

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA KUKOVEC

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA KUKOVEC

**DERIVATIZACIJA VALPROJSKE KISLINE S 3-(2-BROMOACETIL)-7-
(DIETILAMINO)KUMARINOM IN RAZVOJ ANALIZNE METODE ZA
DOLOČANJE NJENIH KONCENTRACIJ V PLAZMI**

**DERIVATIZATION OF VALPROIC ACID WITH 3-(2-BROMO
ACETYL)-7-(DIETHYLAMINO)COUMARIN AND
DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR THE
DETERMINATION OF ITS CONCENTRATIONS IN PLASMA**

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Staneta Pajka, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Tomažu Vovku in somentorju asist. dr. Stanetu Pajku za vse nasvete in vodenje pri izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Staneta Pajka, mag. farm.

Mojca Kukovec

Ljubljana, 2014

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. Matjaž Jeras, mag. farm.

Članica diplomske komisije: asist. dr. Meta Kokalj, mag. farm.

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	DOLOČANJE PLAZEMSKJE KONCENTRACIJE VALPROJSKE KISLINE	1
1.1.1	Krvna plazma.....	1
1.1.2	Valprojska kislina	3
1.1.3	Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil	6
1.1.3.1	<i>TDM valprojske kisline</i>	7
1.2	DERIVATIZACIJSKI REAGENTI ZA KARBOKSILNE SKUPINE	9
1.2.1	Analogi kumarina	10
1.3	ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE VALPROJSKE KISLINE	12
2	NAMEN DELA	14
3	EKSPERIMENTALNI DEL.....	15
3.1	METERIALI	15
3.1.1	Biološki material.....	15
3.1.2	Standardi	15
3.1.3	Interni standardi	15
3.1.4	Reagenti in topila	15
3.1.5	Naprave in pribor	16
3.2	METODE.....	17
3.2.1	Priprava standardnih raztopin analita in internih standardov	17
3.2.2	Priprava plazemskih vzorcev	18
3.2.3	Priprava mobilne faze	19
3.2.4	Razvoj tekočinske kromatografije	19
4	REZULTATI in RAZPRAVA	22
4.1	REAKCIJSKA SHEMA	22
4.2	TLC.....	22
4.2	HPLC.....	24
4.2.2	Rezultati testiranja dinamike nastanka produkta (nebiološka reakcijska mešanica).....	26
4.2.3	Rezultati testiranja vpliva T na nastanek produkta (nebiološka reakcijska mešanica)...	28
4.2.4	Rezultati testiranja vpliva razmerja reagentov na nastanek produkta (plazemska reakcijska mešanica).....	29
4.2.5	Izbira internega standarda	30

4.2.6	Optimizacija metode	31
4.2.7	Selektivnost	34
4.2.8	Umeritvena premica	37
5	SKLEPI	43
6	LITERATURA.....	44

POVZETEK

Diplomska naloga predstavlja razvoj analizne metode določanja valprojske kisline (VPA) v človeški plazmi z reverzno-fazno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti v kombinaciji s fluorescenčnim detektorjem. Metoda temelji na predhodni derivatizaciji z uporabo fluorescenčnega reagenta 3-(2-bromoacetil)-7-(dietilamino)kumarina. Kot interni standard smo uporabili heptanojsko kislino. Vzorce smo pripravili s pomočjo ekstrakcije tekoče-tekoče. Ekstrakcijsko topilo, ki smo ga pri tem uporabili, je bil etilacetat. Proces derivatizacije smo izvajali v etil acetatu v prisotnosti K_2CO_3 in 18-Crown-6 in sicer 2 uri pri 60 °C.

Ločba je potekala na koloni Phenomenex Gemini 5u C18 110A, 150 x 4,60 mm 5 micron s pretokom 1,5 ml/min in izokratsko ločbo (0,5 % očetna kislina v milli-Q vodi: acetonitril, 35:65). Temperaturo kolone smo vzdrževali na 50 °C. Derivatizacijski produkt smo detektirali na fluorescenčnem detektorju ($Ex = 435 \text{ nm}$, $Em = 478 \text{ nm}$). Vendar smo, zaradi neuspešne ločbe dodatnega stranskega produkta, odzive kasneje spremljali na detektorju z nizom diod pri absorbanci 420 nm.

Med razvojem metode nam je uspelo določiti derivatizacijske parametre (T in čas derivatizacije, množinsko razmerje reagentov) in kromatografske pogoje (sestava mobilne faze, pretok, T kolone, analitski čas), ki bi jih lahko še izboljšali. Vendar se je metoda z uporabo izbranega derivatizacijskega reagenta izkazala za nelinearno in neponovljivo.

Ključne besede: valprojska kislina, krvna plazma, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, ekstrakcija tekoče-tekoče, derivatizacija.

ABSTRACT

This work represents the development of analytical method for the determination of valproic acid (VPA) in human plasma by reverse-phase high performance liquid chromatography combined with fluorescence detector. The method is based on derivatization of extracted valproic acid with 3-(2-bromoacetyl)-7-(diethylamino)coumarin. Heptanoic acid was used as an internal standard. Analytes were extracted from plasma samples using liquid-liquid extraction. Ethyl acetate was used as extraction solvent. Process of derivatization was carried out in an aliquote of ethyl acetate in the presence of K_2CO_3 and 18-Crown-6 at 60 °C for 2 hours.

Separation was carried out on a column Phenomenex Gemini 5u C18 110A, 150 x 4.60 mm 5 micron at a flow rate of 1.5 ml/min and isocratic separation (0.5 % acetic acid in milli-Q water: acetonitrile, 35:65). The temperature of the column was maintained at 50 °C. We have detected the product with fluorescence detector (Ex = 435 nm, Em = 478 nm), however due to the unsuccessful separation of additional byproduct from product of valproic acid, the analyte was detected by diode array detector at 420 nm absorbance.

During the development of the method we determined derivatization parameters (T and time of derivatization, molar ratio of reagents) and chromatographic conditions (mobile phase composition, flow rate, temperature column and the analytical time), however further improvements could be achieved. The method we used to derivatize valproic acid proved to be non-linear and imprecise.

Key words: Valproic acid, blood plasma, high performance liquid chromatography, liquid-liquid extraction, derivatization.

SEZNAM OKRAJŠAV

- AED – protiepileptična zdravila (AntiEpileptic Drug)
- AUC – površina pod krivuljo (Area Under the Curve)
- DAD – detektor z diodnim nizom (Diode Array Detection)
- ECD – detektor za zajetje elektronov (Electron Capture Detector)
- EDTA – etilendiamintetraocetna kislina (ethylenediaminetetraacetic acid)
- EMIT – encimska imunokemična metoda (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique)
- ESI – elektrorazprševalna ionizacija (electrospray ionization)
- FID – plamensko ionizacijski detektor (Flame Ionization Detector)
- FLD – fluorescenčni detektor (Fluorescence Detector)
- FPIA – polarizacijska imunofluorescenčna metoda (Fluorescence Polarization Immunoassay)
- GABA – γ -aminobutirna kislina (Gamma-Aminobutyric Acid)
- GABA-T – GABA transaminaza (GABA-transaminaze)
- GAD – glutamat-dekarboksilaza (Glutamic Acid Decarboxylase)
- GC – plinska kromatografija (Gas Chromatography)
- HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Pressure Liquid Chromatography)
- IS – interni standard (Internal Standard)
- LC-MS/MS – tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
- LLOQ – spodnja limita kvantifikacije (Lower Limit Of Quantification)
- MF – mobilna faza
- MS – masna spektrometrija (Mass Spectrometry)
- SPE – ekstrakcija na trdnem nosilcu (Solid Phase Extraction)
- TDM – terapevtsko spremljanje koncentracij (Therapeutic Drug Monitoring)
- TLC – tankoplastna tekočinska kromatografija (Thin Layer Chromatography)
- UPLC – tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (Ultra Performance Liquid Chromatography)
- UV – ultravijolično (Ultraviolet)
- VPA – valprojska kislina (2-propilpentanojska kislina)

1 UVOD

1.1 Določanje plazemske koncentracije valprojske kisline

1.1.1 Krvna plazma

Kri je sestavljena iz plazme (55 %) in krvnih celic (45 %) (1). Krvna plazma je tekoča sestavina krvi, ki vsebuje približno 85-90 % vode, kar predstavlja 6-8 % telesne teže (cca. 3,5 litra) (1, 2). Plazma ima podobno ionsko sestavo kot zunajcelična tekočina v intersticiju. V njej so raztopljene beljakovine, ki jih razvrščamo v tri razrede: albumin, globulini in fibrinogen. Albumin predstavlja vsaj 60 % beljakovin plazme. Sintetizira se v jetrih in je potreben za nespecifičen prenos snovi po krvi (npr. bilirubina). Med drugim je tudi odgovoren za večino koloidnoosmotskega tlaka plazme. Globulini, ki predstavljajo 35 % beljakovin plazme, so specifične transportne beljakovine (za tiroidne hormone, maščobe, železo) in imunoglobulini (protitelesa proti bakterijskim in virusnim okužbam) (1). V plazmi so še elektroliti (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , fosfati in sulfati), hranila (glukoza, aminokisliline, proste maščobne kisline), regulatorne snovi (hormoni), vitamini ter produkti celične presnove (sečnina). Gostota krvne plazme znaša 1,055-1,063 g/ml. Vrednost pH plazme pa se giblje med 7,33 in 7,43 (2).

Podrobnejšo sestavo plazme prikazuje **Preglednica I**.

Preglednica I: Sestava krvne plazme (2).

