

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARUŠA TAMŠE

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



MARUŠA TAMŠE

**RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE ZA SOČASNO
KVANTIFIKACIJO PROPRANOLOLA, BISOPROLOLA,
MIDAZOLAMA IN RAMIPRILATA V KRVNEM MADEŽU**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL
METHOD FOR SIMULTANEAUS QUANTIFICATION OF
PROPRANOLOL, BISOPROLOL, MIDAZOLAM AND
RAMIPRILAT IN DRIED BLOOD SPOT**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja.

ZAHVALA

- *Mentorici doc. dr. Mojci Kerec Kos, somentorju asist. dr. Juriju Trontlju, Katji*
- *Staršem*

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos in somentorstvom asist. dr. Jurija Trontlja.

Maruša Tamše

Ljubljana, oktober 2013

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh

Članica diplomske komisije: doc. dr. Alenka Zvonar

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	<i>BISOPROLOL</i>	1
1.1.1	FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI.....	1
1.1.2	FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI	2
1.1.3	FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI.....	3
1.2	<i>PROPRANOLOL</i>	3
1.2.1	FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI.....	3
1.2.2	FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI	4
1.2.3	FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI.....	5
1.3	<i>RAMIPRIL/RAMIPRILAT</i>	5
1.3.1	FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI.....	5
1.3.2	FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI	6
1.3.3	FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI.....	6
1.4	<i>MIDAZOLAM</i>	7
1.4.1	FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI.....	7
1.4.2	FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI	8
1.4.3	FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI.....	8
1.5	<i>METODA POSUŠENEGA MADEŽA KRVI</i>	9
1.5.1	PRINCIP METODE.....	9
1.5.2	MASNA SPEKTROMETRIJA (MS).....	12
1.5.3	PREDNOSTI IN SLABOSTI METODE DBS.....	13
2	NAMEN DELA	16
3	EKSPERIMENTALNI DEL	17
3.1	<i>MATERIALI</i>	17
3.1.1	BIOLOŠKI MATERIAL.....	17
3.1.2	STANDARDI IN INTERNI STANDARDI.....	17
3.1.3	REAGENTI IN TOPILA.....	18
3.1.4	NAPRAVE IN PRIBOR.....	18
3.2	<i>PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN</i>	19

3.2.1	PRIPRAVA RAZTOPIN INTERNIH STANDARDOV	20
3.3	PRIPRAVA KALIBRACIJSKIH STANDAROV IN KONTROLNIH VZORCEV	20
3.4	EKSTRAKCIJA DBS VZORCEV.....	20
3.5	POGOJI ANALIZE S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO, SKLOPLJENO S TANDEMskim MASNIM SPEKTROMETROM (LC-MS/MS).....	22
3.6	VALIDACIJA.....	24
3.6.1	LINEARNOST, OBMOČJE, SPODNJA MEJA KVANTIFIKACIJE.....	24
3.6.2	SPECIFIČNOST/SELEKTIVNOST	25
3.6.3	TOČNOST, PONOVLJIVOST	25
3.6.4	STABILNOST.....	26
3.6.5	UČINEK MATRICE, IZKORISTEK EKSTRAKCIJE.....	27
3.7	UPORABA ANALIZNE METODE NA REALNIH VZORCIH.....	28
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1	IZBIRA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA.....	31
4.2	POGOJI ANALIZE S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO, SKLOPLJENO S TANDEMskim MASNIM SPEKTROMETROM (LC-MS/MS).....	31
4.3	VALIDACIJA.....	37
4.3.1	LINEARNOST, TOČNOST, SPODNJA MEJA KVANTIFIKACIJE.....	37
4.3.2	ZNOTRAJDNEVNA TOČNOST IN PONOVLJIVOST	40
4.3.3	MEDDNEVNA TOČNOST IN PONOVLJIVOST	41
4.3.4	ABSOLUTNI UČINEK MATRICE	42
4.3.5	IZKORISTEK EKSTRAKCIJE (RECOVERY)	44
4.3.6	DOLGOROČNA STABILNOST.....	44
4.3.7	SELEKTIVNOST	46
4.4	UPORABA ANALIZNE METODE NA REALNIH VZORCIH.....	47
5	SKLEPI.....	52
6	VIRI.....	53

POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo razvili in validirali metodo za sočasno kvantifikacijo bisoprolola, propranolola, midazolama in ramiprilata v posušenem madežu podganje krvi. Metoda se bo uporabila za analizo DBS vzorcev *in vivo* študije na podganah, kjer bomo preučevali vpliv razvoja raka na farmakokinetiko navedenih učinkovin. Prednost razvite metode so majhni volumni odvzetega biološkega vzorca (20 μL), kar je ugodno za farmakokinetične študije na podganah ali manjših živalih. V analizo smo vključili bisoprolol in ramiprilat kot učinkovini za zdravljenje srčno-žilnih bolezni. Midazolam je označevalec intrinzičnega metabolizma, saj se presnavlja v jetrih s CYP3A, propranolol pa je označevalec pretoka krvi skozi jetra. Najprej smo na DBS kartice nanegli kapljice krvi z raztopino analitov koncentracij 5–250 $\mu\text{g/L}$ in po sušenju izvedli ekstrakcijo s topilom metanol/voda 90:10 (v/v) z 0,1 % mravljične kisline. Po intenzivnem mešanju, inkubaciji v ultrazvočni kadički in centrifugiranju smo dodali raztopino internih standardov in supernatant prenesli na Ostro™ ploščico. Z vakuumom smo vzorce prefiltrirali v zbiralno ploščico in analizirali z LC-MS/MS. Separacijo smo izvedli na reverzno-fazni koloni Kinetex C18 (50 \times 2,1 mm) pri temperaturi 50 °C. Mobilna faza je bila sestavljena iz topila A (0,1 % mravljična kislina v vodi) in topila B (98 % acetonitril). Uporabili smo gradientno elucijo, kjer smo spreminjali delež topila B in s tem dosegli čas analize 1,75 minute. Za detekcijo in kvantifikacijo smo uporabili masni spektrometer s tremi kvadrupoli in multirezidualnim načinom meritve. Vzorce smo ionizirali z elektrorazprševanjem v pozitivnem načinu. V okviru validacije smo določevali naslednje parametre: linearnost, specifičnost, točnost, ponovljivost, območje in limita kvantifikacije, stabilnost, učinek matrice in izkoristek ekstrakcije. Pri tem smo se ravnali po smernicah FDA in načelih Matuszewskega. Ugotovili smo, da je metoda linearna v območju od 5 do 250 $\mu\text{g/L}$, ima ustrezno točnost, ponovljivost znotraj enega dneva in med tremi dnevi validacije ter specifičnost. Z metodo smo dosegli spodnjo mejo kvantifikacije 5 $\mu\text{g/L}$. Absolutni učinek matrice je bil za vse analite ponovljiv z RSD < 15 %. Z metodo smo dosegli povprečen izkoristek ekstrakcije bisoprolola 88,5 %, midazolama 92,5 %, propranolola 108,6 % in ramiprilata 72,6 %. Vzorci DBS so bili stabilni po dveh tednih izpostavljenosti trem različnim temperaturam (-20 °C, 25 °C in 37 °C).

Ključne besede: posušen madež krvi, masna spektrometrija, propranolol, bisoprolol, midazolam, ramiprilat, validacija

ABSTRACT

We have developed and validated an analytical method for the simultaneous quantification of bisoprolol, propranolol, midazolam and ramiprilat in a rat dried blood spot. A method will be applied for the analysis of DBS samples from *in vivo* study in rats, where we will study the impact of cancer development on drugs pharmacokinetics. Advantages of developed method are small volumes of collected biological samples (20 μ l), which is favourable for pharmacokinetic studies in rats or small animals. The analysis included bisoprolol and ramiprilat as substances for the treatment of cardiovascular diseases. Midazolam is a marker of intrinsic metabolism, as it is metabolized in the liver by CYP3A, propranolol is a marker of liver blood flow. Firstly, we have applied drops of blood on DBS card with solution of the analyte concentration from 5 to 250 μ g/L and after drying we did extraction with a solvent of methanol/water 90:10 (v/v) with 0.1 % formic acid. After intensive mixing, incubation in the ultrasonic bath and centrifugation was added a solution of internal standards and the supernatant was transferred to OstroTM plate. Samples were vacuum filtered in the collection plate and analyzed by LC-MS/MS. Separation was performed on a reversed-phase column Kinetex C18 (50 x 2.1 mm) at 50 °C. The mobile phase was composed of solvent A (0.1 % formic acid in water) and solvent B (98 % acetonitrile). We used a gradient elution, where we varied proportion of solvent B, and thereby achieving the analysis time 1.75 minutes. For detection and quantification we used triple quadrupole mass spectrometer operating in multiple reaction monitoring mode. Samples were ionized with electrospray in a positive ion mode. During validation we determined the following parameters: linearity, specificity, accuracy, repeatability, range and limit of quantification, stability, matrix effect and extraction recovery. We act in accordance with FDA guidelines and principles of Matuszewski. We have found that the method is linear in the range of 5 to 250 μ g/L, has the appropriate accuracy, repeatability within one day and three days of validation and specificity. With this method we have reached the lower limit of quantification of 5 μ g/L. Absolute matrix effect was reproducible for all analytes with RSD < 15 %. Achieved extraction recoveries were 88.5 % for bisoprolol, 92.5 % for midazolam, 108.6 % for propranolol and 72.6 % for ramiprilat. DBS samples were stable after two weeks of exposure to three different temperatures (-20 °C, 25 °C and 37 °C).

Key words: dried blood spot, mass spectrometry, propranolol, bisoprolol, midazolam, ramiprilat, validation

OKRAJŠAVE

ACE	encim angiotenzinska konvertaza
c_{\max}	maksimalna koncentracija v plazmi
CŽS	centralni živčni sistem
DBS	posušen madež krvi (<i>dried blood spot</i>)
ESI	elektrozprševalna ionizacija (<i>electrospray ionization</i>)
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (<i>Food and Drug Administration</i>)
GABA	gama-aminomaslena kislina
GC	plinska kromatografija
Hct	hematokrit
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IS	interni standard
LC	tekočinska kromatografija
LC-MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
LLOQ	spodnja limita kvantifikacije
v/v	volumski odstotek
m/z	razmerje med maso in nabojem
ME	učinek matrice
MF	mobilna faza
MRM	multirezidualna analiza (<i>multiple reaction monitoring</i>)
MS	masna spektrometrija
PS	primarni standard
Q	kvadrupol ali masni filter
QC	kontrolni vzorec

- QC_h kontrolni vzorec visoke koncentracije
- QC_l kontrolni vzorec nizke koncentracije
- QC_m kontrolni vzorec srednje koncentracije
- r^2 determinacijski koeficient
- Re izkoristek ekstrakcije (*recovery*)
- RSD relativna standardna deviacija
- T temperatura
- t_{max} čas, pri katerem je dosežena maksimalna koncentracija v plazmi
- w_i regresijska utež
- WS delovna raztopina

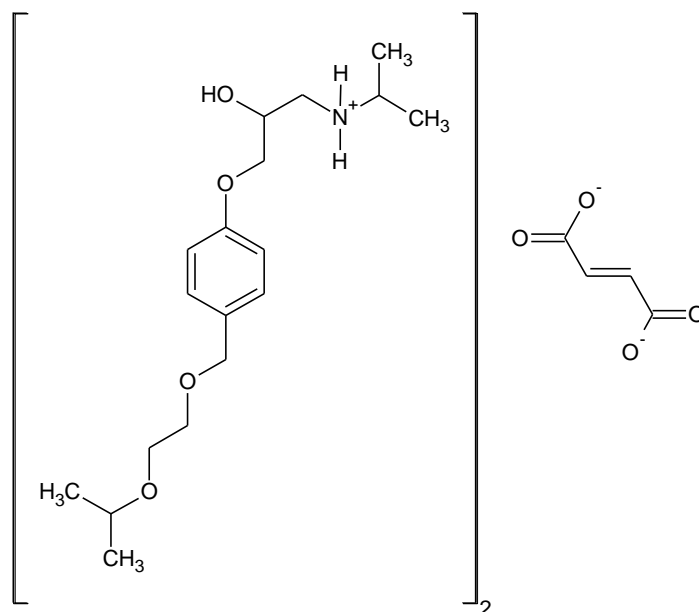
1 UVOD

Pogostost pojavljanja srčno-žilnih bolezni v razvitem svetu narašča in posledično uporaba učinkovin za zdravljenje le-teh. Mednje spadata tudi bisoprolol in ramiprilat, ki smo ju vključili v analizo. Poleg teh dveh učinkovin smo zajeli še midazolam in propranolol. Midazolam se skoraj popolnoma presnovi v jetrih s citokromalnimi encimi CYP3A in zato nam pri preiskovancih služi kot marker intrinzičnega metabolizma, propranolol pa kot marker pretoka krvi skozi jetra. V nadaljevanju bomo predstavili glavne značilnosti izbranih analitov in uporabljene analizne metode. Metoda posušenega madeža krvi (DBS) je sicer že starejša tehnika vzorčenja, vendar v zadnjih letih postaja vse bolj uporabna za študije farmakokinetike učinkovin. Prednosti metode v kombinaciji z LC-MS/MS detekcijo so hitrost, enostavnost in visoka zmogljivost.

1.1 BISOPROLOL

1.1.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI

Bisoprolol je (\pm)-1-{4-[(2-izopropoksietoksi)metil]fenoksi}-3-(izoproilamino)propan-2-ol, torej gre za derivat oksipropanolamina. Kot tak spada v skupino učinkovin, ki delujejo zaviralno na β_1 receptorje v adrenergičnem sistemu. V zdravilih se nahaja v obliki soli s fumarano kislino, kar prikazuje slika 1. Bisoprolol ima tako hidrofilne kot lipofilne lastnosti, kar ga uvršča med pomembne učinkovine v skupini β zaviralcev, saj zaradi vodotopnosti ne prehaja v centralni živčni sistem (CŽS) in tako se, v primerjavi s popolnoma lipofilnimi učinkovinami, zmanjša pojavnost neželenih učinkov. Spojina ima en stereogeni center, za delovanje je odgovoren predvsem *S*(-)-enantiomer. Najpomembnejše fizikalno-kemijske lastnosti bisoprololijevega fumarata so podane v preglednici I (1, 2).



Slika 1: Struktura bisoprololijevega fumarata

Preglednica I: Fizikalno-kemijske lastnosti bisoprololijevega fumarata (3)

Kemijska formula	$C_{18}H_{31}NO_4 \cdot \frac{1}{2}(C_4H_4O_4)$
Molekulska masa	383,48 g/mol
pKa (bisoprolol)	9,5
logP (bisoprolol)	1,87
Temperatura tališča	100 °C
Topnost	Dobro topen v vodi, metanolu, etanolu in kloroformu
Izgled	Bela kristalinična snov

1.1.2 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Bisoprolol je tako hidrofilen kot lipofilen in zato se po peroralni aplikaciji skoraj popolnoma absorbira, le majhen delež (10 %) je podvržen metabolizmu prvega prehoda. Hrana na absorpcijo ne vpliva. Približno 30 % se ga veže na plazemske proteine. Najvišje koncentracije v plazmi so dosežene 2–4 ure po zaužitju. Plazemski razpolovni čas je 9–12 ur, kar omogoča jemanje tablet enkrat na dan. Bisoprolol izkazuje linearno farmakokinetiko. Stacionarno stanje se vzpostavi po 5 dneh jemanja učinkovine enkrat dnevno. 50 % bisoprolola se presnovi v jetrih v neaktivne metabolite, 50 % pa se izloči

nespremenjenega večinoma z urinom preko ledvic, le 2 % se ga izloči z blatom. Pri starejših se zaradi oslabiljene jetrne funkcije razpolovni čas podaljša (1).

1.1.3 FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI

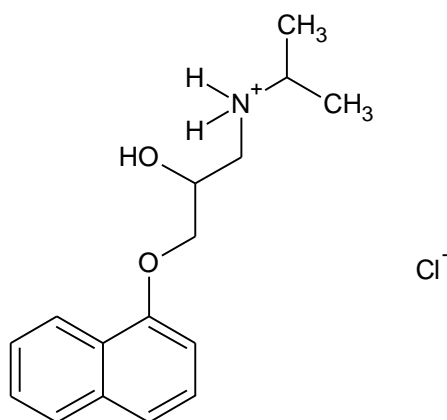
Bisoprolol je β_1 antagonist adrenergičnih receptorjev v srcu in ledvicah, vendar lahko pri višjih odmerkih deluje antagonistično tudi na β_2 receptorje v gladkih mišicah bronhijev in žil. Zato je za želeno blokado β_1 receptorjev treba uporabiti najnižji učinkoviti odmerek. Z blokado β_1 receptorjev se srčni utrip upočasni in zmanjša se utripni volumen, posledično je poraba kisika v srčni mišici zmanjšana. Takšen učinek na srce je zaželen pri zdravljenju angine pectoris. Prav tako je to eden izmed mehanizmov antihipertenzivnega delovanja. Na znižanje povišanega krvnega tlaka lahko vpliva tudi zmanjšanje plazemske aktivnosti renina zaradi blokade β_1 receptorjev v ledvicah (4, 2). Bisoprolol je registriran tudi za zdravljenje stabilnega kroničnega srčnega popuščanja. Vezava kateholaminov na adrenergične receptorje povzroči hitrejše bitje srca in poveča moč krčenja srčne mišice. Za kronično srčno popuščanje je značilno trajno in čezmerno delovanje teh kateholaminov, kar pa oslabele srce še dodatno poškoduje. Z antagonisti β_1 adrenergičnih receptorjev učinek kateholaminov nevtraliziramo. Zdravljenje je potrebno začeti z nizkimi odmerki, da ne pride do prevelikega zmanjšanja krčenja srčne mišice (5). Dnevni odmerki za zdravljenje stabilnega kroničnega srčnega popuščanja se gibljejo od začetnega 1,25 mg/dan (pričakovana plazemska koncentracija 6 ng/mL) do maksimalnega 10 mg/dan (pričakovana plazemska koncentracija 50 ng/mL) (6). Pri maksimalnem odmerku znašajo najvišje plazemske koncentracije bisoprolola v stacionarnem stanju 64 ± 21 ng/mL (7). V zdravilih se bisoprolol nahaja sam in v kombinacijah z diuretiki ali acetilsalicilno kislino (4).

