

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ERIK TIČAR

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ERIK TIČAR

**RAZVOJ IN VALIDACIJA METODE ZA
DOLOČANJE REMIFENTANILA V KRVNIH
MADEŽIH POPKOVNIČNE KRVI**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF
METHOD FOR DETERMINATION OF
REMIFENTANIL IN DRIED BLOOD SPOTS OF
UMBILICAL CORD BLOOD**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljal na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm.

ZAHVALA

Končana diplomska naloga v svoji kompleksnosti kar sama kliče po hvaležnosti. Hvaležnost izkazujem vsem, ki so mi v času njenega nastajanja nudili skrb, potrpljenje, podporo in dobro voljo. Posebno hvaležnost izražam doc. dr. Juriju Trontlju, ki mi je s svojimi nasveti in pomočjo omogočil njen nastanek. Zahvala gre tudi doc. dr. Robertu Roškarju. Hvala tudi Alešu Rozmanu, dr. med. za priskrbljene vzorce za raziskavo. Glasna zahvala velja mojim staršem, ki so me s svojo podporo in spodbudami pripeljali do te točke, da iz študenta postajam magister farmacije. Hvaležnost naj zaobjame tudi vse tiste, ki so v času mojega študija z menoj delili nepozabne trenutke.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom doc. dr. Roberta Roškarja, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm.

Erik Tičar

Ljubljana, oktober 2013

Predsednik diplomske komisije:izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič

Član diplomske komisije: doc. dr. Petra Kocbek

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1 LAJŠANJE PORODNE BOLEČINE	1
1.1.1. Nefarmakološke metode	2
1.1.2. Farmakološke metode	3
1.2 REMIFENTANIL	5
1.3 METODA KRVNIH MADEŽEV	9
2. NAMEN DELA	11
3. MATERIALI IN METODE	12
3.1 MATERIALI	12
3.1.1. Standardi	12
3.1.2. Topila, mobilne faze, reagenti	12
3.1.3. Biološki material	13
3.2 LABORATORIJSKA OPREMA	14
3.3 METODE	15
3.3.1. Priprava internega standarda	15
3.3.2. Priprava plazemskih kalibratorjev	15
3.3.3. Priprava DBS	17
3.3.4. Priprava vzorcev QC	18
3.3.5. Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE)	19
3.3.6. Analiza vzorcev	24
3.3.7. Obravnava rezultatov – validacija metode	27
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	33
4.1 TESTIRANJE RAZLIČNIH SPE KARTUŠ	33
4.2 VALIDACIJA DOLOČANJA REMIFENTANILA V OBOGATENI PLAZMI	35
4.2.1. Linearnost	36
4.2.2. Točnost	37
4.2.3. Ponovljivost	38
4.2.4. Spodnja meja kvantifikacije	39
4.2.5. Območje	40
4.3 VALIDACIJA DOLOČANJA REMIFENTANILA V KRVNIH MADEŽIH	40
4.3.1. Linearnost	40
4.3.2. Točnost	42
4.3.3. Ponovljivost	43
4.3.4. Spodnja meja kvantifikacije	44
4.3.5. Območje	45

4.3.6.	<i>Stabilnost</i>	45
4.3.7.	<i>Specifičnost in učinek matrice</i>	46
4.3.8.	<i>Izkoristek</i>	49
4.3.9.	<i>Navzkrižni prenos med vzorci</i>	50
4.4	PRIMERJAVA REZULTATOV VALIDACIJ METOD DOLOČANJA REMIFENTANILA V PLAZMI IN V VZORCIH DBS.....	51
4.5	REALNI BIOLOŠKI VZORCI	51
4.6	RAZPRAVA O USTREZNOSTI RAZVITE METODE GLEDE NA CILJE RAZISKAVE	53
5.	SKLEP	54
6.	LITERATURA	56

POVZETEK

Remifentanil je novejši sintezni opioidni analgetik. Zanimiv je zaradi hitrega nastopa učinka ter izredno kratkega razpolovnega časa. Nespecifične esteraze v krvi in drugih tkivih prepolovijo njegovo koncentracijo v telesu v 3 do 5 minutah. Sprva se je uporabljal kot analgetik za začetek in vzdrževanje splošne anestezije, v zadnjih letih pa se vse pogosteje uporablja za lajšanje porodne bolečine, čeprav za to indikacijo uradno ni registriran. Če njegove plazemske koncentracije presežejo 1 $\mu\text{g/L}$, se začne kazati depresija dihanja, zato je pomembno pravilno odmerjanje učinkovine. Za oceno tveganja in vpliva na plod in novorojenčka, je treba poznati koncentracijo remifentanila v njenem krvnem obtoku. V ta namen smo razvili metodo kvantitativnega določanja remifentanila v krvnih madežih, ki smo jih pridobili na neinvaziven način iz popkovnične krvi. Analiza vzorcev je potekala s tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti povezano s tandemsko masno detekcijo.

V prvem koraku smo z namenom korelacije rezultatov med plazmo in krvjo najprej razvili klasično metodo za določevanje remifentanila v vzorcih plazme. Vzorce smo najprej očistili z ekstrakcijo na trdnem nosilcu, nato smo jih koncentrirali. Na podlagi testiranja različnih načinov ekstrakcije smo se odločili za kartuše z reverznofazno podlago. Glavni cilj diplomskega dela je bil razvoj in validacija metode določanja remifentanila v posušeni krvni madeži, pridobljeni iz le 20 μL krvi. Metoda določanja koncentracije posameznih snovi v krvi iz posušeni krvni madežev je poznana že več desetletij predvsem na področju neonatalne diagnostike, vendar se v zadnjih letih hitro širi in razvija tudi na drugih področjih zaradi manjše invazivnosti ter lažjega shranjevanja in transporta vzorcev. Uspeli smo razviti in validirati metodo, za katero smo dokazali ustrezno točnost, ponovljivost in linearnost v območju med 0,3 - 30 $\mu\text{g/L}$. Hkrati smo dokazali, da je relativni učinek matrice zanemarljiv, zato sklepamo, da je remifentanil primeren za določanje z metodo posušeni krvni madežev. Z razvito metodo smo analizirali vzorec venske krvi porodnice ter arterijski in venski vzorec popkovnične krvi, ki so jih odvzeli v klinični študiji takoj po porodu. Rezultati so potrdili dobro prehodnost remifentanila preko posteljice in njegovo hitro razgradnjo v telesu ploda. Izmerjena koncentracija v krvi porodnice je bila 0,51 $\mu\text{g/L}$, pri novorojenčku pa še približno 20 % nižja, zaradi česar predvidevamo, da ob času poroda nista bila izpostavljena resnim neželenim učinkom remifentanila, ki nastopijo pri koncentracijah nad 1 $\mu\text{g/L}$.

KLJUČNE BESEDE: remifentanil, validacija metode, krvni madež, SPE, LC-MS/MS

ABSTRACT

Remifentanyl is a new synthesized opioid analgesic drug. It is interesting due to the rapid onset of action and extremely short half life. Its concentration in blood and other tissues is halved in 3 to 5 minutes by non-specific esterases. Initially it was used as an analgesic for induction and maintenance of general anaesthesia, in recent years, however, it is increasingly being used to relieve labour pain, although this indication is not officially registered. If its plasma concentration exceeds 1 µg/L, respiratory depression starts to set in, therefore proper dosage is essential. Knowing the remifentanyl concentration in bloodstream is crucial for potential health risk assessment and impact on fetus and a newborn baby. For this reason, we have developed a method for determination of remifentanyl in dry blood spots that were obtained in a non-invasive manner from umbilical cord blood. The analysis of the samples was performed by liquid chromatography coupled with mass detection. In the first step, we have developed a method of determination of remifentanyl in plasma samples. The samples were first cleaned by solid phase extraction and then concentrated. On the basis of testing different methods of extraction, we opted for the cartridge Strata-X, polymeric reversed phase.

The main goal of the thesis was the development and validation of the method for determination of remifentanyl in dry blood spots, obtained from only 20 µL of blood. Method for quantitative determination of individual substances in blood from dried blood spots has been known for several decades, especially in the field of neonatal diagnostics, but in the recent years it has experienced fast development and expanded usage also in other fields due to reduced invasiveness and easier storage and transport of samples. We managed to develop and validate the method for which we demonstrated suitable accuracy, repeatability and linearity within the range between 0.3 – 30 µg/L. At the same time, we demonstrated that the relative matrix effect is negligible, therefore we conclude that remifentanyl is suitable for determination by method of dried blood spots. With the developed method we analyzed the sample of venous blood of mother and samples of arterial and venous umbilical cord blood that were collected during clinical study immediately after birth. The results confirmed a good placental transfer of remifentanyl and its rapid metabolism in the body of the foetus. The measured concentration in the blood of a woman in childbed was 0.51 µg/L and even by about 20 % lower in the blood of a newborn baby, therefore we assume that at the time of birth, they were not exposed to serious unwanted effects of remifentanyl which occur with concentrations of above 1 µg/L.

KEYWORDS: remifentanyl, method validation, dry blood spots, SPE, LC-MS/MS

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

AUM	absolutni učinek matrice
CŽS	centralni živčni sistem
DBS	metoda krvnih madežev (angl. dry blood spots)
DPS	metoda plazemskih madežev (angl. dry plasma spots)
DR	delovna raztopina
IS ₁	interni standard 1
IS ₃	interni standard 3
K	naklon premice
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija povezana s tandemsko masno detekcijo
MCX	mešana kationska izmenjeva (angl. mixed-mode cation exchange)
MRM	multirezidualna analiza (angl. multiple reaction monitoring)
N	odsek na osi y
pKa	negativni logaritem kislinske disociacijske konstante
PCX	polimerna kationska izmenjava (angl. polymeric cation exchange)
PR	primarna raztopina
PMK	pod mejo kvantifikacije
RN	relativna napaka
RO	relativni odziv
RSD	relativna standardna deviacija
QC _{L1}	plazemski kontrolni vzorec z najnižjo koncentracijo
QC _{L2}	plazemski kontrolni vzorec z drugo najnižjo koncentracijo
QC _M	plazemski kontrolni vzorec s srednjo koncentracijo
QC _H	plazemski kontrolni vzorec z najvišjo koncentracijo
QC _S	kontrolni DBS vzorec z najnižjo koncentracijo
QC _{SR}	kontrolni DBS vzorec s srednjo koncentracijo
QC _Z	kontrolni DBS vzorec z najvišjo koncentracijo
SR	sekundarna raztopina
SPE	ekstrakcija na trdni podlagi (angl. solid phase extraction)
VAL	vizualna analogna lestvica
TENS	transkutana električna stimulacija
X	Koncentracija

1. UVOD

1.1 LAJŠANJE PORODNE BOLEČINE

Bolečina je bolj ali manj lokaliziran občutek nelagodja. Pri tem ne gre samo za neprijetno čutno ampak tudi čustveno doživljanje. Povezano je z dejansko ali potencialno okvaro tkiva in navadno predstavlja zaščitni mehanizem ob poškodbi. Samo aktivnost v živčnih poteh, ki posredujejo signale o bolečinskih dražljajih, imenujemo nocicepcija. Bolečina je eden od najpogostejših bolezenskih znakov raznih bolezni. Na pogostost srečevanja ljudi z bolečino kaže tudi velik nabor različnih zdravil, ki posega na to področje in pomaga preprečevati oz. omiliti bolečino. To skupino zdravil imenujemo analgetiki. Njihov cilj je doseči neobčutljivost na bolečinske dražljaje pri ohranjeni zavesti. Pri izbiri analgetika se osredotočimo na vzrok, jakost in vrsto bolečine. Jakost bolečine ocenjujemo z vizualno analogno lestvico (z mednarodno oznako VAL), vrednoteno od 0 do 10, kjer vrednost 0 označuje stanje brez bolečine. Na voljo imamo poleg neopioidnih analgetikov, kamor sodijo med drugim nesteroidni antirevmatiki in paracetamol, tudi opioidne analgetike. Ti so najučinkovitejša zdravila za lajšanje bolečine, saj hkrati povečajo prag za percepcijo bolečine, vplivajo pa tudi na njen čustveni vidik. Delujejo sedativno, vendar pri tem ne povzročijo splošne depresije CŽS in ne spremenijo praga za percepcijo drugih čutilnih vtisov (1, 2).

Bolečina je normalen spremljevalec poroda in jo je potrebno lajšati, ker lahko ovira porod. Bolečino sproža krčenje maternice in pritisk ploda na okolna tkiva ter raztezanje materničnega vratu. Za prvo porodno dobo je značilna visceralna bolečina, ki je slabo lokalizirana in ni ostro omejena. Po popolnem odprtju materničnega vratu sledi druga porodna doba, ko se stopnjuje bolečina zaradi spuščanja ploda v porodni kanal in raztezanja presredka. Ta bolečina je somatska, se hitro prenaša, je ostro omejena in zbadajoča. Občutenje bolečine se med ženskami razlikuje. Eden od pomembnejših dejavnikov je odnos do bolečine, ki so si ga pridobile v življenju. Z zaupanjem v bolnišnično osebje je manjši tudi strah pred porodom, to pa pripomore, da porod poteka pravilneje in hitreje (1, 3).

Večina žensk uporablja vsaj eno od metod za lajšanje porodnih bolečin. Obstajajo številni pristopi lajšanja porodne bolečine. Pri izboru smo podvrženim strogim kriterijem, saj moramo gledati tako na koristi porodnice kot tudi na koristi novorojenčka. Otrok je preko popkovine povezan s posteljico oz. placento, kjer prihaja do izmenjave snovi med materino in otrokovo krvjo. Na ta način skoraj vse učinkovine, z izjemo velikih polarnih molekul, prehajajo v plodov krvni obtok in vplivajo na plod. Obseg in hitrost prehoda sta odvisni od lastnosti učinkovin. Pri izbiri zdravil za lajšanje bolečin je ključnega pomena stopnja vezave na plazemske beljakovine, topnost v maščobah, hitrost presnove in molekulska masa učinkovine (1).

Pristope lajšanja porodne bolečine lahko delimo na nefarmakološke in farmakološke, ki ne vključujejo uporabe zdravil.

1.1.1. Nefarmakološke metode

Nefarmakološke metode so navadno dopolnilo farmakološkemu obvladovanju bolečine. To so različni načini sproščanja in senzorične stimulacije. Porodničnice se trudijo, da bi se porodnica pri njih čim bolj počutila, saj ima sproščenost pomemben vidik pri občutenju bolečine. V določeni meri si lahko porodnica pomaga že sama, saj z umirjenim dihanjem pride v telo in mišice več kisika, kar zmanjša bolečine, hkrati pa je z osredotočenostjo na dihanje manj vznemirjena zaradi bolečin. Med dopolnilne metode sodijo hipnoza, akupunktura, refleksologija in aromaterapija. Med pogosteje uporabljene pomožne metode sodi transkutana električna stimulacija (angl. transcutaneous electrical neurostimulation, TENS), kjer s pomočjo štirih elektrod, ki so nameščene na določenem predelu križa, proizvajamo bifazne električne impulze. TENS naj bi koristil predvsem na začetku poroda, ko so bolečine lokalizirane predvsem v hrbtu. V porodnišnici Ljubljana so v raziskavi ugotovili, da TENS ni pomembneje olajšal porodne bolečine, je pa občutneje zmanjšal uporabo analgetikov (1, 3, 4).

1.1.2. *Farmakološke metode*

Farmakološke načine lajšanja bolečin razdelimo na sistemsko analgezijo in lokalno analgezijo. Za sistemsko analgezijo so na voljo inhalacijski analgetiki. Najpogosteje se uporablja dušikov oksidul, ki je brezbarven nevnetljiv plin, brez vonja. Porodnica med popadki preko maske ali ustnika vdihuje plinsko mešanico, ki je sestavljena iz 50 % kisika in 50 % dušikovega oksidula. Metoda je preprosta, deluje hitro, zaradi izredno kratkega razpolovnega časa (< 3 minute) pa tudi hitro izzveni. Plin ne vpliva na krčenje maternice, hkrati pa plinska mešanica zagotavlja dodaten kisik (1, 4).

Sistemski učinek prinašajo tudi intravensko vneseni opioidni analgetiki. Ti delujejo na opioidnih receptorjih, ki posredujejo tri vrste učinkov:

- Preko proteina G inhibirajo pot adenilat ciklaze
- Odpirajo kalijeve kanalčke
- Zavirajo odpiranje napetostnih kalcijevih kanalčkov

S tem se zmanjša živčna vzdraženost in zavre izločanje živčnih prenašalcev. Slaba stran opioidov je, da lahko povzročijo slabost in zaspanost. Zaspanost pri otroku se lahko kaže s slabšim pričetkom dojenja. Poleg tega povzročajo depresijo dihalnega centra matere in ploda. Včasih to pomeni, da je potrebno žensko dodatno spodbujati, da globlje in hitreje diha, v določenih primerih pa je potrebna kisikova obrazna maska. Večja koncentracija opioidov v novorojenčkovem krvnem obtoku lahko podaljša njegov čas do prvega vdiha. Če se odmerek aplicira tik pred porodom, je njegov učinek na otroka zelo majhen. Opioidi učinkujejo tudi na gastrointestinalni trakt. Povzročajo zaprtje in upočasnjujejo praznjenje želodca. To lahko povzroči težavo, če pride do potrebe po splošni anesteziji, ko lahko vsebina želodca zaradi okrnjenih obrambnih refleksov zaide v pljuča. Tveganje za potencialne zaplete je odvisno predvsem od koncentracije opioidnega analgetika v krvi in od razpolovnega časa učinkovine. V izogib potencialnim neželenim učinkom se trend uporabe zato nagiba vse bolj proti krajše delujočim opioidnim analgetikom (1, 4).

