

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA GOLOB (HOČEVAR)

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za *farmacijo*



MOJCA GOLOB (HOČEVAR)

**RAZVOJ IN VALIDACIJA METODE ZA DOLOČANJE
HALOPERIDOLA IN REDUCIRANEGA HALOPERIDOLA V
KRVNIH MADEŽIH S TEKOČINSKO KROMATOGRFIJO,
SKLOPLJENO S TANDEMSKO MASNO SPEKTROSKOPIJO**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR THE
DERMINATION OF HALOPERIDOL AND REDUCED
HALOPERIDOL IN DRIED BLOOD SPOTS USING LIQUID
CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Juriju Trontlju za vodenje, trud, strokovno pomoč in vse nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Hvala tudi doc. dr. Tomažu Vovku in drugim sodelavcem Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi pomagali pri delu v laboratoriju.

Iskreno se zahvaljujem staršem, ki so mi omogočili študij, me vedno spodbujali in mi zaupali. Hvala tudi možu, ostalim članom družine in bližnjim za vso podporo in pomoč. Hvala, ker ste verjeli vame.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja.

Ljubljana, julij 2014

Mojca Golob

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Ilija Ilić, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Shizofrenija	1
1.2	Antipsihotiki	1
1.3	Haloperidol	2
1.3.1	Fizikalno-kemijske lastnosti.....	2
1.3.2	Farmakokinetične lastnosti in metabolizem.....	4
1.3.3	Farmakodinamične lastnosti.....	5
1.3.4	Terapevtsko spremljanje koncentracij.....	6
1.4	Metoda posušenega madeža krvi (DBS).....	6
1.4.1	Potek DBS analize.....	7
1.4.2	Prednosti in slabosti uporabe DBS za terapevtsko spremljanje koncentracij	8
1.5	Primerjava med meritvami v polni krvi in v plazmi	9
2	NAMEN DELA.....	11
3	MATERIALI IN METODEDE	13
3.1	Materiali	13
3.1.1	Standardi.....	13
3.1.2	Reagenti.....	13
3.1.3	Mobilne faze in topila	13
3.1.4	Biološki material	14
3.2	Naprave in laboratorijski inventar	15
3.3	Metode	16
3.3.1	Priprava osnovnih raztopin in topil	16
3.3.2	Priprava DBS vzorcev	18
3.3.3	Ekstrakcija.....	19
3.3.4	Analiza vzorcev	19
3.3.5	Validacija metode.....	21

3.3.6	Analiza skladnosti dveh metod z diagramom Blanda in Altmana	26
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1	Ekstrakcija	27
4.2	Analiza vzorcev	27
4.3	Validacija	31
4.3.1	Selektivnost (specifičnost)	31
4.3.2	Linearnost.....	33
4.3.3	Znotrajdnevna točnost in ponovljivost.....	36
4.3.4	Meddnevna točnost in ponovljivost	36
4.3.5	Delovno območje metode.....	37
4.3.6	Spodnja meja določitve	38
4.3.7	Stabilnost.....	39
4.3.8	Učinkovitost ekstrakcije.....	39
4.3.9	Navzkrižni prenos med vzorci.....	40
4.4	Uporaba analizne metode na vzorcih pacientov	40
4.5	Analiza skladnosti dveh metod (Bland-Altman plot)	43
5	SKLEPI	45
6	LITERATURA.....	46

POVZETEK

Haloperidol je nevroleptik iz skupine starejših tipičnih antipsihotikov, a se kljub temu še vedno pogosto uporablja za zdravljenje akutne in tudi kronične shizofrenije. Vzdrževalno zdravljenje s psihiatričnimi zdravili bistveno zmanjša ponovitev bolezni pri pacientih s shizofrenijo. Težava pri tem je slabo sodelovanje pacientov ter variabilnost v farmakokinetiki haloperidola in neželeni učinki, ki jih povzročajo. V diplomski nalogi smo z namenom lažjega spremljanja zdravljenja razvili metodo za terapevtsko spremljanje koncentracij haloperidola, ki je manj invazivna in s tem bolj prijazna do bolnikov, zato lahko pričakujemo tudi njihovo boljše sodelovanje. Analizna metoda omogoča določanje haloperidola in njegovega aktivnega metabolita, reduciranega haloperidola, iz posušenih madežev krvi (DBS). Bistvene prednosti te metode v primerjavi s klasično metodo merjenja koncentracij v plazmi ali serumu so, da je metoda manj invazivna, potrebni so manjši volumni krvi (le 4–12 µL za posamezen vzorec), ki jo odvezamo z vbodom v prst ali peto. Poleg tega bi si lahko pacienti DBS vzorce jemali sami doma in jih preko navadne pošte poslali v analizo. Razvili smo ekstrakcijski postopek, pri čemer smo iz predhodno nanesenih in posušenih kapelj krvi na filter papirju DBS kartic s topilom prenesli analite v raztopino. Detekcija analitov je potekala na tekočinskem kromatografu ultra visoke ločljivosti, sklopljenim s tandemskim masnim spektrometrom vrste trojni kvadrupol (UHPLC-MS/MS). Sledila je validacija metode po smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila. Dokazali smo, da je metoda primerno točna, ponovljiva, selektivna ter zagotavlja dobro učinkovitost ekstrakcije. Metoda je za oba analita, haloperidol in reduciran haloperidol, linearna v območju 0,4–100 µg/L. Metoda uporablja izotopno označen interni standard $^{13}\text{C}_6$ haloperidol, ki učinkovito korigira učinek matrice, sicer bi slednji lahko mejno značilno vplival na točnost metode (15 %). DBS vzorci kažejo ustrezno stabilnost po 13 dneh izpostavljenosti različnim temperaturam (3 °C, 25 °C in 40 °C). Dosegli smo primerljivo občutljivost oziroma spodnjo mejo določitve (0,4 µg/L), kot pri klasičnih plazemskih metodah. Z razvito in validirano metodo smo analizirali DBS vzorce 41 pacientov iz klinične študije, ki so prejeli depo obliko haloperidola. Dobljene rezultate krvnih vzorcev smo primerjali z rezultati plazemskih vzorcev iz pretekle raziskave, pripravljenih iz istih vzorcev krvi. Z analizo skladnosti dveh metod z grafičnim postopkom Blanda in Altmana smo ugotovili, da je razvita metoda primerljiva plazemski

metodi. Zato bi lahko metoda posušenega madeža krvi uspešno nadomestila klasični odvzem krvi iz vene pri terapevtskem spremljanju koncentracij haloperidola.

Ključne besede: haloperidol, terapevtsko spremljanje koncentracij, posušen madež krvi, UHPLC-MS/MS, validacija

ABSTRACT

Haloperidol is a neuroleptic drug belonging to the group of older typical antipsychotics, nevertheless it is still being frequently used for the treatment of acute or chronic schizophrenia. Maintenance therapy with psychiatric medications essentially contributes to the decreased relapse rate in patients with schizophrenia. This may be hindered by the poor adherence to treatment of patients and the variability of pharmacokinetics of haloperidol and its adverse effects. In order to monitor the treatment in a more convenient way, this degree paper presents a new method for therapeutic drug monitoring for haloperidol that offers less invasive sampling and is thus more patient-friendly, which can lead to improving adherence to drug treatment. The analytical method enables determination of haloperidol and active metabolite of reduced haloperidol in dried blood spots (DBS). In comparison to the traditional method of concentration measurements in plasma or serum, the main advantage of this method is its less invasive sampling and lower blood volume required (only 4–12 μL for a sample), which can be taken by finger prick or heel prick. In addition, DBS samples can be taken by patients themselves and sent to the laboratory by post. An extraction procedure was developed, where analytes from previously collected and dried blood spots on a filter paper of DBS cards were transferred to a solution. The detection of analytes was carried out by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). This was followed by the validation of the method according to the FDA guidelines. The method was proved to have acceptable accuracy, precision, selectivity, and to enable an effective extraction. It was linear in the range of 0.4–100 $\mu\text{g/L}$ for both of the analytes, haloperidol and reduced haloperidol. The method uses an isotope labelled internal standard $^{13}\text{C}_6$ haloperidol, which effectively corrects matrix effects, so that the latter does not have any significant influence on the accuracy of the method. After the period of 13-day exposure to various temperatures (3 $^{\circ}\text{C}$, 25 $^{\circ}\text{C}$ and 40 $^{\circ}\text{C}$) DBS samples show acceptable stability. The method gave comparable results regarding sensitivity or the lower limit of quantification (0.4 $\mu\text{g/L}$) to those obtained by traditional plasma methods. DBS samples of 41 patients from the clinical trial, who had received depot haloperidol, were analysed using the developed and validated method. Subsequently, obtained results of blood samples were compared to the results of plasma samples from the previous study, which were prepared from the same blood samples. Through the consistency analysis of the two methods using the Bland-Altman

graphic approach it was found out that the developed method is comparable to plasma sampling. The dried blood spot method may successfully replace the traditional blood sampling from a vein for the therapeutic drug monitoring for haloperidol.

Key words: haloperidol, therapeutic drug monitoring, dried blood spot, UHPLC-MS/MS, validation

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

- c koncentracija
- CV koeficient variacije
- CŽS centralni živčni sistem
- DBS posušen madež krvi (*angl. dried blood spot*)
- DR delovna raztopina
- DR-QC delovna raztopina za pripravo kontrolnega vzorca
- ESI elektrorazprševalna ionizacija (*angl. electrospray ionization*)
- FDA Ameriška agencija za hrano in zdravila (*angl. Food and Drug Administration*)
- HA haloperidol
- Hct hematokrit
- HPLC tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (*angl. high-performance liquid chromatography*)
- IS interni standard
- LC-MS/MS tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
- LLOQ spodnja meja določitve (*angl. lower limit of quantification*)
- m/z razmerje med maso in nabojem (*angl. mass-to-charge ratio*)
- MF mobilna faza
- MRM multirezidualna analiza (*angl. multiple reaction monitoring*)
- MS masna spektrometrija
- ND ne zaznane vrednosti (*angl. not detected*)
- PR primarna osnovna raztopina

- QC kontrolni vzorec (*angl. quality control*)
- QC_H kontrolni vzorec visoke koncentracije
- QC_L kontrolni vzorec nizke koncentracije
- QC_M kontrolni vzorec srednje koncentracije
- r² determinacijski koeficient
- rHA reduciran haloperidol
- RSD relativna standardna deviacija
- SR sekundarna osnovna raztopina
- TDM terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil (*angl. therapeutic drug monitoring*)
- Ue učinkovitost ekstrakcije
- UHPLC tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (*angl. ultra high performance liquid chromatography*)
- UM učinek matrice

1 UVOD

1.1 SHIZOFRENIJA

Pri shizofreniji in ostalih psihotičnih motnjah je še dandanes zelo prisotna stigma in ljudje z duševnimi motnjami navadno veljajo za šibkejše in manjvredne. Vzrok so verjetno klinični znaki, ki se v primerjavi s somatskimi boleznimi kažejo predvsem z obnašanjem, spremenjenim doživljanjem resničnosti, halucinacijami, socialnim umikom. Tak odnos družbe do teh bolezni slabo vpliva na njihovo zgodnje odkrivanje, saj se ljudje z duševnimi motnjami za iskanje pomoči odločajo v manjši meri, kar pa je bistveno za kasnejše zdravljenje in morda ozdravitev. Upad samospoštovanja in samostigmatizacija pacientov shizofrenije med drugim vplivata tudi na slabo sodelovanje pri zdravljenju (1, 2).

Shizofrenija je ena najbolj proučevanih psihotičnih motenj, za katero zboli okoli 1 % prebivalstva, obolevajo mladi ljudje, je pogosto kronična in lahko hudo obremeni oz. hendikepira obolelega (3). Klinične znake shizofrenije lahko razdelimo v tri skupine: *pozitivni* (slušne halucinacije, paranoidne blodnje, motorični nemir – agitacija, motnje gibanja), *negativni* (brezvoljnost, pomanjkanje zanimanja – apatija, čustvena otopelost) ter *motnje kognitivnih funkcij* (motnje pozornosti, osredotočenosti, spomina, abstraktnega mišljenja, presojanja in smiselnega odločanja) (4). Vzroki za bolezen še niso popolnoma razjasnjeni. Pomembni so genetski dejavniki, razvojni vplivi v prenatalnem obdobju ter vplivi okolja. Gre za nevrokemične nepravilnosti v možganih, za katere obstaja več razlag. Najbolj pogosta je dopaminska hipoteza, po kateri je vzrok za psihozo prekomerna aktivnost dopamina v možganih (5). Alternativne razlage vključujejo tudi vpletenost drugih mediatorjev, kot so glutamat, serotonin in noradrenalin. Shizofrenija se lahko pojavlja v obliki ponovitev in začasnih izboljšanj simptomov, ali je kronična in progresivna, obe obliki pa zdravimo z antipsihotiki oz. nevroleptiki (3). Farmakoterapija shizofrenije je usmerjena predvsem v zdravljenje pozitivnih in negativnih simptomov, zato je v zdravljenje pogosto vključena tudi psihološka in socialna podpora (4).

1.2 ANTIPSIHOTIKI

Učinkovine za zdravljenje shizofrenije delimo v dve skupini. Prve razvite učinkovine uvrščamo med klasične antipsihotike oz. antipsihotike prve generacije (flufenazin, flupentiksol, haloperidol, levomepromazin, promazin in pentiksol). Zanje je značilno, da izboljšajo predvsem pozitivne klinične znake shizofrenije, medtem ko je učinek na

negativne znake zelo slabo izražen. Novejše učinkovine pa uvrščamo med atipične antipsihotike oz. antipsihotike druge generacije (amisulprid, aripiprazol, klozapin, kvetiapin, olanzapin, paliperidon, risperidon, sulpirid in ziprazidon). Le-te so učinkovite v izboljšanju tako pozitivnih, kot negativnih znakov in so zdravila prvega izbora pri zdravljenju shizofrenije. Tudi pojav ekstrapiramidnih stranskih učinkov je tu manj pogost kot pri tipičnih antipsihotikih (3, 4, 5).

Mehanizem delovanja

V centralnem živčnem sistemu (CŽS) razlikujemo pet podtipov dopaminskih receptorjev, ki jih delimo v dve večji skupini: 1) skupina receptorjev podobnih D₁: sem sodijo podtipi D₁ in D₅; 2) skupina receptorjev podobnih D₂ pa vključuje podtipe D₂, D₃ in D₄. Interakcije antipsihotičnih učinkovin z D₂ receptorji so kompleksne in vključujejo antagonizem, inverzni agonizem in delni agonizem, poleg tega večina zavira še vrsto drugih receptorjev. Za dosežen terapevtski učinek je odgovoren predvsem antagonizem D₂ dopaminskih receptorjev in potrebna je blokada najmanj 80 % le-teh receptorjev. Za izboljšanje pozitivnih znakov shizofrenije je odgovoren antagonizem D₂ receptorjev v mezolimbicni poti. Žal pa sistemsko aplicirani antipsihotiki ne razlikujejo med receptorji v različnih možganskih regijah, zato se pojavljajo stranski učinki (npr. blokada D₂ receptorjev v nigrostriatni poti povzroči motorične neželene učinke, blokada v tuberoinfundibularni poti poveča izločanje prolaktina, itd.). Nekateri antipsihotiki, predvsem novejše učinkovine z bolj raznolikimi strukturami, so dodatno še antagonisti muskarinskih acetilholinskih (mACh) receptorjev in serotoninskih (5-HT_{2A}) receptorjev, s čimer neželene učinke različno omilijo (3, 5, 6).

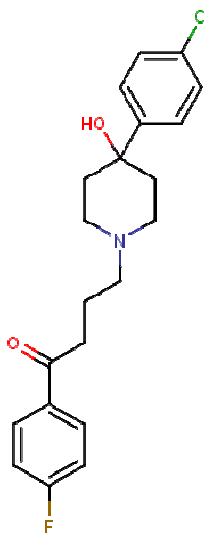
Pomembno je, da bolniki ob začetku zdravljenja shizofrenije ne obupajo prehitro, saj do nastopa terapevtskega učinka antipsihotikov pride šele po določenem času, kljub takojšnji blokadi dopaminskih receptorjev. Mehanizem za zakasnen nastop učinka še ni popolnoma razjasnjen, vendar gre za kompenzatorne spremembe v možganih, ki jih povzroči uporaba antipsihotičnih zdravil (3).

1.3 HALOPERIDOL

1.3.1 Fizikalno-kemijske lastnosti

Haloperidol je spojina z IUPAC imenom 4-[4-(4-klorofenil)-4-hidroksi-1-piperidinil]-1-(4-fluorofenil)-1-butanon in glede na strukturo spada med butirofenone. Struktura spojine je

predstavljena na sliki 1. Je dokaj lipofilna spojina in se veže predvsem na dopaminske D₂ in serotoninske 5-HT₂ receptorje v možganih sesalcev, ki so vključeni v posredovanje antipsihotične aktivnosti butirofenonov. Za nevroleptično delovanje je esencialna amino skupina na četrtem ogljiku v butirofenonskem skeletu. Razvili so tudi haloperidol dekanolat, ki je depo oblika zdravila za intramuskularno aplikacijo za vzdrževalno zdravljenje. Najpomembnejše fizikalno-kemijske lastnosti haloperidola so podane v preglednici I (5, 7, 8).