1.2 PROPRANOLOL

1.2.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI

Propranolol je spojina z IUPAC imenom (2RS)-1-[(1-metiletil)amino]-3-(naftalen-1-iloksi)propan-2-ol in je predstavljena na sliki 2. Kot učinkovina se uporablja v obliki soli s klorovodikom. Je prvi sintetično pridobljeni β antagonist. Spada v skupino neselektivnih antagonistov β adrenergičnih receptorjev, kar pomeni, da deluje tako na β_1 receptorje v srcu kot β_2 receptorje v gladkih mišicah bronhijev in žil. Spojina je lipofilna, zato lahko prehaja krvno-možgansko bariero, kar pa poveča pojavnost neželenih učinkov. Ima en

stereogeni center, za blokado β receptorjev je večinoma odgovoren *S*(-)-enantiomer, vendar se v zdravilih uporablja racemat (8). Pomembne fizikalno-kemijske lastnosti propranolola so v preglednici II.



Slika 2: Struktura propranololijevega klorida

Preglednica II: Fizikalno-kemijske lastnosti propranolola (9, 10)

Kemijska formula	$C_{16}H_{21}NO_2$
Molekulska masa	259,34 g/mol
pKa	9,42
logP	3,48
Temperatura tališča	163–165 °C
Topnost	Dobro topen v vodi in etanolu
Izgled	Bel kristaliničen prašek

1.2.2 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Po peroralni aplikaciji se propranolol hitro in popolnoma absorbira, vendar pa je močno podvržen metabolizmu prvega prehoda skozi jetra. Njegova biološka uporabnost je namreč med 25 % in 30 %. Najvišje plazemske koncentracije doseže 60–90 minut po zaužitju. 93 % učinkovine se veže na plazemske beljakovine. Enantiomera se vežeta na različne proteine, *S*(-)-enantiomer večinoma na α -1-glikoproteine, *R*(+) pa na albumine. Presnova poteka v jetrih, pri čemer je glavni metabolit, 4-hidroksipropranolol, tudi farmakološko aktiven. Propranolol oziroma njegovi metaboliti se izločajo z urinom. Razpolovni čas učinkovine je od 3 do 6 ur (4).

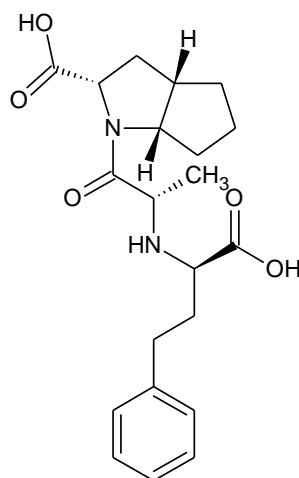
1.2.3 FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI

Ko se propranolol veže na β receptorje, se kronotropni in inotropni odziv na stimulacijo teh receptorjev zmanjša. Zaradi zmanjšane frekvence bitja srca je propranolol primeren za zdravljenje srčnih aritmij, zmanjšana krčljivost srca pa je odgovorna za antihipertenzivni učinek. Potreba srčne mišice po kisiku je zato zmanjšana, kar je ugodno za zdravljenje angine pectoris. Pri bolnikih, ki so doživeli srčni infarkt, propranolol zmanjša tveganje za smrt zaradi srčno-žilnih dogodkov. Poleg tega se uporablja za preprečevanje napadov migrenskih glavobolov. Zaradi neselektivne vezave na β receptorje je učinkovina kontraindicirana pri astmatičnih bolnikih in bolnikih s kronično obstruktivno pljučno boleznijo, saj lahko vezava na β_2 receptorje povzroči bronhokonstrikcijo. Dnevni odmerki pri zdravljenju hipertenzije so od 80–640 mg, terapevtske plazemske koncentracije pa med 50 in 100 ng/mL (4, 11, 12, 13).

1.3 RAMIPRIL/RAMIPRILAT

1.3.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI

Ramipril je predzdravilo, ki se z jetrnimi esterazami pretvori v aktivno obliko ramiprilat. Pri tem se odcepi etilna skupina in nastane spojina na sliki 3 z IUPAC imenom (2*S*,3*aS*,6*aS*)-1-[(*S*)-2-[[(*S*)-1-karboksi-3-fenilpropil]amino]propanoil]-oktahidrociklopenta[*b*]pirol-2-karboksilna kislina. Ramiprilat spada v skupino zaviralcev encima angiotenzinska konvertaza oz. je ACE inhibitor (14, 4). V preglednici III so podane najpomembnejše fizikalno-kemijske lastnosti ramiprilata.



Slika 3: Struktura ramiprilata

Preglednica III: Fizikalno-kemijske lastnosti ramiprilata (15)

Kemijska formula	$C_{21}H_{28}N_2O_5$
Molekulska masa	388,46 g/mol
pKa	pKa ₁ = 2,2 pKa ₂ = 3,4 pKa ₃ = 8,0
logP	3,32
Temperatura tališča	139–141 °C
Topnost*	Polarna organska topila, puferske vodne raztopine
Izgled	Bel kristaliničen prašek

*velja za ramipril

1.3.2 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Po peroralni aplikaciji se ramipril hitro absorbira iz prebavil, najvišje plazemske koncentracije so dosežene že po 1 uri. Delež absorpcije je 56 %. Hrana na absorpcijo ne vpliva. Ramiprilat, aktivni presnovek ramiprila, doseže najvišje koncentracije v plazmi 2–4 ure po zaužitju. Biološka uporabnost ramiprilata je 45 %. Ramipril se veže na plazemske beljakovine v 73 %, ramiprilat pa v 56 %. V nizkih odmerkih (< 5 mg) izkazuje nelinearno farmakokinetiko, kar je povezano z nasitljivo vezavo ramiprilata na ACE. Pri odmerkih 5 ali 10 mg ramiprila je razpolovni čas ramiprilata od 13 do 17 ur, pri 2,5 mg pa 27 do 36 ur. Izloča se skozi ledvica, ker pa je vezava na ACE močna in disociacija z encima počasna, je terminalna faza izločanja dolga. Pri bolnikih z okvarjenim delovanjem jeter so koncentracije ramiprila v plazmi višje, saj je presnova v ramiprilat, zaradi zmanjšanega delovanje jetrnih esteraz, upočasnjena (16).

1.3.3 FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI

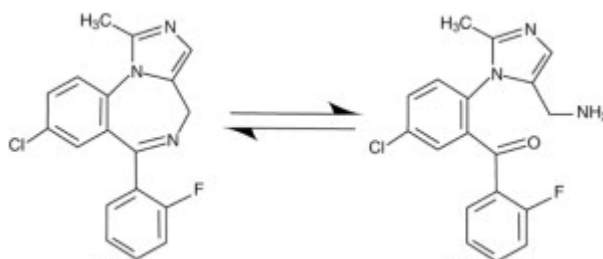
ACE katalizira pretvorbo angiotenzina I v angiotenzin II, ki je odgovoren za vazokonstrikcijo, prav tako pa encim povzroči razgradnjo vazodilatatorne snovi bradikininina. Z inhibicijo tega encima se tako zmanjša nastajanje angiotenzina II in razgradnja bradikininina, kar povzroči vazodilatacijo. Angiotenzin II stimulira tudi sproščanje hormona aldosterona, ki je odgovoren za reabsorpcijo natrija iz ledvic in s tem za zadrževanje vode v telesu. Zaradi zmanjšanega nastajanja angiotenzina II, ki je posledica inhibicije encima ACE, ramiprilat vpliva tudi na ta proces. Za zniževanje

povišanega krvnega tlaka se uporablja sam ali v kombinaciji z diuretiki. Antihipertenzivni učinek je posledica razširitve žil in zmanjšanja skupnega perifernega žilnega upora, kar ugodno vpliva tudi na srčno hemodinamiko. Poleg tega zmanjšuje pojavnost srčnih napadov pri bolnikih z višjim tveganjem za takšne dogodke. Pri bolnikih s srčnim popuščanjem po doživetem srčnem napadu, ramiprilat upočasni napredovanje bolezni in zmanjša umrljivost. Začetni terapevtski odmerek ramiprila pri zdravljenju srčnega popuščanja je 1,25 mg na dan, nato pa se povečuje do maksimalno 10 mg na dan. Terapevtske koncentracije ramiprilata v stacionarnem stanju so med 26 in 36 ng/mL in so dosežene po štirih odmerkih (4, 17).

1.4 MIDAZOLAM

1.4.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI

Midazolam je kratkodelujoči benzodiazepin z IUPAC imenom 8-kloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepin. Je lipofilen in slabo topen v vodi. Parenteralna raztopina za intravensko ali intramuskularno injiciranje vsebuje učinkovino v obliki soli s klorovodikom, kar izboljša topnost v vodi. V tej raztopini se midazolam nahaja v dveh oblikah, odvisno od pH raztopine, in sicer je diazepinski obroč lahko zaprt ali se odpre na mestu dvojne vezi 4,5. To prikazuje slika 4. Pri fizioloških pogojih absorpcije v sistemski krvni obtok (pH od 5 do 8) je vsa učinkovina v obliki lipofilnega zaprtega obroča. V zdravilih za peroralno aplikacijo se midazolam nahaja v obliki maleata (4). Fizikalno-kemijske lastnosti učinkovine so predstavljene v preglednici IV.



Slika 4: Zaprt in odprt diazepinski obroč midazolama (18)

Preglednica IV: Fizikalno-kemijske lastnosti midazolama (19)

Kemijska formula	$C_{18}H_{13}ClFN_3$
Molekulska masa	325,78 g/mol
pKa	6,57
logP	3,59
Temperatura tališča	159 °C
Topnost	Topen v vodi pri pH < 4, topen v maščobah pri fiziološkem pH, topen v organskih topilih
Izgled	Bel do rahlo rumen kristaliničen prašek

1.4.2 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Midazolam se po peroralni aplikaciji hitro in popolnoma absorbira. Zaradi metabolizma prvega prehoda skozi jetra je njegova biološka uporabnost med 30 in 70 %. Hrana zmanjša hitrost absorpcije midazolama. Učinkovina se hitro porazdeli po telesu, 96–98 % se je veže na plazemske proteine, večinoma na albumine. Počasi in v zelo majhnih količinah prehaja v cerebrospinalno tekočino. Midazolam se skoraj v celoti presnovi s citokromalnimi izoencimi P450 3A, pri čemer sta v jetrno oksidativno presnovo vključena oba izoencima, CYP3A4 in CYP3A5. Modulatorji CYP3A lahko spremenijo plazemske koncentracije midazolama in s tem njegov klinični učinek. Glavna presnovka sta 1'-hidroksimidazolam (tudi alfa-hidroksimidazolam) in 4'-hidroksimidazolam. Glavni aktivni presnovek je 1'-hidroksimidazolam in pomembno prispeva k učinku midazolama. Učinkovina se v 60–80 % izloči s sečem v obliki 1'-hidroksimidazolam glukuronida in le 1 % se izloči nespremenjene. Razpolovna doba midazolama je 1,5–2,5 ure (4).

1.4.3 FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI

Midazolam je kratko delujoči benzodiazepin, ki deluje zaviralno na CŽS. Je najpogosteje uporabljen benzodiazepin za doseg sedacije pred kirurškimi ali diagnostičnimi posegi. Uporablja se tudi za kratkotrajno zdravljenje nespečnosti, ima anksiolitične, antikonvulzivne in miorelaksantne učinke. Benzodiazepini se vežejo na benzodiazepinsko regulatorno vezavno mesto na α podenoti GABA_A receptorjev. Midazolam se kot agonist veže na to mesto in s tem poveča afiniteto ter učinek GABA, ki je najpomembnejši zaviralni živčni prenašalec v CŽS (5). Pri dolgotrajni uporabi benzodiazepinov se lahko

razvije fizična odvisnost, zato se pri hitri prekinitvi zdravljenja pojavijo odtegnitveni simptomi, kot so glavobol, bolečine v mišicah, anksioznost, vznemirjenost, zmedenost, nespečnost, spremembe razpoloženja, halucinacije in konvulzije. Odmerke zdravila je zato priporočljivo zmanjševati postopoma. Zdravljenje začnemo z najmanjšim odmerkom (7,5 mg na dan) in ga nato povečujemo do največ 15 mg na dan. V tem območju izkazuje midazolam linearno farmakokinetiko. Minimalne učinkovite plazemske koncentracije se gibljejo od 30 do 100 ng/mL (20). Po peroralni aplikaciji 15 mg midazolama je po 1 uri dosežena maksimalna plazemska koncentracija 70–120 ng/mL (21).

1.5 METODA POSUŠENEGA MADEŽA KRVI

1.5.1 PRINCIP METODE

Metoda posušenega madeža krvi (dried blood spot-DBS) je tehnika vzorčenja pri kateri majhen volumen krvi ($\leq 100 \mu\text{L}$) naneseemo na ustrezno DBS kartico, posušimo in analiziramo v laboratoriju. Začetki metode segajo v 60. leta prejšnjega stoletja, ko je Dr. Robert Guthrie ta analizni pristop uporabil za merjenje L-fenilalanina pri novorojenčkih za ugotavljanje metabolične motnje fenilketonurije. Kri so novorojenčkom odvzeli iz pete ali prsta. Zaradi enostavnega in neinvazivnega postopka odvzema biološkega vzorca, se je metoda razširila tudi na druga klinična testiranja novorojenčkov, dojenčkov, drugih posebnih skupin bolnikov in manjših živali. Z razvojem kromatografskih metod z visoko občutljivostjo in specifičnostjo se je uporaba DBS metode razširila tudi na področja predkliničnih in kliničnih študij farmakokinetike in toksikologije učinkovin ter terapijskega spremljanja koncentracij (22, 23).

Vsak madež krvi bi teoretično moral predstavljati homogen volumen krvi, vendar pa se kakovost le-teh lahko razlikuje. Zato je potrebno analizno metodo previdno načrtovati, tako da upoštevamo vpliv raznolikosti vzorcev na točnost in natančnost kvantifikacije analitov (24). Osnovni princip metode DBS je sestavljen iz treh korakov:

- I. odvzem vzorca krvi
- II. ekstrakcija analitov iz posušenega krvnega madeža
- III. analiza ekstrahiranega vzorca s kromatografskimi tehnikami

I. ODVZEM VZORCA KRVI

Pred izvedbo postopka je potrebno preveriti, če ima analit primerne fizikalno-kemijske lastnosti za DBS metodo. Hlapne in na zrak občutljive spojine namreč niso primerne za nanos na DBS kartico. Kapilarna kri se odvzame s pikom v prst ali peto. Poznamo dva načina vzorčenja: kapljo krvi lahko s pomočjo lancete nanese direktno na DBS kartico ali pa si pri vzorčenju pomagamo s kalibrirano pipeto in tako na kartico nanese točno določen volumen krvi. Prednost drugega načina je, da se s tem izognemo vplivu hematokrita na velikost madežev krvi, kar lahko povzroči netočne rezultate analize. Kri nanese na s krogom označena mesta na kartici, pri tem pa moramo paziti, da se z lanceto ali pipeto ne dotaknemo kartice. Nanose vizualno pregledamo, saj morajo biti simetrični in rdeča barva madežev mora biti na zgornji in spodnji strani kartice enaka. Po nanosu je potrebno kartice sušiti vsaj 2 uri na sobni temperaturi, odvisno od vrste kartice in volumna nanosa. Potrebno jih je tudi zaščititi pred direktnim soncem. Na sliki 5 vidimo DBS kartico z nanesenimi madeži krvi. Kartice shranjujemo v vrečkah, ki ne prepuščajo vlage in plinov, saj lahko vlaga inducira rast bakterij in s tem vpliva na kvaliteto vzorcev ali pa povzroči razpad nestabilnih analitov. V vrečko lahko dodamo tudi sušilno sredstvo in indikatorje vlažnosti. Tako zaščitene vzorce lahko shranjujemo več mesecev na sobni temperaturi, medtem ko vzorce z manj stabilnimi analiti shranjujemo pri nižjih temperaturah ($2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\leq -15\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\leq -60\text{ }^{\circ}\text{C}$). Kartice z DBS so primerne tudi za pošiljanje po pošti v laboratorije. Vzorčenje z DBS je ustrezno tudi za živalske modele, saj so potrebni majhni volumni krvi in lahko celoten toksikološki profil neke spojine preučimo že z enim samim glodavcem (24, 25).



Slika 5: Madeži krvi na DBS kartici; velikost in gostota por filter papirja določata zmogljivost nanašanja in porazdelitev krvnega vzorca na DBS kartici (26)

II. EKSTRAKCIJA ANALITOV IZ KRVNEGA MADEŽA

S postopkom ekstrakcije analit iz DBS kartice prevedemo v raztopino, ki je primerna za injiciranje v kromatografski sistem. Poznamo dve vrsti ekstrakcije: *off-line* in *on-line* ekstrakcijo.

Pri *off-line* ekstrakciji je potrebno najprej iz DBS kartice izrezati madeže krvi in jih prenesti v epice ali v vdolbinice mikrotitrne ploščice. Nato dodamo točno določen volumen ekstrakcijskega topila z internim standardom. Topilo je lahko metanol, acetonitril ali zmes vode in organskega topila, mora pa biti dovolj močno, da prekine vezi med analitom in proteini matrice ali DBS kartice. Vzorce je nato potrebno intenzivno stresati ali mešati, s centrifugiranjem pa odstranimo morebitne ostanke filter papirja. Po centrifugiranju supernatant s pipeto prenesemo v mikrotitrsko ploščico in direktno injiciramo v LC-MS/MS. Včasih pa je potrebno supernatant prej posušiti in nato rekonstituirati s topilom, ki je primerno za meritve z masnim spektrometrom. Na ta način vzorec skoncentriramo (24). Ta način ekstrakcije zahteva veliko ročnega dela, kar poveča možnost napak, je dolgotrajen in zato ni primeren za večje število vzorcev (27).

Ekstrakcija *on-line* je novejši pristop tretiranja DBS vzorcev in je bolj primerna za večje število vzorcev v predkliničnih in kliničnih študijah. Ekstrakcija in analiza DBS vzorcev je avtomatizirana in zato predpriprava vzorcev ni potrebna. V celicah iz nerjavečega jekla pride do desorpcije analitov iz filter papirja, ki je odvisna od vrste ekstrakcijskega topila in njegovega pretoka. Različna topila omogočajo selektivno desorpcijo, najbolj primerno topilo pa je acetonitril. Na sistemu kolon se analiti ločijo in nato sledi detekcija na masnem spektrometru (24, 27).