Snov	Delež	Snov	Delež
Ioni		Albumini	
Na ⁺	142 mEq/l	Albumin	3500-5000 mg/dl
K ⁺	4 mEq/l	Vitamin-D-vezavni protein	40 mg/dl
Mg ²⁺	2 mEq/l	Koagulacijski faktorji	
Ca ²⁺	5 mEq/l	Faktor V	10 µg/ml
Cl ⁻	103 mEq/l	Faktor VII	v sledovih
HCO ³⁻	27 mEq/l	Faktor VIII	100 ng/ml
HPO ³⁻	2 mEq/l	Faktor IX	5 µg/ml
SO ⁴²⁻	1 mEq/l	Faktor X	10 µg/ml
Glukoza	100 mg/dl	Faktor XI	5 µg/ml
Holesterol	200 mg/dl	Faktor XII	30 µg/ml
Trigliceridi	200 mg/dl	Faktor XIII	60 µg/ml
Urea	15 mg/dl	Fibrinolitični proteini	
Elementi		Fibrinogen	2-3 mg/ml
Cu	70-155 µg/dl	Protrombin	100 µg/ml
Zn	70-150 µg/dl	Antitrombin	0,15 mg/dl
Fe	40-160 µg/dl	Heparin	0,06 mg/dl
Si	40-1000 µg/dl	α-antiplazmin	7 mg/dl
Se, Mn, Ni, Cr	v sledovih	vWF	5-10 µg/ml
Vitamini		Inhibitor proteina C	0,004 mg/dl
Askorbinska kislina	600-1000 µg/dl	Plazminogen	20 mg/dl
Kobalamin	0,02-0,08 µg/dl	Komponente komplemeta	
Folat	0,2-0,9 µg/dl	Properdin	25 µg/dl
Retinol	30-65 µg/dl	Faktorji D, H, I, P	35-500 µg/dl
Tokoferol	500-2000 µg/dl	Protein S	500 µg/dl
Imunoglobulini		C4 bp in C8 bp	500 µg/dl
IgG	5-14 mg/dl	Ostali proteini	
IgM	0,3-2,5 mg/dl	Haptoglobin	se spreminja
IgA	0,5-5,0 mg/dl	C-reaktivni protein	se spreminja
IgD	0,01 mg/dl	α 1-antitripsin	25 mg/dl
IgE	v sledovih	C1-inhibitor	200 µg/dl

1. 1.2 Valprojska kislina

Protiepileptično delovanje valprojske kisline (VPA) (**Slika 1**) je leta 1962 po naključju odkril francoski znanstvenik Pierre Eymard. Pri glodavcih je proučeval s pentilentetrazolom povzročeno epilepsijo in protiepileptičen učinek spojin, za katere je uporabil valprojsko kislino kot topilo (3). Že leta 1964 so poročali o prvih kliničnih preizkusih z valprojsko kislino. Na trg je bila sproščena leta 1967 v Franciji in leta 1978 v Združenih državah Amerike. Valprojska kislina je tako postala ena izmed najbolj predpisanih protiepileptičnih učinkovin na svetu (4).

Valprojska kislina ima širok spekter delovanja. Primarno se uporablja za zdravljenje generaliziranih epileptičnih napadov: absence, mioklonične napade in tonično-klonične epileptične napade. Učinkovita je v terapiji proti delnim epileptičnim napadom, sekundarno generaliziranim napadom, specifičnim sindromom (Lennox-Gastaut, West sindrom) in vročinskim krčem (5). Poleg tega se uporablja za zdravljenje maničnih epizod povezanih z bipolarno motnjo in za preprečevanje migren (6).

Številne študije pa poročajo o njeni učinkovitosti intravenskega zdravljenja status-a epilepticus-a (7).

Do danes je bilo odkritih kar nekaj mehanizmov delovanja valprojske kisline.

Z aktivacijo glutamat-dekarboksilaze (GAD) poveča sintezo γ -aminobutirne kisline (GABA). Z inhibicijo GABA transaminaze (GABA-T) in sukcin semialdehid dehidrogenaze inhibira katabolizem GABA-e. Inaktivira napetostne natrijeve kanalčke, katerih odprtje povzroči nastanek akcijskega potenciala v nevronu in s tem vzburjenje nevrone.

Med drugim pa naj bi valprojska kislina inhibirala tudi T-tip kalcijevih kanalčkov (3).

Biološka uporabnost po peroralni aplikaciji valprojske kisline je skoraj popolna. Hitrost absorpcije je odvisna od vrste pripravka, ki ga uporabljamo (sirup, kapsule, obložene tablete s takojšnjim, podaljšanim ali zakasnelim sproščanjem). Valprojska kislina se v veliki meri veže na plazemske proteine (približno 90 %). Z večanjem plazemske koncentracije valprojske

kislina se povečuje tudi njena prosta frakcija v plazmi, kar lahko privede do pojava neželenih učinkov.

Učinkovina se hitro in skoraj v celoti izloča z jetrno presnovo. Približno 80 % presnove predstavljata β -oksidacija (30-40 %) in konjugacija z glukuronsko kislino (40-60 %). Nekatere druge protiepileptične učinkovine (induktorji encimov), povzročijo nastanek dveh farmakološko najbolj aktivnih metabolitov valprojske kisline, 2-en- in 4-en valprojske kisline. Približno 3 % učinkovine se v nespremenjeni obliki izloča preko ledvic (8, 9).

Razpolovni čas izločanja valprojske kisline je zelo variabilen. Pri odraslih znaša najpogosteje 8-12 ur (lahko tudi 4-16 ur), pri otrocih do 10 leta znaša 6-8 ur in pri novorojenčkih 17-40 ur. V primeru, ko pacient prejema še druge protiepileptične učinkovine (npr. karbamazepin, fenobarbital, fenitoin), ki inducirajo jetrne encime, se razpolovni čas VPA precej skrajša (7, 8, 9).

Terapevtske koncentracije valprojske kisline so med 50 in 100 $\mu\text{g/ml}$ (7, 8).

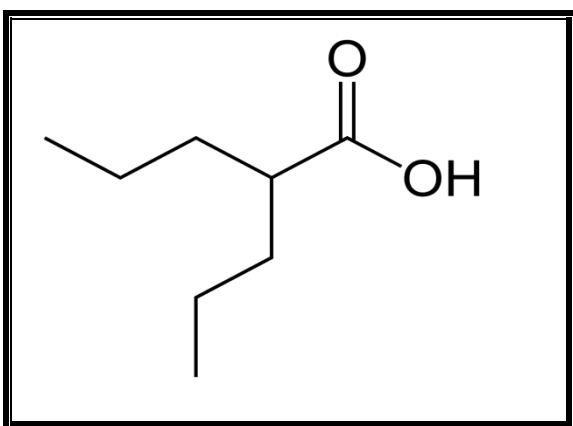
Začetni dnevni odmerek je običajno 10–15 mg/kg, ki ga lahko v tedenskih presledkih povečujemo za 5–10 mg/kg na dan. Pri pacientih s primarno generaliziranimi napadi, ki se zdravijo le z valprojsko kislino, je dnevni odmerek 10–20 mg/kg velikokrat zadosten za klinični učinek. Tipičen vzdrževalni odmerek pri otrocih je 20–30 mg/kg na dan. V primeru kombinirane terapije z drugimi protiepileptičnimi učinkovinami (npr. induktorji encimov) so potrebni dnevni odmerki med 30 in 60 mg/kg, pri otrocih celo višji od 100 mg/kg na dan (5, 8, 10).

Neželeni učinki valprojske kisline:

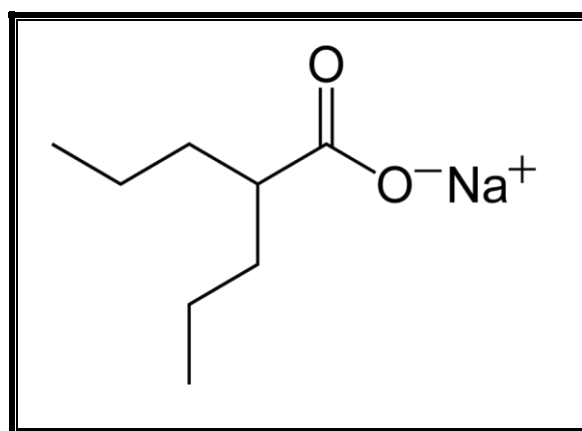
- nevrološki (tremor, zaspanost, letargije, stupor, koma),
- gastrointestinalni (slabost, bruhanje, anoreksija, povečan apetit, pridobitev teže),
- izguba las,
- hiperamonemija, hepatična nekroza, trombocitopenija, pankreatitis, teratogenost,
- pri ženskah lahko povzroči nepravilnosti v menstrualnem ciklu, hormonske spremembe, sindrom policističnih ovarijev,
- v prvem trimesečju nosečnosti obstaja nevarnost razvoja defekta nevralne cevi (spina bifida) pri zarodku (7, 9, 10).

Na tržišču so na voljo pripravki:

- z valprojsko kislino (Depakene – kapsule, sirup),
- z natrijevim valproatom (**Slika 2**) (Depacon – za IV uporabo),
- s kombinacijo VPA in natrijevega valproata (Depakine chrono – tablete) ter
- z natrijevim hidrogen divalproatom – 50 % VPA in 50 % Na-valproat (Depakote – tablete z zakasnelim in podaljšanim sproščanjem, kapsule; Epival - tablete) (9).



Slika 1: Struktura valprojske kisline
(CS ChemDraw Drawing program).



Slika 2: Struktura natrijevega valproata
(CS ChemDraw Drawing program).

1.1.3 Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil

TDM (Therapeutic Drug Monitoring) predstavlja merjenje koncentracije zdravila v serumu ali plazmi za pridobitev informacij o farmakokinetičnih lastnostih individualnega pacienta. Pridobljeni podatki se uporabljajo za prilagoditev odmerka zdravila pri posameznih pacientih (11). Na področju epilepsije se že 50 let uporablja kot orodje terapevtske optimizacije (12).