Slika 1. Struktura haloperidola

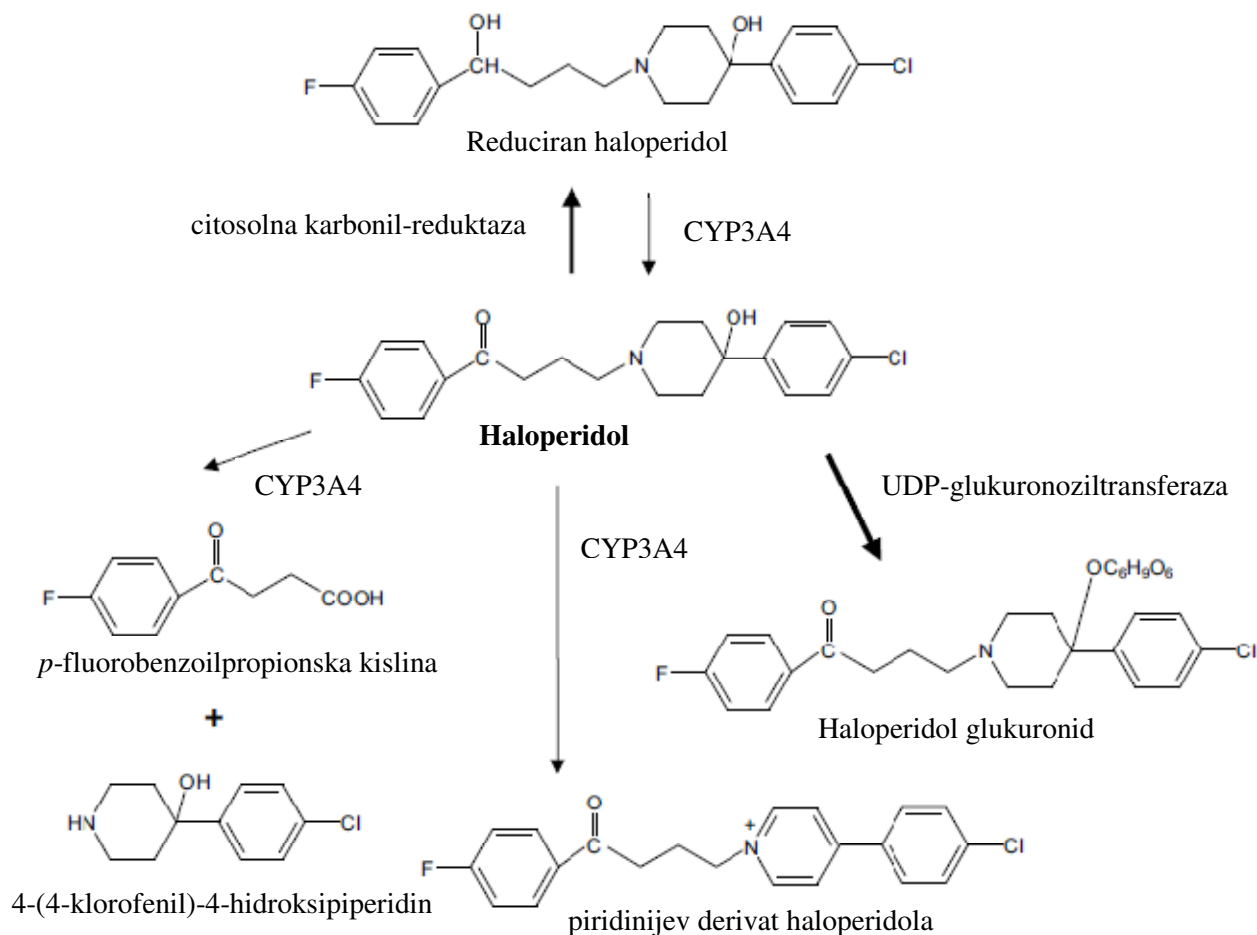
Preglednica I. Fizikalno-kemijske lastnosti haloperidola

Kemijska formula	C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂
Molekulska masa	375,86 g/mol
pKa	8,66
logP	4,30
Temperatura tališča	151,5 °C
Topnost	dobro topen v dimetilsulfoksidu, metanolu, slabo topen v vodi (14 mg/L pri 25 °C)
Izgled	trdna bela snov, brez vonja

1.3.2 Farmakokinetične lastnosti in metabolizem

Za haloperidol je značilna velika interindividualna variabilnost farmakokinetike, ki je posledica različnih dejavnikov. Vključeni so genetski polimorfizem encimov presnove, interetnične razlike, interakcije haloperidola z drugimi učinkovinami preko inhibicije ali indukcije encimov in tudi kajenje (9). Zdravilo lahko apliciramo intravensko, intramuskularno ali peroralno. Intramuskularna aplikacija je prednostno uporabljena pri akutni shizofreniji za takojšnje obvladovanje nasilnega vedenja, saj je največja plazemska koncentracija učinkovine dosežena po 33,8 minutah. Po peroralni aplikaciji se haloperidol dobro, vendar individualno različno absorbira iz prebavil, hrana pa lahko upočasni ali zmanjša obseg absorpcije. Največja plazemska koncentracija je dosežena po dveh do šestih urah. Haloperidol ima ozko terapevtsko okno in klinično učinkovite koncentracije v plazmi so med 5,6 in 16,9 µg/L (10). V veliki meri, kar 92 %, se ga veže na beljakovine v plazmi in vstopa tudi v krvne celice (11). Prosto prehaja v različna tkiva, posebej se porazdeljuje v globus pallidus v možganih. Navidezen volumen porazdelitve v stanju ravnotežja je velik in znaša od 9,5 do 21,7 L/kg po intravenski aplikaciji. Haloperidol se v glavnem presnavlja v jetrih preko različnih poti, predvsem z glukuronidacijo in encimskim sistemom citokrom P450, kjer imata encima CYP3A4 in CYP2D6 največjo vlogo. Le 1 % odmerka se izloči nespremenjenega z urinom. Metabolizem haloperidola je prikazan na sliki 2. Pri oksidativni N-dealkilaciji haloperidola z encimom CYP3A4 nastaneta *p*-fluorobenzoilpropionska kislina in 4-(4-klorofenil)-4-hidroksipiperidin. S pomočjo encima karbonilne reduktaze pride do redukcije ketonske skupine haloperidola, pri čemer nastane najpomembnejši metabolit, reduciran haloperidol, encim CYP3A4 pa z oksidacijo le-tega pretvori nazaj do haloperidola in to je edina reverzibilna pot v metabolizmu haloperidola. Reduciran haloperidol je sicer farmakološko aktiven metabolit, vendar v raziskavi povezave med koncentracijo rHA in povečanim terapevtskim učinkom niso našli, saj rHA doseže le 1/400 vezave haloperidola na D₂ dopaminske receptorje (10, 12). Z oksidacijo haloperidola nastane piridinijev derivat haloperidola. V drugi fazi metabolizma je najpomembnejša reakcija haloperidola konjugacija z glukuronsko kislino, kjer ob prisotnosti UDP-glukuronoziltransferaze nastaja haloperidol glukuronid (predvsem O-glukuronid) (9). Pri prvem prehodu skozi jetra se nekaj peroralno apliciranega haloperidola presnovi, vendar je njegova biološka uporabnost na splošno visoka (60–70 %). Razpolovni čas haloperidola je zaradi variabilnosti med posamezniki razpet med 14,5 in 36,7 ur po peroralni aplikaciji, med 14,1 in 26,2 ur po intravenski ter znaša 20,7 ur po intramuskularni

aplikaciji. Variabilnost razpolovnih časov haloperidola po različnih načinih aplikacije pa je posledica enterohepatične cirkulacije, ki ji je učinkovina podvržena (13). Izloča se s sečem (40 %) ter z blatom (60 %) (8, 14).



Slika 2. Shema metabolične pretvorbe haloperidola pri ljudeh; CYP = citokrom 450, UDP = uridin-difosfat

1.3.3 Farmakodinamične lastnosti

Haloperidol je močan antagonist osrednjih dopaminskih receptorjev; ima namreč visoko afiniteto do D_2 receptorjev in se počasi disociira iz njih, medtem ko ima do drugih receptorjev, kot na primer $5-HT_{2A}$, D_1 in D_3 , nizko afiniteto. Domnevajo, da ravno zaradi tega izkazuje manjšo učinkovitost pri negativnih znakih shizofrenije, saj naj bi v njihovem izboljšanju imela pomembno vlogo vpletenost drugih receptorjev (14, 15). Osnovni farmakološki učinki haloperidola so podobni učinkom piperazinskih derivatov

fenotiazinov. Ima močno antipsihotično delovanje, dobro uravnava psihomotorični in nevrovegetativni sistem, dobro inhibira nekoordinirane gibe, poleg tega pa izkazuje tudi močno antiemetično delovanje zaradi antagonizma D₂ receptorjev v kemoreceptorski trigger coni v meduli oblongati (16). Ima visoko stopnjo povzročanja ekstrapiramidnih reakcij, sedacija pa je pri povprečnih odmerkih manjša kot pri klorpromazinu. V primerjavi z drugimi antipsihotiki ima manj izrazit učinek na avtonomni živčni sistem in pojavi se le blaga hipotenzija, tudi pri visokih odmerkih (5, 7, 14).

Haloperidol in drugi tipični antipsihotiki, razviti pred mnogimi leti, se kljub razvoju nove generacije učinkovin še danes pogosto uporabljajo za zdravljenje shizofrenije in drugih nevropsihiatričnih bolezni (17). Še vedno namreč ugotavljajo, ali so novejša zdravila učinkovitejša in ali jih pacienti bolje prenašajo, ker povzročajo stranske učinke (prim. antiholinergični učinki, močno sedativno delovanje, znižanje krvnega pritiska, matabolne spremembe, debelost, diabetes), ki lahko pretehtajo njihovo korist (10, 18). Haloperidol je pomemben tudi za zdravljenje maničnih stanj bipolarni motnje (5), paranoje in akutnih stanj zmedenosti (14), je zdravilo izbora za zdravljenje tikov (predvsem vokalnih) pri Tourettovem sindromu, učinkovit je za zdravljenje resnih vedenjskih motenj hiperaktivnih otrok (predvsem pretirana motorična aktivnost) (8), uporablja se kot antiemetik pri akutni slabosti po kemoterapijah (16). Velika prednost je tudi to, da je relativno poceni.

1.3.4 Terapevtsko spremljanje koncentracij

Zdravljenje s haloperidolom zaradi pomembne interindividualne variabilnosti farmakokinetike in plazemskih koncentracij ter ozkega terapevtskega okna zahteva individualno obravnavo vsakega bolnika (8). Zato strokovnjaki po zadnji posodobitvi Soglasja o smernicah za TDM v psihiatriji za učinkovito kontrolo zdravljenja močno priporočajo terapevtsko spremljanje koncentracij za haloperidol (19).

1.4 METODA POSUŠENEGA MADEŽA KRVI (DBS)

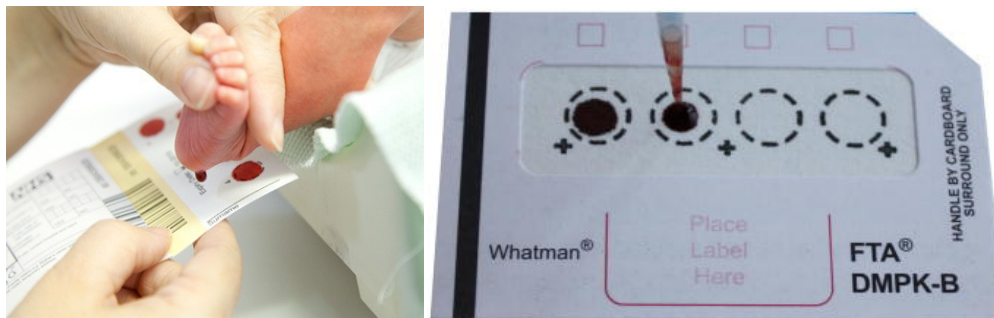
Zbiranje vzorcev polne krvi na filter papirju, znano kot metoda *posušenega madeža krvi (DBS)*, predstavlja alternativo klasičnim metodam odvzema krvi in vzorčenja seruma ali plazme. Metodo zbiranja DBS vzorcev z vbodom v peto novorojenčkov in nanosom kapljic krvi na filter papir je prvič uporabil dr. Robert Guthrie leta 1963 za merjenje fenilalanina pri presejalnih testih za metabolično motnjo fenilketonurijo. Metoda je v zadnjih desetih letih pridobila na popularnosti zaradi številnih prednosti, ki jih prinaša.

Njena uporaba se je že razširila na področje presejalnih testov pri novorojenčkih, terapevtskega spremljanja koncentracij učinkovin ter predkliničnih in kliničnih študij farmakokinetike, farmakodinamike, toksikokinetike (20–22).

1.4.1 Potek DBS analize

Za pripravo DBS vzorcev je potreben majhen volumen krvi, ki jo največkrat vzamemo z vbodom v prst ali peto (pri novorojenčkih) s posebno lanceto. Mesto odvzema segrejemo in očistimo ter zbodemo z lanceto. Prvo kapljo krvi obrišemo z gazo, naslednjo kapljo pa nanesemo neposredno v označen krogec na filter papir na kartici, pri čemer pazimo, da ne pride do stika kože s papirjem. Madež, ki se naredi na papirju, mora biti homogen in simetričen ter na zgornji in spodnji strani papirja enako velik. Kri lahko na kartice nanesemo tudi s kalibrirano pipeto, s čimer zagotovimo enak volumen vseh vzorcev in se izognemo vplivu hematokrita na porazdelitev kaplje na papirju. Oba načina priprave vzorcev sta prikazana na sliki 3. DBS vzorce nato najmanj dve uri sušimo na zraku pri sobni temperaturi, odmaknjene od direktne sončne svetlobe, ali jih sušimo v temi, če je spojina občutljiva na svetlobo. Kartice z dobro posušenimi vzorci shranimo v nepropustno zrakotesno plastično vrečko ter dodamo sušilno sredstvo, da preprečimo prisotnost vlage, ki lahko vpliva na kakovost vzorcev. Tako pripravljene vzorce lahko pošljemo tudi po navadni pošti v laboratorij, kjer opravimo analizo. Odvisno od stabilnosti analitov lahko vzorce tako shranjujemo več tednov ali celo let (20, 21, 23, 24). Tehnika izrezovanja vzorcev iz filter papirja mora biti ponovljiva, pri čemer za izrezovanje uporabljamo posebno napravo (pečat). Iz posušenega madeža krvi izrežemo enega ali več manjših diskov, če smo dokazali, da volumen in viskoznost krvi ne vplivata na porazdeljevanje krvi na filter papirju. Kadar je volumen kaplje krvi definiran (nanos določenega volumna s pipeto ali kapilaro), lahko izrežemo tudi celoten madež (21). Z ekstrakcijskim topilom nato prenesemo analite iz papirja v raztopino in opravimo kvantitativno analizo s tekočinsko kromatografijo, ki je največkrat sklopljena z masnim detektorjem (LC-MS/MS). Najpogosteje ekstrakcijo izvajamo ročno oz. »off-line«. Zaradi hitrega razvoja in usmerjenosti uporabe DBS metode predvsem za TDM ter predklinične FK študije na živalih in posledično velikega števila vzorcev pa so v laboratorijih z velikimi serijami vzorcev razvili tudi napravo za direktno in avtomatizirano analizo DBS vzorcev, kjer poteka »on-line« ekstrakcija (npr. sistem DBS-MS 500, CAMAG) (25). V tem primeru za ekstrakcijo ni potrebna predpriprava vzorcev in le-ta poteka direktno iz kartic, brez

izrezovanja diskov. Celoten postopek je avtomatiziran in delo poteka s pomočjo robotskih rok (22, 26).



Slika 3. Priprava DBS vzorcev z vbodom v peto novorojenčka (levo) in nanos krvi s kalibrirano pipeto (desno)

1.4.2 Prednosti in slabosti uporabe DBS za terapevtsko spremljanje koncentracij

DBS metoda vzorčenja krvi se je zelo razširila za uporabo pri TDM. Prinaša namreč nekaj pomembnih prednosti v primerjavi s klasičnimi načini pridobivanja biološkega materiala. Iz vidika pacientov je bistvena prednost to, da je metoda manj invazivna kot venepunkcija in potreben je manjši volumen krvi. Znano je namreč, da je pri psihiatričnih pacientih zelo slaba komplanca in navodilom o zdravljenju sledi v celoti le polovica pacientov s shizofrenijo (1). Strah pred injekcijsko iglo ali odvzem večjega volumna krvi pri teh pacientih lahko pomeni veliko psihično obremenitev, predvsem pa sodelovanje pri zdravljenju močno zmanjša sprejem v bolnišnico proti pacientovi volji. Ob minimalnem usposabljanju bi si lahko pacienti DBS vzorce jemali sami doma in jih po pošti poslali v laboratorij, s čimer bi se zmanjšalo število njihovih obiskov v bolnišnici. Vzorce bi si tako lahko vzeli v nestresnem okolju in ob času, ki njim najbolj ustreza. Poleg tega tudi zdravniško osebje prihrani čas, ki bi bil sicer potreben za odvzem krvi. Rezultate analize bi pacienti dobili ob naslednjem rutinskem pregledu pri zdravniku. Pomembno je tudi, da se z DBS vzorci tveganje za okužbe s HIV/AIDS in drugimi infekcijskimi patogeni zmanjša na minimum. Poleg tega posušena kri stabilizira mnoge analite (20, 21, 23, 24).