III. ANALIZA EKSTRAHIRANEGA VZORCA S KROMATOGRAFSKIMI TEHNIKAMI

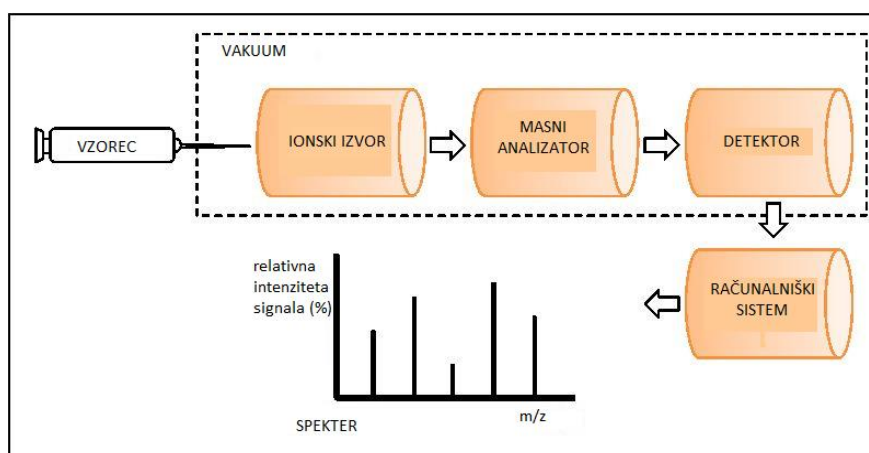
Analiza DBS vzorcev je lahko kvalitativna, semikvantitativna in kvantitativna. Prednost kvalitativne in semikvantitativne analize je, da ni potrebna ekstrakcija analita iz DBS. Možna je analiza direktno iz madeža krvi z masnim spektrometrom (25). Viri navajajo še druge analize pristope, kot so imunološke tehnike, mikrobiološke tehnike, jedrska magnetna spektroskopija (23). Kvantitativna analiza DBS vzorcev se je v začetku 90.-ih let izvajala s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno z ultravijoličnim ali fluorescenčnim

detektorjem. Tehnika je bila uporabna za majhne molekule, vendar pa je bila zaradi nizke občutljivosti metode potrebna visoka koncentracija analita v krvi. Ker je volumen krvnih madežev majhen, je za detekcijo in kvantifikacijo analitov smiselno uporabiti metodo z visoko občutljivostjo, ki z gotovostjo lahko določi analite celo v koncentracijah nižjih od 1 ng/mL. To nam omogoča tehnika ločevanja analitov s tekočinsko kromatografijo in detekcija z masnim spektrometrom (LC-MS), še pogosteje pa se za analizo uporablja tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS) (28).

1.5.2 MASNA SPEKTROMetriJA (MS)

Analizne tehnike, ki temeljijo na MS, so široko uporabne za kvalitativne in kvantitativne analize. Vzorci so večinoma kompleksni, zato je pred analizo z MS potrebno komponente vzorca ločiti s kromatografskimi metodami. Pri kromatografskih metodah je ločevanje posledica razlik v hitrosti potovanja komponent skozi kromatografsko kolono pod vplivom mobilne faze zaradi zadrževanja komponent na stacionarni fazi. Hitrost potovanja komponente je odvisna od eksperimentalnih pogojev (sestava mobilne faze, lastnosti kolone) in polarnosti komponente. Glede na mobilno fazo ločimo *tekočinsko (LC)* in *plinsko (GC)* kromatografijo (29).

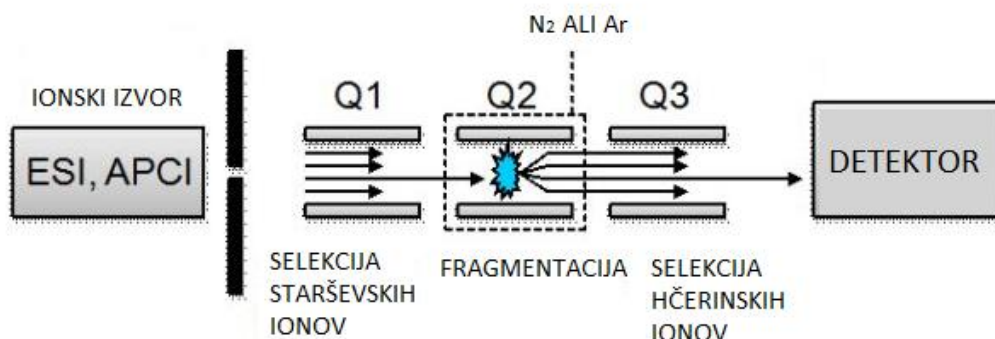
MS je visoko občutljiva in selektivna metoda in omogoča detekcijo analitov že v zelo nizkih koncentracijah. To je pomembno za analizo urinskih in krvnih vzorcev, kjer so lahko koncentracije učinkovin in njihovih metabolitov nizke in je količina vzorca omejena. Analizo omogoča zelo kompleksna in draga naprava, masni spektrometer. Njegova shema je predstavljena na sliki 6 (29).



Slika 6: Masni spektrometer z glavnimi sestavnimi deli (30)

V masnem spektrometru vzorec najprej ioniziramo. *Elektrozprševalna ionizacija (ESI)* in kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku sta tehniki ionizacije, kjer je MS povezan z LC. Pri ESI poteka ionizacija pri atmosferskem tlaku zunaj masnega spektrometra. Primerna je za kisle in bazične analite, ki morajo biti v ionizirani obliki, da je signal na MS višji. To dosežemo z ustreznim pH mobilne faze LC sistema. Poleg tega mora biti mobilna faza lahko hlapna, da jo odstranimo s sušilnim plinom. ESI daje stabilne ione $(M + 1)^+$ ali $(M - 1)^+$, ki ne fragmentirajo. Ioni se nato na masnem analizatorju ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (m/z), detektor pa nam poda masni spekter, ki prikazuje intenziteto ionskega toka v odvisnosti od m/z (29).

Zaradi večje občutljivosti in selektivnosti metode se pogosto uporablja tehnika *tandemske MS* (MS/MS). V tem primeru ima masni analizator tri kvadrupole, pri čemer sta dva masna filtra (Q1 in Q3) ločena s kolizijsko celico (Q2). Prvi filter prehajajo le ioni z določenim razmerjem m/z (prekurzorski ali starševski ioni), ki se v kolizijski celici fragmentirajo na hčerinske ione (produktni ioni). Drugi filter pa nato analizira samo točno določene hčerinske ione. Pari m/z vrednosti starševskih in hčerinskih ionov so masni prehodi (29).



Slika 7: Masni spektrometer s trojnim kvadrupolom (31)

1.5.3 PREDNOSTI IN SLABOSTI METODE DBS

DBS metoda ima številne prednosti pred drugimi tehnikami odvzema biološkega materiala. Za analizo so potrebni majhni volumni krvi (večinoma 15–30 μL), zato je metoda primerna tudi za pediatrično populacijo. Poleg tega je za študije na živalskih modelih potrebno manjše število živali, predvsem glodavcev, kar je etično bolj sprejemljivo. Ugodno je tudi to, da je odvzem vzorca enostaven in nizko invaziven, zato ga lahko preiskovanci opravijo

doma. Za pripravo plazemskih vzorcev je treba polno kri centrifugirati, nato pa je treba vzorce plazme shranjevati v zamrzovalniku. Z uporabo DBS metode zmanjšamo stroške priprave, shranjevanja in transporta DBS vzorcev, saj centrifugiranje ni potrebno, vzorce shranjujemo na sobni temperaturi, zaščitene pred vlago, in jih lahko prenesemo v laboratorij v navadni ovojnici. Vzorci so na sobni temperaturi večinoma stabilni tudi več mesecev (23, 27, 32).

Vendar pa ima metoda tudi nekatere slabosti. Zaradi majhnega volumna vzorca in posledično nizkih koncentracij analitov ima analiza vzorcev slabo občutljivost in nizko limito kvantifikacije. Ta pomanjkljivost se je izboljšala z razvojem kromatografskih tehnik z visoko občutljivostjo (LC-MS/MS), ki omogočajo detekcijo analitov v koncentracijah, nižjih od 1 ng/mL. Postopek ekstrakcije analitov iz madežev krvi je sestavljen iz več korakov, ki se opravijo ročno in zato je možnosti za napako veliko. Na voljo so že avtomatizirani ekstrakcijski sistemi, ki zmanjšajo možnost napak, skrajšajo postopek ekstrakcije in s tem tudi stroške. Primer takšnega sistema je Camag DBS–MS 500 (33). Ena izmed slabosti je tudi ta, da je po nanosu krvi na filter papir madeže potrebno sušiti na sobni temperaturi vsaj 2 uri in to lahko povzroči kontaminacijo vzorca iz zraka ali površin. Največjo težavo pa gotovo predstavlja hematokrit (Hct), saj je biološki vzorec polna kri. Hct je volumski delež rdečih krvnih celic in je merilo za viskoznost krvi. Ta vpliva na porazdelitev krvi po DBS kartici in na velikost madeža krvi. Višji Hct povzroči nastanek manjših in bolj koncentriranih madežev. Poleg tega se lahko pokaže vpliv Hct na točnost kvantifikacije analitov (izkoristek ekstrakcije) in ionizacijo analitov. Vpliv na ionizacijo je večji pri nižjem Hct, saj je v tem primeru delež plazme večji in se poleg analitov ekstrahira tudi več interferenc, ki so v plazmi (34, 35). V primeru, da rezultate analize DBS vzorcev primerjamo z rezultati plazemskih vzorcev, je treba preučiti porazdelitev vsakega analita v rdeče krvne celice in v plazmo (34). Izmeriti je treba Hct, da lahko določimo volumen plazme v madežu krvi in nato primerjamo vrednosti med DBS in plazemskimi vzorci. Ker pa določevanje Hct zahteva velike volumne krvi, za DBS pa potrebujemo majhne volumne, za pretvorbo DBS vrednosti na plazemske po navadi uporabimo teoretični Hct (srednja vrednost Hct pri starosti preiskovanca) (36). Najbolj enostavno zmanjšamo vpliv Hct na različno velikost in obliko madeža krvi tako, da analiziramo celoten madež, ki ga na DBS kartico nanese s kalibrirano pipeto. Pri nevolumetričnem nanosu krvi na DBS kartice pa analiziramo takšen volumen krvnega madeža, ki bo zagotovil ustrezno točnost in

natančnost rezultatov za preiskovan analit (34). Z optimizacijo ekstrakcijskega postopka in kromatografskih metod lahko zmanjšamo vpliv hematokrita na izkoristek ekstrakcije in ionizacijo (22). Čeprav je v okviru validacije metode DBS treba določiti območje Hct, ki daje ustrezno točne in natančne rezultate, pa mi tega nismo določevali. Namreč, potrebni bi bili večji volumni podganje krvi, ki nam niso bili na voljo. Prav tako rezultatov DBS vzorcev ne bomo primerjali s plazemskimi vzorci.

2 NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo razvili analizno metodo za sočasno kvantifikacijo štirih učinkovin po odvzemu podganje krvi z metodo DBS. Te učinkovine so bisoprolol, propranolol, ramiprilat in midazolam. Po nanosu krvi na DBS kartico bomo razvili ekstrakcijski postopek, ki bo omogočil prehod analitov v ekstrakcijsko topilo. Volumen odvzetega vzorca krvi je majhen (20 μ L) in zato so koncentracije analitov v ekstraktih nizke (< 1 ng/mL). Za detekcijo analitov bomo uporabili metodo z visoko občutljivostjo in sicer tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemskim masnim spektrometrom (LC-MS/MS).

Metodo bomo validirali kot zahtevajo smernice Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA). Ugotoviti namreč želimo, če je metoda ustrezna za kvantitativno merjenje analitov v krvnih madežih. Parametri, ki jih bomo določevali, so linearnost, specifičnost, točnost, ponovljivost, območje, limita kvantifikacije, stabilnost, učinek matrice in izkoristek ekstrakcije.

Validirano metodo bomo uporabili za kvantifikacijo analitov v DBS vzorcih *in vivo* študije na podganah. Pri tem bomo preučevali vpliv razvoja raka na farmakokinetiko učinkovin.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

3.1.1 BIOLOŠKI MATERIAL

Za potrebe razvoja in validacije analizne metode smo kri netretiranih podgan Sprague-Dawley, v skladu s predpisi za zaščito živali v Republiki Sloveniji, dobili od odvečnih poskusnih živali s terminalnim odvzemom s srčno punkcijo v anesteziji s CO₂. Kri smo zbirali v epruveti z antikoagulantom K₂ EDTA.

DBS vzorce podgan Wistar Han, na katerih smo uporabili našo metodo, smo pridobili iz *in vivo* študije, ki je bila izvedena na univerzi Charite v Berlinu v skladu s predpisi nacionalne etične komisije za poskuse na živalih. Kri je bila podganam odvzeta pod anestezijo iz vratne vene.

3.1.2 STANDARDI IN INTERNI STANDARDI

STANDARDI:

- **bisoprololijev fumarat:** C₁₈H₃₁NO₄ • ½(C₄H₄O₄), M = 383,48 g/mol, proizvajalec Sequoia Research Products Ltd. (Pangbourne, Velika Britanija)
- **propranololijev hidroklorid:** C₁₆H₂₁NO₂•HCl, M = 295,81 g/mol, proizvajalec Fluka- Sigma Aldrich (Buchs, Švica)
- **ramiprilat:** C₂₁H₂₈N₂O₅, M = 388,46 g/mol, proizvajalec Sequoia Research Products Ltd. (Pangbourne, Velika Britanija)
- **midazolam:** C₁₈H₁₃ClFN₃, M = 325,77 g/mol, proizvajalec Cerilliant (Round Rock, Teksas, ZDA)

INTERNI STANDARDI:

- **bisoprolol-D₅:** C₁₈H₂₆D₅NO₄, M = 330,47 g/mol, proizvajalec Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Kalifornija, ZDA)
- **propranolol-D₇:** C₁₆H₁₄D₇NO₂, M = 266,39 g/mol, proizvajalec Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Kalifornija, ZDA)
- **ramiprilat-D₅:** C₂₁H₂₃D₅N₂O₅, M = 393,49 g/mol, proizvajalec Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Kalifornija, ZDA)

- **midazolam-¹³C₆**: C₁₈H₁₃ClFN, M = 331,72 g/mol, proizvajalec ALSACHIM (Illkirch Graffenstaden, Francija)

3.1.3 REAGENTI IN TOPILA

- ultra čista voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore Corporation, Bedford, MA, ZDA)
- metanol Chromasol V® (CH₃OH); M = 32,04 g/mol (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- mravljična kislina, 98–100 %, Suprapur® (HCOOH); M = 46,03 g/mol (Merck, Darmstadt, Nemčija)

Iz navedenih reagentov in topil smo pripravili naslednje raztopine:

- topilo za ekstrakcijo: Pripravili smo 20 mL topila, tako da smo v čaši zmešali 18 mL metanola in 2 mL ultra čiste vode, v katero smo že pred tem dodali 20 µL 100 % mravljične kisline.
- topilo za pripravo delovne raztopine standardov: Najprej smo pripravili 0,1 % raztopino mravljične kisline, tako da smo v 25 mL bučko odpipetirali 25 µL 100 % mravljične kisline in bučko dopolnili do oznake z ultra čisto vodo. Nato smo 15 mL te raztopine zmešali s 5 mL metanola.

3.1.4 NAPRAVE IN PRIBOR

- analitska tehtnica XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- mešalnik Vortemp 56 EVC (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- mešalnik Vibromix 403 EVT (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- ultrazvočna kadička Bandelin Sonorex digital 10 P (Schalltec, Mörfelden – Waldorf, Nemčija)
- centrifuga Eppendorf 5415 R (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- Ostro™ ploščica s 96 vdolbinami (Waters, Milford, Massachusetts, ZDA)
- zbiralna ploščica za vzorce (Waters, Milford, Massachusetts, ZDA)
- sistem za filtriranje vzorcev z vakuumsko črpalko (Waters, Milford, Massachusetts, ZDA)

- sistem LC-MS/MS: UPLC Agilent Technologies 1290 Infinity, sklopljen z Agilent 6460 Triple Quadrupole Jetstream® (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- kolona LC-MS/MS: Kinetex C18, 50 x 2,10 mm, 2,6 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- polavtomatske pipete 2–20 µL, 20–200 µL, 200–1000 µL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- epice 1,5 mL, 2 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- steklovina: merilne bučke, čaše, tehtiči, merilni valji
- ostali inventar: spatule, nastavki za pipete

3.2 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN

Osnovne raztopine analitov s koncentracijami 1 mg/mL smo pripravili tako, da smo točno zatehtano količino analita raztopili v ustrezni količini metanola, da smo dobili raztopino s koncentracijo 1 mg/mL.

Za pripravo primarne raztopine standardov (PS) s koncentracijo 5000 µg/L je bilo potrebno osnovne raztopine 200-krat redčiti. V 5 mL bučko smo odpipetirali po 25 µL osnovnih raztopin vseh štirih analitov in dopolnili do oznake z metanolom.

Delovne raztopine standardov (WS), ki smo jih nato uporabili za pripravo kalibratorjev in kontrolnih vzorcev (QC), smo pripravili iz PS na način, ki je predstavljen v preglednici V. Uporabili smo topilo za pripravo WS.

Preglednica V: Način priprave delovnih raztopin standardov (WS)

Konc. WS (µg/L)	Volumen PS (µL)	Volumen topila (µL)
0	0	500
100	20	980
200	20	480
500	50	450
1000	100	400
2000	200	300

3500	350	150
5000	500	0
300	30	470
1500	150	350
4000	400	100

3.2.1 PRIPRAVA RAZTOPIN INTERNIH STANDARDOV

Osnovne raztopine internih standardov (IS) s koncentracijami 1 mg/mL smo pripravili tako, da smo v 1,5 mL epico točno zatehtali približno 1 mg IS in ga raztopili v takšni količini metanola, da smo dobili raztopino s koncentracijo 1 mg/mL.

Za pripravo delovne raztopine IS smo odpipetirali 50 μ L osnovne raztopine IS ramiprilata in propranolola, 25 μ L osnovne raztopine bisoprolola in 20 μ L osnovne raztopine midazolama v 5 mL bučko in dopolnili z metanolom do oznake. To raztopino smo nato še 10-krat redčili. Dobili smo končno raztopino IS s koncentracijo IS ramiprilata in propranolola 1000 μ g/L, bisoprolola 500 μ g/L in midazolama 400 μ g/L. Koncentracijo IS bisoprolola in midazolama smo znižali zaradi povišane ionizacije teh IS in s tem smo zmanjšali njun odziv na masnem spektrofotometru.