V primeru protiepileptičnih učinkovin (AED) se lahko TDM primarno uporablja v naslednjih primerih:

- po uvedbi zdravljenja ali po prilagoditvi odmerka (za doseganje ciljnih koncentracij pri posameznem pacientu in vzpostavitev individualnega terapevtskega območja),
- pri pacientih, ki se zdravijo z zdravili, katerih farmakokinetika je odvisna od odmerka (fenitoin),
- v primeru domnevne toksičnosti antiepileptikov,
- ko se, kljub ustreznemu odmerku, napadi nadaljujejo,
- med zdravljenjem določenih skupin pacientov (otroci, starejši, nosečnice z epilepsijo); razlog za spremljanje teh bolnikov je pojasnitev sprememb farmakokinetike kot posledica fizioloških sprememb: staranje, nosečnost ...),
- pri bolnikih z domnevnimi interakcijami med zdravili; potrebno je oceniti potencialne spremembe v stanju dinamičnega ravnovesja koncentracije protiepileptičnih učinkovin,
- v primeru suma na slabo complianco,
- v primeru spremembe oblike zdravila, vključno s spremembami pri generičnih oblikah,
- v primeru nepričakovane spremembe v kliničnem odzivu (12, 13).

Serum in plazma sta najpogosteje uporabljena matriksa za določanje koncentracije protiepileptičnih učinkovin. Lahko pa jih določamo tudi v slini, cerebrospinalni tekočini, tkivih in celo solzah (14).

Uporaba TDM je primerna za učinkovine z ozkim terapevtskim indeksom, manj predvidljivo farmakokinetiko in pri učinkovinah, ki izkazujejo dobro korelacijo med njihovo koncentracijo in učinkom (12).

Pri razumevanju vsebine TDM je potrebno omeniti dva termina, ki se pogosto zamenjujeta: referenčno in terapevtsko območje. Referenčno območje predstavlja koncentracijsko območje, znotraj katerega je zdravljenje optimalno za večino pacientov. Določeno je s spodnjo mejo, pod katero je terapevtski učinek zdravila malo verjeten, in z zgornjo mejo, nad katero obstaja velika verjetnost pojava toksičnih/neželenih učinkov zdravila.

Za večino novejših protiepileptičnih učinkovin referenčna območja še niso jasno opredeljena. Poleg tega lahko zgornja referenčna meja zelo varira od pacienta do pacienta. Obstajajo pacienti, pri katerih se pojavljajo toksični simptomi že pri nizkih koncentracijah učinkovin. Medtem ko nekateri prenašajo in celo potrebujejo koncentracije učinkovin nad zgornjo referenčno mejo in pri tem ne razvijejo neželenih učinkov. Iz tega sledi, da referenčno območje ni vedno enako terapevtskemu. Terapevtsko območje je koncentracijsko območje za optimalno zdravljenje posameznega pacienta. Gre za območje, ki preprečuje epileptične napade in pojav neželenih učinkov zdravila. Zato je pomembno, da prilagoditev odmerka učinkovine ni rezultat samo njene plazemske koncentracije, ampak hkrati tudi skrbne klinične ocene posameznega pacienta (12, 13).

Kot že omenjeno je TDM lahko zelo uporabno in včasih nujno potrebno za spremljanje interakcij med zdravili. Če želimo oceniti plazemsko koncentracijo učinkovin, je pri tem potrebno upoštevati odmerek, čas zadnjega odmerka, trajanje predhodnega zdravljenja, starost, težo in zdravstveno stanje pacienta. V primeru, ko so farmakodinamični učinki zdravila hitri in se jih da zlahka izmeriti, terapevtskega spremljanja učinkovine ni potrebno (11).

1.1.3.1 TDM valprojske kisline

Terapevtsko spremljanje valprojske kisline je nujno pri pacientih, ki hkrati prejemajo še druge učinkovine (induktorje encimov), in je ključnega pomena pri preprečevanju toksičnosti učinkovine (8).

Fenitoin, fenobarbital, pirimidon in karbamazepin so znani induktorji jetrnih encimov, ki zmanjšajo plazemsko koncentracijo VPA. Vendar se učinek VPA pri tem naj ne bi zmanjšal zaradi aktivnih metabolitov: 2-en in 4-en valprojske kisline. Tudi lamotrigin in topiramid

zmanjšata plazemsko koncentracijo VPA (7, 9). Ostale učinkovine, ki zmanjšujejo plazemsko koncentracijo VPA so: rifampicin, cisplatin, metotreksat in karbapenemi.

Valprojska kislina ima signifikanten učinek na ostale protiepileptične učinkovine. Povečuje plazemske koncentracije karbamazepin 10,11-epoksida (metabolit karbamazepina), lamotrigina in fenobarbitala. Zaradi vezave na albumine vpliva na druge učinkovine, ki se vežejo na plazemske proteine in poveča njihovo prosto frakcijo: fenitoina in acetilsalicilne kisline (7).

Zaradi nepredvidljivega razmerja med odmerkom in koncentracijo VPA je velika potreba po uporabi TDM za določitev individualne in vzdrževalne terapije posameznega pacienta. Valprojska kislina ima relativno kratek razpolovni čas. Zato je pri interpretaciji plazemskih koncentracij VPA zelo pomembno vzorčenje. Najbolj idealen čas odvzema vzorca za merjenje koncentracije je pred jutranjim odmerkom (12, 14).

Najpogostejše analizne metode za določanje TDM so: imunološke (FPIA – »Fluorescence Polarization Immunoassay«, EMIT – »Enzyme Multiplied Immunoassay Technique«) in kromatografske metode. Med slednjimi se uporabljata plinska kromatografija (GC – »Gas Chromatography«) in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC – »High Pressure Liquid Chromatography«) v kombinaciji z različnimi detektorji - ultravijolični detektor (UV – »Ultraviolet«), detektor na zajetje elektronov (ECD – »Electron Capture detector«), fluorescenčni detektor (FLD – »Fluorescence detector«) in detekcija s pomočjo masne spektrometrije (MS – »Mass spectrometry«) (12).

1. 2 Derivatizacijski reagenti za karboksilne skupine

Približno 8 % organskih spojin, ki se uporabljajo v farmacevtske in biomedicinske namene, vsebujejo karboksilno funkcionalno skupino (15). Različne karboksilne kisline, vključno z maščobnimi, žolčnimi kislinami in prostaglandini imajo pomembno fiziološko vlogo v živih organizmih. Zato je v analitiki velik interes za njihovo izolacijo in kvantifikacijo (15, 16).

Dejstvo je, da karboksilne kisline s preprosto strukturo, med njimi tudi VPA, ne vsebujejo kromofora, ki bi omogočil zadostno detekcijo z UV-VIS ali fluorescenčnim detektorjem (16). Za povečanje občutljivosti in selektivnosti detekcije karboksilnih kislin se v analitiki vse bolj uporablja derivatizacija karboksilne skupine s primernim kromoforom, fluoform ali elektroformom (15, 16, 17).

Idealen derivatizacijski reagent naj bi reagiral pod naslednjimi kriteriji:

- ❖ popolna in kvantitativna pretvorba analita v en konjugat pod milimi reakcijskimi pogoji,
- ❖ izvedba derivatizacije v vodnih ali nevodnih topilih,
- ❖ minimalne stranske reakcije med derivatizacijo,
- ❖ stabilnost reagenta in konjugata pri sobni temperaturi,
- ❖ enostavna kromatografska ločba reagenta in konjugata (15).

Preglednica II: Povzetek UV in fluorescenčnih derivatizacijskih reagentov glede na funkcionalno skupino, ki sodeluje pri derivatizaciji (16).

Kemijska skupina	Funkcionalna skupina reagenta		Tvorba konjugata
Alkil halidi	-CH ₂ Br	+ R-COOH →	-CH ₂ OCO-R
Diazoalkani	-CHN ₂		-CH ₂ OCO-R
Hidrazidi	-NHNH ₂		-NHNHCO-R
Amini	-NH ₂		-NHCO-R
Alkoholi	-OH		-OOC-R
Sulfonati	-SO ₃ CF ₃		-OOC-R

1.2.1 Analogi kumarina

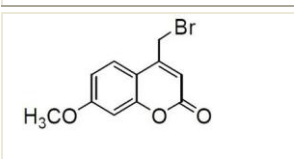
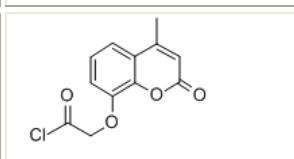
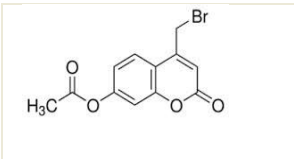
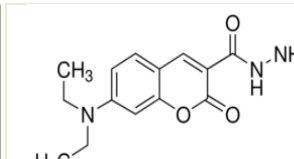
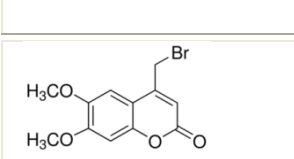
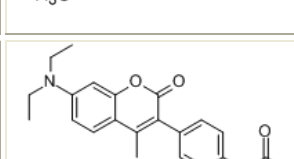
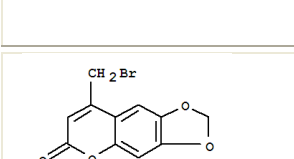
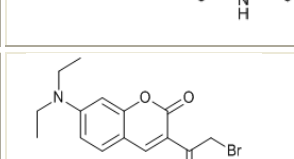
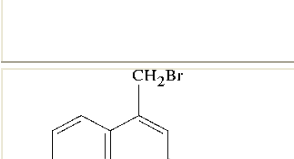
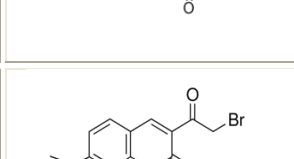
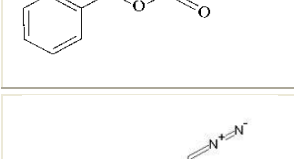
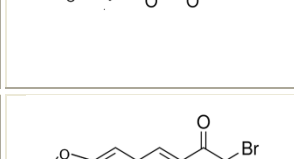
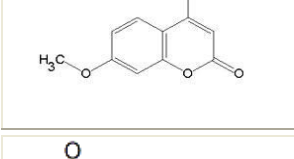
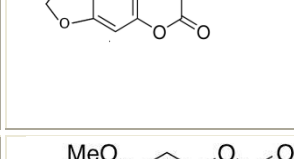
Reagenti te skupine so bili razviti specifično za UV oz. FL detekcijo karboksilnih kislin. Reakcijski pogoji se med reagenti razlikujejo. V večini primerov pa je za ločbo derivatov potrebna reverzno-fazna kolona in mobilna faza v kombinaciji acetonitril : voda ali metanol : voda.