Vendar pa ima taka uporaba DBS vzorcev tudi nekatere slabosti. Kljub usposabljanju pacientov je tveganje, da številni vzorci ne bi zadostili minimalnim standardom kakovosti. Nemogoče je tudi izvajati nadzor o izvoru krvi in času odvzema. Poleg tega nekateri

pacienti zaradi strahu pred zbadanjem in pogledom na kri ne bi bili sposobni sami sebe zbsti in pripraviti vzorce. Zaradi majhnih volumnov so koncentracije analitov v vzorcih zelo nizke. Zato so za merjenje analitov potrebne visoko specifične in občutljive analizne naprave, kot na primer masna spektrometrija, ki pa so zelo drage (20, 21, 23, 24).

1.5 PRIMERJAVA MED MERITVAMI V POLNI KRVI IN V PLAZMI

DBS metoda vzorčenja biološkega materiala v primerjavi s klasičnim merjenjem koncentracij učinkovin v plazmi prinaša povsem nov pristop do dela. Med metodama so bistvene razlike že v pripravi in ravnanju z vzorci, v matrici, vplivu porazdeljevanja učinkovin v krvne celice, itd.

Za plazemske vzorce največkrat opravimo venski odvzem krvi, DBS vzorci pa so pripravljani iz kapilarnega odvzema iz pete ali prsta na roki in ta kri je mešanica krvi iz arteriol, venul in kapilar (27). Velika razlika je v volumnu krvi, ki je potreben za pripravo vzorcev. Za plazemski vzorec je potreben odvzem najmanj 0,5 mL krvi, za DBS vzorec pa manj kot 100 μ L oz. nam tehnološki razvoj analiznih instrumentov v zadnjih letih omogoča merjenje analitov celo iz samo 4–12 μ L krvi (28). Prav ta lastnost DBS metode nam omogoča bolj etične predklinične raziskave na malih živalih, saj je število žrtvovanih živali manjše, ker je možno več zaporednih odvzemov od iste živali (22). Praktično je, da pri DBS vzorcih ni potrebno dodajati antikoagulantov, saj je kri nanešena direktno na papir in vzorce le posušimo na zraku (28). Medtem ko je za pripravo plazme iz polne krvi potrebno s centrifugiranjem ločiti celično frakcijo. Tudi shranjevanje in prenos plazme sta zahtevnejša. DBS vzorcev ni potrebno zamrzovati oz. le vzorce z manj stabilnimi komponentami shranjujemo pri nižjih temperaturah in za njihov transport do laboratorija ne potrebujemo suhega ledu, temveč le kvalitetne ovojnice. S tem se zmanjšajo tudi stroški (23, 29). DBS metoda je zaenkrat razvita le za majhne molekule, ki ne smejo biti hlapne in občutljive na zrak, zato moramo pred načrtovanjem analize preveriti stabilnost analitov (23). Iz vidika analize pa so DBS vzorci malo zahtevnejši kot plazemski vzorci. Plazma je relativno enostavna matrica in je za večino analiznih tehnik lažja za izvedbo meritev kot polna kri. Polna kri je namreč kompleksnejša matrica, saj vsebuje številne endogene komponente, kot naprimer membranske fosfolipide, hemoglobin, proteine idr., ki lahko na masnem detektorju interferirajo in spreminjajo učinkovitost ionizacije analita. Pomemben je tudi vpliv hematokrita v DBS vzorcih. Le-ta vpliva na oblikovanje in širjenje lise krvi na

filter papirju ter homogenost madežev. Pri visokem hematokritu je kri bolj viskozna, zato so madeži na papirju manjši in bolj skoncentrirani. Od hematokrita lahko zavisita tudi izkoristek ekstrakcije in učinek matrice (23, 30). Na splošno so vrednosti hematokrita precej konstantne, spremenijo pa se lahko pri pacientih z anemijami ali zaradi vpliva zdravlil na hematokrit. Hematokrit je pomemben dejavnik tudi v primerih, ko DBS rezultate primerjamo s plazemskimi, saj se učinkovine različno vežejo na plazemske proteine in porazdeljujejo v krvne celice, kar vpliva na izmerjene koncentracije v enih in drugih vzorcih (26). Vpliv hematokrita je najbolj opazen pri analitih, ki se ne porazdeljujejo v eritrocite (hidrofilne in kisle učinkovine ter terapevtski proteini z visoko afiniteto do plazemskih proteinov), saj zaradi hemolize pride do razredčevanja krvnega vzorca. Ravno obratno je pri analitih, ki v veliki meri vstopajo v eritrocite, saj se koncentracija analitov v krvnih vzorcih zaradi hematokrita v tem primeru ne spremeni. Lahko pa veliko porazdeljevanje analitov v eritrocite predstavlja težavo pri plazemskih vzorcih, kjer že najmanjša hemoliza povzroči precejšnjo napako zaradi povečanja plazemske koncentracije. Porazdeljevanje učinkovin med plazmo in celicami je odvisno od prepustnosti celične membrane ter afinitete učinkovine do komponent v plazmi in znotraj celic ter morebitnega aktivnega transporta (28). Praviloma je farmakološko aktivna le prosta oz. nevezana učinkovina, ki lahko preide plazemsko membrano in se veže na farmakološke receptorje (31).

2 NAMEN DELA

V diplomskem delu bomo razvili analizno metodo za določanje koncentracije haloperidola in njegovega aktivnega metabolita, reduciranega haloperidola, v polni krvi iz posušenih madežev krvi.

Haloperidol je nevroleptik iz skupine tipičnih antipsihotikov in je najbolj uporabljen nevroleptik za zdravljenje akutne in tudi kronične shizofrenije. Vzdrževalno zdravljenje s psihiatričnimi zdravili bistveno zmanjša ponovitev bolezni pri pacientih s shizofrenijo. Težava pri tem je slabo sodelovanje pacientov. Z namenom izboljšanja sodelovanja pacientov pri zdravljenju želimo razviti metodo za terapevtsko spremljanje koncentracij učinkovine, ki bi bila manj invazivna in bolj enostavna za uporabnike. Metoda posušenih madežev krvi ima nekaj prednosti v primerjavi z merjenjem koncentracij v plazmi ali serumu. Iz vidika pacientov so največje prednosti, da je metoda manj invazivna, saj kri odvzamemo z vbodom z lanceto v prst in za odvzem ni potreben obisk bolnišnice ter zbadanje z injekcijsko iglo. Pacienti si lahko kri odvzamejo sami doma in vzorce pošljejo v analizo preko navadne pošte. Za mnoge psihiatrične bolnike je obisk bolnišnice zelo stresen in obremenjujoč, kar je pogosto vzrok za slabo sodelovanje pri zdravljenju. S tem načinom bi dosegli večjo complianco pri pacientih, lažje bi nadzorovali koncentracije učinkovine v krvi in posledično bi bilo manj hospitaliziranih ljudi zaradi poslabšanj ali ponovitev bolezni.

Razviti moramo ekstrakcijski postopek, s katerim bomo iz predhodno nanesenih in posušenih kapelj krvi na DBS karticah v čim večji meri prenesli analite v raztopino. Detekcija analitov bo potekala na tekočinskem kromatografu ultra visoke ločljivosti sklopljenim s tandemskim masnim spektrometrom (UHPLC-MS/MS). Za analizo je potrebna zelo občutljiva in selektivna naprava, saj so koncentracije analitov zelo nizke (pričakovano 10 ng/mL). Zaradi majhnega volumna odvzete krvi pa je tudi množina analita v posamičnem vzorcu izredno majhna (rang 10 piko gramov: $10 \mu\text{L} * 10 \mu\text{g/L} = 10 \text{e}^{-12} \text{g} = 10 \text{ piko gramov}$).

Sledila bo validacija metode po smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA), v okviru katere bomo preverjali selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost, stabilnost, območje in mejo določitve ter učinkovitost ekstrakcije. Razvito metodo bomo uporabili za

analizo DBS vzorcev pacientov iz klinične študije in dobljene rezultate primerjali z že opravljenimi meritvami iz plazemskih vzorcev, ki so bili pripravljene iz istih vzorcev krvi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Standardi

- **Haloperidol:** 4-[4-(4-klorofenil)-4-hidroksi-1-piperidinil]-1-(4-fluorofenil)-1-butanon, $M = 375,86 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- **Reduciran haloperidol:** (\pm) -4-(4'-klorofenil)-(4'-fluorofenil)-4-hidroksi-1-piperidinbutanol, $M = 377,9 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- **$^{13}\text{C}_6$ haloperidol:** 98,6 % (99 % ^{13}C) - interni standard, $M = 381,9 \text{ g/mol}$ (Alsa Chim, Francija)

3.1.2 Reagenti

- **Ultračista voda – mili-Q voda,** pridobljena z aparatom Mili-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
- **Metanol ($\geq 99,9 \%$) – $\text{CH}_3\text{OH Chromasol V}^{\text{®}}$** (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- **Mravljična kislina (98–100 %) – $\text{HCOOH Suprapur}^{\text{®}}$** (Merck KgaA, Nemčija)
- **Acetonitril ($\geq 99,9 \%$) – $\text{CH}_3\text{CN ChromasolV}^{\text{®}}$** (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, ZDA)
- **Ortofosforna kislina (85 %) – H_3PO_4** (Merck, Darmstadt, Nemčija)

3.1.3 Mobilne faze in topila

Pripravili smo jih v laboratoriju iz reagentov, opisanih zgoraj. Zaprte bučke s pripravljenimi topili smo ovili s parafilmom, da smo preprečili izhlapevanje hlapnih komponent, in jih hranili v hladilniku pri temperaturi $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

- **50 % metanol v vodi:** je topilo pri pripravi sekundarne osnovne raztopine. 50 % raztopino metanola uporabimo zato, da preprečimo vezavo analitov na stene plastike in stekla. Zaradi hlapnosti metanola smo pred vsako uporabo pripravili sveže topilo. Odpipetiramo 50 mL metanola v 100 mL bučko in s prečiščeno vodo dopolnimo do oznake.

- **0,1 % mravljična kislina v vodi:** mobilna faza pri tekočinski kromatografiji. Pripravimo jo v stekleni posodi. V 0,5 L vode odpipetiramo 500 μ L mravljične kisline.
- **0,1 % mravljična kislina v metanolu:** uporabimo kot topilo pri ekstrakciji. V 100 mL bučko odpipetiramo 100 μ L mravljične kisline in z metanolom dopolnimo do oznake.
- **1 % mravljična kislina v metanolu:** potrebujemo za pripravo delovne raztopine internega standarda. Pripravimo 2 mL mravljične kisline v 200 mL bučko in dopolnimo z metanolom do oznake.
- **4 % fosforna kislina v vodi:** uporabimo jo v zadnji fazi priprave delovne raztopine internega standarda. Pomembna je, ker je analit v njej stabilen. V 50 mL bučko odpipetiramo 2,35 mL 85 % fosforne kisline in dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake.

3.1.4 Biološki material

Pri svojem delu smo uporabljali polno kri, pridobljeno iz Kliničnega oddelka za hematologijo, UKC Ljubljana. To je bila polna kri, ki je ostala po opravljenih rutinskih preiskavah in je imela hematološke parametre v okviru normale. Kri je bila preverjena na odsotnost HIV in hepatitisa C. Za uporabo človeške krvi v raziskovalne namene smo pridobili odobritev Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št.: 77/1/07). Kri je bila do uporabe zamrznjena pri -20 °C.

DBS vzorce pacientov smo pripravili iz vzorcev polne krvi pacientov iz klinične študije v okviru doktorata dr. Marije Boškovič, mag. farm. iz leta 2011, ki so se zdravili s haloperidolom (32). Klinična študija z naslovom »Preprečevanje posledic oksidativnega stresa pri bolnikih s shizofrenijo z vitaminom E in omega-3 nenasičenimi maščobnimi kislinami« je kot vir vzorcev pacientov služila tudi Urški Konjedic, ki je v svoji diplomski nalogi »Razvoj in validacija analizne metode za kvantifikacijo haloperidola in njegovih metabolitov v plazmi s tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno detekcijo« (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012) razvijala analizno metodo za kvantifikacijo haloperidola in njegovih metabolitov iz vzorcev plazme (33). Naši krvni in njeni plazemski vzorci so bili pripravljani iz istih vzorcev krvi sodelujočih oseb, zato smo vzorce zaradi lažje sledljivosti označili enako kot predhodnica (s št. vzorca in št. vzorca + P za plazmo), saj smo na koncu primerjali vrednosti, dobljene z njeno in našo metodo.

3.2 NAPRAVE IN LABORATORIJSKI INVENTAR

- **Whatman™ FTA DMPK-C kartice** (GE Healthcare Bio-science corp., Piscataway, NJ, ZDA)
- **silikagel Mini Pax®**, 5 g vrečke (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- **tehtnica XP 105** (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- **mešalnik LabDancer** (IKA, Staufen, Nemčija)
- **mešalnik Vibromix 10** (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- **ultrazvočna kadička – Sonis 4** (Iskra Pio, d.o.o., Šentjernej, Slovenija)
- **centrifuga – Centrifuge 5415®** (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- **hladilnik 4 °C** (LTH, Škofja Loka, Slovenija)
- **hladilnik 3 °C z zamrzovalnikom –20 °C** (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- **zamrzovalnik –21 °C LIEBHERR** (Liebherr-International AG, Bulle, Švica)
- **pipete:** 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- **plastične epruvete oz. mikrocentrifugirke** 1,5 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija) in 2 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- **programska oprema MassHunter** (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- **aparatus LC-MS/MS** – Agilent 1290 Infinity UHPLC, sklopljen z Agilent 6460 trojnim kvadrupolnim masnim spektrometrom, opremljenim z JetStream™ ESI izvorom (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- **MS kolona:** Kinetex 50 mm x 2,1 mm C18 kolona, 2,6 µm delci (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- **mikrotitrna plošča Agilent U96 PP 0,5 mL** (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- **silikonski pokrov za mikrotitrsko ploščo Nalgene®** (Thomas scientific, NJ, ZDA)
- **stekleni inventar:** tehtiči, merilne bučke, čaše, merilni valji
- **ostali inventar:** nastavki za pipete, vrečke s pritisnim zapiralom, parafilm, škarje, pinceta, spatula, stojalo za epruvete, štoparica, zaščitne rokavice

3.3 METODE

3.3.1 Priprava osnovnih raztopin in topil

3.3.1.1 Raztopina internega standarda

Pripravili smo si raztopino internega standarda (s ^{13}C označen haloperidol) s koncentracijo 70 $\mu\text{g/L}$ po sledečem postopku. V vialo smo natehtali 1,0 mg internega standarda in ga raztopili z 1 mL metanola. Nato smo z naslednjimi postopki redčitve dobili raztopino želene koncentracije. Najprej smo tisočkrat redčili z 1 % mravljično kislino v metanolu (v 100 mL bučko smo odpipetirali 100 μL pripravljene raztopine in dopolnili s topilom do oznake). Nato smo odpipetirali 700 μL dobljene raztopine v 10 mL bučko in do oznake dopolnili s 4 % fosforno kislino v vodi. Raztopino internega standarda smo razdelili v Eppendorfove mikrocentrifugirke (v nadaljevanju: epice) po 1 mL in jih shranili zamrznjene pri $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.1.2 Primarna osnovna raztopina (PR)

Koncentracija primarnih osnovnih raztopin je bila 1 mg/mL. Pripravili smo si raztopini za haloperidol in reduciran haloperidol. Naredili smo po dve paralelki vsake iz dveh zateht analitov. Na tehtič smo zatehtali 25,0 mg haloperidola in ga natančno prenesli v 25 mL bučko ter ga v metanolu raztopili in z njim dopolnili do oznake. Postopek smo ponovili za reduciran haloperidol, le da smo zatehtali 5,0 mg analita in ga raztopili v 5 mL bučki.

3.3.1.3 Sekundarna osnovna raztopina (SR)

To je raztopina, ki vsebuje oba analita, HA in rHA. Njuni koncentraciji sta bili 10 mg/L. Naredili smo dve paralelki raztopine. Uporabili smo 25 mL bučko. Vanjo smo odpipetirali 250 μL vsake od primarnih osnovnih raztopin posameznega analita. Do oznake smo dopolnili s 50 % metanolom v vodi.