3.3 PRIPRAVA KALIBRACIJSKIH STANDAROV IN KONTROLNIH VZORCEV

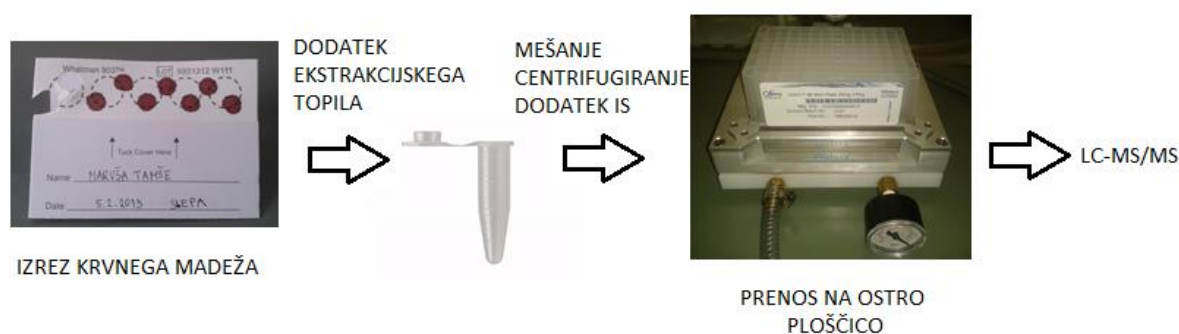
Zmešali smo kri treh netretiranih podgan in jo po 380 μ L odpipetirali v 1,5 mL epice. V posamezno epico smo dodali 20 μ L ustreznih WS, v slepi vzorec pa 20 μ L metanola. Na ta način smo pripravili kalibracijske standarde s koncentracijami 5, 10, 25, 50, 100, 175 in 250 μ g/L in QC vzorce s koncentracijami 15, 75 in 200 μ g/L. Krvne vzorce smo 15 min mešali v mešalniku Vortemp 56 EVC pri temperaturi 37 °C in pri 200 obratih/min. Po mešanju smo za vsak kalibrator in QC vzorec nanesti na DBS kartico po osem krvnih madežev z volumnom 20 μ L in jih sušili na sobni temperaturi približno 16 ur.

3.4 EKSTRAKCIJA DBS VZORCEV

Posušen madež krvi smo v celoti izrezali in ga prenesli v 1,5 mL epico. S pipeto smo dodali 300 μ L ekstrakcijskega topila. Vzorce smo najprej 1 minuto intenzivno mešali na

mešalniku Vibromix 10 in nato za 10 minut postavili v ultrazvočno kadičko. Po tem smo jih 45 minut mešali na stresalniku Vibromix 403 EVT pri sobni temperaturi in pri 100 obratih/min. S tem postopkom smo dosegli ustrezno ekstrakcijo analitov iz krvnih madežev. Sledilo je 10 minutno centrifugiranje pri 5 °C in 15000 vrtljajih/minuto, da smo odstranili morebitne ostanke filter papirja, ki bi motili nadaljnje delo. Nato smo v epico odpipetirali 35 μ L končne raztopine internih standardov. Sledil je prenos vzorca na Ostro™ ploščico s 96 vdolbinami, ki smo jo postavili nad zbiralno ploščico na sistemu z vakuumsko črpalko (prikazano je na sliki 8). V vdolbine smo odpipetirali 280 μ L supernatanta in sistem za 3 minute izpostavili podtlaku 15 mm Hg, da so se vzorci prefiltrirali v zbiralno ploščico. Tako pripravljene vzorce smo analizirali z LC-MS/MS.

Ostro™ ploščico smo uporabili, da smo vzorce očistili fosfolipidov iz krvi. Endogeni fosfolipidi v bioloških vzorcih so glavna komponenta matrice, ki zmanjša ionizacijo vzorca v bioanaliznih metodah. To je lahko vzrok slabše ponovljivosti in občutljivosti metode ter zmanjšane sposobnosti metode za kvantitativno določevanje analitov v vzorcu. Takšen način priprave vzorca je v primerjavi z drugimi (obarjanje proteinov, ekstrakcija tekoče-tekoče, ekstrakcija trdno-tekoče) hiter in enostaven, prav tako vzorca ni treba sušiti in rekonstituirati. Novejši pristop uporabe plošče omogoča ekstrakcijo analitov iz krvnega madeža kar v vdolbini in tako že opisana predpriprava ni potrebna. S tem se skrajša čas analize in zmanjša možnost izgube analitov pri prenašanju ekstraktov (37). Tega načina nismo uporabili, ker je potreben ustrezno majhen posušen krvni madež.



Slika 8: Ekstrakcija DBS vzorcev: krvni madež izrežemo v epico in dodamo ekstrakcijsko topilo, epice intenzivno mešamo in centrifugiramo, nato supernatantu dodamo raztopino IS, vzorce prefiltriramo skozi Ostro™ ploščico in analiziramo z LC-MS/MS

3.5 POGOJI ANALIZE S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO, SKLOPLJENO S TANDEMskim MASNIM SPEKTROMETROM (LC-MS/MS)

Za analizo ekstrahiranih vzorcev smo uporabili sistem LC-MS/MS. Sestavljen je iz masnega analizatorja s tremi kvadrupoli in multirezidualnim (MRM) načinom meritve. Pred tem je bila potrebna ločba analitov s tekočinsko kromatografijo. Ločba je potekala na reverzno-fazni koloni Kinetex C18, $50 \times 2,1$ mm in z $2,6 \mu\text{m}$ delci pri temperaturi 50°C in maksimalnem tlaku 250 barov. Mobilna faza je bila sestavljena iz topila A, ki predstavlja 0,1 % mravljične kisline v vodi in topila B, kar pa je 98 % acetonitril. Pretok mobilne faze je bil 0,5 mL/min. Potekala je gradientna elucija, kjer smo v različnih časovnih točkah spreminjali delež topila B, kot je predstavljeno v preglednici VI. Injicirali smo $1 \mu\text{L}$ vzorca in po 1,4 min je bil tok mobilne faze usmerjen v ionski izvor masnega spektrometra.

Preglednica VI: Gradientna elucija za kromatografsko separacijo

ČAS (min)	PRETOK (mL/min)	DELEŽ TOPILA B (%)
0,25	0,5	3
0,5	0,5	9
1	0,5	30
1,25	0,5	50
1,7	0,5	90
1,75	0,5	3

Z gradientno ločbo smo skrajšali retencijske čase analitov in s tem zmanjšali čas analize. Vzorce smo injicirali po naraščajočih koncentracijah analitov, po vsakem injiciranju pa smo iglo 10 s spirali s topilom. Masni analizator z elektrorazprševalnim ionizatorjem je bil nastavljen na pozitivni način. Najpomembnejši parametri so predstavljeni v preglednici VII.

Preglednica VII: Najpomembnejši parametri masnega analizatorja

PARAMETER	VREDNOST
temperatura sušilnega plina	275 °C
pretok sušilnega plina	5 L/min
tlak razpršilnega plina	45 psi
temperatura plaščnega plina	320 °C
pretok plaščnega plina	11 L/min
napetost na kapilari	4000 V
čas vzorčenja enega m/z	20 ms

MRM prehodi, napetosti fragmentorja ter kolizijske energije analitov in njihovih internih standardov so podane v preglednici VIII.

Preglednica VIII: MRM prehodi in kolizijska energija analitov in internih standardov

ANALIT OZ. IS	m/z PREHOD	NAPETOST FRAGMENTORJA (V)	KOLIZIJSKA ENERGIJA (eV)
ramiprilat	389,2 → 206,1	110	13
ramiprilat-D ₅	394,24 → 211,3	110	13
midazolam	326,09 → 291,1	170	25
midazolam- ¹³ C ₆	332,09 → 297,1	170	25
bisoprolol	326,24 → 116,1	150	13
bisoprolol-D ₅	331,24 → 121,1	150	13
propranolol	260,2 → 116,1	124	13
propranolol-D ₇	267,2 → 123,1	124	13

3.6 VALIDACIJA

Validacija bioanalizne metode potrjuje, da je za kvantitativno merjenje analita v biološkem vzorcu (kri, plazma, serum, urin) metoda zanesljiva in ponovljiva. Parametri, ki smo jih validirali so linearnost, specifičnost, točnost, ponovljivost, območje in limita kvantifikacije, stabilnost, učinek matrice in izkoristek ekstrakcije (*recovery*). Pri tem smo se ravnali po smernicah FDA in načelih Matuszewskega (38, 39).

3.6.1 LINEARNOST, OBMOČJE, SPODNJA MEJA KVANTIFIKACIJE

Za vsak analit potrebujemo kalibracijsko (umeritveno) krivuljo, ki predstavlja razmerje med odzivom instrumenta in znano koncentracijo analita. Uporabimo 6–8 kalibratorjev, njihove koncentracije pa izberemo glede na pričakovano koncentracijsko območje vzorcev, ki jih preučujemo (38). V našem primeru smo v umeritveno krivuljo vključili 7 kalibratorjev s koncentracijami 5, 10, 25, 50, 100, 175 in 250 µg/L. Umeritveno krivuljo smo naredili prvi dan validacije, pri tem smo morali zadostiti pogojem (38):

- odstopanje od nominalne vrednosti pri spodnji meji kvantifikacije (LLOQ) ± 20 %
- odstopanje od nominalne vrednosti pri vsaj štirih od šestih kalibratorjev in najvišjem ± 15 %
- r^2 vsaj 0,990

Za vsak kalibrator smo izvedli po tri meritve in kot odziv upoštevali njihovo povprečno vrednost. Na abscisno os grafa smo nanegli koncentracije kalibratorjev, na ordinato pa odziv analita relativno glede na odziv IS. Enačbo umeritvene krivulje smo določili z linearno regresijo po metodi najmanjših kvadratov. Uporabili smo enačbo 1. Del krivulje, kjer je odziv analit/IS proporcionalen koncentraciji analita, je območje *linearnosti* metode (38).

$$ODZIV \frac{analit}{IS} = k \times konc + n \quad (\text{enačba 1})$$

Območje metode je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita, kjer je dokazana linearnost, natančnost in točnost. Običajno ga določimo iz območja linearnosti (40).

Po FDA smernicah predstavlja kalibrator z najnižjo koncentracijo v umeritveni krivulji *spodnjo mejo kvantifikacije (LLOQ)*. Ta vrednost mora zadostiti naslednjim pogojem (38):

- odziv analita mora biti vsaj 5-krat višji od odziva slepega vzorca
- točnost med 80 in 120 %
- ponovljivost, izražena kot RSD, do 20 %

Pri umeritveni krivulji se pogosto zgodi, da je standardna deviacija odmika od napovedanih vrednosti odvisna od koncentracije analita. Pri višjih koncentracijah je razpršenost rezultatov večja in večji je tudi vpliv na enačbo premice. Zato z uporabo utežene linearne regresije povečamo vpliv nižjih koncentracij in s tem izboljšamo točnost na spodnjem delu umeritvene krivulje (41). Uporabili smo uteži 1 ($1/C$, $C = \text{konc.}$) in 2 ($1/C^2$). Z dodatkom Reševalec v programu Microsoft Excel smo določili parametra k in n uteženi umeritveni krivulji. Po uteževanju Reševalec minimizira vsoto kvadratov razlike med dejansko in izračunano vrednostjo, pomnoženo z utežjo (enačba 2) (42). Parametre končne umeritvene krivulje smo izračunali z utežjo 2, saj je bila tako točnost povratno izračunanih koncentracij najboljša.

$$SS = \sum w_i \times (y_i - y'_i)^2 \quad (\text{enačba 2})$$

SS.....vsota

y_idejanska vrednost odziva

y'_iizračunana vrednost odziva,

w_iutež pri določeni koncentraciji

3.6.2 SPECIFIČNOST/SELEKTIVNOST

Selektivnost metode je njena sposobnost, da kvantificira analit v prisotnosti vseh ostalih komponent, ki so lahko prisotne v biološkem vzorcu. Analiziramo 5 slepih vzorcev biološkega matriksa in nato njihove kromatograme primerjamo s kromatogramom analita pri LLOQ. Pri retencijskem času analita in internega standarda ne smemo opaziti pojave interference. Potencialne interference predstavljalo endogene komponente matriksa, metaboliti, razgradni produkti ali eksogene snovi (38).

3.6.3 TOČNOST, PONOVLJIVOST

Točnost analizne metode predstavlja ujemanje izmerjene vrednosti analita s pravo vrednostjo. Določujemo jo z analizo vzorcev z znano koncentracijo analita. Uporabiti

moramo tri različne koncentracije analita v območju metode, v našem primeru so bile za vse analite koncentracije kontrolnih vzorcev 15 µg/L (QC_l), 75 µg/L (QC_m) in 200 µg/L (QC_h). V treh dneh validacije smo izmerili po minimalno sedem vzorcev vsake koncentracije QC in točnost izračunali po enačbi 3. Povprečje izmerjenih vrednosti analita lahko odstopa od nominalne vrednosti za ± 15 % (38).

$$Točnost (\%) = \frac{\bar{C}_{izmerjena}}{C_{nominalna}} \times 100 \quad (\text{enačba 3})$$

Natančnost metode izraža stopnjo ujemanja rezultatov med serijo analiz istega homogenega vzorca pod predpisanimi pogoji. *Ponovljivost* je eden izmed treh nivojev natančnosti, kjer določujemo stopnjo ujemanja rezultatov pod enakimi delovnimi pogoji v kratkem časovnem obdobju. Izražamo jo z relativno standardno deviacijo (RSD) (38). Ponovljivost smo določili znotraj enega dneva tako, da smo izmerili minimalno po sedem vzorcev vseh treh QC in RSD izračunali po enačbi 4. Meddnevno ponovljivost smo izrazili z RSD QC vseh treh koncentracij v treh zaporednih dneh validacije. RSD v obeh primerih ne sme presegati 15 % (38).

$$RSD = \frac{sd}{\bar{C}} \times 100 \quad (\text{enačba 4})$$

RSD.....relativna standardna deviacija

sd.....standardna deviacija

\bar{C}povprečna koncentracija vzorcev

3.6.4 STABILNOST

Stabilnost analitov v bioloških vzorcih je odvisna od pogojev shranjevanja, kemijskih lastnosti analita, matriksa in vsebnika, kjer je vzorec shranjen (38). Določevali smo stabilnost DBS vzorcev po 21 dneh pri treh različnih temperaturah. Po tri vzorce vseh treh QC smo dali v zamrzovalnik (-20 °C), na sobno temperaturo (25 °C) ali na 37 °C in nato s pomočjo umeritvene krivulje izračunali odstopanje od nominalne vrednosti. Sprejemljiv je odstop manj kot 15 % (38).

3.6.5 UČINEK MATRICE, IZKORISTEK EKSTRAKCIJE

LC-MS/MS je pogosto uporabljena analizna tehnika za kvantitativno določevanje analitov v bioloških vzorcih zaradi visoke občutljivosti in selektivnosti. Vendar pa je ena izmed njenih slabosti vpliv matrice na ionizacijo analita in s tem vpliv na točnost, natančnost in ponovljivost metode. Ocena vpliva matrice je zato pomemben del razvoja in validacije metod, ki vključujejo masno spektroskopijo. Komponente matrice, ki lahko povečajo ali zmanjšajo učinkovitost ionizacije, so tiste, ki se eluirajo skupaj z analitom. To so lahko komponente biološkega materiala ali pa različni metaboliti in razgradni produkti analita ter nečistote. Zato je pomembna ustrezna priprava vzorca, dobra kromatografska ločba in ustrezen tip ionizacije. Obseg vpliva na ionizacijo analita in internega standarda je lahko v enakih bioloških vzorcih, odvzetih pri različnih darovalcih, različen. Prav tako se razlikuje vpliv matrice na različne analite in je težko predvidljiv. Z ustreznimi pristopi lahko ta pojav zmanjšamo (39, 43):

- optimiziramo kromatografske pogoje, tako da ločimo pik analita in matrice, ki povzroči povečanje ali zmanjšanje ionizacije
- če je mogoče, vzorec redčimo
- spremenimo pripravo vzorca, ki naj ne vključuje obarjanje proteinov, manj dovzetna za vpliv matrice je ekstrakcija na trdnem nosilcu
- kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku je manj občutljiva za vpliv matrice kot ESI
- uporaba stabilnega izotopno označenega internega standarda

Smernice FDA sicer predvidevajo določitev vpliva matrice, vendar ne navajajo postopka izvedbe poskusa. Zato smo se v tem primeru ravnali po načelih Matuszewskega (39). V okviru validacije smo določevali *absolutni učinek matrice*. Ekstrahirali smo slepe DBS vzorce petih različnih darovalcev in na koncu dodali raztopino standardov in internih standardov v mobilni fazi (set B). Odziv teh vzorcev smo primerjali z odzivom standardov in internih standardov v mobilni fazi (set A). ME smo izračunali po enačbi 5.

$$ME (\%) = \frac{B}{A} \times 100$$

(enačba 5)

Od vsake izmed petih krvi smo ekstrahirali 6 slepih DBS vzorcev (dva vzorca za vsak QC) in nato dodali takšno koncentracijo raztopine standardov, ki je ustrezala koncentraciji analitov v posameznem QC vzorcu. V primeru, da so vrednosti med 85 in 115 %, lahko izključimo absolutni vpliv matrice. RSD med različnimi darovalci ne sme presegati 15 % (39, 44).

Izkoristek ekstrakcije (Re) je merilo sposobnosti metode, da zazna celotno količino analita, ki je prisotna v vzorcu. Določujemo ga tako, da primerjamo odzive vzorcev, ki smo jim pred ekstrakcijo dodali raztopino analitov in IS (set C) z odzivom slepih vzorcev, ki smo jim po ekstrakciji dodali raztopino analitov in IS ustrezne koncentracije (set B). Lahko bi kot vzorec B izbrali čisto raztopino standardov in IS, vendar na ta način ne upoštevamo učinka matrice na ionizacijo. Izkoristek ekstrakcije (Re) izračunamo po enačbi 6 (38).

$$Re (\%) = \frac{C}{B} \times 100 \quad (\text{enačba 6})$$

Re smo določevali QC vzorcem koncentracij 15, 75 in 200 $\mu\text{g/L}$. Ekstrahirali smo po tri slepe DBS vzorce za vsak QC in po ekstrakciji dodali raztopino analitov in IS ustrezne koncentracije. Odzive teh vzorcev smo primerjali s QC vzorci, ki smo jih ekstrahirali isti dan. Ni potrebno, da dosežemo 100 % Re, bolj pomembno je, da je Re ponovljiv z RSD < 15 % in konstanten skozi celotno območje metode (38).