V Sloveniji se največ uporablja petidin. Ima dober analgetični učinek, ki se ob intravenski aplikaciji pojavi po 5 minutah. Zaradi relativno dolgega razpolovnega časa se plazemska

koncentracija pri materi razpolovi po 2,5 do 3 urah, pri otroku pa šele po 18 do 23 urah. Med njegovo presnovo v jetrih nastaja tudi normeperidin, ki ima močan zaviralni učinek na dihanje. V uporabi je tudi fentanil, ki je po jakosti približno 800-krat močnejši od petidina. Njegov razpolovni čas je bistveno krajši, saj učinek izzveni po 30 do 60 minutah (1). V nekaterih porodnišnicah v Sloveniji je v uporabi novejši ultrakratko delujoč sintetični opioidni analgetik remifentanil (4).

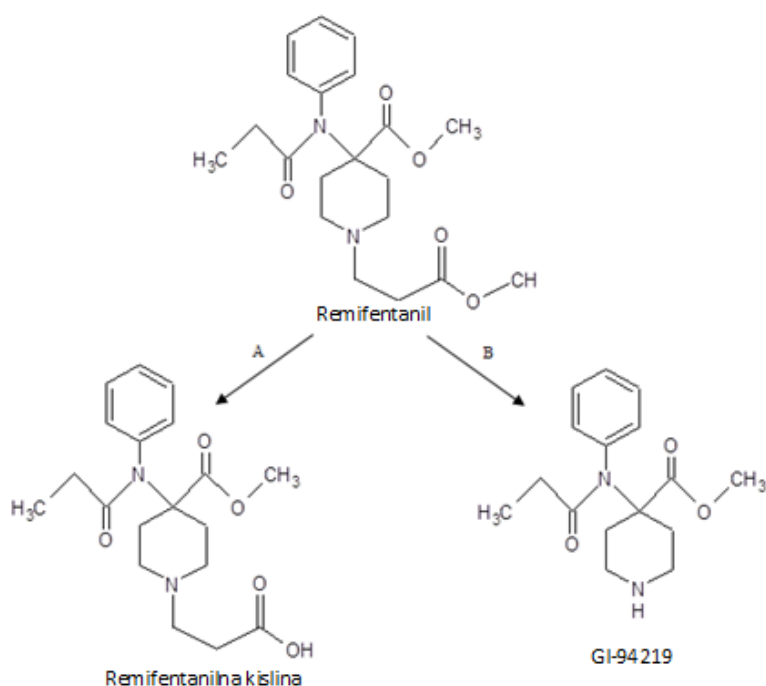
Lokalna analgezija ima nekaj prednosti pred sistemsko. Zaradi manjšega tveganja za zaplete z dihanjem se v veliki meri uporablja pri carskih rezih. Z injiciranjem lokalnih anestetikov se doseže blokado prevajanja senzornih impulzov iz periferije v centralno živčevje. Lokalni anestetiki imajo zelo malo neposrednega vpliva na plodov utrip. Pri uporabi lokalnih anestetikov poznamo glede na mesto apliciranja zdravila dve metodi ter tudi njuno kombinacijo. Bolj pogosto uporabljena je epiduralna analgezija. Kot ime pove, anesteziolog analgezijo doseže z apliciranjem zdravila v epiduralni prostor v spodnjem delu hrbta. Anesteziolog namesti kateter, ki omogoča neprekinjeno infuzijo lokalnega anestetika, ki se lahko kombinira tudi z opioidom. Najpogosteje uporabljeni lokalni anestetiki so: levobupivakain, ropivakain in bupivakain. Slabost te metode je dolgotrajen čas do pričetka delovanja, ki vključujoč namestitev katetra, lahko traja tudi 40 minut. Hitrejši učinek lokalnega anestetika dosežejo s spinalno (subarahnoidno) analgezijo, ko bolusno injekcijo apliciramo neposredno v tekočino, ki obdaja hrbtenične živce (4). Metoda se redkeje uporablja zaradi večje možnosti za popunkcijski glavobol (1). Epiduralna in subarahnoidna analgezija sta najbolj učinkoviti metodi, ki pa sta hkrati tudi najbolj zahtevni, tako da ju izvajajo anesteziologi. Epiduralna analgezija prinaša tudi določena tveganja. Z njeno uporabo se običajno podaljša trajanje druge porodne dobe, hkrati pa se približno podvoji verjetnost, da si je pri porodu potrebno pomagati z vakuumom ali porodničarskimi kleščami (4, 5). Prehajanje lokalnih anestetikov v centralni živčni sistem in kardiovaskularni sistem (npr. nehoteno znotraj žilno vbrizganje) lahko povzroči vrtoglavico, zaspanost, slabost ter zmanjšano kontrakcijo in prevodnost srca (1). Delež porodov pri katerih je uporabljena epiduralna analgezija se med slovenskimi porodnišnicah precej razlikuje in je v letu 2006 znašal med 4 in 29 %. V nekaterih porodnišnicah epiduralne analgezije ne izvajajo (6).

1.2 REMIFENTANIL

Remifentanil je novejši sintezni μ -selektivni opioidni agonist (7). Je analog fentanila in je bil v ZDA registriran leta 1996 za souporabo pri splošni anesteziji (8). Danes se tako uporablja predvsem za zagotavljanje analgezije pri anesteziji ter za zagotavljanje analgezije in sedacije pri bolnikih na intenzivni negi, ki so umetno ventilirani (9).

Njegova posebnost sta predvsem hiter nastop učinka ob intravenski aplikaciji in izredno kratek razpolovni čas. Maksimalen učinek lahko pričakujemo že po dobri minuti, medtem ko znaša razpolovni čas med 3-5 minutami in ni odvisen od trajanja infuzije. Ta je v povezavi s precejšnjim očistkom, ki pri zdravih osebah znaša približno 40 mL/min/kg (9-11). Njegov volumen distribucije je dokaj majhen in znaša okrog 0,39 L/kg. Presnova poteka s cepitvijo estra, ki jo sprožijo nespecifične esteraze v krvi in drugih tkivih (12). S cepitvijo metilnega estra nastane remifentanilna kislina, ki je glavni metabolit in se izloča iz telesa v večinski meri preko ledvic, deloma pa tudi s fecesom (slika 1) (13, 14). Z nastankom metabolita učinek takoj izzveni, saj ima v primerjavi z remifentanilom 4600-krat manjšo aktivnost (7). To je velika prednost, saj si pacienti po posegu, ki ga lajšajo z omenjeno učinkovino, veliko hitreje opomorejo. Razpolovna doba primarnega metabolita znaša pri ljudeh z zdravo ledvično funkcijo okrog dve uri (9).

Od ostalih lastnosti remifentanila velja omeniti dokaj dobro topnost v maščobah (porazdelitveni koeficient oktanol/voda znaša pri fiziološkem pH-ju 19,9) in visoko vezavo na plazemske proteine (70-80 %), večinoma α_1 kisle glikoproteine. Remifentanil sodi med šibke baze. Učinkovina se v zdravih nahaja v obliki remifentanilijevega klorida. Vrednost pKa (7,1), je malenkost nižja od vrednosti fiziološkega pH-ja, zato v telesu nekoliko prevladuje neionizirana oblika (8-10). Dobro se porazdeljuje po vseh tkivih (15). Ta značilnost je skupaj z zadovoljivo topnostjo v maščobah glavni razlog za hiter nastop učinka.



Slika 1. Metabolizem remifentanila poteka večinoma v smeri A le v manjši meri po poti B (prirejeno po viru 8).

Slabosti remifentanila se nanašajo predvsem na njegovo aplikacijo, saj je potrebna stalna infuzija, ki jo pripravimo z raztapljanjem liofiliziranega praška, ki vsebuje učinkovino in pomožne snovi. Vsakršna motnja pri dostavi učinkovine vodi v hitro izgubo analgetičnih in anestetičnih učinkov. Manjšo težavo predstavlja tudi prehod na dolgodelujoč opioidni analgetik za lajšanje postoperativne bolečine, saj se ob kombiniranju lahko pojavi depresija dihanja (14).

Remifentanil ima podobne neželene učinke, kot jih imajo drugi opioidni analgetiki. Najpogosteje se pojavlja otrplost skeletnih mišic ($\geq 1/10$), bradikardija ($\geq 1/100$ do $< 1/10$), hipotenzija ($\geq 1/10$), slabost in bruhanje ($\geq 1/10$) ter akutna depresija dihanja ($\geq 1/100$ do $< 1/10$) (9). Mejna koncentracija za pojav neželenih učinkov je zelo odvisna od načina aplikacije. Najvarnejši način aplikacije je infuzija. Bolusnim odmerkom se izogibamo, saj se lahko pojavi nevarna depresija dihanja in padeč oksigeniranosti krvi. Infuzija je primernejša, saj se koncentracija v krvi postopno povečuje, zato se kompenzacijski mehanizmi v telesu lahko vzpostavijo ter stimulirajo dihanje in s tem preprečijo večji padeč delnega tlaka kisika v krvi. Opazili so, da koncentracije, ki jih brez težav dosežemo z infuzijo, po bolusni injekciji povzročijo opazno hipoventilacijo (16).

Uporaba remifentanila je priljubljena predvsem za krajše boleče posege, saj pacient zelo hitro okreva in je lahko odpuščen domov že nekaj minut po posegu. Kljub vsemu pa je uporaba propofola vseeno pogostejša, saj je manjša možnost za zaplete (npr. bruhanje, depresija dihanja) in se hitreje doseže stabilno stanje, ki je primerno za poseg (17). Njegova uporaba se širi na področje lajšanja porodnih bolečin. Pri uporabi analgetik apliciramo preko posebne črpalke z zunanjim sprožilcem, ki ga deloma lahko upravlja kar porodnica sama in si prilagaja odmerek. Metodo zato imenujemo tudi Remi-PCA (angl. remifentanil patient-controlled analgesia). V ta namen je bilo narejenih že precej študij in zbranih mnogo ugotovitev. V letu 2005 so se na kolegiju slovenskih anesteziologov dogovorili za izvedbo vseslovenske študije uporabe remifentanila (Ultive[®]) med porodom, zato je bil postavljen protokol in pridobljena odobritev etične komisije. V Ptujski porodnišnici so bili med prvimi, ki so aktivneje začeli raziskavo. Anketa med porodnicami je pokazala odobravanje nove metode, saj jih je bilo 54 % zelo zadovoljnih, 45 % zadovoljnih in samo 2 % nezadovoljnih. Metoda se je izkazala za varno, saj razen zaspanosti in nekoliko podaljšanja trajanja porodov, niso opazili drugih resnejših neželenih učinkov. Pri uvajanju novosti so opazili tudi nekaj začetnih težav, ki pa so bili v večji meri povezane s pomanjkanjem jasnih smernic. Pri uporabi remifentanila je moral biti vključen tudi anesteziolog, kar je drugače kot pri ostalih rutinsko uporabljenih intravenskih opioidnih analgetikih (18).

Italijanski raziskovalci so v študiji, ki je vključevala 205 udeleženk, prišli do podobnih zaključkov kot v Ptujski porodnišnici. Porodnice so bile v 87,3 % zadovoljne ali zelo zadovoljne z uporabljenim analgetikom. Porodnicam so povečevali hitrost infuzije, dokler bolečine niso ocenile pod stopnjo 4 na 10 stopenjski lestvici. Infuzijska hitrost pri udeleženkah v raziskavi je bila tako med 0,025 in 0,150 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$. V nobenem primeru ni bilo potrebno zmanjšanje hitrosti infuzije zaradi neželenih učinkov (10).

V slovenskih porodnišnicah je opazen trend povečevanja povpraševanja po porodni analgeziji. V obdobju med leti 2002 in 2006 si je povprečno 40 % slovenskih porodnic lajšalo bolečine med porodom z enim od intravenskih analgetikov. V Sloveniji se najpogosteje uporabljata petidin ali fentanil, ki pa imata precej daljši razpolovni čas in precej neželenih učinkov, zato pri nekaterih anesteziologih nista posebej priljubljena.

Povečuje se tudi uporaba epiduralne analgezije, za katero so se porodnice Bolnišnice Postojna v letu 2008 odločile v slabih 38 % (6).

Ena od prednosti uporabe remifentanila je tudi, da ne zmanjšuje zgolj bolečine, temveč tudi strah in zaskrbljenost porodnice, kar pomembno vpliva na samo občutenje bolečine in porodnici izboljša izkušnjo poroda (8). Precejšna lipofilnost je verjetno tudi vzrok za dobro prehajanje remifentanila preko posteljice. V povprečju naj bi bila njegova koncentracija v venski popkovnični krvi okrog 12 % nižja kot v arterijski materini krvi. V popkovnici so funkcije arterije in vene ravno obrnjene. Oksigenirana kri s hranili priteka iz posteljice v plod po popkovni veni, s kisikom nenasičena kri pa se vrača po dveh popkovnih arterijah (19). Učinkovina se tudi pri novorojenčku dobro presnavlja. V povprečju je njena koncentracija v arterijski krvi zgolj 29 % koncentracije, ki je v popkovnični venski krvi. Posebnost remifentanila je, da je njegov metabolizem neodvisen od ledvične in jetrne funkcije (20). To je velika prednost za zdravstvene delavce, saj bolnikom z jetrnimi ali ledvičnimi okvarami ni potrebno prilagajati odmerka. Pri ledvičnih bolnikih je pričakovano opazno nalaganje kislinskega metabolita, vendar tudi ob večdnevni stalni infuziji ni opaziti podaljšanja učinkov, ki so vezani na μ -opioidne receptorje (9, 13). Prav tako tudi spol in povečana telesna masa nimata pomembnejšega vpliva na farmakokinetiko remifentanila (8).

Plazemske koncentracije okrog 1 ng/mL že lahko povzročijo pojav depresije dihanja, ko pa koncentracije presežejo 3 ng/mL, lahko postane dihanje neredno z občasnimi obdobji apneje (21). Ob močnem predoziranju je rešitev aplikacija opioidnega antagonista (npr. naloksona). Povečanje infuzijskega pretoka za $0,1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ posledično pomeni porast koncentracije remifentanila v krvi za 2,5 ng/mL (9). V izogib zapletom se remifentanil uporablja le ob prisotnosti anesteziologa. Ustreznost terapije se ves čas spremlja z merjenjem oksigeniranosti krvi matere, z nadzorovanjem frekvence dihanja ter spremljanjem srčnega utripa matere in plodu. Po pričetku zadnje faze poroda, ko poteka iztis otroka, se prekine dovajanje remifentanila.

1.3 METODA KRVNIH MADEŽEV

Metoda določanja vsebnosti posameznih snovi v krvi iz posušenih krvnih madežev (angl. dry blood spots oz. DBS) je poznana že več desetletij. Občutno povečanje njene uporabe v predkliničnih in kliničnih študijah je doživela v zadnjih nekaj letih na račun tehnološkega razvoja analiznih instrumentov, ki so sedaj sposobni določiti koncentracije iz mikroliterskih vzorcev krvi (22, 23).

Posušeni krvni madeži so posamezne kapljice krvi, ki jih nanese na posebne lističe ter posušimo na zraku. Z obdelavo in analizo s tekočinsko kromatografijo povezano s tandemsko masno detekcijo (LC-MS/MS) lahko kvantitativno določamo številne manjše molekule. DBS metoda zahteva zelo majhne količine krvi, zato zadostuje za pripravo vzorcev že vbod v peto ali prst. Metoda je še posebej primerna za analize krvi novorojenčkov, otrok in malih živali ter za paciente, ki potrebujejo pogostejše analize krvi. Testiranje novorojenčkov na presnovne bolezni je eno od področij, kjer se metoda zelo pogosto uporablja (24). Poleg manjše invazivnosti ima ta metoda še nekaj drugih prednosti pred običajnimi vzorci. Potrebna je manjša obdelava vzorcev, lažje je shranjevanje in transport vzorcev, saj jih ni potrebno shranjevati zamrznjenih na suhem ledu, kar pa hkrati pomeni tudi zmanjšanje stroškov. V primerjavi s klasičnimi vzorci je manjša možnost za prenos okužb (npr. HIV). Manjši volumni krvi, ki zadostujejo za pripravo vzorcev, omogočajo njen večkratni odvzem pri posameznem malem glodalcu. Predklinične farmakokinetične in toksikološke študije zato lahko izvedemo na manjšem številu živali (22-24).