3.3.1.4 Delovne raztopine (DR)

To so raztopine z različnimi koncentracijami analitov za vsak analit posebej, ki jih potrebujemo za izdelavo umeritvene krivulje. Le-ta nam služi za preverjanje linearnosti pri validaciji metode. Koncentracije učinkovin v teh raztopinah so bile dvajsetkrat večje, kot želene krvne koncentracije. Raztopine smo pripravljali v 2 mL epicah. Uporabili smo sekundarno osnovno raztopino iz prve zatehte haloperidola ter reduciranega haloperidola in 50 % metanol v vodi kot topilo. V prvem koraku smo pripravili raztopini s koncentracijo 1000 $\mu\text{g/L}$ in 2000 $\mu\text{g/L}$, vse nadaljnje koncentracije pa smo pripravili s postopki redčenja

raztopine s koncentracijo 1000 $\mu\text{g/L}$. Ravno zato smo te raztopine pripravili 2 mL, vseh ostalih pa 1 mL. Postopek priprave vseh delovnih raztopin je razviden iz preglednice II.

Preglednica II. Podatki o koncentracijah delovnih raztopin in potrebnih volumnov ostalih raztopin za njihovo pripravo

Zaporedna številka DR	Želena konc. v krvi [$\mu\text{g/L}$]	Konc. DR [$\mu\text{g/L}$]	Volumen SR [μL]	Volumen DR ₄₀₀ [μL]	Volumen DR ₁₀₀₀ [μL]	Volumen topila [μL]
1	0	0	/	/	/	1000
2	0,4	8	/	20	/	980
3	1	20	/	50	/	950
4	4	80	/	200	/	800
5	5	100	/	/	100	900
6	10	200	/	/	200	800
7	20	400	/	/	400	600
8	40	800	/	/	800	200
9	50	1000	200	/	/	1800
10	100	2000	200	/	/	800

3.3.1.5 Delovne raztopine za pripravo kontrolnih vzorcev (DR-QC)

Kontrolni vzorci (QC) so vzorci z znano koncentracijo analita. Namenjeni so spremljanju zmogljivosti bioanaliznih metod in vrednotenju skladnosti ter validacije rezultatov neznanih vzorcev (32). Pripravili smo tri delovne raztopine za pripravo kontrolnih vzorcev za vsak analit: pri nizki (DR-QC_L), pri srednji (DR-QC_M) in pri visoki (DR-QC_H) koncentraciji. Njihove koncentracije so bile sledeče:

$$\text{DR-QC}_L = 100 \mu\text{g/L}$$

$$\text{DR-QC}_M = 200 \mu\text{g/L}$$

$$\text{DR-QC}_H = 800 \mu\text{g/L}$$

Dodatni DR-QC, ki smo ga potrebovali za izračun relativnega učinka matrice:

$$\text{DR-QC} = 400 \mu\text{g/L}$$

Za pripravo DR-QC smo sledili postopku, ki je opisan pri pripravi delovnih raztopin, le da smo za DR-QC uporabili sekundarno osnovno raztopino iz druge zatehte haloperidola in reduciranega haloperidola. Osnovni raztopini za umeritveno krivuljo in kontrolne vzorce morata biti namreč različni.

3.3.1.6 Obogateni krvni vzorci

To so vzorci krvi, ki smo jim dodali pripravljene delovne raztopine (DR) oziroma delovne raztopine za pripravo kontrolnih vzorcev (DR-QC). Za vse poskuse smo uporabili kombinirano kri (združili smo kri različnih posameznikov), razen za relativni učinek matrice smo uporabili kri šestih posameznikov. Zamrznjeno kri smo počasi odtalili na sobni temperaturi, jo homogenizirali z rahlim mešanjem in si v večji centrifugirki pripravili kombinirano kri. Nastavili smo si 1,5 mL epice in jih ustrezno označili. Vanje smo nato odpipetirali po 475 μL ustrezne krvi ter dodali 25 μL posamezne DR (3x omočimo nastavek pipete, preden odpipetiramo, da se plastika nasiti). Kontrolnih vzorcev (kri, obogatena z DR-QC), smo pripravili dvojni volumen, da smo imeli dovolj zaloge za vse poskuse. Zato smo uporabili 2 mL epice in pipetirali 950 μL krvi in 50 μL posameznega DR-QC. Naredili smo tudi slepi krvni vzorec v 1,5 mL epici, kamor smo namesto raztopine analitov odpipetirali 25 μL topila (0,1 % mravljična kislina v metanolu). Vsebnike smo zatesnili in jih dobro premešali, da so se dodane komponente homogeno porazdelile po celotnem vzorcu. Sledila je priprava DBS vzorcev.

3.3.1.7 Raztopina za poznejše obogatenje (QC topilo)

Raztopine potrebujemo za izračun učinka matrice in izkoristka ekstrakcije. Naredili smo tri različne raztopine iz pripravljenih delovnih raztopin za pripravo kontrolnih vzorcev DR-QC. Ker pri pripravi DBS vzorcev za ekstrakcijo pride do 50-kratnega redčenja vsebovanega DR-QC (iz epice s 500 μL obogatenega krvnega vzorca smo na DBS kartico nanesli 10 μL le-tega), smo to redčitev in dodatek volumna IS pri ekstrakciji upoštevali pri pripravi teh topil. Zato smo v 10 mL bučke odpipetirali po 13,33 μL posameznega DR-QC (pri nizki, srednji in visoki koncentraciji) in do oznake dopolnili z 0,1 % mravljično kislino v metanolu.

3.3.2 Priprava DBS vzorcev

Za raziskavo smo imeli na voljo zamrznjeno polno kri, zato smo morali DBS vzorce pripraviti sami v laboratoriju (kapljali smo kri na DBS kartice).

Za ekstrakcijo naših analitov smo si izbrali Whatman DMPK-C kartice. Položili smo jih na pripravljene podstavke, tako da so bili robovi kartic naslonjeni nanje, filter papir z natisnjenimi krogi, kamor nanašamo vzorce, pa ni prišel v stik s podlago ali s čim drugim. Nato smo začeli s pipeto previdno kapljati pripravljene obogatene krvne vzorce na kartice tako, da ni prišlo do neposrednega stika med papirjem in nastavkom pipete. Volumen vsake kaplje krvi je bil 10 μL . Kartice z nanešenimi vzorci smo ustrezno označili in pustili sušiti pri sobni temperaturi 2 uri. Tako pripravljene vzorce smo zložili v vrečke s pritisnim zapiralom, dodali vrečko silikagela in jih shranili v temnem prostoru oziroma smo neposredno začeli z ekstrakcijo. Ravno tako smo pripravili vzorce polne krvi pacientov, pridobljene iz klinične študije, le da smo jih pred nanosom odtalili na sobni temperaturi in previdno homogenizirali, saj so bili vzorci zamrznjeni.

3.3.3 Ekstrakcija

DBS ekstrakcijo smo izvajali tako, da smo v označeno epico izrezali celoten posušen madež krvi iz kartice. Pomagali smo si s pinceto, da se nismo dotikali površine papirja s prsti. Izrezan disk papirja v epici smo prelili s 350 μL topila – 0,1 % mravljična kislina v metanolu. Tekočino v epici smo premešali, tako da smo štirikrat aspirirali s pipeto. Dodali smo 25 μL s ^{13}C označenega internega standarda haloperidola. Epice z vzorci smo zaprli in eno minuto mešali na vibracijskem mešalniku z največjo močjo obratov. Nato smo epice, zložene v stojalu, položili v ultrazvočno kadičko in pustili delovati pet minut. Med mešanjem na vibracijskem mešalniku in v ultrazvočni kadički pride do ekstrakcije analitov iz krvnih madežev v raztopino. Epice smo prenesli v centrifugo in centrifugirali pet minut pri 10.000 $\times g$ in 25 °C, da so se košček filter papirja, vlakna, oborjeni proteini in druge komponente biološke matrice usedli na dno epice in smo jih na ta način ločili od bistre raztopine. Vzorce smo nato prenesli v vdolbine na mikrotitrski plošči – pipetirali smo 150 μL vzorca iz zgornjega dela epice, kjer ni usedlin. Mikrotitrsko ploščo smo pokrili s silikonskim pokrovom in naredili analizo na LC-MS/MS.

3.3.4 Analiza vzorcev

Izvajali smo jo s tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti, sklopljene s tandemskim masnim spektrometrom vrste trojni kvadrupol (UHPLC-MS/MS). Najprej pride na koloni do ločitve analitov v vzorcu, nato na masnem spektrometru poteče kvantifikacija signalov z multirezidualno analizo – MRM (ionizacija vzorca, fragmentacija

ionov, ločitev ionov glede na razmerje med maso in nabojem (m/z), detekcija masnih prehodov). Rezultat analize je masni spekter.

Podatki kromatografske ločbe:

- kolona: reverzno fazna kolona Kinetex C18, 50 mm x 2,1 mm, 2,6 μm delci
- temperatura: 50 °C
- volumen injiciranja: 1 μL
- čas analize: 2,95 min
- mobilna faza: topilo A: 0,1 % raztopina mravljične kisline v vodi
topilo B: 100 % acetonitril
- pretok mobilne faze: 0,5 mL/min

Potekalo je gradientno izpiranje na koloni, kjer smo v različnih časovnih točkah spreminjali sestavo mobilne faze (večali delež topila B), kot je prikazano v preglednici III.

Preglednica III. Potek spreminjanja sestave mobilne faze v odvisnosti od časa pri kromatografski ločbi

Čas [min]	Pretok [mL/min]	Delež topila B [%]
0	0,5	10
0,5	0,5	20
1	0,5	37
1,25	0,5	39
1,85	0,5	41
2,2	0,5	55
2,25	0,5	10

Vzorci smo v sistem injicirali po naraščajočih koncentracijah analitov in po vsakem injiciranju spirali iglo 10 sekund z 80 % metanolom.

Parametri masnega spektrometra:

- vir ionizacije: ESI+ (elektrozprševalni ionizator, pozitivna polarnost)
- temperatura sušilnega plina: 275 °C
- pretok sušilnega plina: 5 L/min

- tlak za razprševanje: 45 psi (3,1 bar)
- temperatura plina v plašču: 320 °C
- pretok plina v plašču: 11 L/min
- napetost na kapilari: 4000 V
- napetost na šobi: 1000 V

MRM prehodi in fragmentacijski parametri so podani v preglednici IV.

Preglednica IV. Retencijski časi ter parametri trojnega kvadrupola

analit	haloperidol	¹³ C haloperidol	reduciran haloperidol
Prekurzorski ion <i>m/z</i>	376,0	382,0	379,17
Hčerinski ion <i>m/z</i>	165,0	165,0	149,5
Napetost fragmentorja [V]	135	80	140
Kolizijska energija [eV]	21	21	29
Čas zadrževanja na eni masi [ms]	50	50	50
Retencijski čas [min]	1,583	1,586	1,494

3.3.5 Validacija metode

To je proces, ki ga izvajamo z namenom dokazati, da analizna metoda zagotavlja zanesljive ter ponovljive rezultate in je v celoti dokumentiran. V našem primeru smo validacijo izvajali po smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila, namenjenih industriji za validacijo bioanaliznih metod (34). Preverjali smo naslednje parametre validacije: selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost, stabilnost, delovno območje in mejo določitve ter učinkovitost ekstrakcije. Absolutni in relativni učinek matrice smo ocenjevali po načelih Matuszewskega (35).

3.3.5.1 Selektivnost (specifičnost)

Bioanalizna metoda je selektivna, če je sposobna izmeriti in razlikovati med analiti, kljub prisotnosti ostalih komponent, ki so lahko v vzorcu. Predvsem so to komponente same matrice, nečistote, metaboliti, razgradni produkti, zunanji ksenobiotiki. Mednje sodijo tudi komponente, ki se s tekočinsko kromatografijo eluirajo ter vstopijo v ionizacijsko komoro

v masnem spektrometru sočasno z analitom, vendar jih ne zaznamo. Le-tam pa vplivajo na ionizacijo analita (jo povečajo ali zmanjšajo) in s tem na njegov odziv. Vse te snovi lahko pri metodah, ki temeljijo na analizi z masnim spektrometrom, vplivajo na slabšo točnost, ponovljivost in občutljivost. Učinek matrice smo preučili z analizo slepih DBS vzorcev in z raztopinami za poznejše obogatenje (34, 35).

Absolutni učinek matrice:

Izrezali smo slepi DBS vzorec, ki smo mu v naslednjem koraku ekstrakcije namesto ekstrakcijskega topila dodali 350 μL raztopine za obogatenje (QC topila). QC topila smo pripravili tako (glej poglavje 3.3.1.7), da je bila koncentracija analitov v raztopini po ekstrakciji slepega DBS vzorca na vsakem koncentracijskem nivoju ekvimolarna koncentraciji analitov ekstrahirane QC vzorca z istega nivoja. Odziv analitov od tu smo primerjali z odzivom analitov iz same raztopine za obogatenje. Delali smo s tremi različnimi koncentracijami topil (ekvimolarne delovnim raztopinam za pripravo kontrolnih vzorcev DR-QC_L, DR-QC_M, DR-QC_H) v petih ponovitvah. Absolutni učinek matrice smo izračunali po *enačbi 1*. Vrednosti večje od 100 % kažejo na povečanje ionizacije, vrednosti pod 100 % pa na zmanjšanje ionizacije analitov (35).

$$UM [\%] = \frac{\text{odziv (pozneje obogaten slepi DBS vzorec)}}{\text{odziv (raztopina za obogatenje)}} * 100 \quad (\text{enačba 1})$$

Relativni učinek matrice:

Naredili smo ekstrakcijo DBS vzorcev, pripravljenih z obogatitvijo krvi petih posameznikov. Vsako od teh krvi smo obogatili s štirimi različnimi koncentracijami DR-QC (100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$, 400 $\mu\text{g/L}$ in 800 $\mu\text{g/L}$). Analizirali smo po tri paralelke pri vsaki koncentraciji. Nato smo naredili umeritvene premice in primerjali naklone vseh petih serij DBS vzorcev. Odsotnost relativnega učinka matrice dokažemo, če so nakloni pri različnih virih enakega biološkega materiala praktično enaki (koeficient variacije (RSD) naklonov ne sme biti večji od 4–5 %) (34).

3.3.5.2 Linearnost

Linearnost je sposobnost analiznega postopka, da daje odzive, ki so premosorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu. Odnos med koncentracijo in odzivom opisuje umeritvena

premice, ki jo določimo z linearno regresijo in jo matematično zapišemo z enačbo $y = k * x + n$. Odvisna spremenljivka y je odziv (razmerje površin kromatografskega vrha analita in internega standarda), neodvisna spremenljivka x je koncentracija analita v vzorcu, parameter k predstavlja naklon premice, n pa odsek na ordinati. Mero linearne povezanosti spremenljivk x in y ovrednotimo s Pearsonovim korelacijskim koeficientom (r) oz. determinacijskim koeficientom (r^2). Priporočljivo je, da je zveza linearna po vsem koncentracijskem območju. Včasih zaradi omejitev biološkega materiala in analiznih naprav tega ne dosežemo v celoti. Kadar je kalibracijsko območje široko (razpon med koncentracijo najvišjega in najnižjega kalibracijskega standarda je 1:500 in več), skušamo vključiti ustrezen algoritem za umeritveno premico. Ponavadi uporabimo uteženo linearno regresijo z utežitvenim faktorjem $1/c$ ali $1/c^2$. S tem preprečimo prevelik vpliv rezultatov vzorcev z višjimi koncentracijami in nagnjenost premic k prilagajanju le-tem rezultatom, povečamo pa vpliv nižjih koncentracij in s tem izboljšamo točnost na spodnjem delu umeritvene premice. V računalniškem programu MS Excel smo s pomočjo reševalca izračunali naklon in odsek utežene umeritvene premice. Program namreč s spreminjanjem naklona in odseka izbere vrednosti, pri katerih je vsota kvadrata odstopa in uteži najmanjša. Z besedo odstop v našem primeru opišemo razliko med izmerjenim odzivom analita (oz. njegovim razmerjem z internim standardom) in iz parametrov utežene premice izračunano vrednostjo odziva (oz. njegovega razmerja z internim standardom). Odstop izračunamo po *enačbi 2* (36).

$$\text{odstop} = y_i - (k * x_i + n) \quad (\text{enačba 2})$$

Umeritveno premico določimo za vsak analit v vzorcu. Za pripravo umeritvene premice analiziramo krvne vzorce, obogatene z delovnimi raztopinami, kjer je koncentracija analitov poznana. Kalibracijski standardi morajo biti pripravljene v enaki matrici, kot je matrica vzorcev pacientov iz študij (37). Umeritvena premica mora prekrivati celotno območje pričakovanih koncentracij analizne metode, zato FDA smernice priporočajo uporabo vsaj šestih standardnih vzorcev z različnimi koncentracijami, vključno s standardom pri spodnji meji določitve (LLOQ) in slepi vzorec. Za dokaz linearosti mora metoda zadostiti naslednjim pogojem: vsaj 4 od 6 ne-ničelnih standardov, vključno s standardom pri najvišji koncentraciji, sme po izračunu njihovih koncentracij iz umeritvene premice odstopati manj kot 15 % od njihove nominalne vrednosti. Za standard pri spodnji meji določitve (LLOQ) je odstopanje dovoljeno za manj kot 20 % (34).