3.7 UPORABA ANALIZNE METODE NA REALNIH VZORCIH

Razvito in validirano analizno metodo smo uporabili na realnih vzorcih *in vivo* študije na podganah. V študiji, ki se je izvedla v Nemčiji, so ugotavljali vpliv razvoja raka na farmakokinetiko bisoprolola, propranolola, ramiprilata in midazolama. Študija je potekala tako, da je bil prvi odvzem krvi ob dnevu 0 pri zdravi podgani, nato pa so podgani inducirali tumor. Iste meritve so izvedli še peti in deseti dan po tem, ko so jim inducirali tumor. Podganam so na dan raziskave intragastrično aplicirali po dve učinkovini, skupina A je dobila 1 mL vodne raztopine midazolama in propranolola s koncentracijo 1 mg/mL, skupina B pa 0,5 mL vodne raztopine bisoprolola in ramiprilata s koncentracijo 1 mg/mL. Uporabili so enake spojine kot pri razvoju analizne metode, razen v primeru midazolama, kjer pa so uporabili Midazolam Torrex parenteralno raztopino 1 mg/mL (Chiesi Pharmaceuticals GmbH, Austria). 100 μL vzorce krvi so odvzeli v sledečih časovnih

točkah: 10, 20, 30, 60, 90 in 120 min po aplikaciji učinkovin. Kaplje krvi z volumnom 20 μL so takoj po odvzemu nanesli na DBS kartice in jih pustili sušiti vsaj 2 uri na sobni temperaturi. Nato pa smo mi izvedli ekstrakcijo in analizo učinkovin po validiranem postopku.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Želeli smo razviti metodo za sočasno analizo štirih učinkovin, bisoprolola, midazolama, propranolola in ramiprilata po odvzemu biološkega vzorca z metodo posušenega madeža krvi. Učinkovine za zdravljenje srčno-žilnih bolezni so ene najpogosteje predpisanih zdravil, zato smo v analizo vključili bisoprolol in ramiprilat. Za midazolam in propranolol pa smo se odločili, ker se midazolam presnavlja v jetrih s CYP3A in je marker intrinzičnega metabolizma, medtem ko je propranolol marker pretoka krvi skozi jetra. Sprva smo med analite vključili tudi ramipril, saj smo želeli preučiti tudi njegovo farmakokinetiko. Vendar pa smo med razvojem metode ugotovili, da se v podganji krvi leta pretvori v aktivno obliko ramiprilat. Pri človeku pride ramipril po absorpciji v jetra s portalno cirkulacijo in se pretvori v ramiprilat izključno z jetrnimi esterazami, medtem ko se pri podganah v jetrih presnovi le del učinkovine. V plazmo tako pride nepresnovljen ramipril, kjer ga plazemske esteraze hitro pretvorijo v ramiprilat (45). Zato po analizi vzorcev z LC-MS/MS nismo dobili odziva za ramipril, odziv ramiprilata pa je bil povišan. Zaradi neustreznih rezultatov analize smo ramipril izključili iz nadaljnega razvoja metode.

Metoda je temeljila na izboru ustreznega ekstrakcijskega postopka in sistema za detekcijo in kvantifikacijo. Pri tem smo se ravnali po že objavljenih DBS analizah naših učinkovin (36, 46, 47, 48, 49). Za ramiprilat objavljene metode nismo našli. Prav tako ni objavljene metode, ki bi sočasno določala vse štiri učinkovine iz DBS vzorcev. Priprava krvnih vzorcev in nanos kapelj krvi na DBS kartico se med raziskavami pomembno ne razlikujejo. Opazimo le razlikovanje med volumni nanosa krvi, ki so med 10 in 30 μL . Ekstrakcijski postopki pa se med sabo razlikujejo glede uporabljenih ekstrakcijskih topil in njihovem volumnu ter glede postopkov mešanja. V analizah propranolola so za topilo uporabili raztopino metanol/voda 95:5 (v/v) z 0,1 % mravljične kisline ali sam metanol. Prav tako se kot ekstrakcijsko topilo v analizi bisoprolola in midazolama pojavi metanol. Vsem raziskavam je skupen dodatek raztopine internega standarda, večinoma izotopno označenega. Sledijo različni postopki intenzivnega mešanja in centrifugiranja. V nekaterih primerih je bilo nato potrebno vzorce sušiti in rekonstituirati, s čimer se poveča koncentracija analita (46, 47). Analiti se v DBS vzorcih nahajajo v nizkih koncentracijah, zato je za separacijo in detekcijo potrebno uporabiti metodo z visoko občutljivostjo. V objavljenih analizah sta to metodi LC-MS/MS in LC, sklopljena z masnim spektrometrom z visoko resolucijo (36, 46, 47, 48, 49).

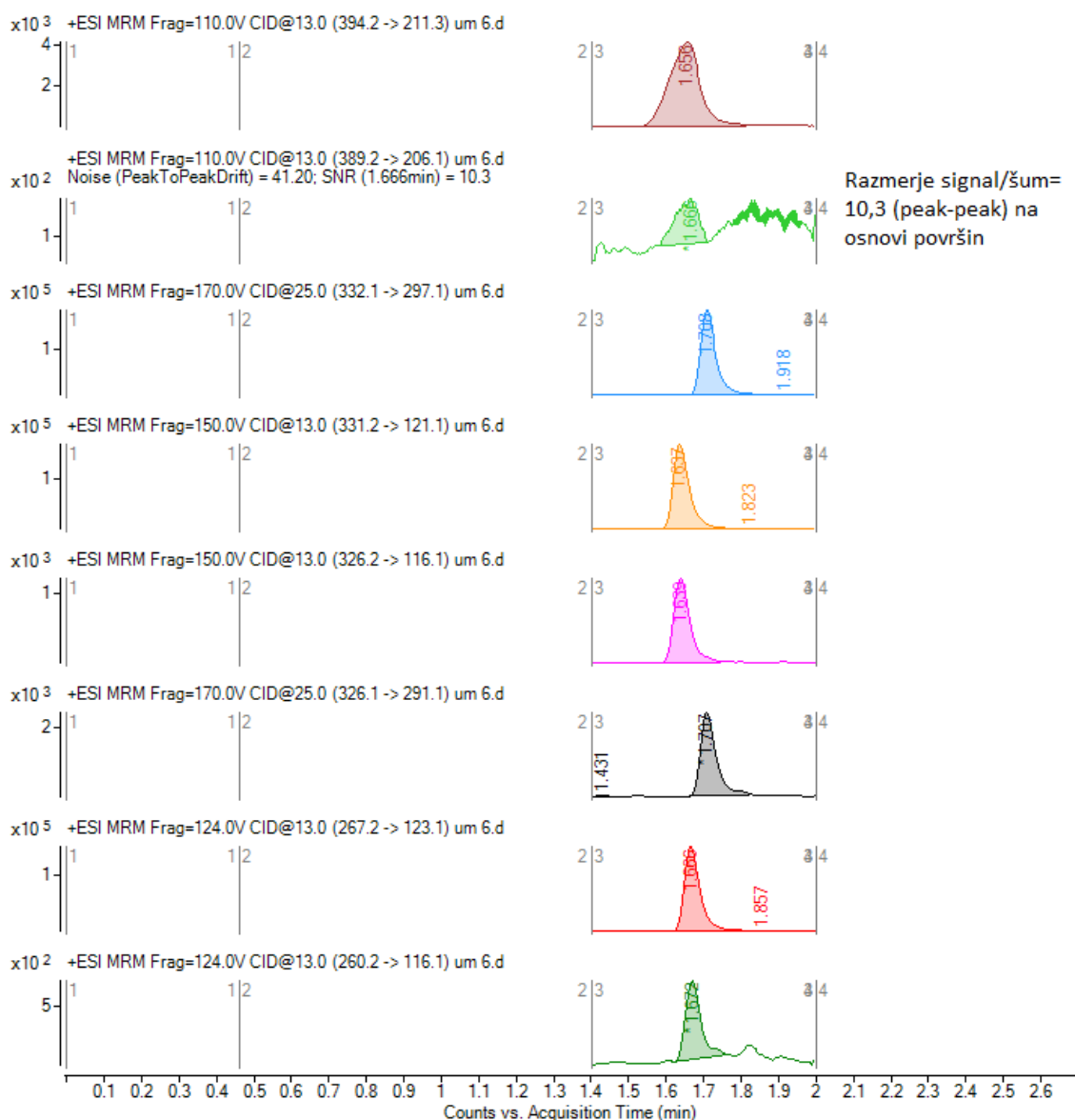
4.1 IZBIRA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA

Z izbiro ekstrakcijskega postopka smo želeli zagotoviti visok izkoristek ekstrakcije. Kot topilo smo uporabili metanol/voda 90:10 (v/v) z 0,1 % mravljične kisline, ki je tudi kompatibilno z mobilno fazo kromatografskega sistema. Nato smo z intenzivnim mešanjem na mešalniku Vibromix 10, inkubaciji v ultrazvočni kadički in stresanjem na Vibromix 403 EVT analite ekstrahirali iz DBS. Sledilo je 10 minutno centrifugiranje pri 15000 vrtljajih/minuto, da smo odstranili morebitne ostanke filter papirja. Nato smo dodali končno raztopino internih standardov. Interni standard kompenzira analizne napake zaradi izgub vzorca in različnega volumna injiciranja. Te namreč vplivajo na analit in IS in tako razmerje površin pod kromatografskima vrhovoma analit/IS ostane enako. Vzorcem dodamo IS z znano koncentracijo običajno pred ekstrakcijo in s tem izboljšamo točnost metode. IS mora imeti podobne fizikalno-kemijske lastnosti kot analit in zato podoben retencijski čas. Pri analizi z LC-MS je najbolje uporabiti stabilne izotopno označene IS analitov (29). Takšne smo pri razvoju metode tudi uporabili. Za razliko od objavljenih raziskav pa smo naš postopek modificirali tako, da smo pred analizo z LC-MS/MS vzorce prefiltrirali skozi OstroTM ploščico in s tem odstranili endogene fosfolipide ter nekatere proteine. Ti bi lahko vplivali na občutljivost metode.

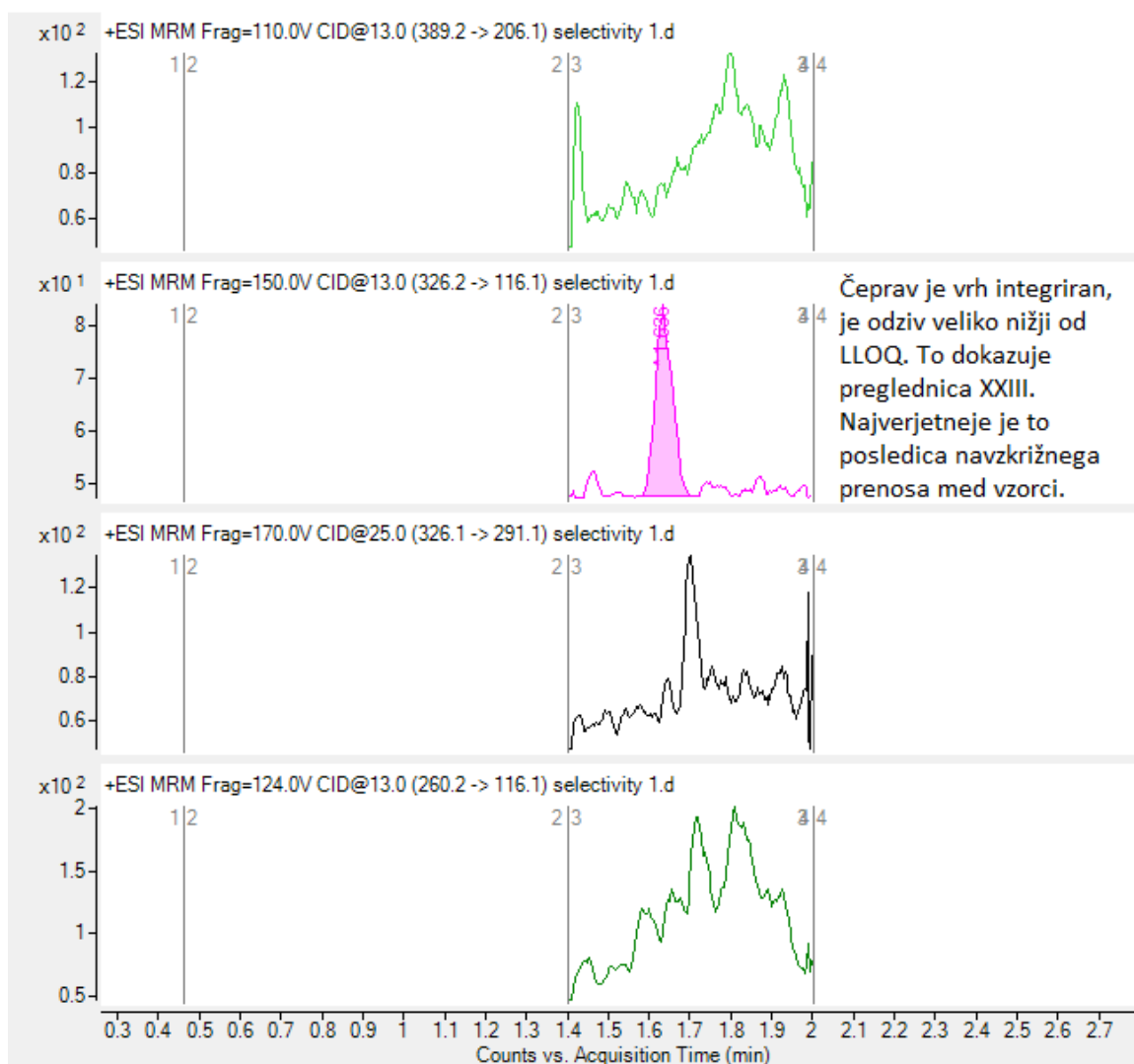
4.2 POGOJI ANALIZE S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO, SKLOPLJENO S TANDEMskim MASNIM SPEKTROMETROM (LC-MS/MS)

Metodo smo razvili s pomočjo tekočinske kromatografije in masne spektrometrije. Separacijski del analize smo izvedli na reverzno-fazni koloni Kinetex C18, 50 × 2,1 mm in z 2,6 µm delci. Ker so učinkovine šibko bazične, smo za vodni del MF izbrali 0,1 % mravljično kislino in s tem povečali ionizacijo analitov. Takšna MF je tudi najbolj primerna za ESI v pozitivnem načinu (50). Za organski del MF smo izbrali 98 % acetonitril (topilo B), ki je bil pogosto uporabljen v že objavljenih analiznih metodah in je prav tako priporočljiv za ESI (36, 46, 48, 49). Pretok mobilne faze smo nastavili na 0,5 mL/min. Potekala je gradientna elucija, kjer smo v različnih časovnih točkah spreminjali delež acetonitrila od 3 do 90 %. S tem smo skrajšali čas separacije na 1,75 min, medtem ko je bil v objavljenih analiznih metodah od 4 do 15 min in dosegli ustrezno ločljivost vrhov (36, 46, 48, 49). Injicirali smo 1 µL vzorca.

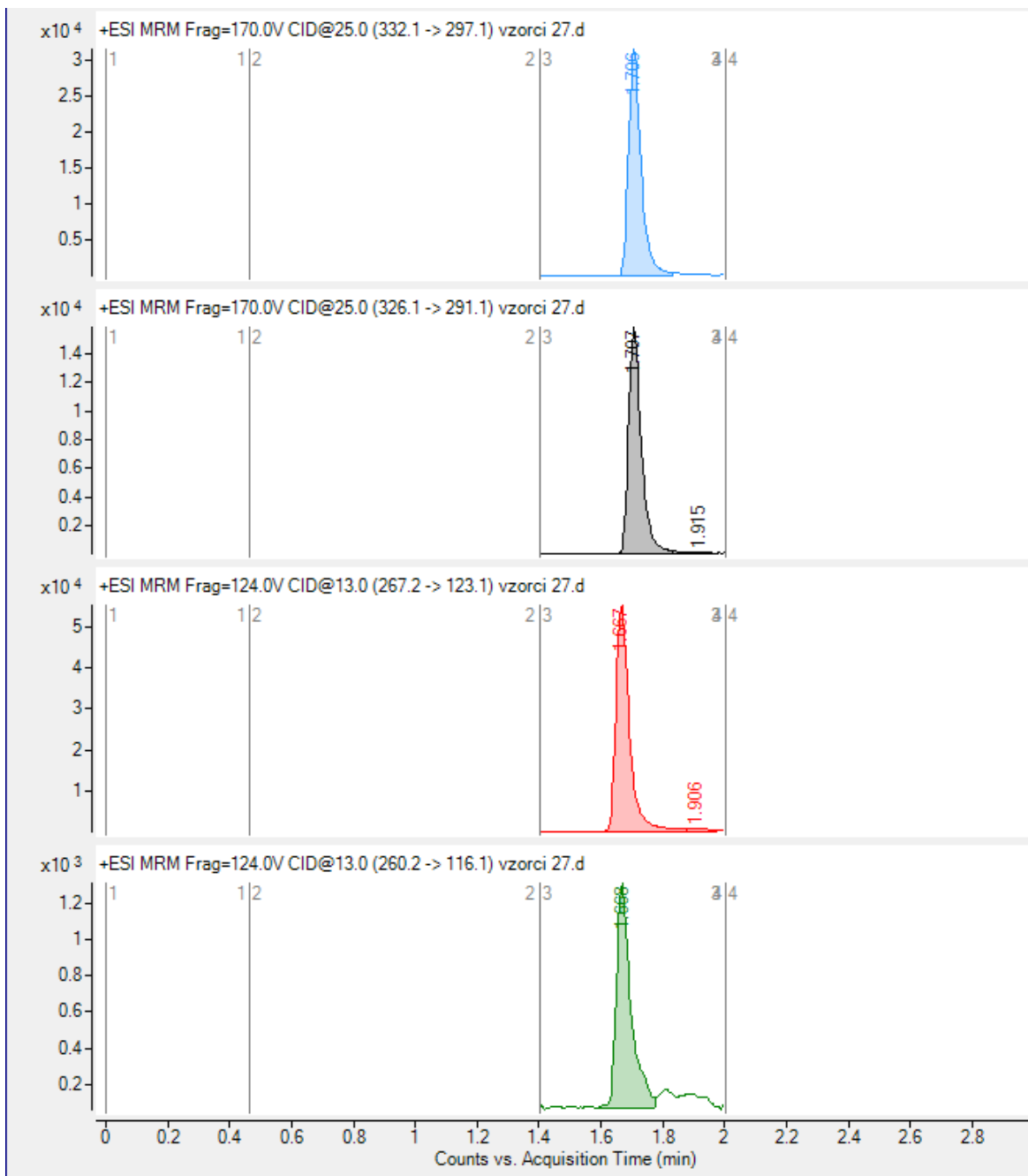
Detekcijo smo izvedli z masnim spektrometrom Agilent 6460 s trojnim kvadрупolom. Ionizacijo smo izvedli z ESI napravo Jetstream, ki smo jo nastavili na pozitiven način. Optimalne pogoje, ki so omogočili dobro občutljivost in selektivnost, smo podali v poglavju 3.5. Za kvantifikacijo smo uporabili MRM način. Masne prehode analitov in internih standardov smo predstavili v preglednici VIII. Napetost fragmentorja in kolizijske energije smo pridobili z optimizacijo. Vrednost fragmentorja je razlika med napetostjo začetnega dela MS, kjer ioni nastanejo, in kolizijsko celico. Na slikah 9–12 so LC-MS/MS kromatogrami slepega vzorca ter kromatogrami analitov in IS pri LLOQ in v realnem vzorcu.