DBS metoda zahteva občutljivejše naprave, slaba stran pa so številne dodatne zahteve za razvoj in validacijo metode. Zaenkrat je metoda razvita že za preko 100 različnih analitov (25). Za samo analizo ponavadi ne uporabimo celotnega krvnega madeža, pač pa se iz njegove sredine s pečatom izluknja krog s točno določenim premerom. Pogoj za primerljive meritve je zato homogenost vzorcev. Ti morajo biti pripravljene po standardiziranem postopku, zato je potrebna dobra usposobljenost zdravstvenega osebja. Očiščeno mesto se prebode z lanceto. Prvo kapljo krvi se obriše z gazo. Po oblikovanju

nove kaplje približamo listič in pustimo, da se kri absorbira vanj (slika 2). Pri tem ne sme priti do neposrednega stika med papirjem in kožo pacienta (25). V idealnem primeru lahko tako pridobljene posušene vzorce neposredno nanesimo na avtomatizirano napravo, kjer analit ekstrahiramo in določimo njegova koncentracijo.



Slika 2. Priprava DBS vzorcev z nanosom kapljic krvi na označena mesta Whatman kartice.

DBS metoda kljub vsemu ni primerna za analizo vseh spojin. Pojavlja se kar nekaj pomislekov o primerljivosti rezultatov klasičnih meritev in meritev DBS vzorcev. Pri DBS metodi vensko kri nadomestijo vzorci kapilarne krvi, ki je mešanica arterijske in venske krvi. Meritve navadno ne dajejo enakih rezultatov, saj se analiti različno porazdeljujejo med plazmo in eritrociti. Obema je skupno, da rezultati skoraj vedno predstavljajo vsoto vezane in nevezane učinkovine (23). Pri DBS metodi na končne rezultate vpliva precej več spremenljivk. Primer je hematokrit, ki poleg materiala lističev vpliva na oblikovanje, velikost, čas sušenja ter homogenost madežev (26). Hematokrit je pomemben dejavnik pri analitih, ki ne vstopajo v eritrocite, saj po hemolizi vzorcev prihaja do redčenja le-teh. Pomembna dejavnika sta tudi delež nevezane frakcije v plazmi in razmerje koncentracij učinkovine v krvnih celicah v primerjavi s plazmo (23). V odvisnosti od kombinacije omenjenih dejavnikov imajo DBS vzorci v nekaterih primerih prednost, v drugih pa slabost v primerjavi z običajnimi vzorci. Posebej primerna je, kadar želimo izvedeti koncentracijo analita v polni krvi. Prednost ima tudi v večini primerov, kadar se učinkovina v večji meri zadržuje v eritrocitih, saj takrat že najmanjša hemoliza lahko precej spremeni izmerjeno koncentracijo v plazmi (23).

2. NAMEN DELA

Remifentanil je novejši ultrakratko delujoči opioidni analgetik. Že vrsto let se uporablja v kombinacijah z različnimi učinkovinami pri anesteziji, v zadnjem času pa je bilo narejenih kar nekaj raziskav o njegovi uporabi za lajšanje bolečin pri porodih. Ponuja se vprašanje, če je njegova uporaba varna, saj ima dokaj ozko terapevtsko območje in v višjih koncentracijah povzroča depresijo dihanja. To nas zanima predvsem iz stališča novorojenčka, ki ga želimo v največji meri zavarovati pred vsakim tveganjem.

Namen naloge je razviti metodo, s katero bo mogoče določiti koncentracijo remifentanila v krvi iz posušenih krvnih madežev, ki so bili pripravljene ob porodu iz kapljic popkovnične krvi in iz krvi porodnice. Vzorci so bili odvzeti v okviru odobrene klinične raziskave, pri kateri se ocenjuje učinkovitost in varnost uporabe remifentanila. Najprej bomo razvili način ekstrakcije, ki bo omogočil, da bomo brez večjih izgub iz krvnih madežev pridobili čim bolj čiste vzorce. Slednje bomo čistili in hkrati koncentrirali z optimizirano metodo ekstrakcije na trdnem nosilcu ter jih injicirali na tekočinski kromatograf ultra visoke ločljivosti povezan z masnim detektorjem vrste trojni kvadrupol. Metodo ekstrakcije na trdnem nosilcu bomo izbrali po preizkusu različnih kartuš večjih proizvajalcev.

Metodo bomo najprej optimizirali za ekstrakcijo remifentanila iz krvne plazme, saj je delo z njo enostavnejše v primerjavi s krvjo, ker je lažje dostopna in bolj stabilna, hkrati pa nudi zaradi večjega volumna vzorca tudi boljšo občutljivost metode. Po izboru najustrežnejšega načina ekstrakcije bomo metodo optimizirali za vzorce krvnih madežev in jo validirali po smernicah ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA), kjer bomo predvsem preverili območje linearnosti, točnost, natančnost, mejo zaznave, stabilnost ter učinek matrice. Posebno pozornost bomo namenili doseganju čim večje občutljivosti metode, saj pričakujemo koncentracije remifentanila v bioloških vzorcih okrog ali celo pod 1 ng/mL. Razvita metoda bo ključna za izvedbo študije učinkovitosti in varnosti novega protokola odmerjanja remifentanila pri porodu. Dobljeni rezultati koncentracije remifentanila v krvi novorojencev bodo poleg pri porodu izmerjenih fizioloških parametrov bistveni za oceno varnosti novega protokola analgetične terapije.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1. Standardi

STANDARDI	PROIZVAJALEC
Remifentanil ¹³C₆ klorid (M = 418,86 g/mol)	Toronto research chemicals, Toronto, ON, Kanada
Remifentanil klorid (M = 412,91 g/mol)	Toronto research chemicals, Toronto, ON, Kanada

3.1.2. Topila, mobilne faze, reagenti

TOPILA, REAGENTI	PROIZVAJALEC
Metanol (≥ 99,9 %), ChromasolV[®]	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, ZDA
Mravljinčna kislina (> 85 %)	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
Acetonitril (≥ 99,9 %), ChromasolV[®]	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, ZDA
Ortofosforna kislina (85 %)	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
Ultračista voda – miliQ voda	pridobljena z aparatom Mili Q – Advantage A10, Millipore Corp., Billerica, MA, ZDA
Citronska kislina monohidrat (99,5 – 100,5 %)	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija

V LABORATORIJU PRIPRAVLJENA TOPILA	KONCENTRACIJA oz. SESTAVA PRIPRAVLJENIH TOPIL
topilo T1	5 % (25 % vodna raztopina amoniaka) 95 % (acetonitril / metanol = 1 / 1)
vodne raztopine mravljinčne kisline	0,05 %, 0,1 %, 1 %, 2 %, 4 %
vodna raztopina fosforne kisline	2 %, 4 %
raztopina mravljinčne kisline v acetonitrilu	1 % mravljinčne kisline
raztopina amoniaka v organskem topilu	5 % raztopina amoniaka v organskem topilu (iz 60 % acetonitrila in 40 % metanola)
metanola in 2 % vodne raztopine mravljinčne kisline	v razmerju 1 / 1
metanol v vodi	10 %, 20 %
raztopina citronske kisline	50 ut%
topilo za rekonstitucijo	10 % acetonitril 90 % (0,1 % vodna raztopina mravljinčne kisline)
Mobilna faza LC	0,1 % vodna raztopina mravljinčne kisline 100 % acetonitril (podrobnosti v poglavju 3.3.6)

Če ni drugače označeno, enote pomenijo volumske %.

3.1.3. *Biološki material*

Plazma – odvzem 2. 3. 2012

Polna kri – pridobljena iz ostankov krvi po rednih hematoloških testih zdravih preiskovancev iz hematološkega laboratorija UKC Ljubljana (odobritev Komisije za medicinsko etiko RS št.: 77/1/07).

Realni biološki DBS vzorci – Bolnišnica za ginekologijo in porodništvo Kranj

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

SPE KARTUŠE	PROIZVAJALEC
Ostro® 96-well Plate, 25 mg	Waters, Milford, MA, ZDA
Oasis® MCX μElution Plate, 30 μm	Waters, Milford, MA, ZDA
Bond Elut 96 Plexa PCX	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, ZDA
Supelco HybridSPE™ Phospholipid Precipitation, 50 mg / 96 Wellplate	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, ZDA
Strata-X, 33 μm Polymeric Reversed Phase, 60 mg / 3 mL	Phenomenex, Torrance, CA, ZDA
LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Lističi Whatman 903	GE Healthcare Bio-sciences corp., Piscataway, NJ, ZDA
TurboVap® 96	Caliper Life Sciences, Inc., Hopkinton, MA, ZDA
TurboVap® LV	Caliper Life Sciences, Inc., Hopkinton, MA, ZDA
Stresalnik – Vortemp 56 EVC	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mešalnik (Vortex) – Vibromix 10	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Programska oprema Masshunter	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, ZDA
UHPLC v povezavi z MS/MS – 6460 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, ZDA
Oljna vakuumska črpalka – Gast DOA-P504-BN	Gast, ZDA
Centrifuga – Centrifuge 5415®	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Ultrazvočna kadička-Sonis 4	Iskra Pio,d.o.o., Šentjernej, Slovenija
Pipete – 2-20 μL, 20-200 μL, 100- 1000 μL, 500-5000 μL	Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija

Hladilnik (3 °C) z zmrzovalnikom (-20 °C)	Gorenje, Velenje, Slovenija
Zmrzovalnik (-80 °C)	Sanyo electric biomedical, Osaka, Japonska
Plastične epruvete oz. mikrocentrifugirke	Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija
Tehtnica	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
Škarje	
Sušilno sredstvo	
Inserti za vialo	

3.3 METODE

3.3.1. Priprava internega standarda

V vialo z 1 mg internega standarda (označenega s ^{13}C) smo prenesli 1 mL metanola in vzorec raztopili. 100 μL tako pripravljene raztopine smo odpipetirali iz originalnega vsebnika v 100 mL bučko. Vanjo smo dodali 25 mL metanola, premešali vsebino in jo dopolnili z 0,1 % mravljinčno kislino do oznake. Interni standard (IS_1) smo razdelili v falkonke in ga zamrznili na $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Za pripravo vzorcev smo uporabljali 200-krat razredčeno (IS_3) osnovno raztopino internega standarda (IS_1), ki smo ga redčili z 0,1 % mravljinčno kislino.

3.3.2. Priprava plazemskih kalibratorjev

Plazemski kalibratorji so vzorci z različnimi poznanimi koncentracijami preiskovane spojine, ki jih uporabimo za konstruiranje umeritvene premice. Lahko jih pripravimo iz standardov z znano vsebnostjo preiskovane spojine, v našem primeru pa smo jih pripravili iz ampule Ultive. Ultiva je farmacevtski izdelek, ki vsebuje remifentanil in je na voljo na slovenskem tržišču. Liofilizat Ultive je bil raztopljen in v začetku leta 2012 sta bili pripravljene raztopini:

Primarna osnovna raztopina (PR) = 2000 µg/L

Sekundarna osnovna raztopina (SR) = 20 µg/L

Postopek:

Najprej smo pripravili delovne raztopine. To so bile različno koncentrirane raztopine remifentanila, pripravljene z redčitvijo raztopine PR oz. SR z 0,1 % mravljinčno kislino. Rahlo nakisanje raztopine poveča stabilnost remifentanila, hkrati pa se zaradi pozitivne nabitosti aminske skupine in posledične boljše ionizacije v manjši meri veže na plastiko. Delovne raztopine so vsebovale 20-krat večjo koncentracijo učinkovine od želenih kalibratorjev. Za pripravo delovne raztopine smo v 2 mL mikrocentrifugirko odpipetirali primeren volumen primarne oz. sekundarne raztopine remifentanila ter jo dopolnili s topilom. Z redčitvijo osnovne raztopine smo pripravili po 1 mL posamezne delovne raztopine. Le te smo shranili zamrznjene na -20 °C v zmrzovalniku in jih po potrebi odtalili tik pred uporabo. Uporabljeni volumni primarne oz. sekundarne raztopine ter topila za razredčevanje so prikazani v preglednici I.

Pred pripravo plazemskih kalibratorjev smo odtalili plazmo na zraku ali pod mlačno vodo. V mikrocentrifugirke smo odmerili po 930 µL plazme in dodali 20 µL 50 % citronske kisline. Mikrocentrifugirke smo na kratko premešali. Dodana citronska kislina prepreči delovanje plazemskih encimov, ki bi lahko cepili esterske skupine remifentanila. Prevelika količina citronske kisline bi povzročila koagulacijo proteinov. Na koncu smo v mikrocentrifugirke dodali 50 µL delovne raztopine in jih eno minuto mešali na orbitalnem mešalniku.

Tako pripravljene plazemske kalibratorje smo shranili v zmrzovalniku na -20 °C. Še pred tem smo pripravili nekaj vzorcev DPS (plazemskih madežev, angl. dried plasma spots). Na lističe Whatman smo nanесли na označena mesta 20 µL kapljice pripravljenih kalibratorjev (zaporedne številke kalibratorjev: 5, 8, 9, 10, 11). Lističe smo pustili 2 uri na zraku, da so se posušili. Nato smo vzorce uporabili za testiranje plošč, ki smo jih imeli na voljo za izvedbo ekstrakcije na trdnem nosilcu.

Preglednica I. Preglednica volumnov primarne oz. sekundarne raztopine ter volumna 0,1 % mravljinčne kisline, uporabljene za pripravo delovnih raztopin. Posamezna vrstica podaja informacije za posamezen kalibrator. Delovna raztopina je pripravljena iz ustreznih volumnov 0,1 % mravljinčne kisline in primarne oz. sekundarne raztopine. Koncentracije delovnih raztopin (DR) so 20-krat večje od koncentracij kalibratorja, saj pri pripravi le-tega pride do 20-kratne redčitve.

Zaporedna številka kalibratorja	Zaželena konc. kalibratorja [$\mu\text{g/L}$]	Zaželena konc. DR [$\mu\text{g/L}$]	Volumen PR [μL]	Volumen SR [μL]	Volumen 0,1 % mravljinčne kisline [μL]
0	0	0	/	0	1000
1	0,01	0,2	/	10	990
2	0,02	0,4	/	20	980
3	0,05	1	/	50	950
4	0,1	2	/	100	900
5	0,2	4	/	200	800
6	0,3	6	/	300	700
7	0,4	8	/	400	600
8	0,5	10	/	500	500
9	1	20	/	1000	0
10	5	100	50	/	950
11	10	200	100	/	900
12	40	800	400	/	600

3.3.3. Priprava DBS

Postopek priprave vzorcev DBS je bil podoben pripravi vzorcev DPS. V tem primeru namesto plazme uporabimo kri. Ta ne sme biti starejša kot 24 ur. Odvzeta je v vakuumske epruvete z antikoagulantom EDTA.

Postopek:

Najprej smo darovalčevo kri homogenizirali, tako da smo jo deset sekund mešali na vibracijskem mešalniku. Ker kri med postopkom priprave kalibratorjev in nanosa na papirnate lističe začne dokaj hitro koagulirati, smo vzporedno pripravljali največ po štiri koncentracije vzorcev. Najprej smo v mikrocentrifugirke odpipetirali 465 μL krvi. Nato smo dodali 10 μL 50 % citronske kisline in zmes 15 sekund mešali. Kalibrator je bil pripravljen po dodatku 25 μL delovnega standarda (preglednica II). Mikrocentrifugirke

smo eno minuto mešali na vibracijskem mešalniku, da se je vsebina homogeno premešala in se je učinkovina porazdelila tudi v krvne celice. Na Whatman lističe smo nanegli 20 μL kapljice tako pripravljenih vzorcev, lističe označili in jih posušili preko noči na zraku. Naslednji dan smo lističe shranili v plastične vrečke, v katere smo dodali sušilno sredstvo (silikagel). Tako zapakirane vzorce smo shranili v temi na sobni temperaturi.

Preglednica II. Uporabljeni volumni osnovnih raztopin pri pripravi delovnih raztopin. Te delovne raztopine smo uporabili pri pripravi DBS kalibratorjev.

Zaporedna številka kalibratorja	Zaželena konc. kalibratorja [$\mu\text{g/L}$]	Zaželena konc. DR [$\mu\text{g/L}$]	volumen PR [μL]	volumen SR [μL]	volumen 0,1 % formične kisline [μL]
0	0	0	/	0	1000
1	0,01	0,2	/	10	990
2	0,02	0,4	/	20	980
3	0,05	1	/	50	950
4	0,1	2	/	100	900
5	0,2	4	/	200	800
6	0,3	6	/	300	700
7	0,4	8	/	400	600
8	0,5	10	/	500	500
9	1	20	/	1000	0
10	2	40	20	/	980
11	5	100	50	/	950
12	10	200	100	/	900
13	20	400	200	/	800
14	40	800	400	/	600

3.3.4. Priprava vzorcev QC

Kontrolni vzorci so namenjeni preverjanju zanesljivosti meritev preko izračuna nekaterih specifikacij, kot sta točnost in ponovljivost meritev. Za pripravo teh vzorcev je potrebno izhajati iz druge zatehte preiskovane spojine kot pri pripravi vzorcev za umeritveno premico. Ker nismo imeli standarda s točno poznano maso remifentanila, smo za pripravo osnovne raztopine uporabili novo ampulo analgetika Ultive. Vsebnost remifentanila v sveže pripravljene raztopine smo smatrali kot točno oz. v skladu s signirano vrednostjo na ampuli. To trditev je potrebno postaviti v okvir proizvajalčeve registrirane limite vsebnosti, ki pa lahko dovoljuje večprocentno odstopanje.