3.3.5.3 Točnost

Točnost analizne metode je definirana kot ujemanje dobljene vrednosti s sprejeto pravo vrednostjo oz. sprejeto referenčno vrednostjo. Merimo jo z uporabo kontrolnih vzorcev (QC) na vsaj treh koncentracijskih nivojih, ki pokrivajo celotno območje metode, z vsaj petimi določitvami za vsako koncentracijo. Točnost določimo z izračunom odstotka odstopanja od referenčne vrednosti. Najprej smo iz odziva kontrolnega vzorca s pomočjo umeritvene premice vsakemu izračunali njegovo koncentracijo. Nato smo izračunali povprečno koncentracijo petih določitev za vsak nivo. Sledil je še izračun njenega odstopanja od prave vrednosti s pomočjo *enačbe 3*. Povprečno odstopanje sme biti manjše kot 15 %, razen pri spodnji meji določitve, kjer je odstopanje dovoljeno za manj kot 20 % (34).

$$\text{odstopanje [\%]} = \frac{\bar{c}(\text{izračunana}) - c(\text{referenčna})}{c(\text{referenčna})} * 100 \quad (\text{enačba 3})$$

3.3.5.4 Ponovljivost

Ponovljivost analizne metode je natančnost znotraj postopka, ko analizo izvede isti analitik v istem laboratoriju in na istem instrumentu. Natančnost izraža stopnjo ujemanja rezultatov med serijo analiz istega homogenega vzorca pri predpisanih delovnih pogojih v kratkem časovnem razmiku. Vsaka analiza je narejena neodvisno in v celoti. Ponovljivost navadno opisujemo s standardno deviacijo (SD) ali relativno standardno deviacijo (RSD) oz. koeficientom variance (CV). FDA smernice predpisujejo, da koeficient variance petih ponovitev pri treh različnih koncentracijah, ki pokrivajo celotno območje metode, ne sme biti večji od 15 % oz. pri spodnji meji določitve 20 %. Določali smo ponovljivost znotraj enega dneva in meddnevno ponovljivost v treh zaporednih dneh z analizo treh različnih koncentracij kontrolnih vzorcev. Z izmerjenimi rezultati smo po *enačbi 4* izračunali relativno standardno deviacijo (σ predstavlja standardni odklon, \bar{y} povprečno vrednost rezultatov) (34).

$$RSD [\%] = \frac{100 * \sigma}{\bar{y}} \quad (\text{enačba 4})$$

3.3.5.5 Delovno območje metode

Uporabno območje analiznega postopka je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, za katerega so bile dokazane točnost, ponovljivost in linearnost. Pri kromatografskih testih je navadno omejeno z linearnim območjem detektorja analitov. Območje ne sme biti preširoko niti preozko, saj zahteve za točnost in natančnost pri ekstremih območja trpijo. Največkrat izhajamo in ga definiramo iz območja linearnosti ali dinamičnega območja, če zveza ni linearna (36).

3.3.5.6 Spodnja meja določitve

Spodnja meja določitve (LLOQ) je definirana kot najnižja koncentracija analita, ki jo lahko z dano metodo še določimo s sprejemljivo točnostjo in natančnostjo. FDA smernice predpisujejo zahteve za točnost med 80 in 120 % ter RSD manjši od 20 % za natančnost. Poleg tega mora biti odziv analita pri spodnji meji določitve vsaj petkratnik odziva slepega vzorca. Zahteva za razmerje med signalom in šumom za spodnjo mejo določitve je 10:1 (38). Ponavadi je LLOQ najnižji kalibracijski standard uporabljen za konstrukcijo umeritvene premice (34, 36).

3.3.5.7 Stabilnost

Pogoji, uporabljeni v študijah stabilnosti, morajo odražati situacije, s katerimi se dejansko srečamo pri rokovanju z vzorci in v analizi. Kartice z vzorci krvnih madežev smo zato podvrgli obremenitvam z različnimi temperaturami, do katerih smo predvidevali, da lahko pride med zbiranjem, transportom in analizo vzorcev. Analizirali smo tri ponovitve pri treh različnih koncentracijah (visoki, srednji in nizki). Kartice s pripravljenimi krvnimi vzorci smo shranjevali v vrečkah s pretisnim zapiralom ob prisotnosti sušilnega sredstva pri sobni temperaturi v temi. Za preizkus stabilnosti smo eno tako pripravljeno vrečko shranili v hladilniku pri 3 °C, drugo smo pustili na sobnih pogojih pri 25 °C in tretjo pri 40 °C. Po preteku trinajstih dni smo analizirali te vzorce in njihove odzive primerjali s tistimi, ki so bili analizirani ob času t_0 (ob upoštevanju internega standarda). Sprejemljiv je odstop manj kot 15 % (34).

3.3.5.8 Učinkovitost ekstrakcije

Izkoristek se nanaša na učinkovitost ekstrakcije analizne metode znotraj mej variabilnosti. Biti mora čim višji, pomembno pa je predvsem, da je konstanten znotraj območja linearnosti (točen in ponovljiv). Vrednotimo ga pri treh različnih koncentracijah (nizki, srednji in visoki). Učinkovitost ekstrakcije za razliko od izkoristka ekstrakcije upošteva še

učinek matrice. Določimo jo s primerjavo odziva ekstrahiranega obogatenega krvnega vzorca DBS z odzivom raztopine za obogatitve. Za izračun učinkovitosti ekstrakcije smo sledili *enačbi 5* (34, 36).

$$Ue [\%] = \frac{\text{odziv (obogaten vzorec DBS)}}{\text{odziv (raztopina za obogatitve)}} * 100 \quad (\text{enačba 5})$$

3.3.5.9 Navzkrižni prenos med vzorci

Pri analizi se moramo zavedati dejstva, da lahko pride do navzkrižnega prenosa analitov med vzorci in posledično do napake pri izmerjenih vrednostih. Izhaja lahko iz priprave vzorcev (prenos med karticami zaradi skupnega shranjevanja, med posušeni madeži krvi zaradi pečatne naprave za izrezovanje) ali iz analizne naprave (avtomatski vzorčevalnik, LC kolona). Največkrat so problematični visoko koncentrirani vzorci, saj lahko del analita zastane v kromatografskem sistemu. Če se ta zastanek spere na masni detektor ob analizi naslednjega vzorca, to povzroči lažno previsok odziv. Da preverimo, ali do tega prihaja, zaporedoma analiziramo vzorec z visoko koncentracijo analita (QC_H) in za njim slepi vzorec. Na MRM kromatogramu slepega vzorca ob retencijskem času analita ne sme biti nobenega kromatografskega vrha višjega od LLOQ, da lahko zagotovimo, da ni prišlo do navzkrižnega prenosa (39).

3.3.6 Analiza skladnosti dveh metod z diagramom Blanda in Altmana

Urška Konjedic je v svoji diplomski nalogi razvila in validirala novo analizno metodo za sočasno kvantifikacijo haloperidola in njegovih metabolitov v plazmi. V naši diplomski nalogi smo želeli razviti in validirati novo analizno metodo, ravno tako za kvantifikacijo haloperidola in njegovega najpomembnejšega metabolita reduciranega haloperidola, vendar iz drugega biološkega materiala – polne krvi (DBS). Uporabljali smo podobno analizno metodo (LC-MS/MS) in tudi vzorci pacientov so bili od istih oseb iz omenjene klinične študije (plazemski vzorci in DBS vzorci so bili pripravljenih iz istih vzorcev krvi). Zato smo na koncu preverili primerljivost rezultatov ene in druge metode. Skladnost med metodama smo analizirali z grafičnim postopkom Blanda in Altmana (Bland & Altman, 1986 and 1999) s pomočjo računalniškega programa MedCalc. Ta grafična metoda primerja dve tehniki merjenja, pri čemer so razlike prikazane glede na povprečje obeh tehnik merjenja (40).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 EKSTRAKCIJA

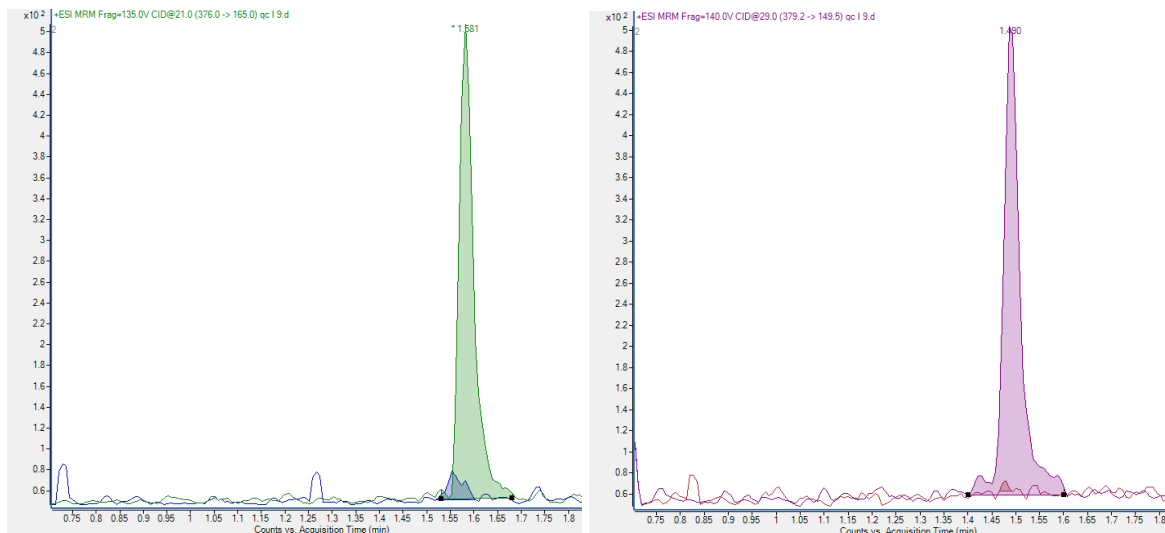
Najprej smo se na podlagi predhodnih analiz različnih učinkovin z DBS vzorci odločili za ekstrakcijski postopek, za katerega smo menili, da bo najbolj primeren glede na lastnosti naše preiskovane učinkovine. Nato smo izmed različnih kartic za analizo DBS vzorcev, ki so bile trenutno na tržišču, izbrali tisto, kjer so bili rezultati po ekstrakciji in analizi raztopine analitov najbolj primerljivi in ponovljivi. Odločili smo se za FTA DMPK-C tip kartic proizvajalca Whatman, GE Healthcare. Nato smo poskušali ekstrakcijski postopek s spremembami priprave vzorcev, količin in sestave topil, časa in načina mešanja, pogojev centrifugiranja itd. čim bolj optimizirati in doseči čim večjo učinkovitost ekstrakcije. Izkazalo se je, da je na boljšo ponovljivost vplival velik delež metanola v sekundarni osnovni raztopini, saj le-ta prepreči vezavo analitov na steklo (sprememba sestave topila iz 10 % v 50 % metanol v vodi). Poleg tega smo povečali volumen ekstrakcijskega topila iz 250 μL na 350 μL , da je prišlo do boljšega omočenja posušenega madeža krvi. Uvedli smo korak mešanja z aspiriranjem s pipeto in spremenili način prenosa vzorca na mikrotitrsko ploščo. Namesto trikratnega spiranja nastavka pipete pred prenosom raztopine smo pipetirali večkrat manjši volumen (3 x 50 μL). S tem se je hkrati nasitila plastika nastavka z analiti in nismo povzročili mešanja bistrega dela raztopine z usedlino. Vse te spremembe so zmanjšale variabilnost rezultatov in povečale učinkovitost ekstrakcije. Sledila je validacija analiznega postopka in nato uporaba validirane metode na vzorcih pacientov.

V ekstrakcijskem postopku smo v raztopino z vzorcem vedno dodali tudi interni standard (IS). Uporabljali smo stabilen izotopno (^{13}C) označen IS haloperidola. S pomočjo IS namreč izboljšamo točnost in ponovljivost analizne metode, saj kompenzira napake zaradi izgub vzorca ali različnega volumna injiciranja. Te napake se odražajo tako pri analitu kot pri IS, zato razmerje površin njunih kromatografskih vrhov ostane enako. Vsi rezultati, razen če je drugače označeno, so podani kot razmerje odziva analita in odziva IS.

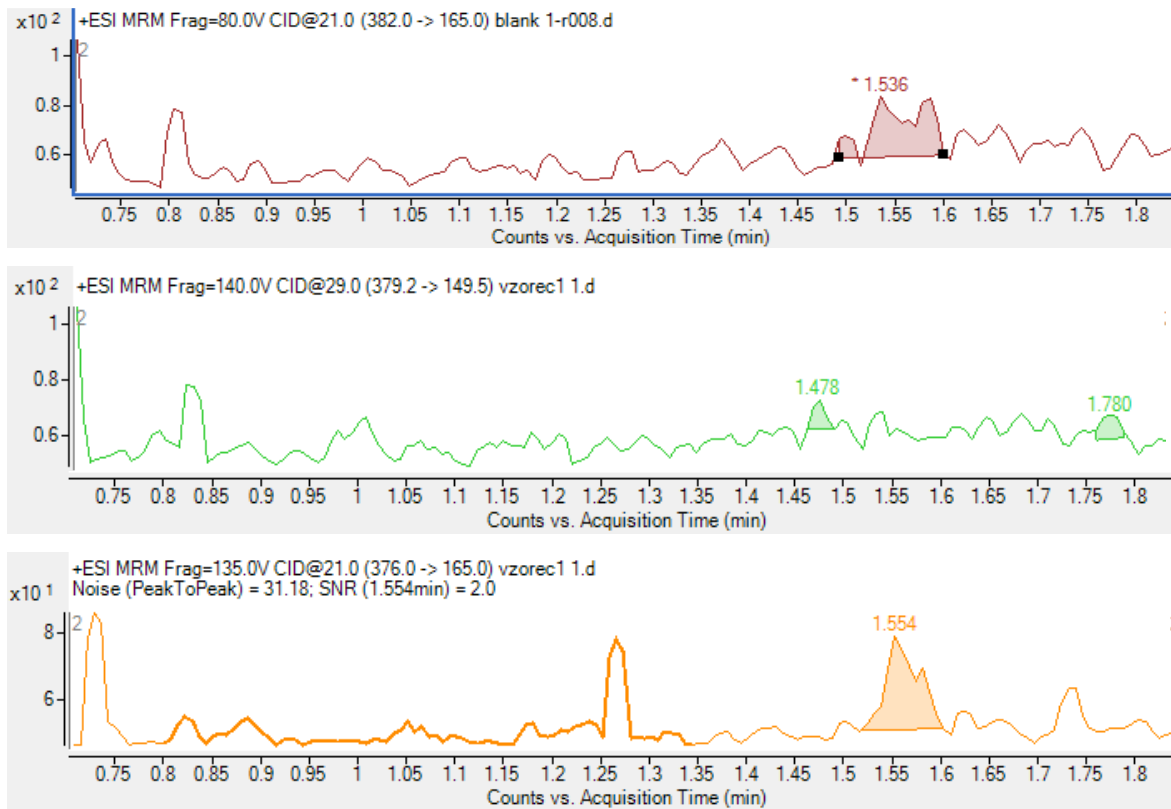
4.2 ANALIZA VZORCEV

Pogoji analize vzorcev s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemskim masnim spektrometrom so opisani v poglavju 3.3.4. Na slikah 4–7 so prikazani MRM kromatogrami slepega vzorca, kontrolnega vzorca pri nizki koncentraciji (QC_L) in vzorca

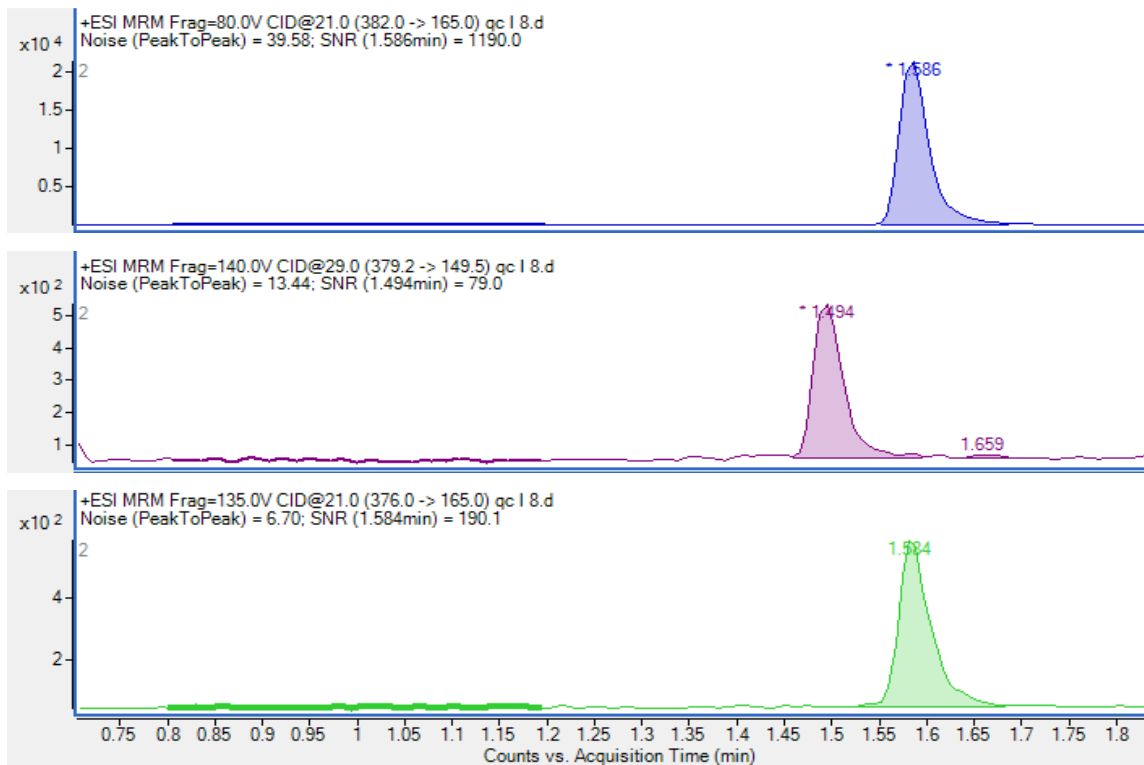
pacienta za haloperidol, reduciran haloperidol in interni standard. Odebeljeni deli črte na posameznih kromatogramih predstavljajo regijo za izračun šuma bazne linije.