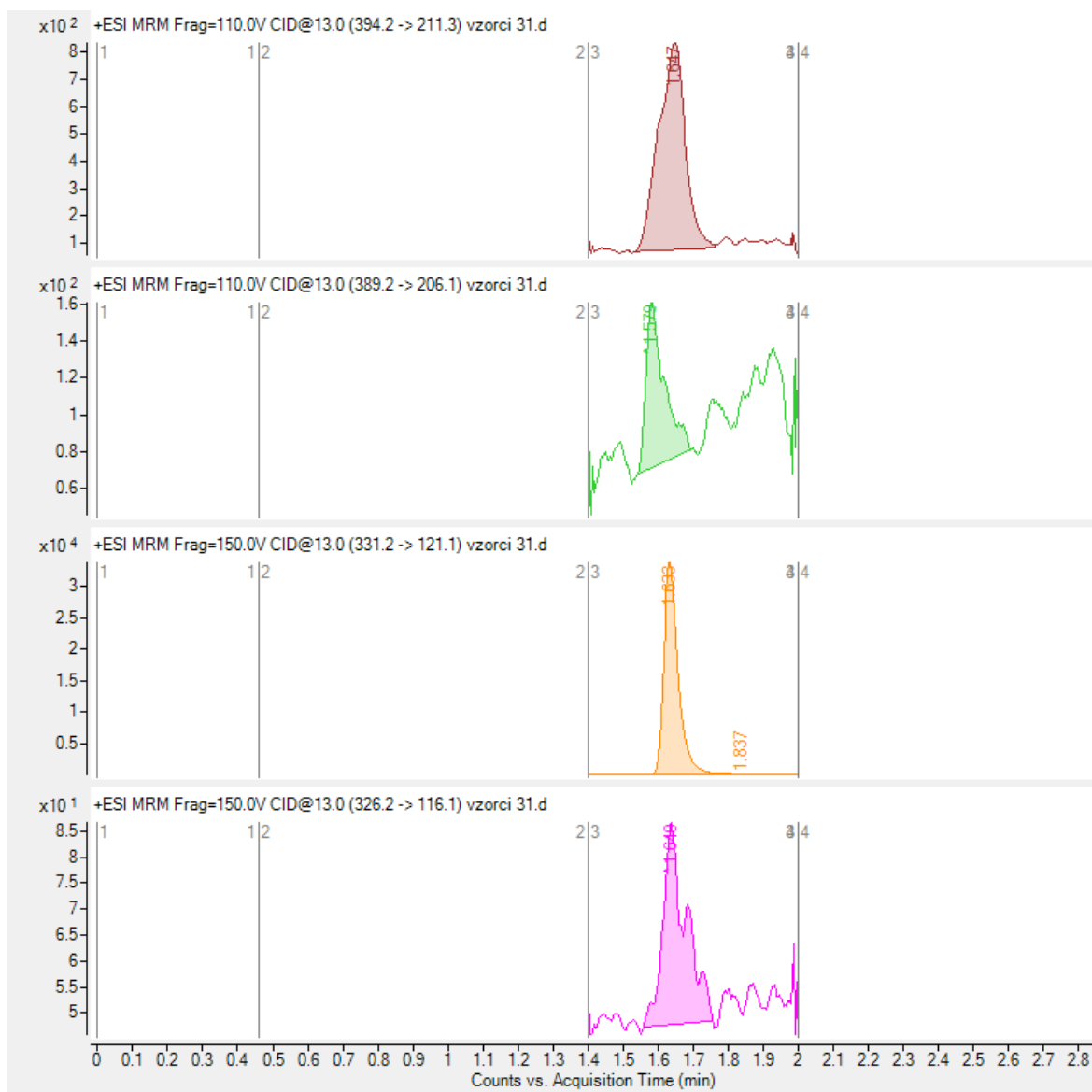
Slika 9: LC-MS/MS kromatogrami analitov pri LLOQ (5 $\mu\text{g/L}$), MRM prehodi od zgoraj: ramiprilat-D₅, ramiprilat, midazolam-¹³C₆, bisoprolol-D₅, bisoprolol, midazolam, propranolol-D₇, propranolol



Slika 10: LC-MS/MS kromatogrami slepega vzorca, MRM prehodi od zgoraj: ramiprilat, bisoprolol, midazolam, propranolol



Slika 11: LC-MS/MS kromatogram vzorca *in vivo* študije, MRM prehodi od zgoraj: midazolam- $^{13}\text{C}_6$, midazolam, propranolol- D_7 , propranolol



Slika 12: LC-MS/MS kromatogram vzorca *in vivo* študije, MRM prehodi od zgoraj: ramiprilat-D₅, ramiprilat, bisoprolol-D₅, bisoprolol

4.3 VALIDACIJA

4.3.1 LINEARNOST, TOČNOST, SPODNJA MEJA KVANTIFIKACIJE

Iz odziva (razmerje med površino kromatografskega vrha učinkovine in IS) kalibracijskih standardov smo določevali območje linearnosti in ugotovili, da je pri vseh analitih odziv proporcionalen koncentraciji analita v območju od 5 µg/L do 250 µg/L. Z metodo najmanjših kvadratov smo nato določili enačbo umeritvene krivulje in determinacijski koeficient (r^2) vsakega analita. Krivuljo smo utežili z utežema 1 in 2. Končne parametre smo izračunali s pomočjo uteži 2 ($1/C^2$), saj smo tako najbolj izboljšali točnost najnižjih koncentracij kalibracijskih standardov. V preglednici IX so predstavljene vrednosti parametrov umeritvenih krivulj in r^2 pred in po uteževanju. Na slikah 13–16 pa so umeritvene krivulje vseh analitov pred in po uteževanju. Determinacijski koeficient je dovolj visok glede na zahteve FDA smernic za vse analite v obeh primerih ($\geq 0,990$). Točnosti kalibratorjev, predvsem tistih z nizkimi koncentracijami analitov, smo po uteževanju močno izboljšali (preglednica X) in vse ustrezajo zahtevam FDA ($\pm 15\%$, v primeru LLOQ $\pm 20\%$). Najnižja koncentracija analitov z odzivom vsaj 5-krat višjim od odziva slepega vzorca je 5 µg/L in predstavlja LLOQ.

Preglednica IX: Vrednosti parametrov umeritvenih krivulj in r^2 analitov pred in po uteževanju, $n = 7$

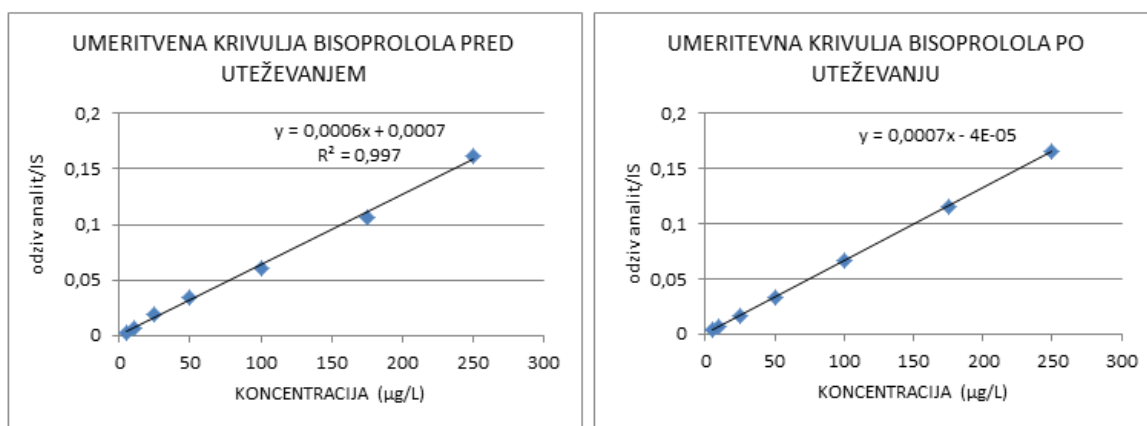
PARAMETER	BISOPROLOL		MIDAZOLAM		PROPRANOLOL		RAMIPRILAT	
	neutežena	utežena	neutežena	utežena	neutežena	utežena	neutežena	utežena
k	0,000630	0,000663	0,00104	0,00109	0,000334	0,000348	0,00263	0,00280
n	0,000707	-0,0000391	0,00147	0,000564	0,00160	0,00125	0,00705	0,00279
r^2	0,997	0,994	0,998	0,995	0,997	0,995	0,997	0,992

Z metodo smo dosegli primerljivo območje linearnosti propranolola kot v že objavljenih raziskavah, kjer je bilo koncentracijsko območje 2,5-200 µg/L oz. 1-500 ng/mL (36, 47). LLOQ midazolama je v objavljeni analizni metodi boljša kot v našem primeru, saj je pogojem ustrezala že koncentracija 0,1 ng/mL, območje pa je bilo do 100 ng/mL (46). Tudi LLOQ bisoprolola je v objavljeni analizi metodi nižja kot v naši in znaša 0,5 ng/mL (49). Povečali pa smo območje linearnosti. Nižjih koncentracij od 5 µg/L z našo metodo

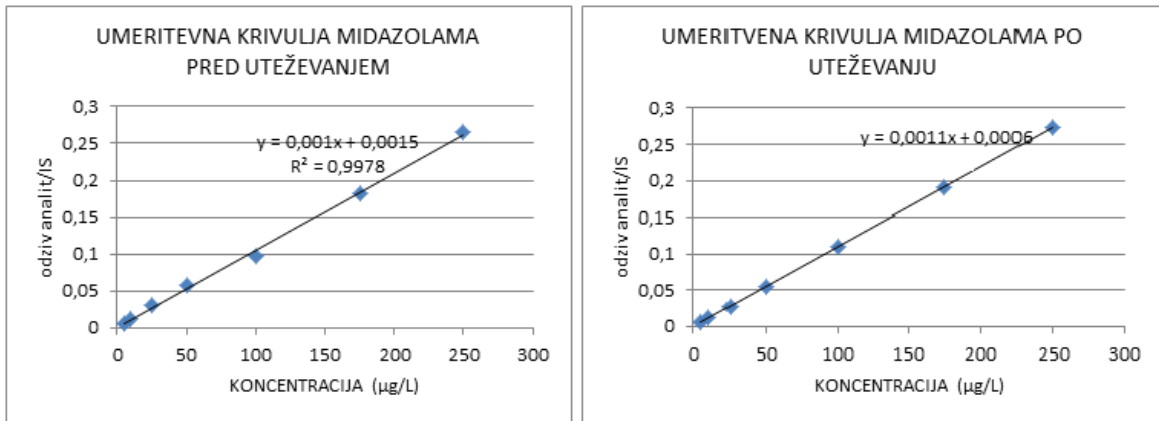
nitri nismo testirali, tako da bi morda dosegli nižjo LLOQ predvsem za bisoprolol in midazolam, ki imata večje odzive. Lahko pa bi tudi povečali volumen injiciranja.

Preglednica X: Točnosti kalibracijskih standardov analitov, n = min. 7

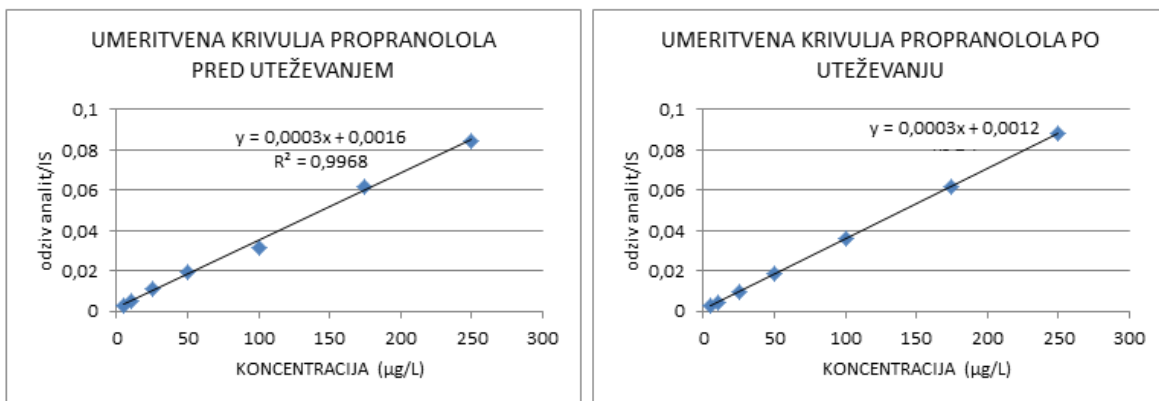
Koncentracija ($\mu\text{g/L}$)	TOČNOST (%)							
	BISOPROLOL		MIDAZOLAM		PROPRANOLOL		RAMIPRILAT	
	neutežena	utežena	neutežena	utežena	neutežena	utežena	neutežena	utežena
5	75,7	94,5	81,2	94,4	78,3	95,7	65,1	91,4
10	99,4	105,8	102,3	106,3	97,5	103,9	103,5	112,4
25	114,8	113,7	115,4	113,8	113,8	113,3	114,1	113,2
50	107,9	104,8	107,0	104,1	106,5	104,3	110,4	106,6
100	95,3	91,8	91,7	88,7	89,7	87,1	90,9	86,8
175	95,4	91,3	98,9	95,2	103,4	99,9	99,0	93,8
250	102,6	98,0	101,4	97,5	99,6	96,0	101,4	95,7



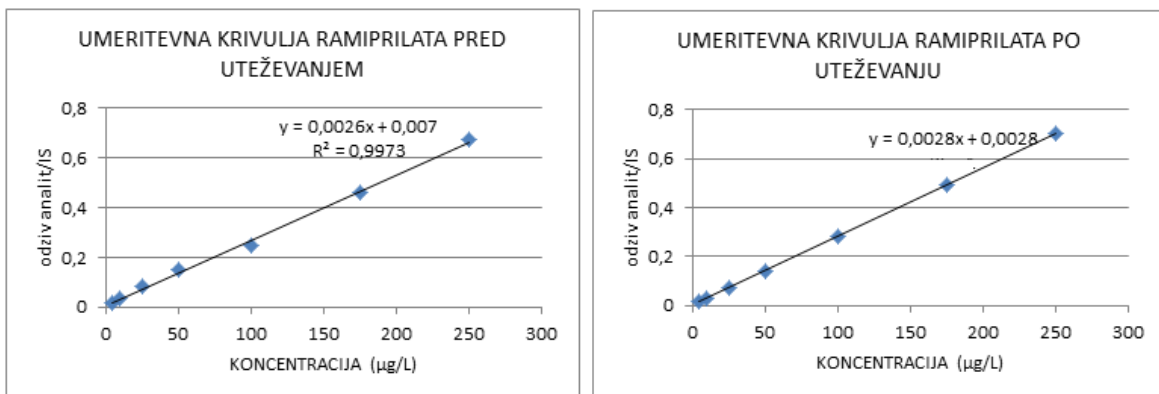
Slika 13: Umeritvena krivulja bisoprolola pred in po uteževanju



Slika 14: Umeritvena krivulja midazolama pred in po uteževanju



Slika 15: Umeritvena krivulja propranolola pred in po uteževanju



Slika 16. Umeritvena krivulja ramiprilata pred in po uteževanju

4.3.2 ZNOTRAJDNEVNA TOČNOST IN PONOVLJIVOST

V preglednicah so predstavljene znotrajdnevne točnosti in RSD kontrolnih vzorcev nizke, srednje in visoke koncentracije analitov v treh dneh validacije. Izmerili smo minimalno po sedem vzorcev vsake koncentracije. Točnosti za bisoprolol so znašale od 91,7 % do 108,9 %, RSD je bil največ 8,37 % (preglednica XI). V primeru midazolama so bile točnosti od 92,1 % do 109,9 %, najvišji RSD je bil 8,73 %, kar je razvidno iz preglednice XII. Znotrajdnevne točnosti propranolola so znašale od 91,7 % do 112,8 %, meritve so bile ponovljive z RSD največ 9,60 % (preglednica XIII). Točnosti ramiprilata so podane v preglednici XIV in so bile v območju od 95,6 % do 107,2 %, RSD pa največ 11,01 %. Ugotovili smo, da rezultati ustrezajo zahtevam FDA smernic, torej je metoda ustrezno točna in ponovljiva znotraj dneva za vse analite.

Preglednica XI: Znotrajdnevna točnost in ponovljivost bisoprolola, n = min. 7

BISOPROLOL	QC ₁		QC _m		QC _h	
	Točnost (%)	RSD (%)	Točnost (%)	RSD (%)	Točnost (%)	RSD (%)
1. dan	105,0	4,75	97,4	7,98	108,9	3,07
2. dan	94,9	6,86	98,4	7,70	97,4	7,98
3. dan	91,7	3,32	101,2	6,23	97,0	8,37

Preglednica XII: Znotrajdnevna točnost in ponovljivost midazolama, n = min. 7

MIDAZOLAM	QC ₁		QC _m		QC _h	
	Točnost (%)	RSD (%)	Točnost (%)	RSD (%)	Točnost (%)	RSD (%)
1. dan	102,6	5,41	96,6	8,04	109,9	3,45
2. dan	92,1	6,84	96,8	8,73	98,0	7,09
3. dan	93,1	2,62	101,9	5,60	97,0	7,40

Preglednica XIII: Znotrajdnevna točnost in ponovljivost propranolola, n = min. 7

PROPRANOLOL	QC ₁		QC _m		QC _h	
	Točnost (%)	RSD (%)	Točnost (%)	RSD (%)	Točnost (%)	RSD (%)
1. dan	97,1	6,63	97,8	7,47	112,8	1,76
2. dan	91,7	9,18	100,8	9,60	99,6	7,58
3. dan	93,9	7,18	103,6	6,99	94,0	5,98

Preglednica XIV: Znotrajdnevna točnost in ponovljivost ramiprilata, n = min. 7

RAMIPRILAT	QC ₁		QC _m		QC _h	
	Točnost (%)	RSD (%)	Točnost (%)	RSD (%)	Točnost (%)	RSD (%)
1. dan	99,6	6,28	97,8	7,09	107,2	4,25
2. dan	95,6	11,01	98,0	8,25	97,1	8,85
3. dan	105,4	6,42	101,0	4,81	99,5	8,74

4.3.3 MEDDNEVNA TOČNOST IN PONOVLJIVOST

Točnost in ponovljivost smo določevali tudi med tremi dnevi validacije in jih podali v preglednici XV. Točnosti bisoprolola so bile v območju od 98,1 % do 100,1 %, RSD pri meddnevni ponovljivosti je bil največ 8,54 %. Za midazolam so točnosti znašale od 96,9 % do 100,6 %, RSD je bil največ 8,20 %. V primeru propranolola so bile vrednosti za točnost od 94,7 % do 101,1 % in RSD največ 9,32 %. Meddnevne točnosti ramiprilata so bile v območju od 98,8 % do 100,5 %, RSD pa največ 8,52 %. Vse te vrednosti ustrezajo zahtevam FDA in tako smo ugotovili, da je metoda ustrezno točna in ponovljiva tudi med tremi dnevi.