Postopek:

Liofilizat, ki je vseboval 1 mg učinkovine, smo raztopili v 1 mL 0,05 % mravljinčne kisline. 100 μ L raztopine smo prenesli v 100 mL bučko, ki smo jo dopolnili do oznake z 0,1 % raztopino mravljinčne kisline in tako dobili raztopino s koncentracijo 1 mg/L, ki smo jo shranili zamrznjeno na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z nadaljnjim razredčevanjem te osnovne raztopine z 0,1 % mravljinčno kislino smo dobili redčitve, ki smo jih uporabili za pripravo tako plazemskih QC vzorcev kot tudi kontrolnih DBS vzorcev. Priprava vsakega od teh vzorcev je sledila postopku, ki je opisan pri pripravi kalibracijskih vzorcev, uporabljenih za konstruiranje umeritvene premice.

Koncentracije QC vzorcev plazme:

$$QC_{L1} = 0,15\ \mu\text{g/L}$$

$$QC_{L2} = 1,50\ \mu\text{g/L}$$

$$QC_M = 15\ \mu\text{g/L}$$

$$QC_H = 30\ \mu\text{g/L}$$

Koncentracije QC vzorcev DBS:

$$QC_S = 1\ \mu\text{g/L}$$

$$QC_{SR} = 15\ \mu\text{g/L}$$

$$QC_Z = 30\ \mu\text{g/L}$$

3.3.5. *Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE)*

To je eden od načinov ločevanja analita od nečistot, pri čemer izkoriščamo različno afiniteto spojin v vzorcu do adsorbenta. Po nanosu vzorca najprej spiramo šibkeje vezane nečistote. V naslednjem koraku z močnejšim topilom izperemo z adsorbenta naš analit. Pri metodi ekstrakcije na trdnem nosilcu uporabljamo kolone, ki imajo obliko injekcijske brizge ter jih poimenujemo kartuše. Te se razlikujejo glede na tip adsorbenta. Adsorbente razdelimo glede na tip interakcije, ki jo tvorijo z analiti. Ločimo: normalno-fazne, reverzno-fazne, ionsko-izmenjevalne (anionske in kationske) ter kombinirane tipe kolon.

Pri iskanju optimalnega načina ekstrakcije smo prizkusili kartuše več različnih proizvajalcev. Želeli smo, da je ekstrakcija čim bolj učinkovita, kar pomeni, da so izgube analita minimalne, hkrati pa naj bi kartuša zadržala večino nečistot. Na podlagi testiranj smo končno metodo razvili in validirali na kartuši Strata-X.

3.3.5.1. Ostro[®] 96-well Plate in Supelco HybridSPE[®]

Obe navedeni plošči sta sestavljeni iz 96 povezanih filtracijskih mest, kamor naneseemo vzorce. Ravno tako je podoben tudi princip delovanja. Kartuši sta namenjeni predvsem odstranjevanju endogenih proteinov in fosfolipidov. Ploščo najprej namestimo na lovilno ploščo. Vzorce plazme lahko naneseemo neposredno na kartušo. Z dodatkom hladnega acetonitrila, ki vsebuje 1 % mravljinčno kislino, povzročimo obarjanje proteinov, ki se nato mehansko odstranijo pri prehajanju tekočine skozi filtracijsko plast kartuše. Ob tem se odstranijo tudi fosfolipidi, ki se zadržijo na adsorbentu kartuše. Med njimi in adsorbentom se vzpostavijo Lewisove kislinsko-bazične interakcije. Fosfolipidi so tako kot ostali lipidi sestavljeni iz polarne glave in dolgega hidrofobnega repa. Fosfatna glava se obnaša kot zelo močna Lewisova baza, medtem ko imajo cirkonijevi ioni (pri Supelco HybridSPE[®]) zaradi praznih d-orbital funkcijo Lewisove kisline (elektron akceptorja). Mravljinčna kislina interagira z nezasedenimi mesti kartuše in tako omogoča, da kartuša ostaja neselektivna za vezavo kislih, bazičnih in nevtralnih spojin (27).

Postopek 1 (vzorci DPS):

S škarjami smo izrezali listič s posušeno kapljico plazemskega vzorca, jo prepognili na pol in dali v mikrocentrifugirko. Dodali smo 500 μL metanola in 50 μL IS₃. Vzorce smo 2 minuti stresali na vibracijskem mešalu, nato pa jih pustili 5 minut v ultrazvočni kadički. Mikrocentrifugirke smo nato 10 minut centrifugirali pri naslednjih pogojih (5 °C , 15000 \times g). S pipeto smo prenesli 400 μL vzorca na Ostro[®] 96-well Plate ploščo, pri čemer smo pazili, da z nastavkom nismo segli pregloboko (na dnu se zberejo izpadla bombažna vlakna). Sledila je filtracija in sušenje vzorcev.

Postopek 2 (vzorci DPS):

Postopek 2 je zelo podoben postopku 1. Organsko topilo je bilo v tem primeru 300 μL acetonitrila, ki je vsebovalo 1 % mravljinčne kisline. Iz mikrocentrifugirke smo na kartušo prenesli 250 μL vzorca.

3.3.5.2. Bond Elut Plexa PCX

Kartuše Bond Elut Plexa PCX temeljijo na kombinirani metodi nepolarne in kationske izmenjave. Namenjene so ekstrakciji šibko bazičnih spojin. Hidrofilna površina delcev adsorbenta omogoča prehajanje analita v notranje pore. S spiranjem odstranimo večje endogene proteine, medtem ko analit ostane vezan v hidrofobnem jedru. Na ta način odstranimo nepolarne in kisle nečistote (28).

Postopek 3 (vzorci DPS):

Izrezane koščke Whatman papirja s plazemskimi madeži smo dali v mikrocentrifugirke, ki smo jih dopolnili s 150 μL 2 % fosforne kisline, 150 μL metanola in 50 μL IS_3 . Nanos na ploščo Plexa in elucija sta potekala po navedenih korakih:

1. *Kondicioniranje kartuše:* I. 500 μL metanola
II. 500 μL vode
2. *Nanos vzorca:* Na kartušo smo nanесли 300 μL vzorca. Nanos je potekal počasi, tako da raztopina skozi kartušo ni prehajala hitreje kot s hitrostjo 1 kaplje na sekundo.
3. *Spiranje:* I. 500 μL 2 % fosforne kisline
II. 500 μL metanola
4. *Elucija:* dvakrat po 250 μL topila T1 (poglavje 3.1.2)

Eluat smo zbrali v elucijsko ploščo in ga posušili.

SUŠENJE IN REKONSTITUCIJA (za analize DPS vzorcev, po uporabi plošč Ostro[®] 96-well Plate, Supelco HybridSPE[®] in Bond Elut Plexa PCX)

Sušenje je potekalo pol ure pri 70 °C v napravi TurboVap 96 z nežnim prepihanjem z dušikom. Vzorce smo rekonstituirali s 50 μL rekonstitucijskega topila. Nato smo ploščo dve minuti stresali na 120 obratih na minuto na stresalniku Vortemp 56, zatem pa še 3

minute na vibracijskem mešalu. Nazadnje smo prenesli 30 μL alikvote rekonstituiranih vzorcev v inserte in jih analizirali na LC-MS/MS.

3.3.5.3. Oasis[®] MCX (mešani kationski izmenjevalni sorbent)

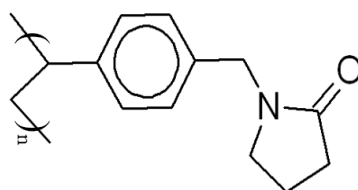
Kombinacija reverznofazne in kationsko izmenjevalne metode ločevanja na trdni podlagi kartuše Oasis[®] MCX je namenjena izolaciji in čiščenju vzorcev z analitom, ki izkazuje bazične lastnosti. Spiranje nečistot poteka pri nižjem pH-ju, saj ima tako analit pozitiven naboj in so interakcije s sulfonskimi skupinami adsorbenta močnejše. Elucija analita poteka pri bazičnih pogojih ob večjem deležu organskega topila (29).

Postopek 4 (za vzorce DPS):

1. *Predpriprava vzorca:* V epruveto smo dali izrezan košček Whatman papirčka s posušenim plazemskim madežem ter dodali 250 μL metanola, 250 μL 4 %-fosforne kisline ter 50 μL IS₃.
2. *Kondicioniranje kartuše:* I. 200 μL metanola
II. 200 μL vode
3. *Nanos vzorca na kartušo:* Nanesli smo 450 μL vzorca in ga počasi (< 1 kaplja / sekundo) spustili skozi kartušo.
4. *Spiranje:* I. 200 μL 2 % vodne raztopine mravljinčne kisline
II. 200 μL 2% vodne raztopine mravljinčne kisline / metanola = 1 / 1
III. 200 μL metanola
5. *Elucija:* dvakrat po 25 μL 5 % amoniaka v organskem topilu iz 60 % acetonitrila in 40 % metanola.
6. *Nevtralizacija:* Eluatu smo dodali 50 μL 4 % vodne raztopine mravljinčne kisline
Pri tej metodi je potekala elucija z zgolj 50 μL topila, zato smo lahko eluate neposredno analizirali brez dodatnega koncentriranja.

3.3.5.4. Strata-X

Uporabili smo kartušo Strata-X, ki vsebuje reverznofazno podlago. Namenjena je za izolacijo nevtralnih in aromatskih spojin. Kartuša se je zdela primerna, saj znaša pKa remifentanila 7,1, prav tako pa učinkovina vsebuje aromatski obroč. Adsorbent sestavljajo delci velikosti 33 μm , s porami velikosti 85 Å, zaradi česar je namenjen analitom z atomsko maso pod 10 kDa (slika 3). Adsorpcijska površina znaša 800 m^2/g , kartuša pa ne izgubi selektivnosti, tudi ko se podlaga posuši (30). Metoda sloni na treh mehanizmih retencije. Prihaja lahko do π - π interakcij, hidrofobnih interakcij in dipol-dipol interakcij.



Slika 3. Kemijska struktura absorbenta, ki sestavlja kartušo Strata-X z reverzno fazo (prirejeno po viru 30).

Postopek 5 (za DBS in DPS vzorce):

1. *Predpriprava vzorca:* I. V 2 mL-mikrocentrifugirko smo dali papirček s krvnim madežem in 500 μL topila, ki je bilo sestavljeno iz metanola in 2 % vodne raztopine mravljinčne kisline v razmerju 1 / 1.
 - II. Vsebino smo pol minute mešali na vibracijskem mešalu.
 - III. Dodali smo 50 μL IS₃ in 1450 μL ultračiste vode.
 - IV. Mikrocentrifugirko smo za 5 minut postavili v ultrazvočno kadičko, nato pa jo 1 minuto mešali na vibracijskem mešalu.
2. *Kondicioniranje:* I. 1 mL metanola
 - II. 1 mL vodePretok topil je potekal pri podtlaku -10 mmHg.
3. *Nanos vzorca na kartušo:* Nanesli smo 1800 μL vzorca in ga počasi spustili skozi kartušo. Zaželeni čas nanosa je bil 10 minut, pri čemer smo pretok po potrebi pospešili z rahlim podtlakom.
4. *Spiranje kartuše:* I. 1 mL vode
 - II. 1 mL 10 % metanola v vodi
 - III. 0,5 mL 20 % metanola v vodi

Vsako topilo za spiranje kartuše smo posebej spustili skozi kolono pri podtlaku -10 mmHg

5. *Sušenje*: 10 minut pri maksimalnem podtlaku
6. *Elucija*: 2 x 500 μ L metanola

V prvem koraku smo na kartušo odpipetirali 500 μ L metanola, ki smo ga po 3 minutah odstranili s podtlakom. Korak smo še enkrat ponovili z novimi svežimi 500 μ L metanola. Eluat smo lovili v nove 1,5-mL mikrocentrifugirke.

Postopek 6 (za vzorce obogatene plazme)

Za obogatene plazemske vzorce smo uporabili modificirano predpripravo vzorca, celoten ostali proces pa je sledil postopku 5. V prvem koraku je izrezani krvni madež nadomestilo 100 μ L obogatene plazme, zato se je v tretjem koraku volumen dodane ultračiste vode zmanjšal za 100 μ L.

SUŠENJE IN REKONSTITUCIJA

Sušenje vzorcev v mikrocentrifugirkah je potekalo ob pretoku dušika na napravi TurboVap[®] LV. Sušenje je potekalo 25 minut pri 60 °C. Vpihani dušik je osušil atmosfero nad vzorci in pospešil sušenje.

Vsebino smo rekonstituirali z 50 μ L topila za rekonstitucijo in mešali 30 sekund na vibracijskem mešalu. S pipeto smo vzorce prenesli na mikrotitersko ploščo in jih analizirali.

3.3.6. Analiza vzorcev

Vzorce smo analizirali z metodo LC-MS/MS. Pri tandemskem masnem spektrometru sta povezana dva masna filtra. Z nastavitvijo smo določili, kateri starševski ioni so se fragmentirali in potem smo detektirali hčerinske ione s točno določenim razmerjem med maso in nabojem. Kvantifikacija signalov je potekala na masnem spektrometru z multirezidualno analizo.

3.3.6.1. Nastavitve LC-MS/MS za analizo DPS in plazemskih vzorcev

Specifikacije - LC del:

- Phenomenex Kinetex (50 x 2,1 mm; C18 2,6 µm delci)
- Temperatura kolone: 50 °C
- Volumen injiciranja: 6 µL
- Čas analize: 2,7 min
- Mobilna faza:
 - Topilo A = 0,1 % raztopina mravljinčne kisline v milliQ vodi
 - Topilo B = 100 % acetonitril
- Gradientna elucija (preglednica III)

Preglednica III. Spreminjanje hitrosti pretoka in sestave mobilne faze pri tekočinski kromatografiji. Prvi stolpec predstavlja časovne korake sprememb pri analizi posameznega vzorca.

Čas [min]	Pretok [mL/min]	Delež topila B [%]
0,25	0,8	10
0,5	0,65	20
1,0	0,65	30
1,25	0,65	50
1,7	0,65	50
1,75	0,65	10

- Parametri ionskega izvora:
 - Vir ionizacije: ESI + (angl. electrospray ionization)
 - Temperatura sušilnega plina: 275 °C
 - Pretok plina 5 L/min
 - Temperatura plašča: 320 °C
 - Pretok plina v plašču: 11 L/min
 - Napetost na kapilari: 4000 V
 - Napetost na šobi: 1000 V
 - Parametri trojnega kvadrupola (preglednica IV)

Preglednica IV. Parametri trojnega kvadrupola.

Analit	IS (Remifentanil $^{13}\text{C}_6$)	Remifentanil
Prekurzorski ion	383,4	377,2
hčerinski ion (sekundarni)	113	317,2
čas vzorčenja enega masnega prehoda [ms]	25	50
Fragmentor [V]	126	86
Kolizijska energija [V]	25	8
Polarnost	Pozitivna	pozitivna

3.3.6.2. Nastavitve LC-MS/MS za analizo DBS vzorcih

Za analizo vzorcev posušenih krvnih madežev smo optimizirali pogoje tekočinske kromatografije (poglavje 4.3.7).

Specifikacije – LC del:

- Kintex 100 (100 x 3mm; C18 2,6 μm delci)
- Temperatura kolone: 50 °C
- Volumen injiciranja: 3 μL
- Čas analize: 5,4 min
- Mobilna faza:
 - Topilo A = 0,1 % raztopina mravljinčne kisline v milliQ vodi
 - Topilo B = 100 % acetonitril
- Gradientna elucija (preglednica V)

Preglednica V. Spreminjanje hitrosti pretoka in sestave mobilne faze pri tekočinski kromatografiji. Prvi stolpec predstavlja časovne korake sprememb pri analizi posameznega vzorca.

Čas [min]	Pretok [mL/min]	Delež topila B [%]
0,25	0,65	10
1,25	0,65	20
2,4	0,65	30
2,8	0,65	50
3,4	0,65	90
4,0	0,65	10

➤ Parametri ionskega izvora:

- Vir ionizacije: ESI + (angl. electrospray ionization)
- Temperatura sušilnega plina: 275 °C
- Pretok plina: 5 L/min
- Tlak razprševanja: 3,1 bar
- Temperatura plašča: 320 °C
- Pretok plina v plašču: 11 L/min
- Napetost na kapilari: 4000 V
- Napetost na šobi: 1000 V
- Parametri trojnega kvadropola (preglednica IV)

3.3.7. Obravnava rezultatov – validacija metode

Metoda določanja remifentanila v popkovnični krvi odvzeti z DBS lističem sestoji iz ekstrakcije analita z lističa, izolacije analita z metodo SPE in analize na sklopljeni metodi tekočinske kromatografije z masnim spektrometrom. Celoten postopek smo želeli tudi validirati, saj s tem potrdimo, da bo analitska metoda zagotavljala rezultate, na katere se bomo lahko zanesli. Pri validaciji metode smo se oprli na smernice, ki jih je določila ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA) (31).