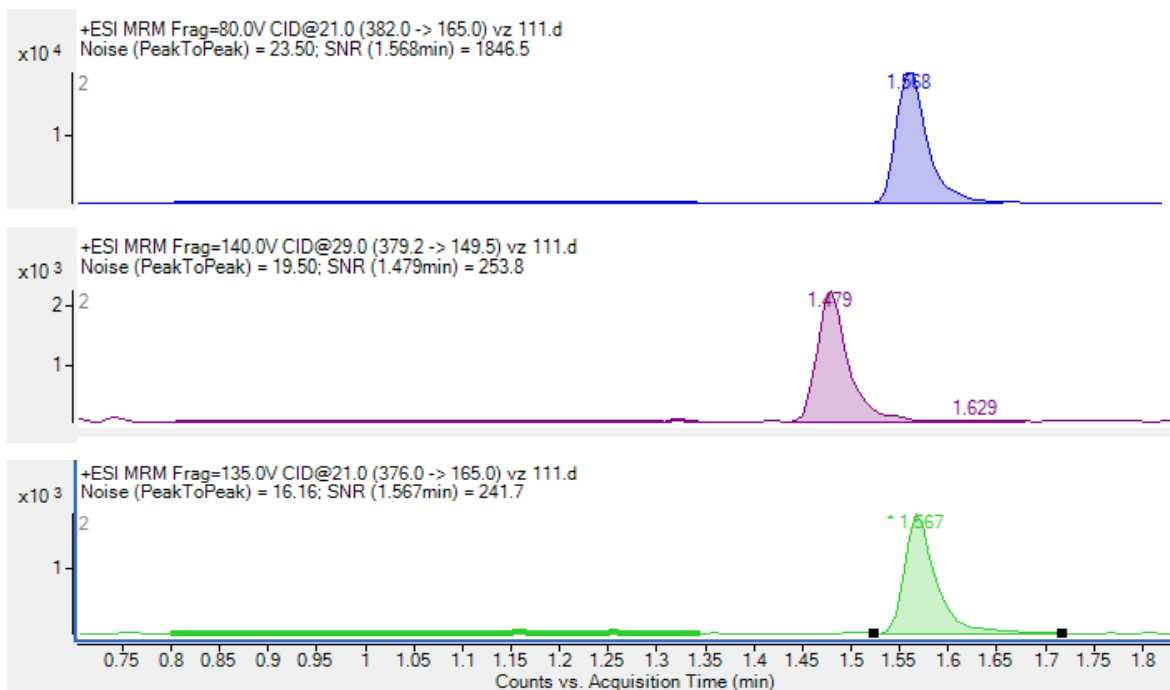
Slika 4. Levo: združena MRM kromatograma QC_L vzorca (vrhovi, označeni z zeleno barvo) in slepega vzorca (vrhovi, označeni z modro barvo) za haloperidol. Desno: združena MRM kromatograma QC_L vzorca (vrhovi, označeni z vijolično barvo) in slepega vzorca (vrhovi, označeni z rdečo barvo) za reduciran haloperidol. Primerjava kromatogramov vzorca pri LLOQ in slepega vzorca je prikazana na sliki 9 (glej poglavje 4.3.6).



Slika 5. MRM kromatogrami slepega vzorca. Zgornji kromatogram pripada internemu standardu (s ^{13}C označen haloperidol), srednji reduciranemu haloperidolu in spodnji haloperidolu.



Slika 6. MRM kromatogrami OC_L vzorca. Zgornji kromatogram pripada internemu standardu (s ¹³C označen haloperidol), srednji reduciranemu haloperidolu in spodnji haloperidolu.



Slika 7. MRM kromatogrami vzorca pacienta (vzorec št. 56). Zgornji kromatogram pripada internemu standardu (s ¹³C označen haloperidol), srednji reduciranemu haloperidolu in spodnji haloperidolu.

Zanimalo nas je tudi razmerje kvantifikatorja proti kvalifikatorju, značilnega za posamezno spojino (v našem primeru za haloperidol), ki mora biti ves čas v sekvenci čim bolj konstantno. Razmerje za haloperidol se je znotraj posameznih skupin analiziranih vzorcev (QC vzorci, vzorci za umeritveno premico ter vzorci pacientov) ohranjalo in je znašalo 3,35 (povprečna vrednost). S tem smo dobili dodatno potrditev o identiteti našega analita haloperidola. Spojina, ki smo jo uporabljali kot znani analitski standard, je bila enaka spojini, ki smo jo določevali v vzorcih pacientov.

4.3 VALIDACIJA

4.3.1 *Selektivnost (specifičnost)*

Učinek matrice se pojavi, kadar biološki vzorec vsebuje komponente, ki jih pri analizi ne zaznamo in na MRM kromatogramu ne vidimo signala, vendar se eluirajo z analitom in vplivajo na ionizacijo analita ter posledično na njegov odziv. Ocenjevanje vpliva matrice predstavlja zelo pomemben del validacije za kvantitativno LC-MS/MS metodo. Vpliv matrice lahko zmanjšamo z uporabo stabilnih izotopno označenih analogov analitov – internimi standardi (41).

Absolutni učinek matrice

Naredili smo ekstrakcijo slepih DBS vzorcev tako, da smo namesto ekstrakcijskega topila dodali raztopino za obogatenje (QC topilo). Uporabili smo tri različne raztopine: z nizko, srednjo in visoko koncentracijo analitov. Delali smo pet ponovitev za vsako koncentracijo. Hkrati z analizo DBS vzorcev smo analizirali tudi raztopine za obogatenje in nato primerjali odzive analitov iz vzorca in iz raztopine. Rezultati analize učinka matrice so podani v spodnjih preglednicah.

Preglednica V. Absolutni učinek matrice za haloperidol, reduciran haloperidol in interni standard (s ¹³C označen haloperidol)

	UM brez upoštevanja IS [%]		
	HALOPERIDOL	REDUCIRAN HALOPERIDOL	IS
QC _L (5 µg/L)	103,3	102,9	98,8
QC _M (10 µg/L)	103,2	93,9	95,7
QC _H (40 µg/L)	84,7	85,2	85,5

Absolutni učinek matrice smo podali na dva načina. V preglednici V so rezultati brez upoštevanja IS. Vidimo, da je vpliv matrice v precejšnji meri prisoten, saj se je odziv DBS vzorca pri najvišji koncentraciji v primerjavi z odzivom v raztopini za obogatitve pri vseh analitih zmanjšal za približno 15 %. Komponente v vzorcu torej zmanjšujejo odziv našega analita. Vse vrednosti UM, razen za haloperidol pri najvišji koncentraciji, kljub temu ustrezajo predpisanim smernicam.

Preglednica VI. Razmerje odzivov* ter absolutni učinek matrice za haloperidol in reduciran haloperidol z upoštevanjem internega standarda (s ^{13}C označen haloperidol)

	HALOPERIDOL			REDUCIRAN HALOPERIDOL		
	*pozneje obogaten slepi vzorec/IS	*obogateno topilo/IS	UM [%]	*pozneje obogaten slepi vzorec/IS	*obogateno topilo/IS	UM [%]
QC _L	2,377	2,319	102,5	2,007	1,928	104,1
QC _M	4,008	3,971	100,9	3,518	3,585	98,1
QC _H	15,988	16,153	99,0	14,934	14,984	99,7

V preglednici VI so rezultati z upoštevanjem IS. S primerjavo rezultatov UM brez in z upoštevanjem IS vidimo, da je učinek matrice sicer prisoten, vendar je z upoštevanjem IS le-ta praktično izginil. Vse krepko označene vrednosti UM se namreč gibljejo blizu 100 %, kar nakazuje na to, da se je učinek matrice korigiral, saj je bil prisoten tako pri analitih kot pri IS. Največji učinek matrice je torej prisoten pri najnižji koncentraciji in za haloperidol znaša 102,5 %, za reduciran haloperidol pa 104,1 %. Ker so vrednosti UM med 85 % in 115 %, to pomeni, da ni značilnega vpliva matrice na ionizacijo analitov in je metoda s tega vidika ustrezna. Na podlagi teh rezultatov lahko vidimo tudi učinkovitost uporabe internega standarda.

Relativni učinek matrice

Z oceno relativnega učinka matrice preverimo, kakšen je vpliv razlik v sestavi krvi posameznih oseb na analizo. Primerjali smo naklone umeritvenih premic po analizi DBS vzorcev iz krvi petih posameznikov. Delali smo po tri ponovitve pri štirih koncentracijah.

Relativna standardna deviacija naklonov petih umeritvenih premic za haloperidol in reduciran haloperidol ni presegla 5 %, zato lahko potrdimo odsotnost pomembnejšega relativnega učinka matrice. Rezultati so zbrani v preglednici VII.

Preglednica VII. Nakloni umeritvenih premic DBS vzorcev, pripravljenih iz krvi petih oseb in relativna standardna deviacija naklonov za haloperidol in reduciran haloperidol

	HALOPERIDOL	REDUCIRAN HALOPERIDOL
vzorec	naklon (k)	
oseba 1	0,01900	0,01961
oseba 2	0,01794	0,01785
oseba 3	0,01959	0,01724
oseba 4	0,02000	0,01844
oseba 5	0,01920	0,01871
povprečje	0,01948	0,01837
RSD [%]	3,98	4,87

4.3.2 Linearnost

Linearnost analizne metode smo določali iz odzivov (površin kromatografskih vrhov) kalibracijskih standardov. Preglednica VIII podaja odzive haloperidola in reduciranega haloperidola v obogatenih krvnih vzorcih brez in z upoštevanjem IS.

Preglednica VIII. Odziv analitov v obogatenih krvnih vzorcih ter razmerje odziva analita in internega standarda

Koncentracija [$\mu\text{g/L}$]	HALOPERIDOL		REDUCIRAN HALOPERIDOL	
	Odziv [area counts]	Odziv/IS	Odziv [area counts]	Odziv/IS
0	73	0,112	43	0,065
0,4	296	0,473	316	0,505
1	335	0,704	370	0,778
4	985	2,049	1130	2,351
20	5035	10,716	5151	10,961
50	10733	22,579	11294	23,759
100	20615	44,104	22105	47,292

Enačbo umeritvene premice smo določili iz razmerij med odzivom analita in odzivom internega standarda z metodo najmanjših kvadratov za vsak analit. Izračunali smo še determinacijski koeficient (r^2). Nato smo umeritveno premico utežili z utežema $1/c$ in $1/c^2$. Odločili smo se za uteževanje z $1/c^2$, saj smo pri tem dosegli najboljšo točnost nižjih koncentracij za oba analita (preglednica X). Vrednosti parametrov umeritvenih krivulj in r^2 pred in po uteževanju so prikazane v preglednici IX, umeritveni krivulji za HA in rHA po uteževanju pa sta na sliki 8. Za izračun koncentracij analitov vzorcev pacientov smo uporabili uteženo umeritveno premico (vrednosti s krepkim tiskom v preglednici IX).

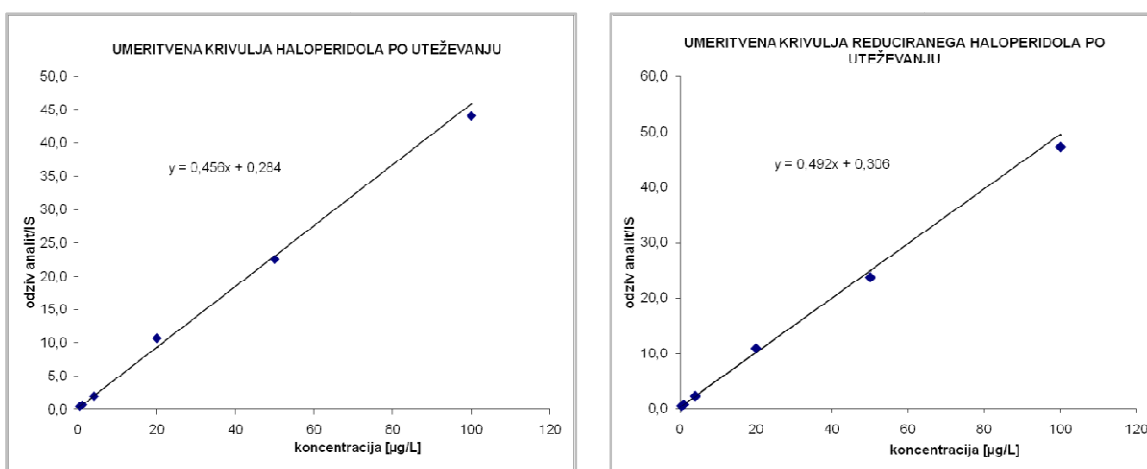
Preglednica IX. Vrednosti parametrov umeritvenih premic in r^2 analitov pred in po uteževanju

PARAMETER	HALOPERIDOL		REDUCIRAN HALOPERIDOL	
	neutežena	utežena	neutežena	utežena
k	0,43795	0,45620	0,46926	0,49207
n	0,6028	0,2848	0,4864	0,3063
r^2	0,9993	0,9970	0,9996	0,9949

Vrednost determinacijskega koeficienta se je zaradi uteževanja pri obeh analitih precej znižala, vendar je kljub temu še ustrezna glede na zahteve FDA smernic ($\geq 0,990$).

Preglednica X. Relativna napaka meritev kalibracijskih standardov glede na uteženo umeritveno premico

c [$\mu\text{g/L}$]	HALOPERIDOL		REDUCIRAN HALOPERIDOL	
	Izračunana c – z upoštevanjem uteži $1/c^2$ [$\mu\text{g/L}$]	Relativna napaka [%]	Izračunana c – z upoštevanjem uteži $1/c^2$ [$\mu\text{g/L}$]	Relativna napaka [%]
0,4	0,413	3,33	0,405	1,15
1	0,919	-8,12	0,959	-4,14
4	3,867	-3,32	4,156	3,91
20	22,865	14,32	21,653	8,26
50	48,870	-2,26	47,662	-4,68
100	96,053	-3,95	95,486	-4,51



Slika 8. Umeritveni premici haloperidola in reduciranega haloperidola po uteževanju

Metoda je torej linearna v območju 0,4–100 $\mu\text{g/L}$ za haloperidol in ravno tako za reduciran haloperidol. Dosegli smo primerljivo območje linearnosti kot Eyles in sodelavci, kjer je območje linearnosti za haloperidol 0,1–142 $\mu\text{g/L}$ ter reduciran haloperidol 0,1–98 $\mu\text{g/L}$ (42).

4.3.3 Znotrajdnevna točnost in ponovljivost

Točnost in ponovljivost smo preverjali z analizo kontrolnih vzorcev pri nizki, srednji in visoki koncentraciji (QC_L , QC_M , QC_H). Znotraj enega dne smo ekstrahirali in analizirali vzorce šestih ponovitev za vsako koncentracijo. Iz povprečja šestih meritev smo z uporabo parametrov utežene umeritvene premice izračunali koncentracije in jih primerjali s pravimi vrednostmi. Točnost smo podali v odstotkih kot odstopanje izračunane vrednosti od prave vrednosti. Znotrajdnevne točnosti in RSD so predstavljeni v preglednici XI.

Preglednica XI. Točnost (odstop v [%]) in ponovljivost (RSD) haloperidola in reduciranega haloperidola znotraj enega dne

	HALOPERIDOL		REDUCIRAN HALOPERIDOL	
	Odstop [%]	RSD [%]	Odstop [%]	RSD [%]
QC_L	7,56	7,84	2,27	2,90
QC_M	0,02	6,90	-5,06	4,92
QC_H	-1,55	5,00	0,63	3,26

Odstop za haloperidol znaša med -1,55 % in 7,56 %, RSD je bil največ 7,84 %. Za reduciran haloperidol je odstop od -5,06 % do 2,27 %, najvišji RSD je 4,92 %. Metoda je ustrezno točna in ponovljiva za oba analita, saj odstop in RSD pri nobeni meritvi nista preseгла 15 %.