Preglednica XV: Točnost in ponovljivost med tremi dnevi validacije za vse analite

	QC _i		QC _m		QC _h	
	Točnost (%)	RSD (%)	Točnost (%)	RSD (%)	Točnost (%)	RSD (%)
BISOPROLOL	98,1	7,83	99,2	7,11	100,1	8,54
MIDAZOLAM	96,9	7,35	98,7	7,44	100,6	8,20
PROPRANOLOL	94,7	7,45	100,9	7,93	101,1	9,32
RAMIPRILAT	99,9	8,50	98,8	6,75	100,5	8,52

4.3.4 ABSOLUTNI UČINEK MATRICE

Učinek matrice smo določevali po splošno sprejetem postopku, ki ga je uvedel Matuszewski (39) in sicer smo po ekstrakciji slepih vzorcev petih različnih podgan ekstraktu dodali ustrezne raztopine standardov in internih standardov. Za primerjavo smo izmerili odziv standardov in internih standardov v sami mobilni fazi in iz razmerja določili absolutni učinek matrice. Vrednosti med 85 % in 115 % pomenijo, da ni značilnega učinka matrice na ionizacijo analita. V preglednici XVI je primer izračuna ME za kontrolni vzorec bisoprolola s koncentracijo 200 µg/L. Za izračun smo uporabili enačbo 7. Razvidno je, da se učinek matrice razlikuje med različnimi podganami, kar lahko pomeni, da so v sicer istem biološkem materialu prisotne različne endogene komponente, ki vplivajo na ionizacijo analita, vendar pa vrednost RSD pod 15 % nakazuje na ustrezno ponovljivost, saj so variacije znotraj dovoljene analitske napake. V preglednici XVII so prikazane vrednosti ME in RSD za vse štiri analite pri treh koncentracijah QC. Matrica različno vpliva na analite, kar vidimo v primeru propranolola, kjer so vrednosti ME sicer v zahtevanih mejah, vendar se precej razlikujejo od ostalih treh analitov, ki pa imajo primerljive vrednosti ME. Vpliv matrice na ionizacijo je nekoliko odvisen tudi od koncentracije analita, kar opazimo pri nizkih koncentracijah, saj je prišlo do povečanja ionizacije bisoprolola, midazolama in ramiprilata, kar bi lahko vplivalo na točnost metode (24, 44). Kljub temu pa so razlike v učinku matrice med nižjimi in višjimi koncentracijami znotraj dovoljenega intervala odstopa, zato lahko zaključimo, da učinek matrice ne vpliva značilno na točnost meritev.

Preglednica XVI: Izračun ME po enačbi 7 za kontrolni vzorec bisoprolola s koncentracijo 200 µg/L

PODGANA	Povprečni odziv bisoprolol/IS	Standard v MF	ME (%)
1	0,12815	0,10274	124,7
2	0,11275		109,7
3	0,11128		108,3
4	0,098442		95,8
5	0,11736		114,2
		POVPREČJE (%)	110,6
		RSD (%)	9,46

$$ME (\%) = \frac{Biso/IS}{Standard_{MF}/IS} \times 100 \quad (\text{enačba 7})$$

Preglednica XVII: Vrednosti absolutnega učinka matrice in njihova ponovljivost za vse kontrolne vzorce analitov, n = 5

	QC _l		QC _m		QC _h		Povp. ME (%)	RSD (%)
	Povp. ME (%)	RSD (%)	Povp. ME (%)	RSD (%)	Povp. ME (%)	RSD (%)		
BISOPROLOL	124,7	10,06	115,3	11,33	110,6	9,46	116,8	6,14
MIDAZOLAM	123,9	9,01	116,6	10,82	110,3	9,57	116,9	5,82
PROPRANOLOL	86,7	10,44	99,3	11,67	95,0	8,73	93,7	6,83
RAMIPRILAT	131,8	9,87	120,7	12,34	114,5	9,48	122,3	7,17

Vpliv matrice na ionizacijo se lahko zmanjša z uporabo stabilnih izotopno označenih internih standardov, ki smo jih pri analizi metodi tudi uporabili. Na povišanje ionizacije v prisotnosti matrice lahko vpliva način ionizacije analita, ki smo jo uporabili. ESI je namreč bolj dovzetna za učinek matrice kot druge metode ionizacije analita (43). V že objavljenih DBS analizah teh učinkovin ne določijo vpliva matrice na ionizacijo (36, 46, 49).

4.3.5 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE (RECOVERY)

Re smo določevali tako, da smo ekstrahirali slepe vzorce podganje krvi in po ekstrakciji dodali raztopino analitov in internih standardov ustrezne koncentracije. Odzive smo nato primerjali z odzivom kontrolnih vzorcev, ki smo jih ekstrahirali isti dan. Vrednosti so prikazane v preglednici XVIII. Povprečni izkoristek ekstrakcije bisoprolola je bil 88,5 %, midazolama 92,5 %, propranolola 108,6 % in ramiprilata 72,6 %. Vsi analiti so izkazovali konsistenten in ponovljiv izkoristek ekstrakcije na vseh QC nivojih. Povečanje, ki ga opazimo pri QC_m pri ramiprilatu in bisoprololu, je še vedno znotraj dovoljenega odstopa analizne metode.

Preglednica XVIII: Povprečen izkoristek ekstrakcije in ponovljivost meritev kontrolnih vzorcev vseh analitov, n = 3

	QC _l		QC _m		QC _h		POVP. Re (%)	RSD (%)
	POVP. Re (%)	RSD (%)	POVP. Re (%)	RSD (%)	POVP. Re (%)	RSD (%)		
BISOPROLOL	86,2	9,65	99,3	9,30	80,0	10,06	88,5	11,14
MIDAZOLAM	95,6	7,54	96,3	10,38	85,7	10,23	92,5	6,41
PROPRANOLOL	108,2	7,65	116,1	8,90	101,4	9,89	108,6	6,76
RAMIPRILAT	69,2	9,55	81,6	11,8	66,9	11,79	72,6	10,89

Izkoristek ekstrakcije midazolama v objavljeni analizni metodi je bil le 40 %, vendar konstanten po celotnem območju metode (46). Z našo metodo ekstrakcije smo ga tako izboljšali. Dosegli smo primerljivo vrednost za bisoprolol, ki je bila v objavljeni metodi od 82 do 99 % (49).

4.3.6 DOLGOROČNA STABILNOST

Vzorci za določevanje dolgoročne stabilnosti smo za 21 dni postavili v zamrzovalnik (-20 °C), v ogrevano komoro na 37 °C in na sobno temperaturo (25 °C). Pri tem smo uporabili po tri DBS vzorce s kontrolnimi raztopinami nizke, srednje in visoke koncentracije. Po ekstrakciji smo izračunali odstotek ujemanja odzivov stabilnostnih vzorcev z odzivi kontrolnih vzorcev, ki smo jih ekstrahirali na dan analize. Po FDA smernicah mora ta vrednost znašati med 85 in 115 %, RSD meritev pa mora biti nižji od 15 %. Kot je

razvidno iz preglednic XIX–XXII, kontrolna vzorca srednje koncentracije bisoprolola in propranolola pri -20 °C ter kontrolni vzorec nizke koncentracije propranolola pri 25 °C malo odstopajo od zahtevanih mej, medtem ko je ponovljivost ustrežna. Ugotovili smo, da so analiti v posušenem madežu krvi na DBS kartici stabilni v testiranem obdobju pod stresnimi pogoji, kar je primerljivo z rezultati preteklih raziskav (36, 46, 49).

Preglednica XIX: Stabilnost DBS vzorcev bisoprolola pri treh različnih temperaturah,

n = 3, *n = 2

TEMPERATURA (°C)	QC _l		QC _m		QC _h	
	% UJEMANJA	RSD (%)	% UJEMANJA	RSD (%)	% UJEMANJA	RSD (%)
25	86,5	7,08	91,1	3,84	94,9	12,42
37	102,1	6,39	96,5	8,41	*94,0	0,95
-20	110,6	8,57	*83,4	7,11	109,0	3,71

Preglednica XX: Stabilnost DBS vzorcev midazolama pri treh različnih temperaturah,

n = 3, *n = 2

TEMPERATURA (°C)	QC _l		QC _m		QC _h	
	% UJEMANJA	RSD (%)	% UJEMANJA	RSD (%)	% UJEMANJA	RSD (%)
25	93,2	8,04	94,8	3,94	95,5	10,18
37	98,4	10,83	100,8	11,88	106,4	11,45
-20	107,5	11,74	*88,9	6,10	108,7	5,68

Preglednica XXI: Stabilnost DBS vzorcev propranolola pri treh različnih temperaturah,

n = 3, *n = 2

TEMPERATURA (°C)	QC _l		QC _m		QC _h	
	% UJEMANJA	RSD (%)	% UJEMANJA	RSD (%)	% UJEMANJA	RSD (%)
25	84,5	4,98	95,2	4,45	87,4	6,89
37	92,2	6,65	93,3	11,19	90,4	9,88
-20	91,9	14,41	*75,0	11,34	97,5	5,36

Preglednica XXII: Stabilnost DBS vzorcev ramiprilata pri treh različnih temperaturah,

n = 3, *n = 2

TEMPERATURA (°C)	QC _l		QC _m		QC _h	
	% UJEMANJA	RSD (%)	% UJEMANJA	RSD (%)	% UJEMANJA	RSD (%)
25	*105,5	13,6	109,0	7,19	105,1	6,24
37	91,2	1,81	97,7	12,84	104,3	10,77
-20	108,5	10,68	87,6	6,71	106,4	6,79

4.3.7 SELEKTIVNOST

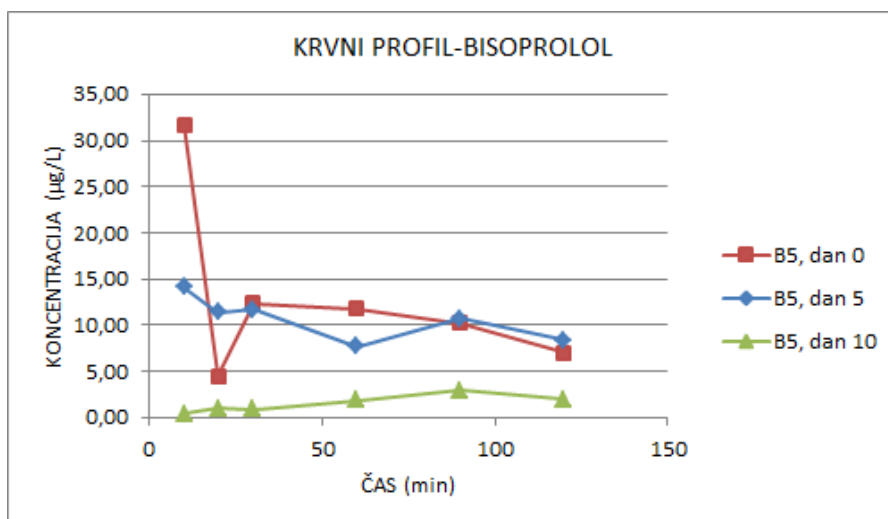
Selektivnost metode smo določevali z vzorci krvi petih različnih podgan, ne da bi krvi dodali raztopino analitov. Povprečen odziv ekstrahiranih slepih vzorcev smo primerjali z odzivom najnižjega kalibratorja in ta je moral imeti vsaj petkrat višji odziv kot slepi vzorci. Ugotovili smo, da to velja za vse analite, torej je metoda selektivna za vse analite. Rezultati so podani v preglednici XXIII.

Preglednica XXIII: Povprečen odziv slepih vzorcev pri retencijskem času posameznega analita (n = 5). Pri vseh analitih je odziv najnižjega kalibratorja vsaj petkrat višji.

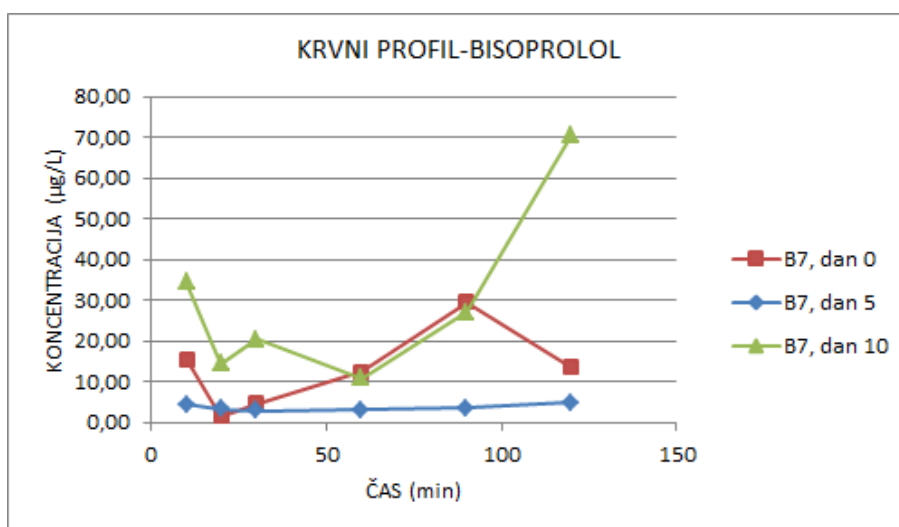
PODGANA	ODZIV SLEPEGA VZORCA			
	BISOPROLOL	MIDAZOLAM	PROPRANOLOL	RAMIPRILAT
1	112	120	85	27
2	69	185	42	39
3	114	245	84	38
4	86	135	82	26
5	99	186	44	36
POVPREČJE	96	174	67	33
POMNOŽENO S 5	480	870	335	166
ODZIV NAJNIŽJEGA KALIBRATORJA	1589	2958	1393	350

4.4 UPORABA ANALIZNE METODE NA REALNIH VZORCIH

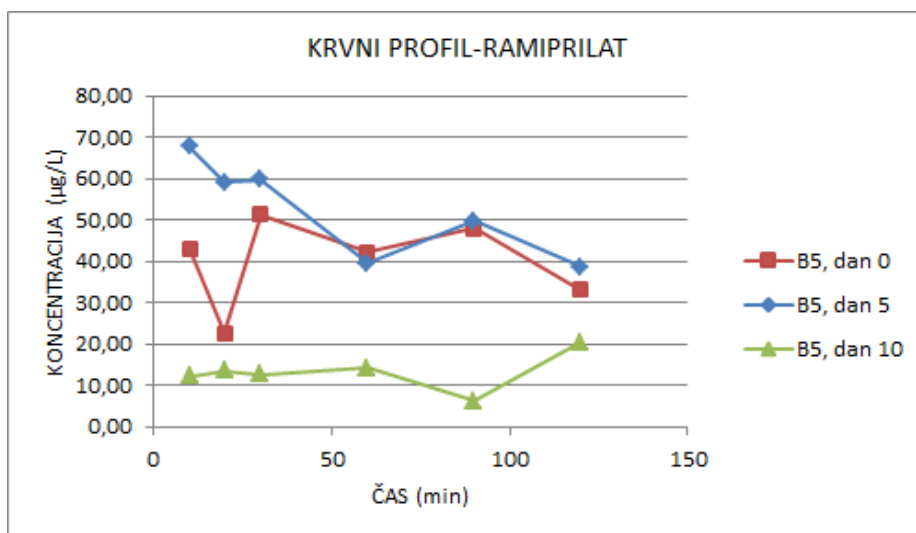
Razvito in validirano metodo smo uporabili na realnih vzorcih *in vivo* študije na podganah. Sočasno smo analizirali kalibracijske standarde s koncentracijami od 5 do 250 µg/L, QC vzorce treh koncentracij (15, 75 in 200 µg/L) in vzorce iz študije, da smo lahko s pomočjo dobljene umeritvene krivulje določili koncentracije učinkovin v realnih vzorcih. QC vzorci so bili ustrezni, če so odstopali od prave vrednosti za največ 15 %. V vseh primerih je bilo takšnih vsaj dve tretjini, kar je tudi pogoj za potrditev pravilnosti analize. Pri vsaki časovni točki smo ekstrahirali dva DBS vzorca in upoštevali povprečno vrednost odzivov. Na slikah 17–24 so prikazani krvni profili dveh podgan iz vsake skupine ob dnevu 0 in 5 oziroma 10 dni po induciranju raka. Skupina podgan A je prejela midazolam in propranolol, skupina B pa bisoprolol in ramiprilat. S študijo smo želeli ugotoviti, kako razvoj raka vpliva na farmakokinetiko učinkovin.



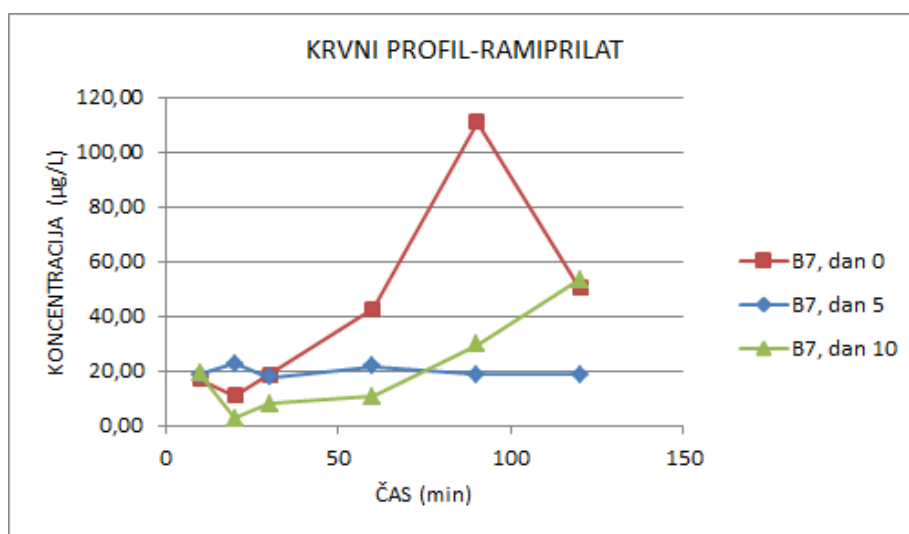
Slika 17: Krvni profil bisoprolola po aplikaciji 0,5 mL vodne raztopine bisoprolola s koncentracijo 1 mg/mL ob dnevu 0 ter 5 in 10 dni po induciranju raka (podgana B5). Glede na izjemno nizke koncentracije učinkovine ob dnevu 10 lahko sklepamo, da je najverjetneje prišlo do napake pri aplikaciji.