Do sedaj znani derivatizacijski reagenti so:

- 4-(bromometil)-7-(metoksi)kumarin (Br-MMC),
- 4-(bromometil)-7-(acetoksi)kumarin (Br-MAC),
- 4-(bromometil)-6,7-(dimetoksi)kumarin (Br-MDMC),
- 4-(bromometil)-6,7-(metilendioksi)kumarin (Br-MDC),
- 4-(bromometil)-7,8-benzokumarin (Br-BC),
- 4-(diazometil)-7-(metoksi)kumarin (DMC),
- 3-(kloroformil)-7-(metoksi)kumarin (MC3C),
- 7-[(klorokarbonil)metoksi]-4-metilkumarin (CMMC),
- 7-(dietilamino)-kumarin-3-karbohidrazid (DCCH),
- 7-(dietilamino)-3-{4-[(jodoacetil)amino]fenil}-4-metilkumarin (DCIA),
- 3-(bromoacetil)-7-(dietilamino)kumarin (Br-DAC),
- 3-(bromoacetil)-7-(metoksi)kumarin (Br-AMC),
- 3-(bromoacetil)-6,7-(metilendioksi)kumarin (Br-AMDC),

- N-(7-metoksi-4-metil-2-okso-2H-6-kromenil)-2-bromoacetamid (Br-MAMC) (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

Preglednica III: Strukture kumarinskih derivatizacijskih reagentov (15, 16, 17, 18, 19, 21).

Analog kumarina	Kemijska struktura	Analog kumarina	Kemijska struktura
Br-MMC		CMMC	
Br-MAC		DCCH	
Br-MDMC		DCIA	
Br-MDC		Br-DAC	
Br-BC		Br-AMC	
DMC		Br-AMDC	
MC3C		Br-MAMC	

1.3 Analizne metode za določanje valprojske kisline

Do sedaj objavljene raziskave so preučevale analizne metode za določanje VPA v različnih bioloških vzorcih: najpogosteje v človeški plazmi (21-31) in serumu (32-34). Redkeje pa v polni krvi (35, 36), urinu in želodčni vsebini (35), mišji plazmi (37, 38) ter solzah (39). V večini izvedenih raziskav so določali le koncentracijo VPA (24-30, 32, 33, 38). V drugih so izvajali derivatizacijo VPA in jo določali s pomočjo konjugatov (21-23, 34, 37). Nekatere raziskave pa so VPA določevale v prisotnosti imunosupresivov (23), atipičnih antipsihotikov (26), njenih metabolitov (27), ostalih protiepileptičnih učinkovin (29, 31) in antidepresivov (35).

Priprava vzorcev v analizne namene pogosto vključuje naslednje procese: bogatenje vzorca, homogeniziranje, precipitacijo oz. obarjanje, vorteksiranje, centrifugiranje, ekstrakcijo, sušenje in rekonstitucijo oz. raztapljanje suhega ostanka. Zaradi uporabe različnih vzorcev in analiznih metod, smo med pregledom literature naleteli na različne kombinacije naštetih korakov priprave vzorca. Najpogosteje uporabljen tip ekstrakcije je bil tekoče-tekoče (21-24, 26, 29, 31, 32, 34-35, 37). Topila za ekstrakcijo so bila različna: acetonitril (21), toluen (22), diklorometan (23), n-heksan (24) in metanol (29). V ostalih raziskavah so, za pridobitev čistejših vzorcev, ekstrakcijo izvedli na trdnem nosilcu (SPE - Solid phase extraction) (25, 27, 28, 36, 38).

V zadnjih letih je vedno več pozornosti usmerjene v mikroekstrakcijo. Gre za alternativno metodo priprave vzorca, ki v primerjavi z običajno ekstrakcijo tekoče-tekoče, porablja veliko manjše volumne topil (1-3 μ l), je hitrejša, zahteva preprosto laboratorijsko opremo, je enostavna za avtomatizacijo, poceni in omogoča minimalno izpostavljenost toksičnim organskim topilom (33, 40).

Med določanjem VPA v bioloških vzorcih je bila največkrat uporabljena reverzno-fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) v kombinaciji s FLD (21-23) in UV (24) detektorji. Za doseganje večje občutljivosti in selektivnosti so analitiki razvili metodo tekočinske kromatografije sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) (25-31, 34, 35, 38).

HPLC z neposredno detekcijo (UV detekcija) pogosto predstavlja težave zaradi slabe zaznavnosti kot posledica pomanjkanja močnega kromofora ali fluorofora. V določenih raziskavah so se temu problemu izognili s predhodno derivatizacijo (21-23, 34).

Novejša različica konvencionalne HPLC metode je tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (UPLC - »Ultra Performance Liquid Chromatography«). Prednost njene uporabe se kaže predvsem v krajših analitskih časih, večji občutljivosti in resoluciji. Proença in sodelavci (37) ter Joo s sodelavci (37) so metodo uporabili v kombinaciji s tandemsko masno spektrometrijo, kar je še dodatno povečalo selektivnost in občutljivost metode.

Nekateri raziskovalci pa so VPA določali s pomočjo plinske kromatografije (GC) sklopljene s FID (33) in masnim spektrometrom (39, 40).

Najnižjo spodnjo mejo kvantifikacije (LLOQ) so določili v primeru masnega detektorja in sicer 50 ng/ml (26). Tudi območje linearnosti je bilo najširše pri uporabi masnega detektorja, 10-20.000 ng/ml. Zgornja meja koncentracijskega območja je bila kar 2000-krat višja od spodnje meje (26). Pri večini metod se je zgornja meja območja linearnosti gibala med 150-200 µg/ml (21-23, 25, 27, 28, 32). Najvišja zgornja meja linearnosti, ki so jo določili, je znašala 500 µg/ml (31).

2 NAMEN DELA

Valprojska kislina (2-propilpentanojska kislina) je preprosta razvejana karboksilna kislina s širokim spektrom delovanja. Uporablja se za zdravljenje epilepsije, maničnih epizod in pri preprečevanju migren.

Pri pacientih, ki se sočasno zdravijo še z drugimi zdravilnimi učinkovinami (induktorji jetrnih encimov, učinkovine z veliko afiniteto do plazemskih proteinov, nevarnost interakcij ...) in pri posebnih skupinah pacientov (otroci, starejši, nosečnice – sprememba farmakokinetike) je nujno potrebno terapevtsko spremljanje koncentracije VPA v bioloških vzorcih. Za to potrebujemo preprosto, zanesljivo, občutljivo, selektivno in hitro analitsko metodo.

V diplomski nalogi bomo poskušali razviti analizno metodo za določanje VPA v človeški plazmi.

Metoda bo temeljila na tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti (HPLC) s fluorescenčnim detektorjem s predhodno derivatizacijo VPA. Derivatizacijo bomo izvedli s 3-(2-bromoacetil)-7-(dietilamino)kumarinom.

Osnovne derivatizacijske pogoje bomo najprej določili v nebiološki reakcijski mešanici s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC). Nato bomo izbrane pogoje preizkusili na plazemskih vzorcih. Pred tem bomo naš analit (VPA) ekstrahirali iz plazme s pomočjo ekstrakcije tekoče – tekoče, vzorec centrifugirali in organsko fazo vzorca posušili v dušikovi atmosferi pod visokim tlakom. Suh preostanek bomo raztopili v mobilni fazi in analizirali s HPLC-FLD.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 METERIALI

3.1.1 Biološki material

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

3.1.2 Standardi

- Na-valproat, $C_8H_{15}NaO_2$: Valproic acid sodium salt; $M = 166,19$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija),
- Valprojska kislina, $C_8H_{16}O_2$; $M = 144,21$ g/mol, $\rho = 0,92$ g/cm³ (Katedra za farmacevtsko kemijo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija),
- SP-77B-1: 2-(7-(dietilamino)-2-okso-2H-kumarin-3-il)-2-oksoetil 2-propilpentanoat, $C_{23}H_{31}NO_5$; $M = 401,50$ g/mol (Katedra za farmacevtsko kemijo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija).

3.1.3 Interni standardi

- Heptanojska kislina 96 %, $C_7H_{14}O_2$; $M = 130,18$ g/mol,
- Oktanojska kislina 100 %, $C_8H_{16}O_2$; $M = 144,21$ g/mol .