Preden smo prešli na DBS vzorce, smo v nekoliko skrčenem obsegu validirali metodo za določanje remifentanila v plazmi. Metodi za določanje remifentanila v plazmi smo določili linearnost, točnost, ponovljivost, spodnjo mejo kvantifikacije in območje.

Linearnost:

Linearnost je sposobnost analitskega postopka, da podaja rezultate, ki so proporcionalni koncentraciji analita v vzorcu. Razmerje med koncentracijo in odzivi opiše premica z matematično enačbo $y = k \cdot x + n$, pri čemer k predstavlja naklon premice, n pa odsek na ordinatni osi. Odvisna spremenljivka y je razmerje med površinama kromatografskega vrha analita in internega standarda in je odvisna od spremenljivke x , ki je koncentracija analita v vzorcu. Umeritveno premico smo pripravili z analizo obogatenih vzorcev s poznano koncentracijo analita. Vzorci morajo biti pripravljene v enakem mediju, kot so kasneje analizirani realni (biološki) vzorci (31).

Umeritveno premico smo določili z metodo linearne regresije v računalniškem programu MS Excel. To metodo imenujemo tudi metoda najmanjših kvadratov, saj postavi umeritveno premico tako, da je vsota kvadratov razdalj med izmerjenimi točkami in premico najmanjša. Zaradi omejitev uporabljenega materiala in analiznih naprav velja linearnost samo v določenem koncentracijskem območju. Navadno je zgornji kalibracijski standard 50 do 500-kratnik najnižjega standarda, ki je vključen v izračun umeritvene premice. Posebno kadar je to kalibracijsko območje široko, uporabljamo za izračun umeritvene premice utežitveni faktor ($1/x$ ali $1/x^2$), kjer x predstavlja koncentracijo. Na ta način se izognemo prevelikemu vplivu rezultatov vzorcev z višjimi koncentracijami in nagnjenosti premice k prilagajanju le-tem rezultatom (32).

Umeritveno premico smo v našem primeru določili po vpeljavi utežitvenega faktorja $1/x^2$. Naklon in odsek utežene premice smo izračunali s pomočjo programskega dodatka Reševalec. Ta je s spreminjanjem naklona in odseka izbral premico, pri kateri je vsota produkta odstopa in uteži najmanjša. Odstop predstavlja razliko med izmerjenim odzivom in simulirano vrednostjo odziva predpostavljenega modela. Linearnost določamo skozi celotno območje analiznega postopka, pri čemer FDA smernice priporočajo vključitev vsaj šestih vzorcev z različno koncentracijo analita in slepega vzorca. Izračunane vrednosti

standardov, razen standarda na spodnji limiti kvantifikacije, smejo odstopati manj kot 15 % od njihove nominalne vrednosti. Za spodnjo limito kvantifikacije je dovoljeno 20 % odstopanje. Pogojem mora zadostiti vsaj 75 % standardov (31).

Točnost:

Točnost izraža ujemanje dobljene vrednosti s sprejeto pravo oz. sprejeto referenčno vrednostjo. Za izračun točnosti potrebujemo analizo kontrolnih vzorcev. Narediti moramo vsaj po pet ponovitev pri treh koncentracijah, ki obsegajo celotno območje metode. Točnost določimo z izračunom povprečnega odstopanja od prave oz. referenčne vrednosti.

Vsakemu odzivu posameznega kontrolnega vzorca (Y_i) smo izračunali po *enačbi 1* njegovo koncentracijo (n in k predstavljata spremenljivki umeritvene krivulje). Nato je sledil izračun povprečne koncentracije iz ponovitev za posamezen nivo in z uporabo *enačbe 2* odstopanje od prave vrednosti. Povprečno odstopanje ne sme presežati 15 %, razen na nivoju meje kvantifikacije, kjer je dovoljeno 20 % odstopanje (31, 32).

$$c \text{ (izračunana)} = \frac{Y_i - n}{k} \quad (\text{enačba 1})$$

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

Ponovljivost:

Ponovljivost je eden od nivojev natančnosti metode in izraža stopnjo ujemanja (stopnjo razpršenosti) rezultatov med serijo analiz istega homogenega vzorca pod enakimi delovnimi pogoji v kratkem časovnem obdobju. Tako izraža natančnost znotraj postopka, ko analize izvaja enako osebje z isto opremo. Tako kot ostale nivoje natančnosti, ponovljivost izražamo kot standardno deviacijo ali relativno standardno deviacijo (RSD) serije meritev. Pri tem vsako analizo izvedemo neodvisno in v celoti. FDA smernice predvidevajo vsaj pet ponovitev pri vsaj treh koncentracijah, ki obsegajo celotno območje metode. Relativna standardna deviacija ne sme presežati 15 %. Izjema je le spodnja limita kvantifikacije, kjer je vrednost RSD lahko največ 20 % (31).

Z analizo kontrolnih vzorcev smo izračunali ponovljivost znotraj posameznega dneva, kot tudi meddnevno ponovljivost. V raziskavo meddnevne ponovljivosti smo vključili po pet

ponovitev iz treh dni in ravno tako izračunali koeficient variance med izmerjenimi rezultati. Relativno standardno deviacijo smo izračunali po *enačbi 3*, kjer σ označuje standardni odklon, \bar{y} pa povprečno vrednost rezultatov.

$$RSD [\%] = \frac{100 * \sigma}{\bar{y}} \quad (\text{enačba 3})$$

Območje:

Območje analiznega postopka je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, za katerega so dokazane točnost, ponovljivost in linearnost. Ponavadi je omejeno z linearnim območjem detektorja analitov. S širšim območjem se izognemo potrebam po redčenju bolj koncentriranih vzorcev, vendar pa moramo hkrati paziti, da ne trpijo omenjene zahteve (33). V našem primeru je bilo uporabno območje metode na spodnjem koncu omejeno s spodnjo limito kvantifikacije in na zgornjem s koncentracijo najvišjega kalibratorja.

Spodnja limita kvantifikacije:

Spodnja limita kvantifikacije je še posebej pomembna, kadar določamo analite, ki so v vzorcu v majhnih koncentracijah. Takšen primer so na primer nečistote in razgradni produkti v zdravilih. Označuje najnižjo koncentracijo analita, ki jo še lahko določimo z zadostno točnostjo in natančnostjo (točnost – dovoljeno odstopanje do 20 %, $RSD < 20$ %). FDA smernice dodajajo pogoj, da mora biti odziv standarda pri tej koncentraciji vsaj petkratnik signala slepega vzorca. Navadno je to tudi najnižji kalibracijski standard uporabljen za pripravo umeritvene premice. Pri instrumentalnih metodah lahko okvirno limito kvantifikacije določimo iz razmerja med signalom in šumom.

Stabilnost:

Lističe s krvnimi madeži smo shranjevali pri sobnih pogojih ob prisotnosti sušilnega sredstva. Zanimala nas je stabilnost tako pripravljenih vzorcev ob temperaturnih obremenitvah. Vzeli smo dve paralelki pri visoki (QC_Z) in dve pri nizki koncentraciji (QC_S) ter jih shranili v zaprto plastično vrečko skupaj s sušilnim sredstvom. Eno vrečko z omenjeno vsebino smo shranili pri -20 °C, drugo pa pri 40 °C. Po dveh tednih smo vzorce analizirali in primerjali odzive analita v vzorcih, ki so bili izpostavljeni stresnim pogojem z odzivi vzorcev, ki so bili shranjeni pri običajnih pogojih (ob upoštevanju IS_3).

Specifičnost in učinek matrice:

V biološkem vzorcu so bile poleg analita prisotne številne snovi, ki jih ni mogoče povsem odstraniti tekom priprave vzorcev za analizo na masnem spektrometru, zato je še posebej pomembno, da se komponente s tekočinsko kromatografijo dobro ločijo, preden pridejo na masni detektor. Ta lastnost je še posebej pomembna pri identifikacijskih testih. Metoda je specifična, če lahko kljub prisotnosti drugih komponent nedvoumno določamo vsebnost raziskovanega analita. Specifičnost metode smo določili z analizo slepih vzorcev, za pripravo katerih smo uporabili delovne raztopine brez dodanega analita.

➤ Absolutni učinek matrice (AUM)

Preverjanje učinka matrice je pomembno pri bioanalitskih metodah zaradi precejšne heterogenosti biološkega materiala. Hematokrit je ena od lastnosti krvi, ki se lahko v precejšni meri razlikuje med posamezniki. Ta ima tudi vpliv na nastanek krvnega madeža (26), kar pa v našem primeru ni imelo posebnega pomena, saj smo izrezali celoten madež. Številne endogene komponente (npr. fosfolipidi), ki jih morda niti ne detektiramo, lahko interferirajo in spreminjajo učinkovitost ionizacije analita na masnem detektorju. Na ta način posledično zmanjšujejo ali povečujejo odziv analita in s tem tudi zmanjšujejo točnost, ponovljivost, lahko tudi selektivnost (34).

Za izračun absolutnega učinka matrice smo ekstrahirali slepi vzorec, ki smo mu naknadno pri rekonstituciji dodali analit. Odziv tako pripravljene vzorca smo primerjali z odzivom obogatene topila (*enačba 4*).

$$\text{AUM } [\%] = \left(1 - \left(\frac{\text{naknadno obogaten slepi vzorec DBS}}{\text{obogaten topilo}}\right)\right) * 100 \quad (\text{enačba 4})$$

➤ Relativni učinek matrice

Relativni učinek matrice smo določevali s primerjavo naklonov umeritvenih premic DBS vzorcev, ki smo jih pripravili iz krvi šestih različnih darovalcev. Iz vsakega vzorca krvi smo pripravili DBS vzorce s štirimi različnimi koncentracijami. Premico za posamezen biološki material smo izračunali z uteževanjem in ob upoštevanju vsaj treh od štirih točk.

Izračunali smo RSD dobljenih naklonov. Za potrditev odsotnosti relativnega učinka matrice vrednost RSD ni smela preseči 4-5 % (34).

Izkoristek ekstrakcije:

FDA smernice dajejo večji pomen točnosti in ponovljivosti izkoristka ekstrakcije, kot pa sami vrednosti le-tega (31). Merili smo ga pri dveh različnih koncentracijah (QC_S in QC_Z). Izkoristek ekstrakcije smo izračunali po *enačbi 5*:

$$Iz [\%] = \frac{\text{odziv (ekstrahiran obogaten DBS)}}{\text{odziv (ekstrahiran naknadno obogaten slepi DBS)}} * 100 \quad (\text{enačba 5})$$

Z izkoristkom ekstrakcije je povezana tudi učinkovitost ekstrakcije, pri kateri je v izračunu poleg izkoristka zajet tudi učinek matrice. Za izračun učinkovitosti ekstrakcije smo uporabili *enačbo 6*.

$$Ue [\%] = \frac{\text{odziv (ekstrahiran obogaten DBS vzorec)}}{\text{odziv (obogaten vzorec topila)}} * 100 \quad (\text{enačba 6})$$

Navzkrižni prenos med vzorci:

Kadar na masnem spektrometru analiziramo visoko koncentriran vzorec, je možnost, da del analita zaostane v kromatografskem sistemu in se nato lahko deloma spere z naslednjim analiziranim vzorcem v masni detektor ter povzroči lažno previsok odziv. V ta namen smo po analizi vzorca z visoko koncentracijo analita (QC_Z) v sistem LC-MS/MS injicirali čisto rekonstitucijsko topilo in primerjali odziva analita. Navzkrižni prenos smo poskusili zmanjšati na minimum s tem, da smo zunanost igle za vzorčenje po vsakem vzorčenju spirali 10 sekund z 80 % metanolom. Notranjost igle se je spirala ves čas analize z mobilno fazo.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Eksperimentalno delo je bilo sestavljeno iz treh glavnih nalog, in sicer iz razvoja metode, validacije metode in analiziranja realnih vzorcev. Najprej smo morali razviti metodo ekstrakcije na trdni fazi. Pri tem se je izkazalo, da prvotno izbrana elucijska plošča OSTRO[®] ni primerna, saj ne zadrži dovolj hidrofilnih nečistot, ki se po rekonstituciji izoborijo. Preizkusili smo 5 različnih kartuš in primerjali njihovo učinkovitost. Na podlagi rezultatov smo se odločili, da bomo za razvoj metode določanja remifentanila uporabljali polimerno reverznofazno kartušo Strata-X. Metodo določanja remifentanila smo se odločili najprej razviti in testirati na obogatenih plazemskih vzorcih, nato pa jo validirati na vzorcih DBS. Metodo ekstrakcije, ki smo jo uporabili za plazemske vzorce, smo nato uporabili tudi za DBS vzorce, ki so zahtevnejši, saj kri vsebuje še več motečih snovi kot sama plazma.

4.1 TESTIRANJE RAZLIČNIH SPE KARTUŠ

Na voljo smo imeli 5 različnih kartuš. Za primerjavo smo naredili analizo posušenih plazemskih vzorcev, ki smo jih nanegli na kartice Whatman 903. Nanje smo odpipetirali 20 μL obogatene plazme s koncentracijo 10 $\mu\text{g/L}$. Izrezali smo posamezne lise in jih prenesli v mikrocentrifugirke. Nadaljna priprava in obdelava vzorcev je sledila opisanim postopkom ekstrakcije DPS vzorcev za posamezno kartušo. Ekstrakcija s ploščama Ostro[®] 96-well Plate in Supelco HybridSPE[®] je potekala v skladu s postopkom 2. Na posameznem tipu kartuš smo ekstrahirali po tri vzorce, kar nam je dalo vpogled v ponovljivost metode. Zanimala nas je tudi učinkovitost ekstrakcije, zato smo pripravili primerljiv vzorec, kjer smo plazmo nadomestili z 0,1 % vodno raztopino mravljinčne kisline. Ta vzorec smo prenesli neposredno na lovilno ploščo.

Preglednica VI. Povprečna učinkovitost ekstrakcije analize DPS vzorcev pri uporabi različnih vrst kartuš za izvedbo ekstrakcije na trdni podlagi. V drugem stolpcu je podana RSD relativnih odzivov analitov (RO), torej razmerij med površinami kromatografskih vrhov analitov in internih standardov. Ti rezultati nakazujejo ponovljivost ekstrakcij (n=3) s posamezno kartušo.

Vrsta elucijske plošče	RSD RO-jev (%)	POVPREČNA UČINKOVITOST EKSTRAKCIJE (%)
Ostro[®] 96-well Plate	3,8	19
Supelco HybridSPE[®]	4,6	12
Bond Elut 96 Plexa PCX	1,3	54
Oasis[®] MCX	2,4	58
Strata-X	2,6	101

Iz rezultatov je razvidno (preglednica VI), da smo najslabše rezultate dosegli s kartušama Ostro[®] 96-well Plate in Supelco HybridSPE[®]. Rezultata sta podobna, kar je pričakovano, glede na to, da smo pri obeh uporabili isti postopek ter glede na podobnost mehanizma čiščenja vzorca. Opazili smo, da se je boljša učinkovitost ekstrakcije pojavila v primerih, ko je bil večji delež metanola v topilu, s katerim smo ekstrahirali učinkovino z Whatman papirja. To se je potrdilo tudi potem, ko smo ob uporabi kartuše Ostro[®] nadomestili s strani proizvajalca priporočenih začetnih 300 μ L acetonitrila s 500 μ L metanola (postopek 1). V tem primeru smo dobili približno trikrat večje odzive. Učinkovitost kartuše Ostro[®] 96-well Plate je bila ob čiščenju vzorcev sveže obogatene plazme, ki smo jo odpipetirali neposredno v kartušo, kljub uporabi acetonitrila bistveno večja (nad 90 %). To samo še potrjuje domnevo, da so največje izgube pri čiščenju DPS vzorcev in uporabi acetonitrila nastale zaradi slabe ekstrakcije analita s papirja.