4.3.4 Meddnevna točnost in ponovljivost

Meddnevno analizo točnosti in ponovljivosti smo izvajali znotraj treh zaporednih dni. Postopek je bil vsak dan enak in je opisan že pri znotrajdnevni točnosti in ponovljivosti. Rezultate analize podaja preglednica XII.

Preglednica XII. Točnost (odstop v [%]) in ponovljivost (RSD) haloperidola in reduciranega haloperidola med tremi zaporednimi dnevi

	HALOPERIDOL		REDUCIRAN HALOPERIDOL	
	Odstop [%]	RSD [%]	Odstop [%]	RSD [%]
QC _L	7,48	6,00	-8,87	7,04
QC _M	0,62	4,87	-8,61	6,85
QC _H	-1,43	3,64	-7,36	7,00

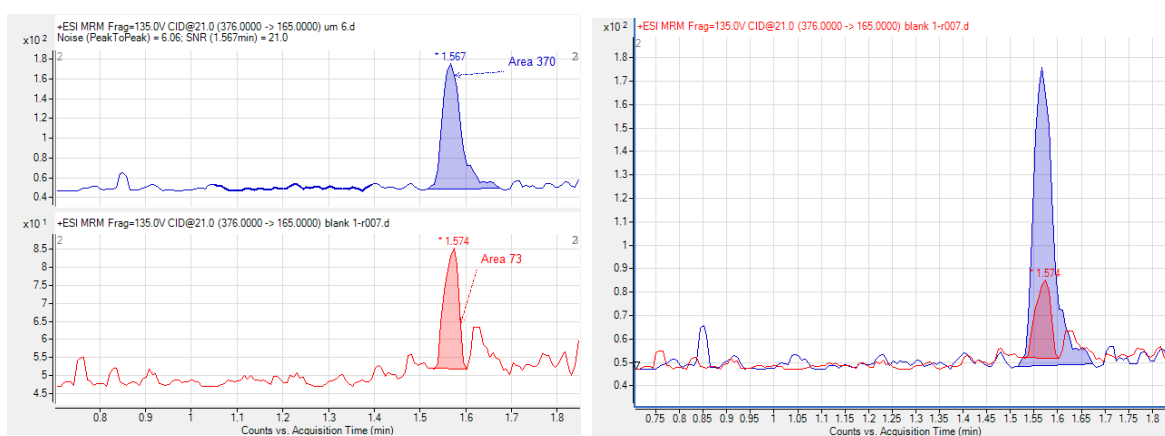
Meddnevna točnost haloperidola je zelo podobna znotrajdnevni, saj se vrednosti odstopov ne razlikujejo dosti, gibljejo se med -1,43 % in 7,48 %, najvišji RSD pa je 6,00 %. Meddnevna točnost za reduciran haloperidol je nekoliko slabša kot znotrajdnevna, vendar je manj razpršena. Pri vseh treh koncentracijah je odstopanje navzdol, vrednosti so med -8,87 % in -7,36 %. Tudi meddnevna ponovljivost rHA je nekoliko slabša kot znotrajdnevna, saj so vrednosti RSD nekoliko višje, največja je 7,04 %. Za oba analita je meddnevna točnost in ponovljivost na vseh nivojih znotraj dovoljenih mej, ki jih predpisujejo smernice FDA, zato lahko zaključimo, da je metoda ustrezna.

4.3.5 Delovno območje metode

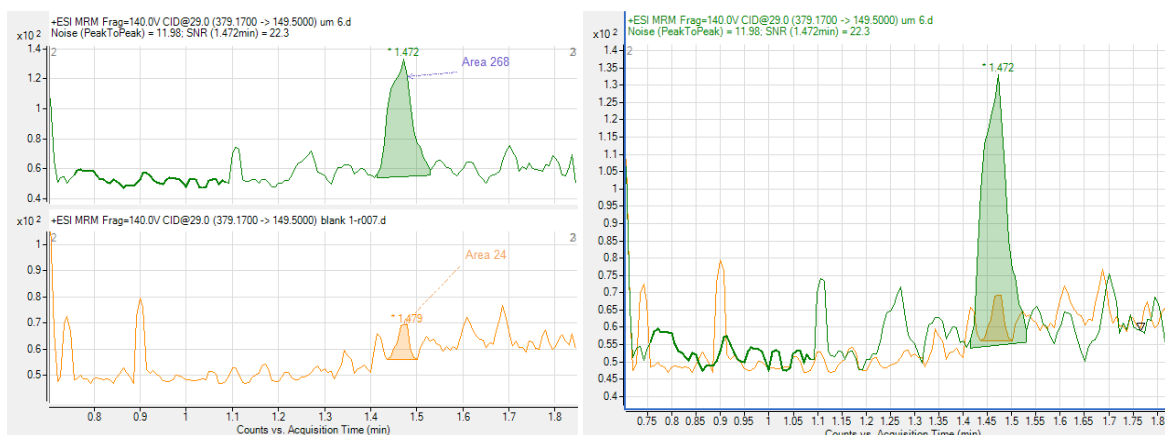
Uporabno območje metode obsega koncentracije med 0,4 in 100 µg/L za HA in rHA. V primerjavi z analizo iz plazme Urške Konjedic (območje med 0,1 in 50 µg/L) smo uspeli območje navzgor precej razširiti, navzdol pa je njim uspelo zagotoviti ustrezne lastnosti pri nižji koncentraciji kot nam. Pomembno je, da naše območje pokriva terapevtsko območje za haloperidol. Pri zdravljenju akutne shizofrenije znaša terapevtsko območje 5,6–16,9 µg/L (43), pri pacientih s kronično shizofrenijo pa 17–42 µg/L (44). Terapevtski območji sta sicer podani za koncentracijo učinkovine v serumu oz. plazmi, koncentracije merjene v polni krvi pa dosežejo nekoliko višje vrednosti (razmerje med krvjo in plazmo za HA je $2,8 \pm 1,2$ in za rHA $3,6 \pm 1,1$) (42). Kljub temu da nimamo podatkov za terapevtske koncentracije učinkovine v polni krvi, lahko iz teh podatkov sklepamo, da je območje naše analizne metode dovolj široko. Pri vzorcih pacientov se je izkazalo, da je zgornja meja območja ustrezna, saj nobena vrednost ni preseгла te meje. Bili pa so vzorci nekaterih pacientov, kjer je bila koncentracija daleč pod terapevtskim območjem.

4.3.6 Spodnja meja določitve

Spodnjo mejo določitve (LLOQ) za haloperidol in reduciran haloperidol predstavlja koncentracija 0,4 $\mu\text{g/L}$. To je najnižja koncentracija analitov, za katero nam je uspelo dokazati ustrezno točnost, ponovljivost in kjer je bil odziv analitov vsaj petkrat višji kot odziv slepega vzorca. Primerjavo slepega vzorca in vzorca pri LLOQ nam nazorno prikazujeta sliki 9 in 10. V preteklih raziskavah so uspeli doseči nižjo LLOQ za oba analita, kjer je pogojem ustrezala koncentracija 0,1 $\mu\text{g/L}$ za haloperidol (33) in 0,25 $\mu\text{g/L}$ za reduciran haloperidol (45). Nekaj odzivov pri vzorcih pacientov je sicer pod LLOQ, vendar je spodnja meja določitve kljub temu zadovoljivo nizka.



Slika 9. MRM kromatograma za haloperidol. Levo: zgoraj je modro obarvan kromatogram na meji določitve (LLOQ), spodaj je rdeče obarvan kromatogram slepega vzorca. Desno: Ta dva kromatograma sta zaradi lažje primerjave združena v eno sliko. Razmerje med signalom in šumom za spodnjo mejo določitve je 21:1.



Slika 10. MRM kromatograma za reduciran haloperidol. Levo: zgoraj je zelen kromatogram na meji določitve, spodaj je oranžen kromatogram slepega vzorca. Desno: Ta dva kromatograma sta zaradi lažje primerjave združena v eno sliko.

4.3.7 Stabilnost

Preverjali smo stabilnost analitov v posušeni madeži krvi na DBS karticah po njihovi izpostavitvi različnim temperaturam. Vpliv vlage in svetlobe na stabilnost smo izključili, saj smo kartice shranjevali v vrečkah s pritisnim zapiralom ob prisotnosti sušilnega sredstva v temi. DBS kartice s tremi madeži posušene krvi za vsak kontrolni vzorec pri nizki, srednji in visoki koncentraciji smo postavili v hladilnik (3 °C), na sobno temperaturo (25 °C) ter v ogrevano komoro (40 °C). Po 13 dneh smo naredili ekstrakcijo in analizo teh vzorcev ter njihove odzive primerjali z odzivi kontrolnih vzorcev, ekstrahiranih prvi dan, takoj po pripravi. V preglednici XIII so podani odstotki spremembe odziva po 13 dneh glede na čas t_0 .

Preglednica XIII. Stabilnost haloperidola in reduciranega haloperidola v DBS vzorcih po trinajstih dneh shranjevanja pri treh različnih temperaturah, podana kot sprememba odziva glede na t_0 .

	HALOPERIDOL			REDUCIRAN HALOPERIDOL		
temperatura	3 °C	25 °C	40 °C	3 °C	25 °C	40 °C
	sprememba odziva glede na t_0 [%]			sprememba odziva glede na t_0 [%]		
QC _L	0,64	-4,35	-6,44	-6,98	0,74	-5,89
QC _M	0,75	0,60	0,27	7,31	2,71	-1,03
QC _H	-6,65	5,08	3,06	2,65	-1,78	-2,19

Dokazali smo, da sta haloperidol in reduciran haloperidol v posušeni madeži krvi stabilna pri različnih temperaturah, tudi pri nizkih in visokih, saj se odziv v nobenem primeru ni spremenil za več kot 15 %. V prihodnje bi bilo priporočljivo preveriti še stabilnost pri zamrzovanju (npr. pri -20 °C), saj so lahko DBS vzorci v zimskih mesecih med transportom do laboratorija izpostavljeni tudi temperaturam pod lediščem.

4.3.8 Učinkovitost ekstrakcije

Uspešnost ekstrakcije analitov iz posušene madeže krvi na papirju smo merili z učinkovitostjo. Povprečne vrednosti na treh različnih koncentracijskih nivojih so enakomerne in ponovljive, kar prikazuje preglednica XIV. Vrednosti učinkovitosti ekstrakcije so blizu 100 % in vse vrednosti so znotraj dovoljenih odstopov točnosti metode po FDA smernicah (RSD je nižji od 15 %). Glede na odlično topnost haloperidola v ekstrakcijskem topilu (0,1 % mravljična kislina v metanolu) in predpostavko, da se

haloperidol ob prisotnosti velikega volumna metanola sprosti iz vezavnih mest v matrici, smo visoko učinkovitost pričakovali.

Preglednica XIV. Učinkovitost ekstrakcije

	HALOPERIDOL	REDUCIRAN HALOPERIDOL	INTERNI STANDARD
	Učinkovitost ekstrakcije [%]		
QC _L	101,7	106,3	101,2
QC _M	103,0	105,9	103,0
QC _H	104,4	109,0	99,4

4.3.9 Navzkrižni prenos med vzorci

S testom, ki smo ga izvedli, smo preverili prisotnost navzkrižnega prenosa, ki bi izhajal iz analizne naprave. Zaporedoma smo analizirali vzorec z visoko koncentracijo (QC_H) in slepi vzorec. Rezultati analize so predstavljeni na slikah 9 in 10 (glej poglavje 4.3.6), ki prikazujejo MRM kromatograme slepega vzorca in vzorca na meji določitve za haloperidol in reduciran haloperidol. Iz slik vidimo, da ne pri HA niti pri rHA v slepem vzorcu, ki je bil analiziran takoj po QC_H vzorcu, ni nobenega kromatografskega vrha, ki bi bil višji, kot vrh pri LLOQ. Posebno dobro se to vidi na obeh slikah desno, kjer sta kromatograma slepega vzorca in vzorca pri LLOQ združena v eno sliko in si lažje predstavljamo velikost in razmerje kromatografskih vrhov. S tem smo potrdili, da med analizami vzorcev ni prihajalo do navzkrižnega prenosa med njimi in da so bili pogoji tekočinske kromatografije dobro optimizirani, da analiti niso zastajali v sistemu. Za natančnejšo oceno navzkrižnega prenosa bi morali preveriti še vse stopnje priprave vzorcev, vendar je le-ta tu manj verjeten zaradi izrezovanja cele lise (ni stika s pečatom) in zaradi uporabe epic ter nastavkov pipet za enkratno uporabo.

4.4 UPORABA ANALIZNE METODE NA VZORCIH PACIENTOV

Z razvito in validirano metodo smo analizirali vzorce pacientov. To so bili DBS vzorci, ki smo jih pripravili sami v laboratoriju iz polne krvi 41 pacientov, obravnavanih v klinični študiji z naslovom »Preprečevanje posledic oksidativnega stresa pri bolnikih s shizofrenijo z vitaminom E in omega-3 nenasičenimi maščobnimi kislinami« (32). Uporabili smo enake oznake vzorcev, kot so bile uporabljene v sami študiji in v diplomski nalogi. V preglednici

XV so podani rezultati analize krvnih vzorcev (DBS) ter podatki analize plazemskih vzorcev, pridobljenih v diplomski nalogi Urške Konjedic, za haloperidol in reduciran haloperidol (33). V preglednico smo vključili tudi podatke za koncentracijo analitov v polni krvi, ki smo jo prevedli v primerljivo s plazemsko tako, da smo upoštevali hematokrit po enačbi: $c(\text{korigirana}) = c(\text{krvna}) / (1 - Hct)$. Za vse vzorce smo uporabili vrednost za hematokrit 0,43 (srednja vrednost normalnih vrednosti za ženske in moške), ker nismo imeli podatka za hematokrit za vsakega posameznega pacienta (46). Rezultati, označeni z zvezdico, so pod spodnjo mejo določitve, zato jih podajamo le informativno, oznaka ND pa označuje vrednosti, ki jih nismo zaznali. Pri koncentracijah v plazmi so z BLQ označene vrednosti analitov, ki so pod LLOQ, ki znaša 0,1 µg/L za HA in rHA (33).

Preglednica XV. Koncentracije analitov pridobljene iz vzorcev polne krvi (DBS) in plazme od pacientov iz klinične študije (32). Vrednosti analitov označene z zvezdico, so pod spodnjo mejo določitve, ki jih v analizi z metodo Blanda in Altmana nismo obravnavali in so v tabeli podane le informativno. ND – vrednosti, ki jih nismo zaznali. BLQ – vrednosti analitov pod LLOQ (33).