3.1.4 Reagenti in topila

- Natrijev karbonat, Na_2CO_3 : Sodium carbonate; $M = 105,99$ g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija),
- Natrijev hidrogen karbonat, $NaHCO_3$: Sodium hydrogen carbonate; $M = 84,01$ g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija),
- Kalijev karbonat, K_2CO_3 : Potassium carbonate; $M = 138,21$ g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija),
- 15-Crown-5, $M = 206,24$ g/mol (New Jersey, USA),
- 18-Crown-6, $M = 264,32$ g/mol (New Jersey, USA),

- SP-7B-1: 3-(2-bromoacetil)-7-(dietilamino)kumarin, $C_{15}H_{16}BrNO_3$; $M = 338,20$ g/mol (Katedra za farmacevtsko kemijo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija),
- Acetonitril, C_2H_3N , Chromasol V®, gradient grade, for HPLC, $\geq 99,9$ %; $M_r = 41,05$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija),
- Etil acetat, $CH_3COOC_2H_5$, Ethyl acetate; $M = 88,11$ g/mol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Nemčija),
- Klorovodikova kislina, HCl: Hydrochloric Acid 37 %; $M = 36,46$ g/mol (Castellar del Valles – Barcelona, Španija),
- Diklorometan, CH_2Cl_2 : Dichloromethane; $M = 84,93$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija),
- Ocetna kislina, CH_3COOH : Acetic acid (glacial) 100 %; $M = 60,05$ g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija),
- Mobilna faza pri TLC: etilacetat:heksan = 1:1 (V/V),
- Bidestilirana voda – milli-Q voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), specifična upornost $> 18,2$ m Ω cm, celokupni organski ogljik (TOC) < 6 ppb, pri $T = 25$ °C (Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija).

3.1.5 Naprave in pribor

- Hladilnik (3 °C) z zmrzovalnikom (-20 °C) (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Zamrzovalnik Gorenje ($T = -20$ °C) (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Tehnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- Tehnica XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- Centrifuga Eppendorf, tip: 5415R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- Turbovap®LV (Caliper, Hopkinton-M, ZDA)
- Mešalnik Vibromix 10 (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- VORTEMP 56 EVC (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- Polavtomatske pipete 2-20 μ l, 20-200 μ l in 100-1000 μ l (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)

- Digestorij
- UV lučka CAMAG
- TLC Silic gel 60 F₂₅₄, Aluminium sheets 20x20 cm (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- HPLC KOLONA: Phenomenex Gemini 5u C18 110A, 150 x 4,60 mm 5 micron (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene držve Amerike)
- PREDKOLONA za HPLC: Phenomenex Gemini 5u C18 (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- Aparatura za merjenje luminiscence
- Stekleni inventar: čaše, steklena kapilara, steklena kadička, viala, inserti za viala.
- Ostali inventar: filter papir, spatule, nastavki za pipete, pokrovčki za viala, plastične epruvete (1,5 ml, 2 ml, 4,5 ml), lateks rokavice in Parafilm®M.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava standardnih raztopin analita in internih standardov

Osnovne raztopine VPA, Na-valproata in IS

Osnovna raztopina VPA (3,6 mg/ml oz. 0,025 M): za pripravo osnovne raztopine VPA smo v 4,5 ml plastično epruveto odpipetirali 11,75 µl VPA s koncentracijo 6,38 M in jo redčili z acetonitrilom do 3 ml.

Osnovna raztopina Na-valproata (4,14 mg/ml oz. 0,025 M): v 4,5 ml plastično epruveto smo natehtali 12,42 mg Na-valproata in vanjo odpipetirali 3000 µl bidestilirane milli-Q vode.

Osnovna raztopina heptanojske kisline (IS1, 68 mM): v 2 ml epruveto smo odpipetirali 20 µl 96 % (6,8 M) heptanojske kisline in z etilacetatom dopolnili do 2 ml. Po izbiri heptanojske kisline kot IS za nadaljnje analize, smo pripravili 0,34 mM raztopino, tako da smo odvzeli 1000 µl osnovne raztopine in jo redčili s 1000 µl etilcetata.

Osnovna raztopina oktanojske kisline (IS2, 63 mM): v 2 ml epruveto smo odpipetirali 20 µl 100 % (6,3 M) oktanojske kisline in z etilacetatom dopolnili do 2 ml.

Delovne raztopine VPA oz. Na-valproata

Delovne raztopine smo uporabljali za pripravo umeritvene premice VPA oz. Na-valproata.

Pripravili smo jih v 1,5 ml epruveh, kamor smo odpipetirali potrebno količino osnovne raztopine in z ustreznim topilom dopolnili do 500 µl. Izjema je bila le koncentracija 180 µg/ml, ki smo jo pripravili z odvzemom 1000 µl osnovne raztopine brez redčitve. Postopek priprave delovnih raztopin je prikazan v **Preglednici IV**.

Preglednica IV: Priprava delovnih raztopin VPA oz. Na-valproata.

VPA (µg/mL)	VPA / Na- valp. (µl)	Acetonitril (pri VPA) / H₂O (pri Na-V.) (µl)	V cel (µl)	konc.VPA (µg/mL)
3600	1000	0	1000	180
3000	417	83	500	150
2500	347	153	500	125
2000	277	223	500	100
1600	222	278	500	80
1200	166	334	500	60
1000	138	362	500	50
800	111	389	500	40
600	83	417	500	30
400	55	445	500	20
200	27	473	500	10

3.2.2 Priprava plazemskih vzorcev

PROTOKOL priprave plazemskih vzorcev:

Slepa plazma: 180 µl plazme + 10 µl topila IS + 10 µl topila Na-valproata

Vzorci z IS: 180 µl plazme + 10 µl IS + 10 µl topila Na-valproata

Vzorci z IS + Na-valproat: 180 µl plazme + 10 µl IS + 10 µl stand. razt. Na-valproata

Slepi plazmi, vzorcju z IS in vzorcju z IS + Na-valproat smo odvzeli 100 µl ter nadaljevali z ekstrakcijo. Biološkemu vzorcju smo dodali 400 µl etil acetata in 200 µl 0,12 M HCl.

Vzorcu smo 5 min vorteksirali in 1,5 min centrifugirali na 13.000 obr/min pri sobni temperaturi.

Odvzeli smo 200 µl organske faze (etil acetat), dodali ostale reagente (40,3 µl 30,4 mM raztopine K₂CO₃, 38,5 µl 31,8 mM raztopine 18-Crown-6 in 44,7 µl 23,5 mM raztopine SP-7B-1) in inkubirali 2 uri pri 60 °C.

Po končani inkubaciji smo vzorce prenesli v Turbovap®LV, kjer smo jih pri 40 °C s pomočjo dušika posušili. Posušene vzorce smo raztopili v 150 µl acetonitrila in jih centrifugirali 1 min na 10.000 obr/min pri sobni temperaturi. Odpipetirali smo 100 µl pripravljenih vzorcev in jih prenesli v inserte, ki smo jih vložili v vialo.

3.2.3 Priprava mobilne faze

Mobilna faza za HPLC sistem je bila vsak dan sveže pripravljena. Vodna komponenta je bila sestavljena iz 0,5 % oetne kisline v bidestilirani milli-Q vodi. Za organsko komponento smo sprva uporabljali 0,5 % oetno kislino v acetonitrilu. Kasneje pa smo izbrali 100 % acetonitril. Obe komponenti smo pred uporabo razplinjevali 10 min v ultrazvočni kadički.

3.2.4 Razvoj tekočinske kromatografije

Kolona

HPLC KOLONA: Phenomenex Gemini 5u C18 110A, 150 x 4,60 mm 5 micron (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike).

Razvoj optimalne mobilne faze

Kot vodno komponento mobilne faze smo uporabljali:

- 0,5 % oetno kislino v bidestilirani milli-Q vodi.

Kot organsko komponento smo preizkusili:

- 0,5 % oetno kislino v acetonitrilu,
- 100 % acetonitril.

Spreminjali smo tudi delež organske komponente mobilne faze. Preizkusili smo različne izokratske (delež org. komponente je ves čas enak) in gradientne metode (delež org. komponente se s časom spreminja) v območju 58–90 % organske komponente MF (acetonitrila). V **Preglednici V** in **VI** so povzete izokratske in gradientne metode, ki smo jih preizkusili. ²

Preglednica V: Sestava mobilne faze pri preizkušeni izokratski metodi.

Metoda	MF (A: 0,5 % očetna v milli-Q vodi; B: 100 % acetonitril)	
izokratska	A:B	Čas analize [min]
	A:B = 42:58	27
	A:B = 35:65	12
	A:B = 30:70	10

Preglednica VI: Sestava mobilne faze pri preizkušeni gradientni metodi.

Metoda	MF (A: 0,5 % očetna v milli-Q vodi; B: 100 % acetonitril)					
gradientna						Čas analize [min]
Čas [min]	0	5	7	14	14.1	15
G1_A:B	80	80	60	60	80	
Čas [min]	0	4	7	14	14.1	15
G2_A:B	80	80	60	60	80	
Čas [min]	0	5	7	14	14.1	15
G3_A:B	85	85	60	60	85	
Čas [min]	0	4	6	14	14.1	15
G4_A:B	90	90	60	60	90	
Čas [min]	0	3	5	12	12.1	15
G5_A:B	70	70	60	60	70	

Za najbolj optimalno se je izkazala izokratska metoda s sestavo MF_A:B = 35:65.

Izbira optimalnega pretoka mobilne faze

Preizkusili smo različne pretoke mobilne faze v območju 1,0 – 2,0 ml/min. Končna izbira je bil pretok 1,5 ml/min.

Izbira optimalne temperature kolone

Kolono smo preizkusili na dveh različnih temperaturah, 40 in 50 °C. Izbrali smo temperaturo 50 °C.

Volumen injiciranja

Razvoj optimizacije smo začeli s 5 µl volumni injiciranja, vmes zvišali na 50 µl in na koncu zaključili z 20 µl.

Vrsta detekcije

Naš cilj je bil s pomočjo fluorescence detektirati nastali produkt (SP-77B-1). Optimalno ekscitacijsko in emisijsko valovno dolžino produkta (SP-77B-1) smo posneli s pomočjo aparature za merjenje luminiscence. Grafa ekscitacije (435 nm) in emisije (478 nm) sta prikazana na **Sliki 4** v poglavju Rezultati in razprava.