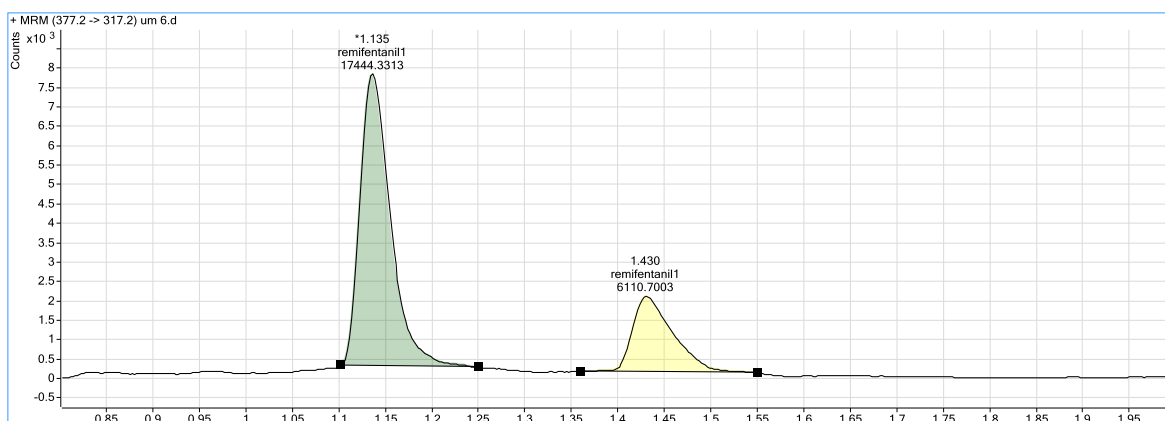
Najnižji RSD je izkazala kartuša Plexa PCX, ki je imela zelo dobro ponovljivost, hkrati je tudi boljše zadržala nečistote kot prvi dve plošči, saj je bila opazna manjša obarvanost eluata. Na tej plošči smo prezkusili test ponovne elucije. V novem eluatu je bila vrednost koncentracije učinkovine v primerjavi s prvim eluatom 4 %. Remifentanil se je torej že s prvim spiranjem dokaj dobro spral iz kartuše. Vzrok za nižjo učinkovitost ekstrakcije je bil torej verjetno v predpripravi vzorca, ki je sledil postopku 3. Za dodatno primerjavo kartuše

Plexa PCX s kartušo Ostro[®] 96-well Plate smo pripravili umeritveno premico z vzorci obogatene plazme. Vrednost determinacijskega koeficienta je bila boljša pri uporabi kartuše PCX (0,998 v primerjavi s 0,990), kar dokazuje boljšo linearno povezanost točk.

Podobno učinkovita je bila kartuša Oasis[®] MCX, ki je kljub majhnemu volumnu ekstrakcijskega topila imela slabšo učinkovitost zgolj od Strate-X. Kljub vsemu pa vzorci teh dveh plošč niso bili najbolj primerni za analizo z LC-MS/MS. To se je izkazalo še posebej ob pripravi DBS vzorcev za analizo. Težava je bila, da se je hemoglobin v precejšnji meri obdržal na kartuši ter se spiral v eluat z učinkovino in tako onečistil vzorce namenjene analizi. Na podlagi rezultatov smo za nadaljnje delo izbrali Strato-X. Edino ta plošča je zadovoljivo odstranila nečistote, hkrati pa je imela popolno učinkovitost ekstrakcije. Dobra učinkovitost je potrjevala tezo pomena velikega deleža metanola v začetni raztopini. V prvi stopnji predpriprave vzorca smo imeli tako kar 50 % delež metanola, ki je omogočal dobro omočenje posušenega nanosa in prehod učinkovine v raztopino. Velik pomen je imela zagotovo tudi dodana ultračista voda, saj smo tako v primerjavi z ostalimi metodami bistveno povečali začetni volumen nanosa. Nezanemarljiv je bil vpliv ultrazvoka, ki je razbil ostanke celic in sprostil remifentanil v raztopino. Popolna učinkovitost ekstrakcije je hkrati potrdila, da kljub uporabi 20 % vodne raztopine metanola, pri spiranju nečistot ni prišlo do izgub.

4.2 VALIDACIJA DOLOČANJA REMIFENTANILA V OBOGATENI PLAZMI

V prvi stopnji smo razvili metodo za kvantitativno določanje remifentanila v plazmi. Ekstrakcija na trdni podlagi je potekala na kartuši Strata-X po postopku 6. Tekočinska kromatografija rekonstituiranih vzorcev je potekala po metodi opisani v poglavju 3.3.6.1. Retencijski čas remifentanila in IS je znašal 1,14 minute (slika 4)



Slika 4. MRM kromatogram plazemskega vzorca s koncentracijo remifentanila 1 $\mu\text{g/L}$. masni prehod $[m/z]$: 377,2 \rightarrow 317,2. Vzorec smo uporabili za pripravo umeritvene krivulje. Remifentanil predstavlja večji zeleno obarvani signal, ki je dobro ločen od signala endogene interference z enakim masnim prehomom.

4.2.1. Linearnost

Najprej smo postavili matematično enačbo, ki je opisala odnos med koncentracijo in odzivom. Rezultate analize kalibratorjev smo obdelali z uporabo metode najmanjših kvadratov. Kalibratorji so obsegali precej široko koncentracijsko območje, zato smo se odločili, da umeritveno premico utežimo z $1/x^2$. Na ta način smo dosegli natančnejše ujemanje premice z rezultati pri nizkih koncentracijah, seveda na račun nekoliko manjše točnosti pri visokih koncentracijah. Za to smo se odločili, ker so bile za nas spodnje koncentracije pomembnejše in so imele večjo uporabno vrednost. Za izračun enačbe premice smo upoštevali razmerje med odzivom analita in odzivom internega standarda. Iz zbranih podatkov smo določili naklon premice (k), presečišče z y (n) in determinacijski koeficient korelacije (preglednica VII).

Preglednica VII. Podana je relativna napaka meritev kalibracijskih vzorcev glede na uteženo umeritveno premico. Sledi primerjava koeficientov umeritvenih premic izračunanih brez in z uteževanjem.

x [$\mu\text{g/L}$]	Odziv / IS_3	Utež ($1/x^2$)	Izračunana koncentracija [$\mu\text{g/L}$]	Relativna napaka [%]
0,2	0,02813	25	0,2060	3,0
0,3	0,03942	11,11111	0,2898	-3,4
0,4	0,05377	6,25	0,3963	-0,9
1	0,1328	1	0,9832	-1,7
5	0,6830	0,04	5,066	1,3
40	5,480	0,000625	40,67	1,7
			Izračun brez uteževanja	Z uteževanjem ($1/x^2$)
Naklon (k)			0,13703	0,13473
Odsek na osi y (n)			-0,001655	0,0003717
Koeficient korelacije (r^2)			1,000	0,9996

Umeritveno premico za vzorce obogatene plazme po ekstrakciji na kartušah Strata-X je opisala enačba $y = 0,13473 * x [\mu\text{g/L}] + 0,0003717$. Zaradi uporabe metode uteževanja se je nekoliko zmanjšala vrednost determinacijskega koeficienta, vendar pa je bil le-ta še vedno visok.

4.2.2. Točnost

Točnost smo preverili s kontrolnimi vzorci. Naredili smo pet ponovitev celotnega postopka priprave vzorca ter analize pri vsaki od štirih koncentracij in tako preverili točnost na celotnem območju umeritvene premice. Podana je relativna napaka posameznega vzorca (preglednica VIII). Relativna napaka je odstopanje izračunane vrednosti od prave vrednosti. Iz tega podatka smo izračunali povprečno relativno napako na posameznem koncentracijskem nivoju (za določen QC). Točnost je ustrezna, saj pri nobeni od meritev relativna napaka ni presegala 15 % (preglednica VIII). Razpršenost ponovitev je dokaj majhna, zato je ustrezna tudi vrednost povprečne relativne napake. Na podlagi relativne

napake se nakazuje trend odstopanja izmerjenih vrednosti navzdol pri nižjih koncentracijah in navzgor pri višjih.

Preglednica VIII. Točnost umeritvene premice je podana z relativnimi odstopi izmerjenih koncentracij kontrolnih vzorcev od njihove prave vrednosti. Z odebeljenim tiskom je označena največja relativna napaka (RN) med petimi ponovitvami. V zadnji vrstici je navedeno povprečno odstopanje kontrolnih vzorcev pri posamezni koncentraciji.

Paralelke	RN (QC _{L1}) [%]	RN (QC _{L2}) [%]	RN (QC _M) [%]	RN (QC _H) [%]
1.	-6,9	-2,6	-3,3	7,2
2.	-10,1	-4,0	3,8	5,6
3.	-2,3	-3,1	3,1	4,4
4.	-5,3	-4,2	4,4	5,6
5.	-0,1	-4,2	1,7	4,7
Povprečna RN [%]	- 4,9	- 3,6	1,9	5,5

4.2.3. Ponovljivost

Zanimala nas je ponovljivost znotraj enega dneva in meddnevna ponovljivost. Preglednica IX prikazuje znotrajdnevno ponovljivost, ki je podana kot RSD vsaj petih meritev na vsakem od koncentracijskih nivojev. Vrednosti meritev so razmerja med odzivi analita in odzivi IS₃ ponovitev, ki so bile pripravljene v istem dnevu. V isti preglednici so podatki za meddnevno ponovljivost, ki je podana kot RSD meritev odzivov QC-vzorcev, ki so bili ekstrahirani in analizirani v treh različnih dnevih znotraj enega tedna (preglednica IX).

Preglednica IX. Podana je RSD izmerjenih koncentracij remifentanila v kontrolnih vzorcih, ki so bili analizirani v istem dnevu in vzorcev, ki so bili analizirani v treh različnih dnevih.

Nivo	RSD [%] – znotraj dneva	RSD [%] – med dnevi
QC _{L1}	3,69	7,79
QC _{L2}	1,95	4,20
QC _M	3,05	2,31
QC _H	1,04	1,45

Rezultati so izkazali dobro ponovljivost metode, saj so bile vrednosti RSD precej pod mejo 15 %. Največja razpršenost rezultatov je opazna pri kontrolnih vzorcih z najnižjo koncentracijo, kar je pričakovano, saj je na območju spodnje limite kvantifikacije. Analize QC_H vzorcev so bile zelo ponovljive, zato lahko predvidevamo, da bi bilo lahko območje metode v zgornjem delu glede na dobro točnost, tudi širše. Meddnevna ponovljivost je bila nekoliko slabša kot znotrajdnevna, kljub vsemu pa variacije med dnevi niso imele posebno velikega vpliva.

4.2.4. Spodnja meja kvantifikacije

Želeli smo metodo, ki bi dosegla čim nižjo spodnjo mejo kvantifikacije (LOQ). V ta namen smo pri razvoju LC – MS/MS povečali volumen injiciranja z začetnih 3 na 6 μL . Za limito kvantifikacije se pogosto uporablja kar koncentracija najnižjega kalibratorja. (33). Za limito kvantifikacije smo postavili koncentracijo 0,15 $\mu\text{g/L}$, pri kateri je imela metoda preverjeno zadostno točnost in natančnost. Relativna standardna deviacija kontrolnih vzorcev s koncentracijo 0,15 $\mu\text{g/L}$ je bila pri izračunu meddnevne ponovljivosti 7,79 %, povprečna relativna napaka pri izračunu točnosti pa $-4,9\%$.

4.2.5. Območje

Metoda obsega območje med 0,15 µg/L in 40 µg/L, torej med limito kvantifikacije in kalibratorjem z najvišjo koncentracijo. Območje je precej široko in na zgornji meji, glede na priporočeno terapevtske vrednosti, občutno presega pričakovane vrednosti. Dobljeni rezultati so vzbudili pričakovanja, da bo možno z zadostno točnostjo in natančnostjo določiti vrednosti remifentanila tudi v posušeni krvnih madežih.

Pri prehodu s plazemskih vzorcev na vzorce krvnih madežev smo zaradi boljšega ločevanja modificirali metodo tekočinske kromatografije in izbrali drugo kolono (poglavje 3.3.6.2). Retencijski čas remifentanila se je s to spremembo podaljšal na 2,71 minute.

4.3 VALIDACIJA DOLOČANJA REMIFENTANILA V KRVNIH MADEŽIH

4.3.1. Linearnost

Pri izračunu umeritvene premice za določanje remifentanila v krvnih madežih smo ravno tako uporabili uteževanje $1/x^2$, saj smo želeli doseči čimvečjo točnost pri nižjih koncentracijah, ki so nas še posebej zanimale. V preglednici X je opaziti, da se je po uteževanju zmanjšal naklon premice ter povečal odsek na osi y. Precejšna vrednost odseka n je potrjeval odziv na območju retencijskega časa remifentanila, ki smo ga zaznali že pri slepih vzorcih. Več o tem je napisano v poglavju specifičnost.

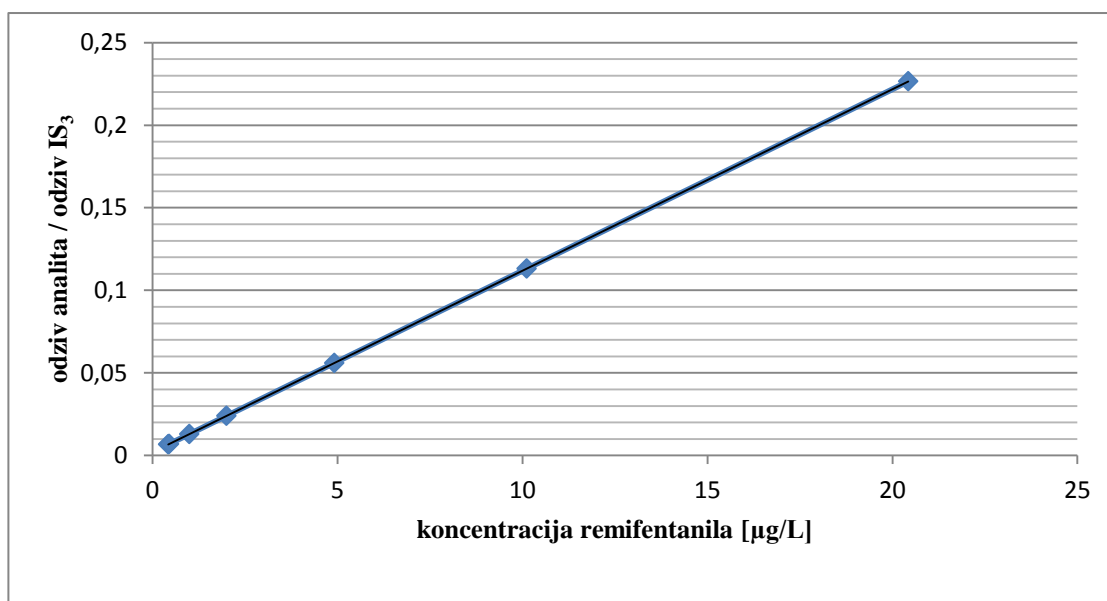
Preglednica X. Podana je relativna napaka meritev kalibracijskih vzorcev glede na uteženo umeritveno premico. Sledi primerjava koeficientov umeritvenih premic izračunanih brez in z uteževanjem.

x [$\mu\text{g/L}$]	Odziv / IS_3	Izračunana koncentracija [$\mu\text{g/L}$]	Relativna napaka [%]
0,4	0,00672	0,428	7,0
0,5	0,00704	0,457	-8,6
1	0,01299	0,998	-0,2
2	0,02400	2,00	0,0
5	0,05608	4,92	-1,6
10	0,11319	10,1	1,2
20	0,22648	20,4	2,2
		Izračun brez uteževanja	Z uteževanjem ($1/x^2$)
Naklon (k)		0,011227	0,010985
Odsek na osi y (n)		0,001398	0,002022
Koeficient korelacij (r^2)		0,9999	0,9993

Naklon premice je bil pri plazemskih vzorcih precej večji, saj smo imeli 2-krat večji volumen injiciranja na kolono. V tem primeru smo uporabili manjši volumen injiciranja, saj smo želeli čim ostrejše kromatografske vrhove analita.

Enačba umeritvene premice za remifentanil v vzorcih krvnih madežev (slika 5):

$$y = 0,010985 \cdot x [\mu\text{g/L}] + 0,002022$$



Slika 5. Umeritvena premica za remifentanil v vzorcih krvnih madežev.

4.3.2. Točnost

Točnost izmerjenih kalibratorskih vzorcev je ustrezala smernicam, saj pri nobeni koncentraciji relativna napaka ni presegala 15 % (preglednica X). Prav tako je bila potrjena tudi točnost metode na kontrolnih vzorcih (QC, preglednica XI). Pri kontrolnem vzorcu s koncentracijo 30 µg/L so bili izračunani rezultati približno 9 % nižji od pravih vrednosti, pri najnižjem kontrolnem vzorcu pa približno 10 % višji.

Preglednica XI. Točnost metode je podana z relativnimi odstopi izmerjenih koncentracij kontrolnih vzorcev od njihove prave vrednosti. Z odebelenim tiskom je označena največja relativna napaka (RN) med petimi ponovitvami. Točnost je bila preverjena s kontrolnimi vzorci treh različnih koncentracij. V zadnji vrstici je navedeno povprečno odstopanje kontrolnih vzorcev pri posamezni koncentraciji.

Paralelke	RN (QC _S) [%]	RN (QC _{SR}) [%]	RN (QC _Z) [%]
1.	-11,7	2,83	9,86
2.	-12,0	6,55	11,2
3.	-7,83	-0,38	8,74

4.	-12,0	-1,74	6,70
5.	-7,27	4,69	7,70
Povprečna RN [%]	- 10,1	2,39	8,83

4.3.3. Ponovljivost

Preglednica XII. Podana je RSD izmerjenih koncentracij remifentanila v kontrolnih DBS vzorcih, ki smo jih analizirali v istem dnevu in RSD izmerjenih koncentracij kontrolnih DBS vzorcev, ki smo jih analizirali v treh različnih dnevih.