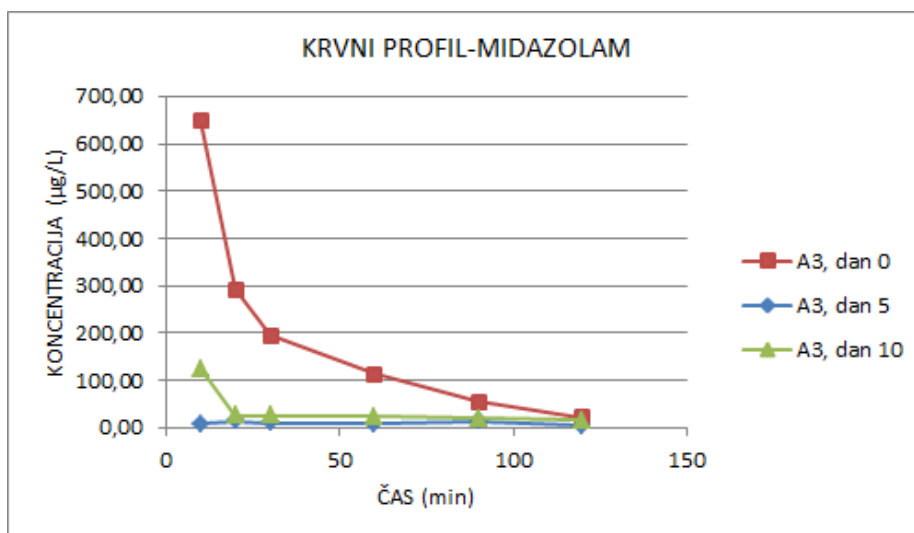
Slika 18: Krvni profil bisoprolola po aplikaciji 0,5 mL vodne raztopine bisoprolola s koncentracijo 1 mg/mL ob dnevu 0 ter 5 in 10 dni po induciranju raka (podgana B7). Opazimo nizke in nespremenjene koncentracije učinkovine ob dnevu 5, zato sklepamo, da je prišlo do težav pri aplikaciji.



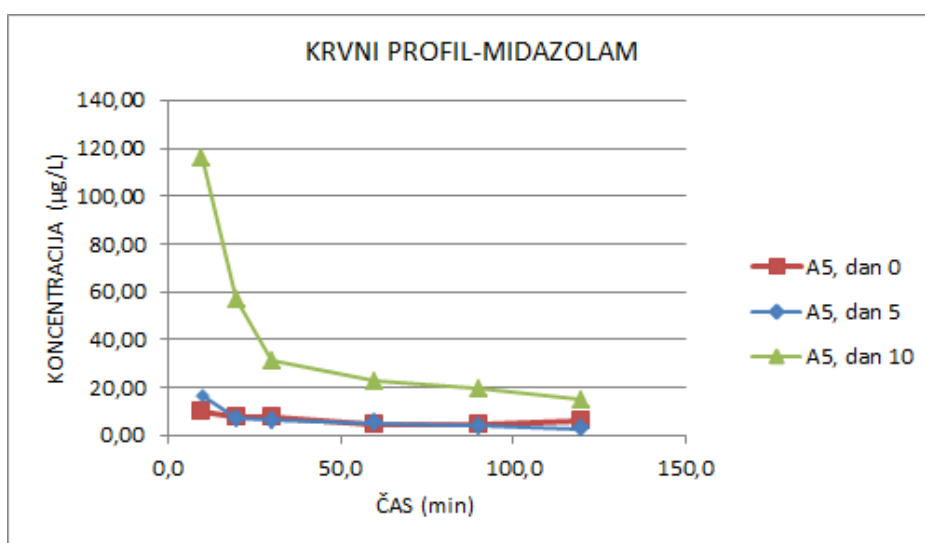
Slika 19: Krvni profil ramiprilata po aplikaciji 0,5 mL vodne raztopine s koncentracijo 1 mg/mL ob dnevu 0 ter 5 in 10 dni po induciranju raka (podgana B5)



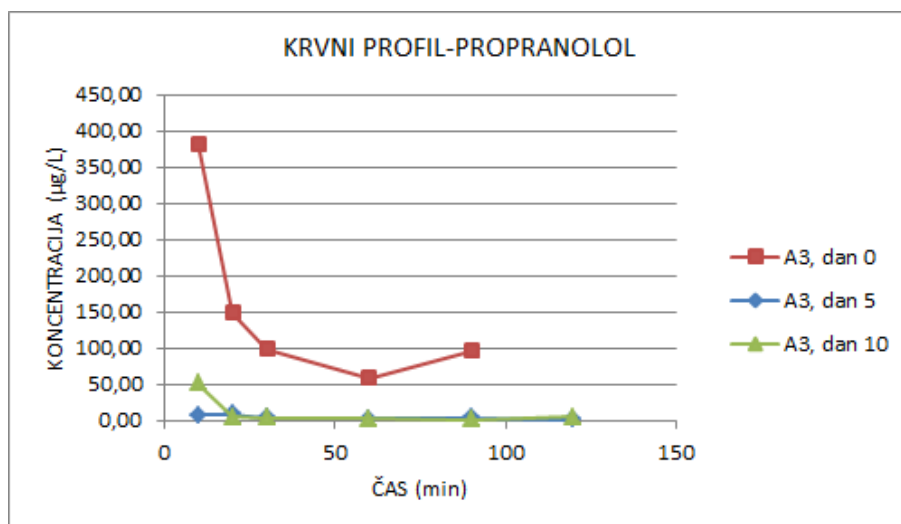
Slika 20: Krvni profil ramiprilata po aplikaciji 0,5 mL vodne raztopine s koncentracijo 1 mg/mL ob dnevu 0 ter 5 in 10 dni po induciranju raka (podgana B7)



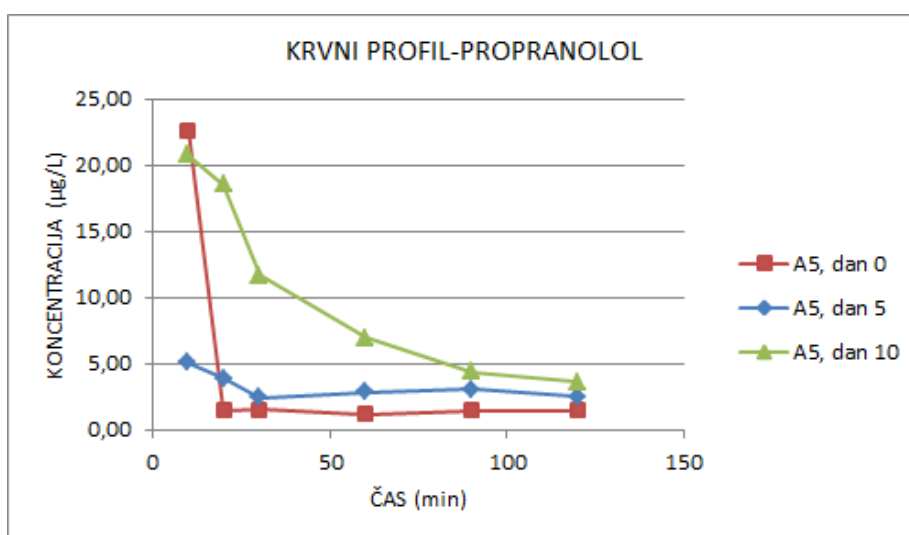
Slika 21: Krvni profil midazolama po aplikaciji 1 mL vodne raztopine s koncentracijo 1 mg/mL ob dnevu 0 ter 5 in 10 dni po induciranju raka (podgana A3)



Slika 22: Krvni profil midazolama po aplikaciji 1 mL vodne raztopine s koncentracijo 1 mg/mL ob dnevu 0 ter 5 in 10 dni po induciranju raka (podgana A5). Če primerjamo oba profila midazolama, opazimo ujemanje premic pri dnevu 0 podgane A3 in dnevu 10 podgane A5. Morda je pri poskusu prišlo do zamenjave vzorca pri eni od podgan.



Slika 23: Krvni profil propranolola po aplikaciji 1 mL vodne raztopine s koncentracijo 1 mg/mL ob dnevu 0 ter 5 in 10 dni po induciranju raka (podgana A3)



Slika 24: Krvni profil propranolola po aplikaciji 1 mL vodne raztopine s koncentracijo 1 mg/mL ob dnevu 0 ter 5 in 10 dni po induciranju raka (podgana A5)

S to pilotno študijo smo želeli ugotoviti, ali je bilo načrtovanje poskusa ustrezno. Glede na dobljene rezultate lahko ugotovimo, da razvoj raka vpliva na koncentracije učinkovin v krvi, vendar pa zaradi razlikovanja rezultatov med podganami ne moremo postaviti jasnih zaključkov. Poleg tega to presega okvir naše diplomske naloge. Gotovo bi bilo treba v raziskavo vključiti večje število podgan in območje metode razširiti še na višje koncentracije. Namreč, koncentracije učinkovin v krvi v primeru podgane A3 presegajo koncentracijsko območje razvite metode, kjer je bila potrjena linearnost (5–250 µg/L).

5 SKLEPI

Razvili smo občutljivo in selektivno metodo za sočasno analizo bisoprolola, propranolola, midazolama in ramiprilata v posušenem madežu podganje krvi. Metoda je hitra in enostavna ter primerna za analizo DBS vzorcev, kjer se analiti nahajajo v nizkih koncentracijah (5–250 µg/L).

Po nanosu krvnih vzorcev na DBS kartice smo izvedli ekstrakcijo analitov s topilom metanol/voda 90:10 (v/v) z 0,1 % mravljične kisline ter vzorce intenzivno mešali in centrifugirali. Po dodatku raztopine internih standardov smo jih prenesli na Ostro™ ploščico, s čimer smo pred analizo z LC-MS/MS vzorce dodatno očistili fosfolipidov.

Z validacijo smo potrdili, da je metoda linearna za vse analite v območju od 5 do 250 µg/L, ustrezno točna in ponovljiva, selektivna in ima dober ter ponovljiv izkoristek ekstrakcije. Pri propranololu, midazolamu in bisoprololu smo pri testiranju vpliva matrice zaznali manjši porast odzivov, vendar so bili rezultati ponovljivi z RSD ≤ 15 %. S testi stabilnosti smo ugotovili, da so bili vzorci DBS stabilni po dveh tednih izpostavljenosti trem različnim temperaturam.

Predstavili smo nekaj rezultatov pilotne študije na podganah, kjer smo uporabili razvito DBS metodo. Ugotavljali smo vpliv razvoja raka na farmakokinetiko učinkovin. Za postavitev ustreznih zaključkov bi morali raziskavo razširiti na večje število podgan. Prav tako bi bilo v prihodnje potrebno območje metode razširiti še na višje koncentracije.

6 VIRI

1. Wikipedia The Free Encyclopedia: Bisoprolol. http://en.wikipedia.org/wiki/Bisoprolol#.CE.B21_Selectivity, dostopano julij 2013.
2. Drugs.com: Bisoprolol. <http://www.drugs.com/pro/bisoprolol.html>, dostopano julij 2013.
3. DrugBank: Bisoprolol. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00612>, dostopano julij 2013.
4. Javna agencija za zdravila in medicinske pripomočke: Baza podatkov o zdravilih. www.zdravila.net, dostopano julij 2013.
5. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: Pharmacology, 7th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh, 2012; 174 – 193, 246 – 284.
6. Roche Slovenia: Bolezni srca in ožilja. http://www.roche.si/portal/roche-slovenija/bolezni_srca_in_ozilja, dostopano julij 2013.
7. Farmacia del nino: Antihypertensive Concor (bisoprolol). <http://farmaciadelnino.com/eng/index/item/217/35/concor-bisoprolol-5mg-30tab>, dostopano julij 2013.
8. Stoschitzky K, Linder W, Egginger G et al: Racemic (R,S)-propranolol versus half-dosed optically pure (S)-propranolol in humans at steady state: Hemodynamic effects, plasma concentrations, and influence on thyroid hormone levels. Clin Pharmacol Ther 1992; 51(4): 445 – 53.
9. DrugBank: Propranolol. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00571>, dostopano julij 2013.
10. European pharmacopoeia 5th edition; Volume 2: 2324 – 2325.
11. Drugs.com: Propranolol. <http://www.drugs.com/pro/propranolol.html>, dostopano julij 2013.

12. MedicineNet.com: Propranolol, Inderal, Inderal LA, Innopran XL.
<http://www.medicinenet.com/propranolol/article.htm>, dostopano julij 2013.
13. Klabunde RE: Cardiovascular Pharmacology Concepts, Beta-Adrenoceptor Antagonists (Beta-Blockers). <http://cvpharmacology.com/cardioinhibitory/beta-blockers.htm>, dostopano julij 2013.
14. Levitt D, Schoemaker R: Human physiologically based pharmacokinetic model for ACE inhibitors: ramipril and ramiprilat. *Biomed Central* 2006; 1 – 27.
15. Chemical Book: Ramiprilat.
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7231407.htm, dostopano julij 2013.
16. Drugs.com: Altace. <http://www.drugs.com/pro/altace.html>, dostopano julij 2013.
17. Drugs.com: Ramipril. <http://www.drugs.com/pro/ramipril.html#ID375>, dostopano julij 2013.
18. Drugs.com: Midazolam Injection. <http://www.drugs.com/pro/midazolam-injection.html>, dostopano julij 2013.
19. DrugBank: Midazolam. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00683>, dostopano julij 2013.
20. Crevoisieri C, Ziegler WH, Eckert M, Heizmann P: Relationship between plasma concentration and effect of midazolam after oral and intravenous administration. *Br J clin Pharmac* 1983; 16,51S – 61S.
21. Roche: Hypnovel Tablets Midazolam 7.5mg tablets.
<http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/h/Hypnoveltab.pdf>, dostopano julij 2013.
22. Keevil B: The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2010; 44(2011): 110 – 118.

23. Eurofins Global Central Laboratory: Dried Blood Spots in drug development.
<http://www.eurofins.com/media/2312136/whitepaper%20dried%20blood%20spots%20web.pdf>, dostopano julij 2013.
24. Li W, Tse FL: Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr* 2010; 24: 49 – 65.
25. Bonate LP, Howard RD: *Pharmacokinetics in Drug Development: Advances and Applications, Volume 3*. Springer, New York, USA, 2011. 91 – 95.
26. Scurtu I, Gruia A, Ordodi V et al: New approaches for the dried blood spot analysis. *Fiziologia-Physiology* 2011; 21.3(71): 43 – 47.
27. Deglon J, Thomas A, Mangin P, Staub C: Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: concepts and biomedical applications. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402: 2485–2498.
28. Patel P: *An Investigation into the Use of Dried Blood Spot Analysis in Pharmacokinetic Studies*. De Montfort University 2011; 9 – 24, 42 – 90.
29. Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K: *Introduction to pharmaceutical chemical analysis*. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, 2012: 231–259, 309 – 326, 453 – 476.
30. Aikawa E: Calcific Aortic Valve Disease. *InTech*, 2013: 158.
31. Paxton J: Topics on drug metabolism. *InTech*, 2012: 254.
32. Spooner N: A glowing future for dried blood spot sampling. *Future science* 2010; 2(8): 1341 – 1344.
33. Camag: Dried blood spot extraction system for mass spectrometry.
http://www.camag.com/en/lp/camag_dbs-ms_500.cfm, dostopano avgust 2013.
34. Capiou S, Stove VV, Lambert EW, Stove PC: Prediction of the Hematocrit of Dried Blood Spots via Potassium Measurement on a Routine Clinical Chemistry Analyzer. *Anal Chem* 2013; 85: 404–410.

35. Arora R, Hudson W, Boguszewski P: Effect of Hematocrit on Analyte Quantification Using Dried Blood Spot Technology for Pharmaceutical Bioanalysis. Agilent Technologies Inc. 2013; 1–13.
36. Della Bona ML, Malvagia S, Villanelli F et al: A rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry-based method for measuring propranolol on dried blood spot. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2013; 78 – 79: 34 – 38.
37. Waters corporation: Improving the Cleanliness of DBS Extracts using the Ostro 96-well Sample Preparation Plate and Single Step Method. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004047en.pdf>, dostopano avgust 2013.
38. U.S. Food and Drug Administration: Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>, dostopano april 2013.
39. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003; 75(13): 3019–3030.
40. UNODC: Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. http://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf, dostopano april 2013.
41. Nist sematech: Weighted Least Squares Regression. <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pmd/section1/pmd143.htm>, dostopano maj 2013.
42. Carnegie Mellon University: Extending Linear Regression: Weighted Least Squares, Heteroskedasticity, Local Polynomial Regression. <http://www.stat.cmu.edu/~cshalizi/350/lectures/18/lecture-18.pdf>, dostopano maj 2013.

43. Modhave Y: Matrix Effect in Bioanalysis: An Overview. *Int J Pharm Phytopharmacol Res* 2012; 1(6): 403-405.
44. Kralj E, Trontelj J, Pajič T, Kristl A: Simultaneous measurement of imatinib, nilotinib and dasatinib in dried blood spot by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2012; 903: 150– 156.
45. Toutain PL, Lefebvre HP: Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships for angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J vet Pharmacol Therap* 2004; 27: 515 – 525.
46. De Boer T, Wieling J, Meulman E et al: Application of dried blood spot sampling combined with LC-MS/MS for genotyping and phenotyping of CYP450 enzymes in healthy volunteers. *Biomed Chromatogr* 2011; 25: 1112–1123.
47. Clark GT, Giddens G, Burrows L, Strand C: Utilization of dried blood spots within drug discovery: modification of a standard DiLabw AccuSamplerw to facilitate automatic dried blood spot sampling. *Laboratory Animals* 2011; 45: 124–126.
48. Thomas A, Geyer H, Schänzer W et al: Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer. *Anal Bioanal Chem* 2012; 403: 1279–1289.
49. Lawson G, Cocks E, Tanna S: Bisoprolol, ramipril and simvastatin determination in dried blood spot samples using LC-HRMS for assessing medication adherence. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 81-82: 99-107.
50. Shimadzu Corporation: Separation Conditions1 Fundamentals of a First-Choice Mobile Phase. <http://www.shimadzu.com/an/lcms/support/lib/lctalk/60/60lab.html>, dostopano avgust 2013.