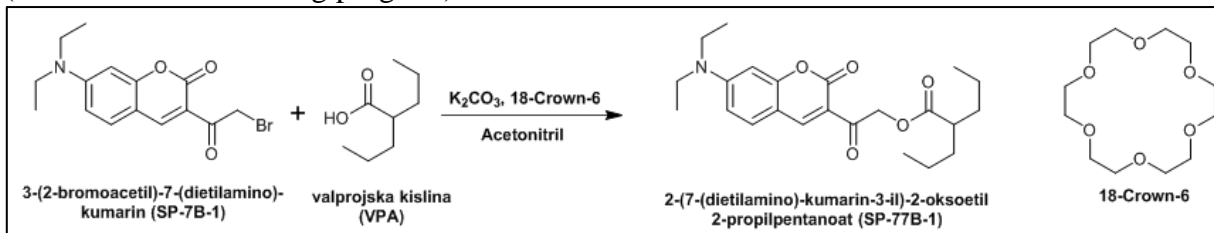
Produktu z analitom in internim standardom lahko poleg fluorescence izmerimo tudi absorbanco. Zato smo odzive spremljali tudi na detektorju z nizom diod (DAD). Na slednjem smo imeli možnost nastavitve različnih valovnih dolžin. Najbolj optimalna valovna dolžina absorbance je bila 420 nm.

Med razvojem HPLC (izbor kolone, mobilne faze, pretoka MF, temperature kolone in pogojev detekcije) smo iskali optimalne pogoje predvsem dveh kriterijev, in sicer časa analize ter resolucijo vrhov preiskovanega analita, internega standarda ter komponent iz plazme.

4 REZULTATI in RAZPRAVA

4.1 REAKCIJSKA SHEMA

Preglednica VII: Reakcijska shema derivatizacije valprojske kisline s kumarinom SP-7B-1 (CS ChemDraw Drawing program).



Kalijev karbonat (K_2CO_3) je baza, ki nevtralizira valprojsko kislino in z njo tvori sol. Spojina 18-Crown-6 je kronski eter, ki se uporablja kot katalizator faznega prenosa, saj omogoča raztapljanje nastale soli. Kalijev ion vključi v sredino svojega obroča in z njim tvori kompleks. Po odtegnitvi kalijevega iona valprojska kislina ostane v obliki aniona in kot nukleofil napade kumarinski reagent (SP-7B-1) ter zamenja brom na acetilni skupini. Nastane produkt (SP-77B-1) v obliki estra.

4.2 TLC

a) Izbira reagentov in določitev prvotnih reakcijskih pogojev

Izvajali smo reakcije z različnimi reagenti:

- Kumarin + VPA + $NaHCO_3$ + 15-Crown-5
- Kumarin + VPA + Na_2CO_3 + 15-Crown-5
- Kumarin + VPA + K_2CO_3 + 18-Crown-6

V kombinaciji z valprojsko kislino (VPA) in kumarinom (SP-7B-1) smo preizkusili različne reagente za aktivacijo VPA. Med testiranjem smo uporabili natrijev hidrogenkarbonat ($NaHCO_3$), natrijev karbonat (Na_2CO_3) in kalijev karbonat (K_2CO_3). Bazičnost raztopin narašča po enakem vrstnem redu.

Vsak kronski eter ima drugačno afiniteto do posameznih kationov (15-Crown-5 ima večjo afiniteto do natrijevega, 18-Crown-6 pa do kalijevega kationa). Zato smo glede na izbiro karbonata izbrali ustrezen kronski eter.

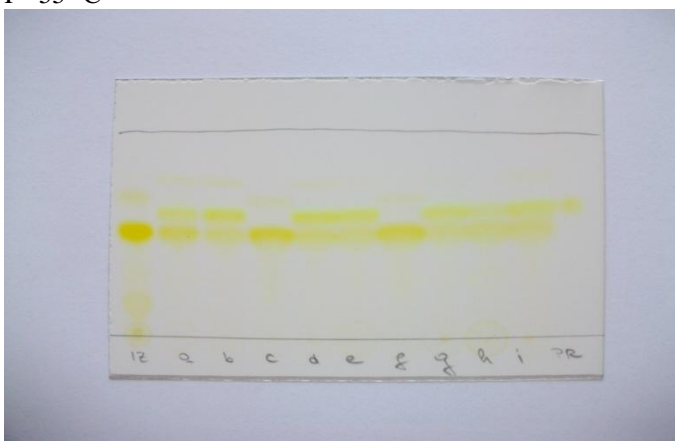
Predvidevali smo, da bo reakcija, s pomočjo katere smo kasneje dokazovali VPA v plazmi, zaradi prisotnosti nečistot in drugih kislin, zahtevala prebitek reagentov. Preizkusili smo različne kombinacije razmerij posameznih reagentov. Derivatizacijo smo izvajali pri različnih časih (30 min in 1 uro) pri temperaturi 55 °C.

V primeru prebitka kumarina je produkt nastal le pri reakciji s K_2CO_3 in 18-Crown-6 (**Slika 3**). Znano je, da so kalijeve soli bolj topne v organskih topilih, zato smo za nadaljnje preizkuse izbrali reagenta K_2CO_3 in 18-Crown-6.

Vrzt = 500 μ L

t = 1 h

T = 55 °C



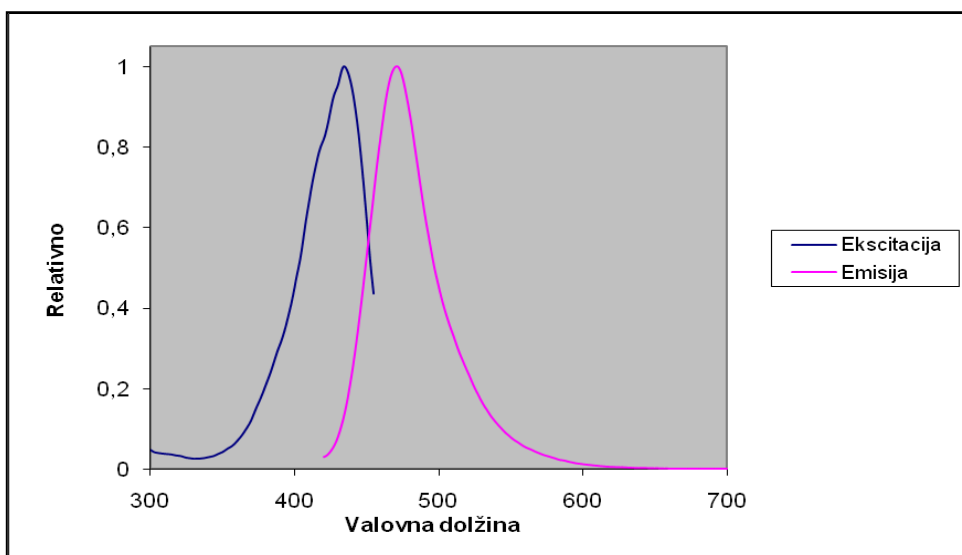
Slika 3: Razvoj TLC ploščice in prikaz intenzitete nastalih produktov v prisotnosti različnih kombinacij reagentov.

- a. Kumarin + VPA + $NaHCO_3$ + 15-Crown-5 = 1:1:1:1
- b. Kumarin + VPA + $NaHCO_3$ + 15-Crown-5 = 1:2:2:2
- c. Kumarin + VPA + $NaHCO_3$ + 15-Crown-5 = 2:1:1:1
- d. Kumarin + VPA + Na_2CO_3 + 15-Crown-5 = 1:1:1:1
- e. Kumarin + VPA + Na_2CO_3 + 15-Crown-5 = 1:2:2:2
- f. Kumarin + VPA + Na_2CO_3 + 15-Crown-5 = 2:1:1:1
- g. Kumarin + VPA + K_2CO_3 + 18-Crown-6 = 1:1:1:1
- h. Kumarin + VPA + K_2CO_3 + 18-Crown-6 = 1:2:2:2
- i. Kumarin + VPA + K_2CO_3 + 18-Crown-6 = 2:1:1:1

4.2 HPLC

4.2.1 Izbira detektorja

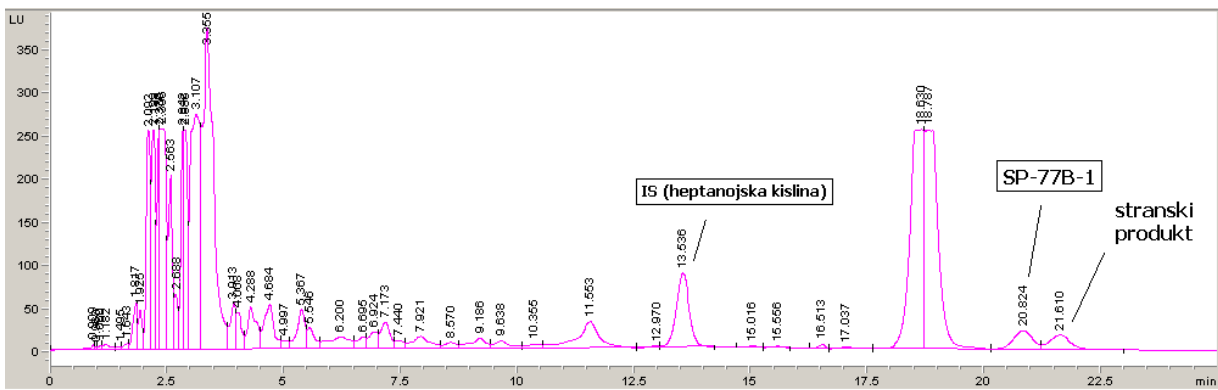
Cilj diplomske naloge je bil razvoj HPLC metode v kombinaciji s fluorescenčnim detektorjem za določanje VPA v plazmi. Omenjen detektor, ki je vgrajen v HPLC, je bolj občutljiv od UV detektorja, omogoča uporabo manjših volumnov vzorca (plazma) in s tem manjši volumen odvzete krvi pri bolnikih. Poleg tega izbran derivatizacijski reagent (SP-7B-1) in njegov produkt z VPA (SP-77B-1) fluorescirata. Grafa ekscitacije (435 nm) in emisije (478 nm) produkta (SP-77B-1) sta prikazana na **Sliki 4**.