Nivo	RSD [%] – znotraj dneva	Izmerjene koncentracije [µg/L] –			RSD [%] – med dnevi
		med dnevi			
QC _S	2,6	0,87	0,88	1,01	6,4
		1,02	0,88	0,90	
		0,86	0,92	1,02	
		0,91	0,88	0,96	
		1,00	0,93	/	
QC _{SR}	3,5	16,07	14,94	16,30	3,9
		14,99	14,74	15,80	
		15,53	15,70	16,18	
		15,73	17,09	15,76	
		15,59	15,00	15,95	
QC _Z	1,6	33,87	32,01	33,70	5,7
		33,09	32,31	27,43	
		34,38	31,95	31,51	
		35,16	33,19	32,88	
		34,42	33,39	/	

Relativno standardno deviacijo smo izračunali na podlagi petih kontrolnih vzorcev na vsakem od nivojev. Rezultati v preglednici XII dokazujejo, da so vse stopnje od priprave do analize vzorcev dobro ponovljive. Tako pri znotrajdnevni kot tudi pri meddnevni ponovljivosti smo upoštevali IS₃.

4.3.4. Spodnja meja kvantifikacije

Meja kvantifikacije nas je še posebej zanimala, saj ima remifentanil zaradi izredne učinkovitosti močan učinek že pri zelo nizkih koncentracijah v krvi. Če smo želeli dokaj točno določiti analit v realnih vzorcih odvzetih pri porodu, smo potrebovali dovolj občutljivo metodo za detekcijo koncentracij pod 1 $\mu\text{g/L}$. Nižja meja detekcije masnega spektrometra je poleg večje selektivnosti ena izmed glavnih prednosti pred UV detekcijo. Strogo gledano ugotovljena spodnja meja kvantifikacije kljub zadostni točnosti in ponovljivosti ni zadostila eni zahtevi FDA smernice, saj je bil odziv pri tej koncentraciji manjši kot petkratnik signala slepega vzorca (preglednica XIII).

Preglednica XIII. Točnost izmerjenih kontrolnih vzorcev na spodnji meji kvantifikacije podana z relativno napako. V preglednici je za paralelke podana standardna deviacija izračunanih koncentracij, povprečna izračunana koncentracija (\bar{Y}) ter na njuni podlagi izračunana relativna standardna deviacija.

Koncentracija [$\mu\text{g/L}$]	Odziv [area counts]	Odziv/ IS_3	Izračunana koncentracija [$\mu\text{g/L}$]	Relativna napaka [%]
0,3	967	0,005852	0,349	16,2
0,3	979	0,005664	0,332	10,5
0,3	869	0,005605	0,326	8,72
0,3	962	0,005943	0,357	19,0
0,3	889	0,005421	0,309	3,12
LOQ ponovitve (0,3 $\mu\text{g/L}$)	Standardna deviacija (od konc.)	\bar{Y} [$\mu\text{g/L}$]	RSD [%]	
	0,0187647	0,335	5,6	

Koncentracija 0,3 $\mu\text{g/L}$ se je izkazala kot skrajna spodnja meja, pri kateri je odstopanje od prave vrednosti še znotraj dovoljenih 20 %.

4.3.5. *Območje*

Območje analitske metode smo omejili med 0,3 in 30 $\mu\text{g/L}$. To je območje, v katerem je metoda izkazala ustrezne lastnosti. V njem je zajeto tudi koncentracijsko območje med 1 in 4 $\mu\text{g/L}$, ki se v literaturi navaja kot meja za pojav neželenih učinkov (21). Zgornjo mejo smo prestavili na 30 iz prvotno načrtovanih 40 $\mu\text{g/L}$ zato, ker s to potezo pridobimo boljše točnost na nižjem območju koncentracij, kar je v skladu z našimi cilji. V italijanski raziskavi so porodnicam hitrost pretoka infuzije povečevali do stopnje, na kateri so udeleženske raziskave bolečino po lestvici VAL ocenile z oceno 4 ali manj. Večina porodnic je potrebovala hitrost infuzije med 0,05 in 0,10 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Pri tej hitrosti bi bile pričakovane koncentracije remifentanila v krvi v območju med 1,25 in 2,5 $\mu\text{g/L}$ (9, 10).

4.3.6. *Stabilnost*

Posušene vzorce krvi na lističih za DBS smo shranjevali zaščitene pred vlago pri sobni temperaturi, zato smo pričakovali, da so stabilni. Kljub vsemu pa smo naredili krajši stresni test, da bi preverili, če se pojavlja kakršnakoli občutljivost na temperaturo. Po dveh tednih shranjevanja pri znižani oz. povišani temperaturi smo krvne madeže analizirali. V preglednici XIV so v procentih podane razlike med odzivi (ob upoštevanju IS₃) vzorcev, ki so bili izpostavljeni stresnim pogojem (- 20 °C in + 40 °C) in vzorci, ki so bili shranjeni pri optimalnih pogojih (sobna temperatura).

Rezultati so primerljivi s točnostjo metode. Pri nobenem od kontrolnih vzorcev, ne glede na pogoje, ki jim je bil izpostavljen, ni opaziti občutnejšega padca vsebnosti. Pri kontrolnem vzorcu s koncentracijo 1 $\mu\text{g/L}$, je pri povišani temperaturi opaziti celo porast odziva, vendar je v meji razpršenosti rezultatov. Na podlagi rezultatov lahko pričakujemo, da so pred vlago zaščiteni posušeni DBS vzorci stabilni vsaj 14 dni.

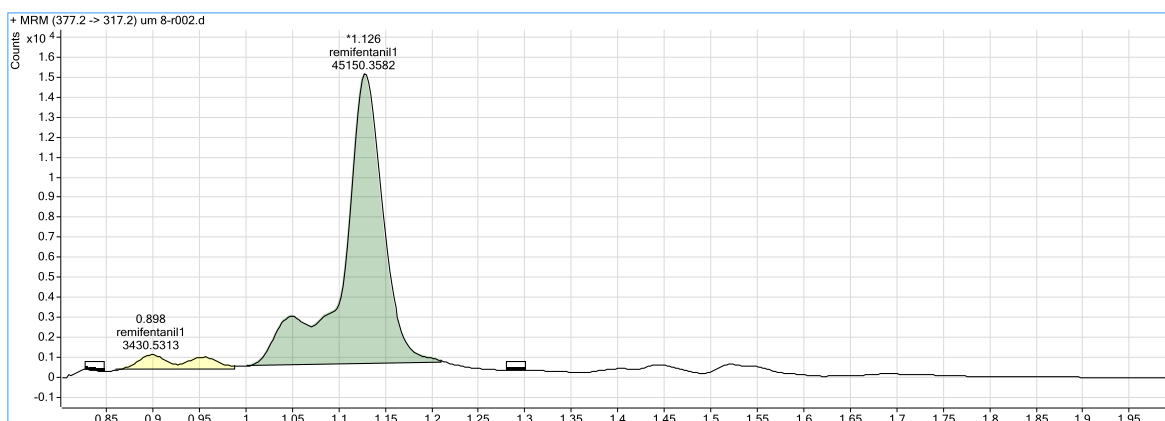
Preglednica XIV. Spremembe izmerjenih vsebnosti remifentanila v DBS vzrocih po dveh tednih shranjevanja le teh pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oz. $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	$+40\text{ }^{\circ}\text{C}$
QC _S	+ 5,0 %	+ 9,5 %
QC _Z	+ 0,1 %	- 3,3 %

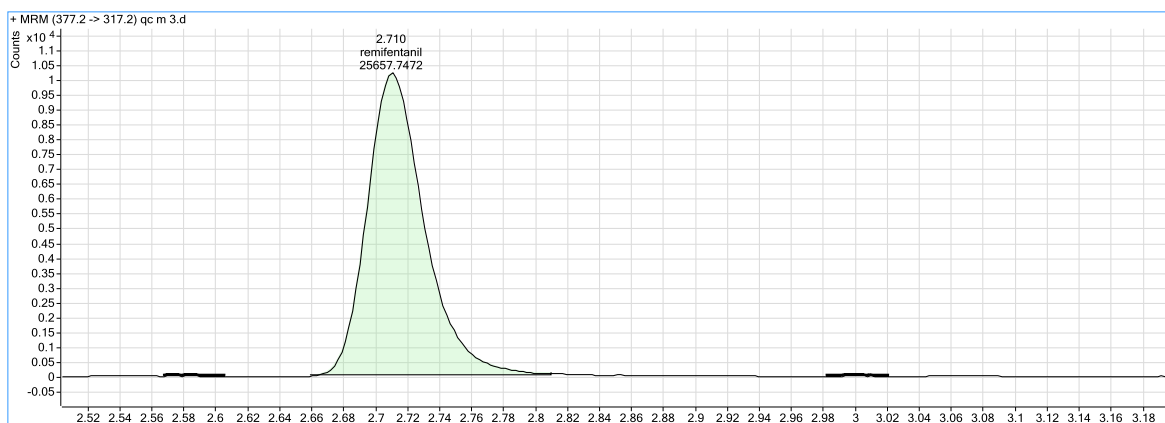
4.3.7. *Specifičnost in učinek matrice*

S prehodom s plazemskih vzorcev na vzorce posušene krvi se je signal analita začel delno prekrivati s signalom, ki je imel podoben retencijski čas in isti masni prehod ($377,2 \rightarrow 317,2$), kot smo ga mi uporabili za kvantifikacijo remifentanila (slika 6). Z namenom, da bi se izognili prekrivanju vrha analita z interferenco, ki je zmanjševala točnost in ponovljivost posebno pri analizi nizkih koncentracij analita, smo izbrali daljšo kolono. S tem se je sicer podaljšal čas analize posameznega vzorca, vendar smo dobili lepše odzive analita in dobro ločbo od endogene interference (slika 7). Kljub tej modifikaciji se je pri pregledovanju kromatogramov izkazalo, da naša metoda ni popolnoma specifična. Pod signalom našega analita se je skrival manjši stalen signal ozadja. Ta signal je bil tako opazen tudi pri analizi slepih DBS vzorcev, ki niso bili obogateni z remifentanilom. Površina pod njeno krivuljo je bila okrog 400. Njen pomen je viden že pri umeritveni premici, pri kateri je opazna precejšnja vrednost n , ki predstavlja vrednost na ordinati, torej začetno vrednost, ki ni odvisna od koncentracije remifentanila v vzorcu. Kljub temu stalnemu signalu ozadja je metoda izkazovala ustrezno točnost in ponovljivost.

Možno je, da je signal posledica navzkrižnega prenosa, saj je bilo območje analize precej široko in se zato lahko že najmanjši prenos odraža na odzivu remifentanila pri vzorcih z zelo majhno koncentracijo. Pri injiciranju mobilne faze se ta signal ni pojavil, tako da lahko sklepamo, da je morda v vsakem vzorcu prisoten analit kot posledica kontaminacije v procesu priprave vzorca.

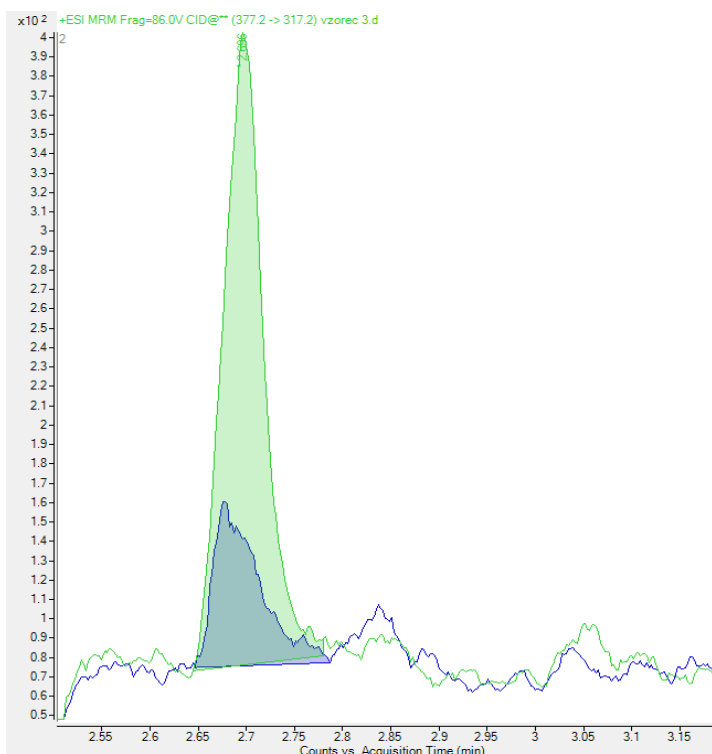


Slika 6. MRM kromatogram DBS vzorca ob uporabi kolone Kintex 50 pred modifikacijo tekočinske kromatografije. Signal remifentanila se prekriva s signalom nečistote. Z rumeno barvo so označeni vrhovi, ki izstopajo iz bazne linije, a ker niso v retencijskem območju remifentanila, jih nismo upoštevali.



Slika 7. MRM kromatogram DBS vzorca ob uporabi kolone Kintex 100. Interferenca, ki je motila pri uporabi krajše kolone, je tukaj izven časovnega območja zajema podatkov.

Pri nizkih koncentracijah remifentanila je predstavljal odziv nečistote bistveno večji delež izmerjenega odziva kot pri višjih vrednostih. Pri izračunu absolutnega vpliva matrice smo zato slepemu vzorcu odšteli vrednost signala ozadja (slika 8) in tako dobili primerljive vrednosti pri različnih koncentracijah. Izračunani absolutni učinek matrice znaša okrog -20 % (preglednica XV), kar pomeni, da ostale komponente v vzorcu, ki ga analiziramo na masnem spektrometru zmanjšujejo odziv našega analita. Tako pri razvoju metode in pripravi umeritvene premice kot tudi pri validaciji metode smo vedno uporabljali enak medij, kot je sestavljal realne vzorce. S tem postopkom smo se izognili vplivu absolutnega učinka matrice na rezultate.



Slika 8. Na sliki sta prekrita kromatograma slepega DBS vzorca in vzorca s koncentracijo na spodnji limiti kvantifikacije.

Preglednica XV. Absolutni učinek matrice (AUM) v primeru QC_s in QC_z.

	Odziv naknadno obogatenega slepega vzorca [area counts]	Odziv obogatenega topila [area counts]	AUM [%]
QC _s	2356	2898	- 19
QC _z	74310	94578	- 21

Preverili smo tudi, kolikšen je relativni vpliv matrice. Relativna standardna deviacija v naklonu umeritvenih premic je znašala 3,5 % (preglednica XVI). Vrednost ni preseгла 4 %, zato lahko s precejšno zanesljivostjo trdimo, da je relativni učinek matrice praktično odsoten oz. zanemarljiv. Tako smo ugotavljali, da razlike v sestavi krvi različnih oseb ne igrajo pomembnejše vloge. Analizna metoda je primerna za splošno uporabo v medicini, le če daje zadovoljive rezultate pri vseh pacientih kljub njihovi variabilnosti.

Preglednica XVI. V preglednici so podani nakloni uteženih umeritvenih premic DBS vzorcev posameznih oseb. Razpršenost izračunanih vrednosti umeritvenih premic je podana z relativno standardno deviacijo.

Vzorci	Naklon umeritvene premice [L/ μ g]
Oseba 1	0,01326
Oseba 2	0,01331
Oseba 3	0,01260
Oseba 4	0,01293
Oseba 5	0,01302
Oseba 6	0,01211

Povprečni naklon [L/ μ g]	0,01287
Standardna deviacija	0,0004521
RSD [%]	3,5

4.3.8. Izkoristek

Izkoristek ekstrakcije je pomemben podatek in nam pove, kako uspešno in v kolikšni meri nam je uspelo sprostiti analit iz papirja s posušeno kapljico krvi ter ga nato sprati iz SPE kartuše. Dober izkoristek posledično pomeni večje koncentracije analita v eluatu in zato ima poseben pomen, kadar so koncentracije analita v krvi nizke. Izkoristek ekstrakcije je bil okrog 82 %, kar pomeni, da smo med ekstrakcijo posušene kapljice krvi in elucije analita s kartuše s trdno fazo izgubili 18 % remifentanila. Popoln izkoristek je tako rekoč nemogoč in je vedno kompromis z ostalimi dejavniki, kot sta čas in stopnja odstranitve nečistot. V desni koloni preglednice XVII je podana učinkovitost ekstrakcije. Ta zajema poleg izkoristka ekstrakcije tudi učinek matrice.

Preglednica XVII. Izkoristek ekstrakcije in učinkovitost ekstrakcije.

	Izkoristek [%]	Učinkovitost ekstrakcije [%]
QC _S	83,0	64,9
QC _Z	81,8	64,2

4.3.9. Navzkrižni prenos med vzorci

S testom smo potrdili, da se navzkrižni prenos med vzorci ni pojavljal pri meritvah naših vzorcev. Pogoji tekočinske kromatografije so bili dovolj optimizirani, da se analit ni zaznaval v naslednjem vzorcu (preglednica XVIII), čeprav je sledil vzorcu z zelo visoko koncentracijo analita. Tako smo se prepričali, da ni prišlo do navzkrižnega prenosa v analizni napravi, v nadaljevanju bi bilo priporočljivo tudi preveriti, možnost navzkrižnega prenosa na kateri od stopenj priprav vzorcev.