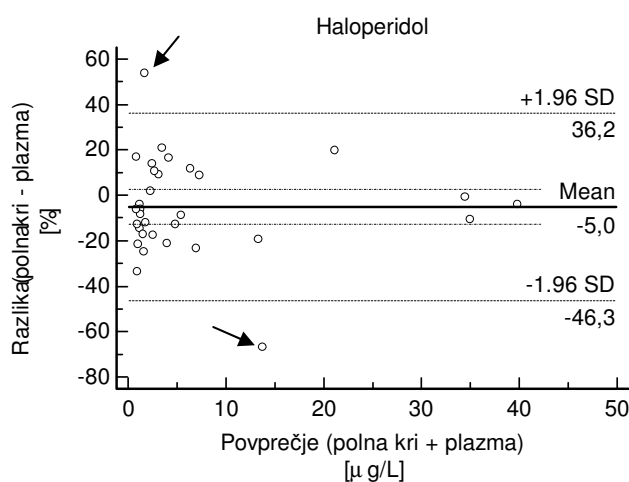
Koncentracija oznaka vzorca	HALOPERIDOL			REDUCIRAN HALOPERIDOL		
	polna kri [µg/L]	polna kri [µg/L]; korigirana	plazma [µg/L]	polna kri [µg/L]	polna kri [µg/L]; korigirana	plazma [µg/L]
41	0,30*	0,52*	0,81	ND	ND	BLQ
42	0,23*	0,41*	0,95	1,41	2,47	2,34
43	0,65	1,14	1,32	ND	ND	0,38
44	0,45	0,79	1,11	ND	ND	0,27
45	22,24	39,01	40,56	41,33	72,51	46,12
46	1,33	2,34	2,3	0,18*	0,32*	0,78
47	1,21	2,12	1,22	0,10*	0,17*	0,25
48	0,82	1,44	1,85	0,04*	0,06*	0,34
50	2,57	4,52	5,13	0,87	1,53	0,99
51	0,80	1,40	1,66	ND	ND	0,25
53	0,51	0,90	0,76	ND	ND	BLQ
56	18,86	33,09	36,84	22,18	38,91	30,29
57	0,68	1,19	1,24	ND	ND	0,31

58	6,85	12,02	14,57	19,89	34,90	23,1
59	0,29*	0,51*	0,93	ND	ND	0,22
61	0,71	1,25	1,33	3,34	5,86	4,37
62	1,87	3,29	3,0	0,09*	0,15*	0,46
64	0,51	0,89	1,01	ND	ND	0,41
65	0,26*	0,46*	1,1	ND	ND	0,35
66	0,97	1,70	1,92	0,19*	0,33*	0,78
71	0,24*	0,42*	0,57	ND	ND	BLQ
5P	5,23	9,17	18,35	6,03	10,58	12,11
6P	2,04	3,57	4,41	0,47	0,82	0,92
7P	4,33	7,60	6,97	1,13	1,99	0,92
8P	2,96	5,19	5,67	1,47	2,58	1,51
9P	3,49	6,12	7,73	2,36	4,13	1,15
10P	0,71	1,24	1,35	ND	ND	0,26
12P	13,24	23,23	19,06	6,14	10,77	3,87
13P	1,32	2,31	2,75	0,13*	0,23*	0,48
14P	0,10*	0,17*	0,63	ND	ND	0,13
15P	2,55	4,47	3,79	0,97	1,70	0,72
16P	0,23*	0,41*	0,78	ND	ND	BLQ
17P	0,52	0,92	1,14	ND	ND	BLQ
19P	1,52	2,66	2,31	4,74	8,32	4,54
20P	19,56	34,32	34,55	15,88	27,86	11,76
21P	0,46	0,81	0,86	ND	ND	BLQ
22P	3,83	6,72	5,97	0,75	1,32	0,87
34P	0,07*	0,12*	0,48	0,74	1,30	0,85
35P	0,31*	0,55*	0,87	ND	ND	BLQ
36P	2,22	3,89	3,15	0,33*	0,58*	0,41
52P	1,61	2,83	2,54	1,07	1,88	0,89

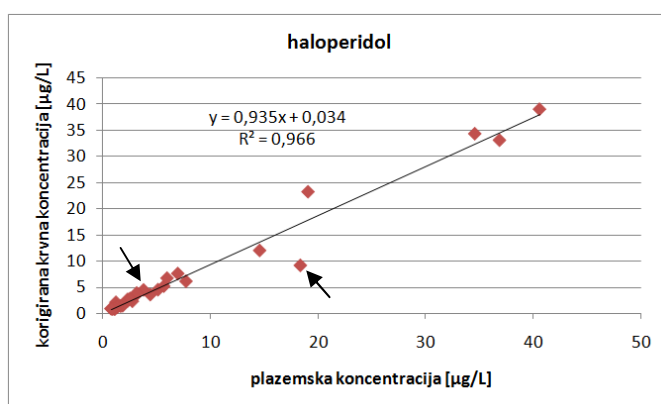
Validirano metodo je po priporočilih FDA mogoče aplicirati v rutinsko analizo, če vsaj 67 % QC-jev, analiziranih med sekvenco realnih vzorcev, odstopa za manj kot 15 % od referenčne vrednosti (34). V našem primeru smo to zahtevo dosegli, saj je bilo takih QC-jev 87 %.

4.5 ANALIZA SKLADNOSTI DVEH METOD (BLAND-ALTMAN PLOT)

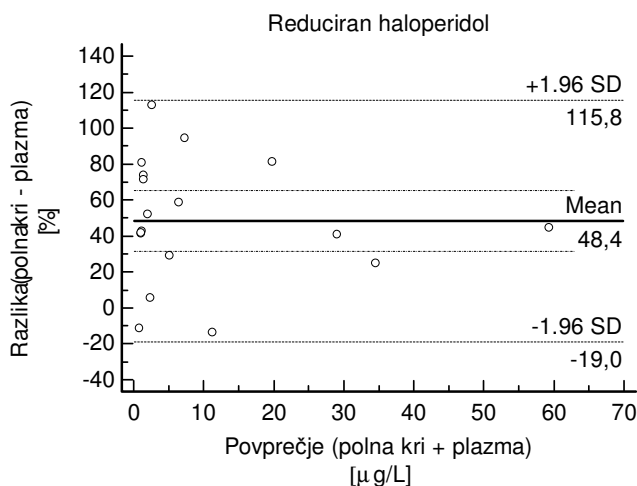
Razliko med analiznima metodama z DBS vzorci in plazemskimi vzorci smo analizirali z uporabo grafične metode Blanda in Altmana, ki primerja dve tehniki merjenja, pri čemer so razlike prikazane glede na povprečje obeh tehnik (40). Uporabili smo podatke korigiranih koncentracij v polni krvi in koncentracij v plazmi iz preglednice XV. Rezultati te analize so prikazani na slikah 11 in 13. Sliki 12 in 14 pa prikazujeta odnos med plazemsko in krvno koncentracijo posameznega analita.



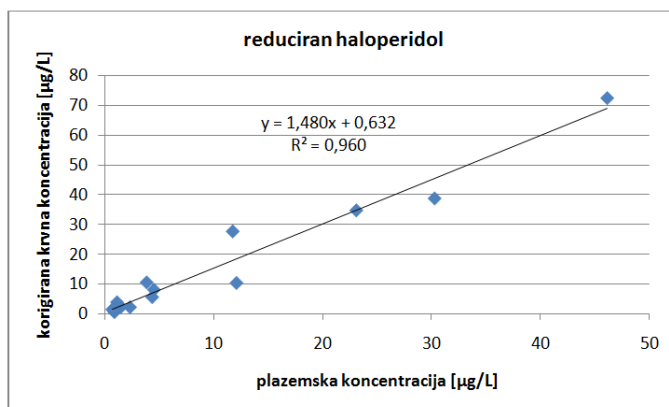
Slika 11. Diagram Blanda in Altmana za haloperidol prikazuje % razlike v koncentracijah pridobljenih iz plazemskih vzorcev in iz DBS vzorcev po korekciji za hematokrit. Neprekinjena vodoravna črta označuje povprečno razliko med metodama, črtkani vodoravni črti pa meje skladnosti (povprečje $\pm 1,96$ SD). Puščici označujeta vzorca, ki izstopata iz območja skladnosti.



Slika 12. Graf, ki prikazuje odnos med plazemsko in korigirano krvno koncentracijo haloperidola. Puščici označujeta vzorca, ki izstopata iz območja skladnosti.



Slika 13. Diagram Blanda in altmana za reduciran haloperidol prikazuje % razlike v koncentracijah pridobljenih iz plazemskih vzorcev in iz DBS vzorcev po korekciji za hematokrit. Neprekinjena vodoravna črta označuje povprečno razliko med metodama, črtkani vodoravni črti pa meje skladnosti (povprečje $\pm 1,96$ SD).



Slika 14. Graf, ki prikazuje odnos med plazemsko in korigirano krvno koncentracijo reduciranega haloperidola.

V diagramih na slikah 11 in 12 vidimo položaj posameznih meritev glede na meje skladnosti (*angl. limits of agreement*), ki predstavljata 95 % interval zaupanja. Diagrama prikazujeta visoko ujemanje rezultatov obeh metod, saj le dve meritvi (samo pri HA) izstopata izven meja skladnosti. S tem lahko potrdimo, da sta metodi spremljanja koncentracij haloperidola in reduciranega haloperidola iz plazme in iz polne krvi (DBS) primerljivi in zato medsebojno zamenljivi.

5 SKLEPI

Razvili in validirali smo prvo analizno metodo za določanje haloperidola in njegovega aktivnega metabolita, reduciranega haloperidola, iz posušenih madežev krvi. Uspeli smo najti ekstrakcijski postopek, s katerim smo analite iz DBS kartic, kjer so v posameznem vzorcu v zelo nizkih koncentracijah, v zadostni meri prenesli v raztopino, da smo jih lahko kvantificirali z UHPLC-MS/MS.

Z validacijo po smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila smo zagotovili, da je metoda točna, ponovljiva, selektivna ter zagotavlja dobro učinkovitost ekstrakcije. Metoda je za oba analita, haloperidol in reduciran haloperidol, linearna v območju 0,4–100 µg/L.

Ugotovili smo, da je učinek matrice sicer prisoten, vendar je na meji značilnega vpliva (15 %), ki je predpisana v FDA smernicah, saj ga z izotopno označenim internim standardom uspešno korigiramo, kar pomeni, da je metoda ustrezna.

DBS vzorci kažejo ustrezno stabilnost po 13 dneh izpostavljenosti različnim temperaturam (3 °C, 25 °C, 40 °C), kar je bistveno za namen uporabe te metode za terapevtsko spremljanje koncentracij haloperidola pri pacientih s shizofrenijo, kjer bi si pacienti sami jemali vzorce in jih po pošti pošiljali v analizo. Pomanjkljivost metode je, da nismo testirali stabilnosti DBS vzorcev pod temperaturo tališča, ki so ji vzorci lahko izpostavljeni med transportom v zimskih mesecih in da nismo testirali stabilnosti v daljšem obdobju od 13 dni (npr. vsaj en mesec).

Z razvito in validirano metodo za določanje haloperidola in reduciranega haloperidola v krvnih madežih smo dosegli primerljivo občutljivost oziroma spodnjo mejo določitve kot pri klasičnih plazemskih metodah. Ob upoštevanju dejstva, da naša metoda potrebuje 50x do 100x manjše volumne vzorcev, to lahko štejemo kot velik uspeh.

S primerjavo rezultatov analize DBS vzorcev in rezultatov plazemskih vzorcev iz pretekle raziskave, vendar pripravljenih iz istih vzorcev krvi, smo ugotovili, da je razvita metoda primerljiva klasični in dolgo uveljavljeni plazemski metodi vzorčenja. Zato bi lahko DBS metoda uspešno nadomestila plazemsko metodo pri terapevtskem spremljanju koncentracij haloperidola in s tem bi morda vplivali na boljše sodelovanje pacientov pri samem zdravljenju.

6 LITERATURA

1. Švab V: Sodelovanje pri zdravljenju: celostna obravnava psihiatričnega pacienta. *Farm Vestn* 2014; 65: 42–48.
2. Viva.si: Shizofrenija. <http://www.viva.si/Psihiatrija/574/Shizofrenija>. Dostop: 6. 4. 2014.
3. Rang HP, Dale MM, Ritter JM: Rang and Dale's Pharmacology, ed. 7, Elsevier, Philadelphia, 2012: 553–563.
4. Locatelli I: Pomen farmakokinetike pri napovedovanju kliničnih učinkov antidepressivov in antipsihotikov. *Farm Vestn* 2014; 65: 24–30.
5. Lemke TL, Williams DA: Foye's principles of Medicinal Chemistry, ed. 6, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, 2008: 601–626.
6. Rang HP, Dale MM, Ritter JM: Rang and Dale's Pharmacology, ed. 7, Elsevier, Philadelphia, 2012: 461–475.
7. DrugBank: Haloperidol. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00502>. Dostop: 11. 4. 2014.
8. Kudo S, Ishizaki T: Pharmacokinetics of Haloperidol: An Update. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37: 435–456.
9. Fang J, McKay G, Song J, Remillard A, Li X, Midha K: In vitro characterization of the metabolism of haloperidol using recombinant cytochrome P450 enzymes and human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 1638–1643.
10. Ulrich S, Wurthmann C, Brosz M, Meyer FP: The Relationship Between Serum Concentration and Therapeutic Effect of Haloperidol in Patients with Acute Schizophrenia. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34: 227–263.
11. Hughes IE, Jellet LB, Ilett KF: The influence of various factors on the In vitro distribution of haloperidol in human blood. *Br J Clin Pharmac* 1976; 3: 285–288.
12. Kelly MW, Perry PJ, Coryell WH, Miller DD, Arndt SV: Reduced haloperidol plasma concentration and clinical response in acute exacerbations of schizophrenia. *Psychopharmacology* 1990; 102: 514–520.
13. Forsman A, Ohman R: Pharmacokinetic studies on haloperidol in man. *Curr Ther Res* 1976; 20 (3): 319–336.
14. Centralna baza zdravil: Povzetek temeljnih značilnosti zdravila Haldol. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/91559559014C6EC8C12579C2003F52D0/\\$File/s-010555.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/91559559014C6EC8C12579C2003F52D0/$File/s-010555.pdf). Dostop: 11. 4. 2014.

15. Reddy VP, Kozielska M, Johnson M, Mafirakureva N, Vermeulen A, Liu J, de Greef R, Rujescu D: Population Pharmacokinetics-Pharmacodynamic Modeling of Haloperidol in Patients With Schizophrenia Using Positive and Negative Syndrome Rating Scale. *J Clin Psychopharmacol* 2013; 33: 731–739.
16. Rang HP, Dale MM, Ritter JM: Rang and Dale's Pharmacology, ed. 7, Elsevier, Philadelphia, 2012: 360–372.
17. Gradinaru J, Vollioud A, Eap CB, Ansermot N: Quantification of typical antipsychotics in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014; 88: 36–44.
18. Taylor DM, McAskill R: Atypical antipsychotics and weight gain – a systematic review. *Acta Psychiatr Scand* 2000; 101: 416–432.
19. Hiemke C et al: AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011; 44: 195–235.
20. Keevil BG: The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2011; 44: 110–118.
21. Edelbroek PM, van der Heijden J, Stolk LML: Dried Blood Spot Methods in Therapeutic Drug Monitoring: Methods, Assays, and Pitfalls. *Ther Drug Monit* 2009; 31: 327–336.
22. Deglon J, Thomas A, Mangin P, Staub C: Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: concepts and biomedical applications. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402: 2485–2498.
23. Li W, Tse FLS: Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr* 2010; 24: 49–65.
24. Spooner N: A glowing future for dried blood spot sampling. *Bioanalysis* 2010; 2 (8): 1341–1344.
25. Camag: Dried blood spot extraction system for mass spectrometry. http://www.camag.com/en/dbs/dbs-ms_500.cfm. Dostop: 22. 4. 2014.
26. Taylor RR, Hoffman KL, Schniedewind B, Clavijo C, Galinkin JL, Christians U: Comparison of the quantification of acetaminophen in plasma, cerebrospinal fluid and dried blood spots using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2013; 83: 1–9.

27. Barfield M, Wheller R: Use of Dried Plasma Spots in the Determination of Pharmacokinetics in Clinical Studies: Validation of a Quantitative Bioanalytical Method. *Anal Chem* 2011; 83: 118–124.
28. Emmons G, Rowland M: Pharmacokinetic considerations as to when to use dried blood spot sampling. *Bioanalysis* 2010; 2(11): 1791–1796.
29. Eurofins; Global Central Laboratory: Dried Blood Spots in drug development. http://www.eurofins.com/media/2312136/whitepaper_dried_blood_spots_web.pdf. Dostop: 25. 3. 2014.
30. Capiou S, Stove VV, Lambert WE, Stove CP: Prediction of the Hematocrit of Dried Blood Spots via Potassium Measurement on a Routine Clinical Chemistry Analyzer. *Anal Chem* 2013; 85: 404–410.
31. Dasgupta A: Usefulness of monitoring free (unbound) concentrations of therapeutic drugs in patient management. *Clinica Chimica Acta* 2007; 377: 1–13.
32. Klinična študija: Preprečevanje posledic oksidativnega stresa pri bolnikih s shizofrenijo z vitaminom E in omega-3 nenasičenimi maščobnimi kislinami. Marija Boškovič, 2011.
33. Konjedic U: Razvoj in validacija analizne metode za kantifikacijo haloperidola in njegovih metabolitov v plazmi s tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno detekcijo. Diplomski naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012.
34. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD, May 2001.
35. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM: Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003; 75: 3019–3030.
36. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M: A Strategy for validation of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1996; 14: 375–388.
37. Guideline on bioanalytical method validation, Committee for Medicinal Products for Human Use, European Medicines Agency, July 2011.
38. Guidance for Industry, Q2B validation of Analytical Procedures: Methodology. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD, November 1996.

39. 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): 1567–1575.
40. MedCalc: Bland-Altman plot. <http://www.medcalc.org/manual/blandaltman.php>. Dostop: 10. 3. 2014.
41. Kralj E, Trontelj J, Pajič T, Kristl A: Simultaneous measurement of imatinib, nilotinib and dasatinib in dried blood spot by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2012; 903: 150–156.
42. Eyles DW, Whiteford HA, Stedman TJ, Pond SM: Determination of haloperidol and reduced haloperidol in the plasma and blood of patients on depot haloperidol. *Psychopharmacology* 1992; 106: 268–274.
43. Ulrich S, Wurthman C, Brosz M, Meyer FP: The Relationship Between Serum Concentration and Therapeutic Effect of Haloperidol in Patients with Acute Schizophrenia. *Clin Pharmacokin* 1998; 34: 227–263
44. Hollister LE, Kim DY: Intensive treatment with haloperidol of treatment-resistant chronic schizophrenic patients. *American Journal of Psychiatry* 1982; 139: 1466–1468.
45. Hoja H, Marquet P, Verneuil B, Lotfi H, Dupuy JL, Pénicaud B, Lachâtre G: Determination of haloperidol and its reduced metabolite in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. *J Chromatogr B: Biomedical Sciences and Applications* 1997; 688: 275–80.
46. Family practice notebook: Hematocrit. <http://www.fpnotebook.com/hemeonc/lab/Hmtcrt.htm>. Dostop: 10. 3. 2014.