Slika 4: Graf ekscitacije in emisije produkta (SP-77B-1).

Ob prehodu na plazemske vzorce smo naleteli na težave pri detekciji produkta (SP-77B-1). Izkazalo se je, da med derivatizacijo VPA potečejo dodatne reakcije, ki povzročijo nastanek stranskega produkta. Slednji je motil določitev SP-77B-1, saj se je eluiral tik za njim (**Slika 5**). To smo ugotovili s primerjavo kromatogramov vzorca in standardne raztopine produkta.

Kljub nastavitvi ekscitacijske in emisijske valovne dolžine produkta (SP-77B-1) ter dodatni optimizaciji kromatografskih pogojev (delež acetonitrila v MF, pretok) nam omenjena vrhova ni uspelo ločiti.



Slika 5: Kromatogram HPLC-FLD plazemskega vzorca z IS (heptanojsko kislino) in SP-77B-1 pri sestavi MF A:B = **40:60** (V/V), izokratska ločba (kromatografski pogoji: Ex = 435 nm, Em = 478 nm, kolona: 5 μ , C18, 150 x 4,6 mm, Gemini, volumen injiciranja: 5 μ l, pretok: 1,2 ml/min, čas analize: 25 min).

Aparatura nam je omogočala sočasno merjenje odzivov tudi na DAD detektorju. Opazili smo, da na tem ni vidnega stranskega produkta, kar je olajšalo detekcijo SP-77B-1. Zato smo se odločili, da za nadaljnje raziskave uporabimo DAD detektor z absorbanco pri 420 nm.

4.2.2 Rezultati testiranja dinamike nastanka produkta (nebiološka reakcijska mešanica)

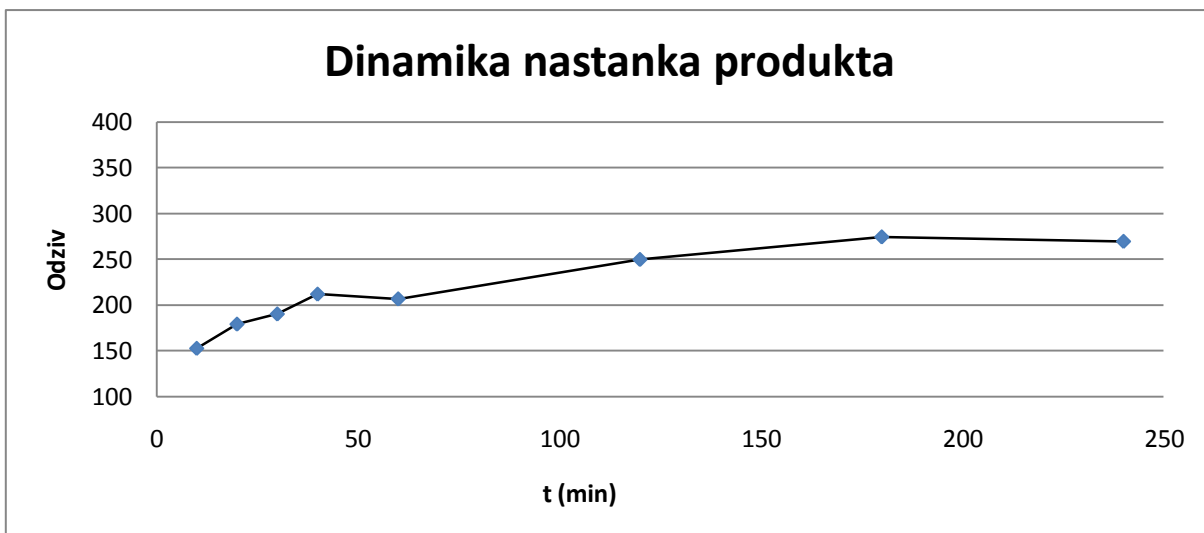
Dinamiko nastanka SP-77B-1 smo spremljali v vzorcu, ki je vseboval 0,7 mM VPA (100 µg/ml). Dodali smo še 56,3 µl 35,5 mM K₂CO₃, 99,6 µL 20,1 mM raztopine 18-Crown-6 in 1173 µl 8,4 mM raztopine kumarina SP-7B-1 ter dopolnili z acetonitrilom do 1,5 ml.

Odzive smo spremljali na DAD detektorju, ki je manj občutljiv od fluorescenčnega detektorja. Za boljšo detekcijo SP-77B-1 smo povečali delež dodanega kumarina (SP-7B-1). Razmerje med posameznimi reagenti je bilo 10:1:2:2 (SP-7B-1 : VPA : K₂CO₃ : 18-Crown-6).

Raztopina standarda produkta je vsebovala 0,3 mM že sintetizirane spojine SP-77B-1. Razmerje koncentracije uporabljene VPA in standarda produkta (SP-77B-1) je znašalo 2,3. Odziv standarda produkta smo pomnožili z razmerjem koncentracij in dobili vrednost površine pod vrhom produkta (AUC) ob predpostavki, da reakcija poteče do konca (100% izkoristek).

		Odziv		
	stand. produkta (SP-77B-1)	176,5	% nastalega produkta (SP-77-B-1)	razlika v % nastalega SP-77B-1 med posam. časi
	t (min)			
VPA	10	152,5	37,6	
	20	179	44,1	6,5
	30	190,1	46,8	2,7
	40	211,8	52,2	5,3
	60	206,6	50,9	-1,3
	120	249,7	61,5	10,6
	180	274,4	67,6	6,1
	240	269,5	66,4	-1,2
			405,95	100

Preglednica VIII: Površine vrhov UV detekcije nastalega SP-77B-1 v nebiološki reakcijski zmesi v različnih časovnih intervalih (konc. VPA 100 µg/ml).



Slika 6: Graf dinamike nastanka produkta (SP-77B-1); površina vrhov nastalega produkta v odvisnosti od časa.

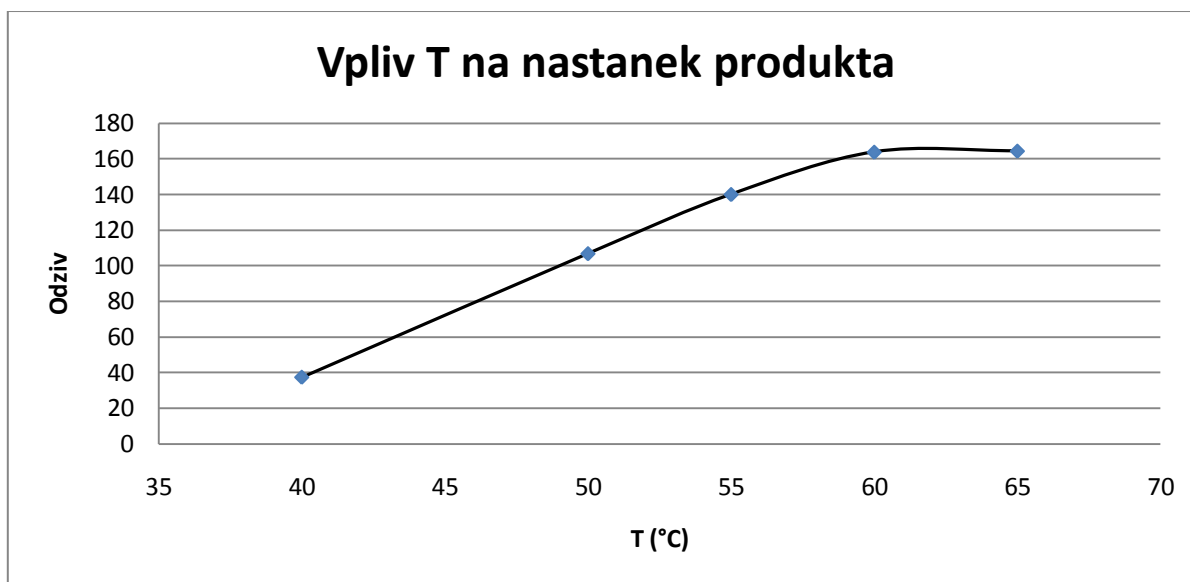
Z grafa (**Slika 6**) je razvidno, da je reakcija najhitreje potekla v prvih štiridesetih minutah. V tem času je zreagirala več kot polovica valprojske kisline (52 %). Med prvo in drugo uro se je vrh povišal še za 10 %, nato je počasi dosegel plato.

Vrh nastalega produkta je sicer po drugi uri še zmeraj naraščal, vendar veliko počasneje. Na začetku, ko je koncentracija valprojske kisline velika, reakcija poteka zelo hitro. S časom se koncentracija valprojske kisline zmanjšuje in posledično se upočasnjuje tudi hitrost reakcije.

Za reakcijski čas smo izbrali 120 minut, saj je med 60-o in 120-o minuto nastalo največ produkta (10 %). V tej točki je zreagiralo 61% valprojske kisline.

Če bi želeli večji izkoristek valprojske kisline, bi lahko reakcijo spremljali še dlje kot samo 2 uri. Vendar bi bilo to z vidika izvedbe manj ugodno.

4.2.3 Rezultati testiranja vpliva T na nastanek produkta (nebiološka reakcijska mešanica)



Slika 7: Vpliv temperature na nastanek SP-77B-1.