Preglednica XVIII. Izmerjeni odzivi remifentanila v dveh zaporedno merjenih vzorcih. Drugi vzorec je predstavljalo zgolj topilo za rekonstitucijo. Izmerjeni signal je zato zgolj posledica preostalega remifentanila, ki je ostal od prvega vzorca z visoko koncentracijo analita.

Zaporedni meritvi	Odziv [area counts]		
QC _Z	60309		
Topilo za rekonstitucijo	13	Navzkrižni prenos [%]	0,02

4.4 PRIMERJAVA REZULTATOV VALIDACIJ METOD DOLOČANJA REMIFENTANILA V PLAZMI IN V VZORCIH DBS

Z validacijama smo potrdili primernost metod s katerima smo določali remifentanil v plazemskih vzorcih in v vzorcih DBS. Med metodama so manjše razlike v parametrih kromatografske separacije, saj smo pri analizi DBS vzorcev zaradi izboljšanja specifičnosti uporabili daljšo kolono. Tako pri plazemskih kot pri DBS vzorcih sta bili vrednosti determinacijskih koeficientov korelacije nad 0,999, vendar pa je bilo območje, v katerem je metoda ustrezala zahtevam, za plazemske vzorce nekoliko širše. Vrednost spodnje limite kvantifikacije je bila pri plazemskih vzorcih polovico manjša (0,15 µg/L) kot pri DBS vzorcih (0,30 µg/L). Točnost je bila ustrezna pri obeh metodah, vendar v povprečju nekoliko boljša pri plazemskih vzorcih. Meddnevna ponovljivost je bila pri nekoliko slabša od ponovljivosti znotraj enega dneva. Pri plazemskih vzorcih je opaziti trend boljše ponovljivosti pri višjih koncentracijah, medtem ko je pri DBS vzorcih le-ta podobna ne glede na koncentracijo. Nekoliko slabši rezultati parametrov validacije pri DBS vzorcih niso presenetljivi. Dodatni koraki pri pripravi DBS vzorcev ter ekstrakcija učinkovine z Whatman lističev lahko z dodatnimi spremenljivkami pripomorejo k večji razpršenosti rezultatov meritev. Cilj diplomskega dela je bil razvoj primerne metode za analizo DBS vzorcev. Metodo za določanje remifentanila v plazmi smo tako validirali v nekoliko skrčenem obsegu in nam je služila predvsem v pomoč pri nadaljnjem prehodu na zahtevnejše vzorce krvnih madežev.

4.5 REALNI BIOLOŠKI VZORCI

Analizirali smo tudi vzorce, ki smo jih pridobili iz porodnišnice in so bili odvzeti takoj ob porodu porodnice, ki je bila vključena v raziskavo o intravenskem lajšanju porodnih bolečin z remifentanilom (preglednica XIX). Ob porodu je bila zažeta popkovnica in hkrati odvzeta kri materi. V porodnišnici so nam tako pripravili DBS vzorec venske in arterijske

krvi novorojenčka ter njegove matere. Porodnicam so lahko remifentanil aplicirali do pričetka iztisa otroka, takrat so črpalko, preko katere so dovajali opioidni analgetik, izklopili.

Preglednica XIX. Rezultati analiziranih DBS vzorcev, ki so nam jih pripravili v porodnišnici. Novorojenčkovi vzorci krvi so bili pripravljene iz popkovnične krvi. Kjer so bili rezultati pod mejo kvantifikacije (PMK) smo ocenjeno vrednost podali v oklepaju.

Vzorci	Odziv/ IS ₃	Izračunana koncentracija [µg/L]
Arterijski vzorec matere (mami novorojenčka 1)	0,007678	0,51
Arterijski vzorec – novorojenček 1	0,003501	PMK (0,13)
Venski vzorec – novorojenček 1	0,006307	0,39
Arterijski vzorec – novorojenček 2	0,003152	PMK
Venski vzorec – novorojenček 2	0,004698	PMK (0,24)

Za boljše ovrednotenje rezultatov smo dobili vzorce dveh novorojencev. Samo pri vzorcu matere in venskem vzorcu njenega novorojenčka so bile koncentracije remifentanila dovolj velike, da so presegle mejo kvantifikacije in ju je možno določiti. Pri ostalih tako izračunane koncentracije, ki so v oklepajih, niso zanesljive in so podane zgolj orientacijsko. Izmerjena koncentracija v venski popkovnični krvi je približno 20 % nižja kot v arterijski materini krvi, kar potrjuje zelo dobro prehajanje remifentanila preko posteljice. Pri novorojenčku je izrazita približno trikrat višja koncentracija analita v venski krvi v primerjavi z arterijsko krvjo, kar je v skladu z navedbami o hitri presnovi v literaturi. To potrjuje hitro razgradnjo remifentanila tudi pri novorojencu. Koncentracije so tako pri materi kot tudi pri otroku krepko pod 1 µg/L. Iz tega je moč sklepati, da je uporaba remifentanila po protokolu, ki je bil uporabljen v raziskavi, varna in ni pričakovati zapletov, kot je na primer izrazitejša depresija dihanja ali bradikardija

4.6 RAZPRAVA O USTREZNOSTI RAZVITE METODE GLEDE NA CILJE RAZISKAVE

Metoda krvnih madežev ima v splošnem nekaj zelo dobrodošliih lastnosti, kot so lažje shranjevanje, lažje rokovanje ter manjši volumni vzorcev odvzete krvi in s tem tudi manjša invazivnost posega, kar je še posebej pomembno pri pediatričnih oz. neonatalnih pacientih.

Velikokrat se pri analizi DBS uporabi le del krvne lise, vendar je takrat možnost značilnega vpliva viskoznosti krvi na širjenje lise in s tem na površinsko gostoto vzorca na izrezanem in analiziranem delu lise. Tej spremenljivki in z njo povezani variabilnosti smo se izognili z vključitvijo celotnega krvnega madeža v analizo in natančnim odmerjanjem volumna krvi pri pripravi le-teh. Na ta način smo tudi izboljšali občutljivost metode, saj z zajemom cele lise povečamo množino analita in s tem tudi odziv inštrumenta.

Vse te lastnosti so pomembne pri raziskavi, za katero smo razvili metodo in ki vključuje tako kri porodnice, otročnice in novorojenčka. S to metodo je omogočen kar najmanjši odzem in s tem najmanjša obremenitev udeležencev raziskave. Poleg tega smo dokazali dovolj dobro občutljivost metode, da z njo zanesljivo lahko določamo tudi koncentracije remifentanila, ki so pod mejo, kjer se lahko pojavljajo njegovi resni neželeni učinki. To velja ne glede na relativno dolgo dobo shranjevanja testiranih realnih vzorcev.

5. SKLEP

Uspelo nam je razviti in validirati metodo določanja remifentanila v krvnih madežih s tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti, povezano s tandemsko masno detekcijo. Vzorce smo pripravili z metodo ekstrakcije na trdni podlagi. Na osnovi testiranja smo izbrali kartušo s polimerno reverznofazno podlago, saj smo z njeno uporabo uspeli primerno očistiti vzorce, hkrati pa smo dosegli izkoristek okrog 82 %.

Dokazali smo ustrezno točnost in ponovljivost metode v območju med 0,3 $\mu\text{g/L}$ in 30 $\mu\text{g/L}$. Relativna standardna deviacija meritev kontrolnih vzorcev je bila pri izračunu meddnevne ponovljivosti med 3,9 in 6,4 %. Primernost metode smo potrdili z dokazom odsotnosti relativnega učinka matrice, saj je variabilnost naklonov umeritvenih premic znašala 4,5 %. Metoda ima pomanjkljivost na področju specifičnosti pri najnižjih koncentracijah analita (pod 1 $\mu\text{g/L}$), ki nam je kljub zamenjavi kolone pri prehodu s plazemskih vzorcev na DBS vzorce ni uspelo popolnoma zagotoviti. Čeprav smo dosegli dokaj nizko spodnjo mejo kvantifikacije (0,3 $\mu\text{g/L}$), vseeno nismo mogli določiti koncentracije remifentanila v vseh realnih bioloških vzorcih. Koncentracija analita v vzorcih, ki so bili odvzeti po porodu, je bila nizka, saj so aplikacijo remifentanila prekinili pred zadnjo fazo poroda. Dosežena občutljivost je bila malenkost slabša, kot je bila glede na podatke iz literature dosežena za fentanil (0,1 $\mu\text{g/L}$), in boljša od večine DBS metod za ostale opiate (35, 36). Z izboljšanjem specifičnosti, s povečanjem volumna injiciranja in z nadaljnjo optimizacijo metode bi morda lahko mejo kvantifikacije še znižali. Kljub vsemu je bila občutljivost metode za potrebe načrtovane raziskave povsem zadostna. Izmerjena koncentracija remifentanila v novorojenčkovi krvi je znašala 0,39 $\mu\text{g/L}$, na podlagi česar lahko sklepamo, da uporaba remifentanila ne predstavlja posebnega tveganja zanj, saj je bila dovolj nizka, da ne bi smela povzročati depresije dihanja. Za potrditev teh domnev bi bilo potrebno meritve ponoviti na svežem vzorcu, saj so bili naši biološki vzorci stari več kot šest mesecev, mi pa smo preverili in potrdili stabilnost znotraj dveh tednov. Vsekakor so za varno uporabo remifentanila in izkoriščanje njegovih prednosti potrebni jasni protokoli in dobra izobraženost zdravniškega osebja. Raziskava je doprinesla k boljšemu poznavanju izpostavljenosti novorojenčka remifentanilu, kar bo lahko omogočilo razvoj

izboljšanih režimov odmerjanja, z namenom čim večje varnosti in hkratne učinkovitosti lajšanja porodne bolečine z remifentanilom.

V Bolnišnici za ginekologijo in porodništvo Kranj so v raziskavi uporabljali dva različna protokola odmerjanja remifentanila za lajšanje porodnih bolečin – z in brez uporabe bazalne infuzije. Žal v okviru diplomske naloge nismo imeli na voljo več bioloških vzorcev, da bi lahko naredili primerjavo med njima. Bo pa to izvedeno v nadaljevanju raziskave. Zanimivo bi bilo tudi raziskati, kakšne so koncentracije remifentanila, če v zadnji stopnji poroda ne prekinemo z njegovo aplikacijo.

6. LITERATURA

1. Močnik Rožnik S.: Analgezija v nosečnosti, med porodom in v času dojenja. Farm Vestn 2012; 68: 15-20
2. Ribarič S.: Temelji patološke fiziologije, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009; 263-270
3. Pajntar M., Novak-Antolič Ž. in sodelavci: Nosečnost in vodenje poroda, 2. dopolnjena izdaja, Cankarjeva založba, Ljubljana, 2004; 129-135
4. Rozman A., Zupančič M., Pavlovič G.: Lajšanje bolečin med porodom, Abbott Laboratories, 2009
(http://www.mojmalcek.si/uploads/file/18_sl_lajsanje_bolecin_med_porodom.pdf)
Dostop: 5-6-2013
5. Anim-Somuah M, Smyth R, Jones L.: Epidural versus non-epidural or no analgesia in labour. Cochrane Database Syst Rev 2011, 12: Art. No.: CD000331
6. Mlakar A. P.: Lajšanje porodne bolečine v Sloveniji.
http://www.szzb.si/kongresszsb/files/dvorana_jupiter_petek/1515_plesko.ppt.
Dostop: 5-6-2013.
7. Dershwitz M., Randel G., Rosow C., Fragen R., Connors P., Librojo E., Shaw D., Peng A., Jamerson B.: Initial Clinical Experience with Remifentanil, a New Opioid Metabolized by Esterases. Anesth Analg 1995; 81: 619-23
8. Egan T.: The clinical pharmacology of remifentanil: a brief review. J Anesth 1998; 12: 195-204
9. <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/14766/SPC> (Dostop: 21-6-2013); Povzetek glavnih značilnosti zdravila – Ultiva
10. D'Onofrio P., Novelli A., Mecacci F., Scarselli G.: The efficacy and safety of continuous intravenous administration of remifentanil for birth pain relief: an open study of 205 parturients. Anesth Analg 2009; 109: 1922-4
11. Hinova A., Fernando R.: Systemic remifentanil for labor analgesia. Anesth Analg 2009; 109: 1925-9
12. Glass P., Hardman D., Kamiyama Y., Quill T., Marton G., Donn K., Grosse C., Hermann D.: Preliminary Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of an Ultra-Short-Acting Opioid: Remifentanil (GI87084B). Anesth Analg 1993; 77: 1031-40

13. Pitsiu M., Wilmer A., Bodenham A., Breen D., Bach D., Bonde J., Kessler P., Albrecht S., Fisher G., Kirkham A.: Pharmacokinetics of remifentanyl and its major metabolite, remifentanyl acid, in ICU patients with renal impairment. *Br J Anaesth* 2004; 92(4): 493-503
14. Michelsen L., Hug C.: The pharmacokinetics of remifentanyl. *J Clin Anesth* 1996; 8: 679-82
15. Egan TD. Remifentanyl pharmacokinetics and pharmacodynamics. A preliminary appraisal. *Clin Pharmacokinet.* 1995; 29(2): 80-94
16. Bouillon T., Bruhn J., Radu-Radulescu L., Andersen C., Cohane C., Shafer S.: A model of ventilator depression potency of remifentanyl in non-steady state. *Anesthesiology* 2003; 99: 779-87
17. Litman R.: Conscious sedation with remifentanyl and midazolam during brief painful procedures in children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1999; 153: 1085-88
18. M.G.: Je kriv strah pred porodom ali odpor proti novostim?, *Štajerski tednik; Ptuj*, 2009; 49: 4-5
19. Felc Z.: *Osnove Pediatrije, Interno učno gradivo, Visoka zdravstvena šola v Celju*, Februar 2011
20. Kan R., Hughes S., Rosen M., Kessin C., Preston P., Lobo E.: Intravenous Remifentanyl: Placental Transfer, Maternal and Neonatal Effects. *Anesthesiology* 1998; 88(6): 1467-74
21. Hsu Y., Cortinez L., Robertson K., Keifer J., Sum-Ping S., Moretti E., Young C., Wright D., MacLeod D., Somma J.: Dexmedetomidine Pharmacodynamics: Part I: Crossover comparison of the respiratory effects of dexmedetomidine and remifentanyl in healthy volunteers. *Anesthesiology* 2004; 101: 1066-76
22. Stokes A., Moose T., Parry S., Barfield M., Lovatt C., Dopson W., Melich D., Overvold C., Gade S., Spooner N.: Determination of drug concentrations using dried blood spots: investigation of drug sampling and collection techniques in Crl:CD (SD) rats. *Lab Anim* 2011; 45: 109-113
23. Emmons G., Rowland M.: Pharmacokinetic considerations as to when to use dried blood spot sampling. *Bioanalysis* 2010; 2(11): 1791-6
24. Li W., Tse F.: Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr* 2010; 24: 49-65

25. Mcdade T., Williams S., Snodgrass J.: What a drop can do: Dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography* 2007; 44 (4): 899-925
26. Timmerman P., White S., Globig S., Lüdtke S., Brunet L., Smeraglia J.: EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. *Bioanalysis* 2011; 3 (14): 1567-75
27. Aurand C., Trinh A., Ye M., Mi C.: Introducing HybridSPE™-Precipitation Technology for Pharmaceutical Bioanalytical Sample Preparation
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/The_Reporter/t208003-hybridspe-ppt.Par.0001.File.tmp/t208003-hybridspe-ppt.pdf. Dostop: 27-5-2013.
28. Agilent technologies, Inc. Agilent Bond Elut Plexa and Polymeric SPE Selection Guide. <https://www.chromspec.com/pdf/e/ag77.pdf>. Dostop: 27-5-2013.
29. Waters Corporation. A Universal Approach to a Complex Analytical Challenge. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/lcSP.pdf>. Dostop: 27-5-2013.
30. Phenomenex, Inc. Simplified Solid Phase Extraction Solutions: Keep it Clean with Strata-X. http://phx.phenomenex.com/lib/br75930712_w.pdf. Dostop: 27-5-2013.
31. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD, May 2001
32. Konjedic Urška: Razvoj in validacija analizne metode za kantifikacijo haloperidola in njegovih metabolitov v plazmi s tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno detekcijo, diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012
33. Braggio S., Barnaby R. J., Grossi P., Cugola M.: A Strategy for validation of bioanalytical methods. *JPharm Biomed Anal* 1996; 14: 375-88
34. Matuszewski B. K., Constanzer M. L., Chavez-Eng: Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003; 75: 3019-30
35. Clavijo C.F., Thomas J.J, Cromie M., Schniedewind B., Hoffman K. L., Christians U., Galinkin J. L: A low blood volume LC-MS/MS assay for the quantification of fentanyl and its major metabolites norfentanyl and despropionyl fentanyl in children. *J Sep Sci* 2011; 34: 3568-77

36. Stove C., Ingels A. S., De Kesel P., Sadones N., Lambert W.: Overview of DBS applications for drugs of abuse, Laboratory of Toxicology, Department of Bioanalysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University

<http://www.iatdmct.org/images/File/Compass/Overview%20of%20DBS.pdf>.

Dostop: 15-8-2013