Graf na **Sliki 7** nam prikazuje površino pod krivuljo nastalega produkta (SP-77B-1), ki je dosegel svoj plato pri temperaturi 60 °C. Vpliv temperature na derivatizacijo smo določali pri isti koncentraciji VPA (100 µg/ml) in istem molarnem razmerju kot dinamiko nastanka SP-77B-1 (SP-7B-1 : VPA : K₂CO₃ : 18-Crown-6 = 10:1:2:2). Medtem ko smo standardne raztopine reagentov pripravili sveže. Ker so se zatehte reagentov in končni volumen reakcijskih zmesi (500 µl) razlikovali od tistih pri testiranju dinamike, smo dodali naslednje količine reagentov: 43,7 µl 16,1 mM K₂CO₃, 42,1 µL 16,2 mM raztopine 18-Crown-6 in 379 µl 9,2 mM raztopine kumarina SP-7B-1 ter dopolnili z acetonitrilom do 500 µl.

4.2.4 Rezultati testiranja vpliva razmerja reagentov na nastanek produkta (plazemska reakcijska mešanica)

PROTOKOL priprave plazemskih vzorcev brez uporabe IS:

Slepa plazma: 90 µl plazme + 10 µl topila Na-valproata

Vzorci z Na-valproatom: 90 µl plazme + 10 µl stand. razt. Na-valproata

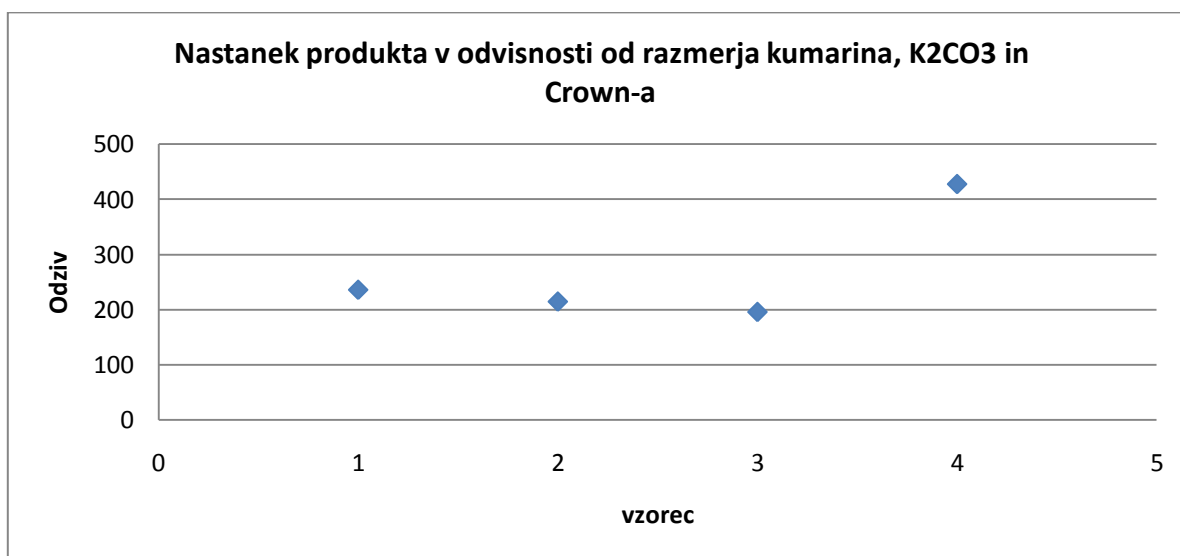
Biološkimi vzorcem smo dodali 400 µl etil acetata in 200 µl 0,12 M HCl.

Vzorci smo 5 min vorteksirali in 1,5 min centrifugirali na 13.000 obr/min pri sobni temperaturi. Odvzeli smo 200 µl organske faze (etil acetat), dodali ostale reagente in inkubirali 2 uri pri 60°C. Nadaljevanje po protokolu priprave plazemskih vzorcev pod točko 3.2.2.

vzorec	odziv	razmerje
VZ1	235,8	10:1:15:15
VZ2	214,4	15:1:20:20
VZ3	195,6	15:1:30:30
VZ4	427,6	30:1:35:35

Preglednica IX: Površine vrhov nastalega produkta kot posledica različnih razmerij reagentov.

Razmerje: SP-7B-1 : VPA : K₂CO₃ : 18-Crown-6.



Slika 8: Vpliv različnih razmerij reagentov na nastanek produkta.

Po številnih testiranjih različnih razmerij reagentov, smo na koncu izbrali 4 primere, v katerih so bili odzivi nastalega produkta SP-77B-1 najvišji. Po zadnjem testiranju je najvišjo površino produkta doseglo množinsko razmerje **30:1:35:35** (kumarin : VPA : K₂CO₃ : 18-Crown-6).

4.2.5 Izbira internega standarda

PROTOKOL priprave plazemskih vzorcev z uporabo internega standarda (IS):

Slepa plazma: 180 µl plazme + 10 µl topila IS + 10 µl topila Na-valproata

Vzorci z IS: 180 µl plazme + 10 µl IS + 10 µl topila Na-valproata

Vzorci z IS + Na-valproat: 180 µl plazme + 10 µl IS + 10 µl stand. razt. Na-valproata

Pripravljenim biološkim vzorcem smo odvzeli 100 µl ter nadaljevali z ekstrakcijo. Biološkim vzorcem smo nato dodali 400 µl etil acetata in 200 µl 0,12 M HCl.

Vzorci smo 5 min vorteksirali in 1,5 min centrifugirali na 13.000 obr/min pri sobni temperaturi. Odvzeli smo 200 µl organske faze (etil acetat), dodali ostale reagente in inkubirali 2 uri pri 60°C. Nadaljevanje po protokolu priprave plazemskih vzorcev pod točko 3.2.2.

Za uporabo IS smo primerjali heptanojsko (IS1) in oktanojsko kislino (IS2).

Preglednica X: Primerjava retencijskih časov IS (heptanojske in oktanojske kisline) z retencijskimi časi SP-77B-1 v plazmi.

Interni standard	tr (min)	tr SP-77B-1 (min)
IS1	13.504	20.799
IS2	19.329	20.786

Kromatografski pogoji: MF A:B = **40:60**; $\lambda = 420$ nm, kolona: 5µ, C18, 150 x 4,6 mm, Gemini, volumen injiciranja: 5 µl, pretok: 1,2 ml/min, čas analize: 25 min).

Prvi kriterij, po katerem smo izbirali IS, je bil retencijski čas. V tem primeru je bila heptanojska kislina v veliki prednosti, saj je bila od produkta oddaljena približno 7 min. Drugi kriterij je bila resolucija vrhov IS s sosednjimi vrhovi, ki bi lahko motili njihovo določitev. Vrednost resolucije je bila v primeru heptanojske kisline boljša, zato smo le to izbrali za IS.

Preglednica XI: Izračun resolucije za IS1 in IS2.

	tr	w	R
IS1	13,504	0,2661	1,8
	12,978	0,3159	
IS2	19,329	0,3214	1,7
	18,655	0,4613	

$$R = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{(w_2 + w_1)} \quad (1)$$

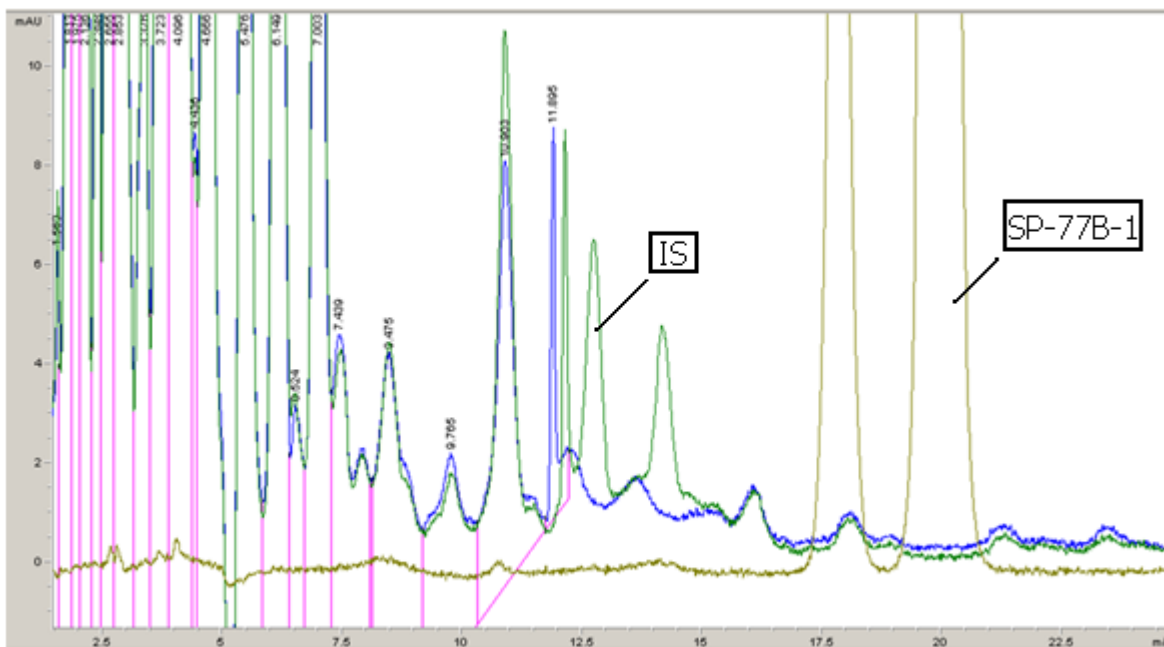
4.2.6 Optimizacija metode

Z namenom, da skrajšamo analitski čas metode smo testirali spremembo pretoka in delež acetonitrila (B) v MF.

Na koncu smo izbirali med tremi metodami, ki so imele skupen pretok (1,5 ml/min) in so se razlikovale v deležu acetonitrila v MF ter analitskem času.

Preglednica XII: Legenda barvnih vrhov na kromatogramu.

Slepa plazma
IS
Stand. produkta (SP-77B-1)



Slika 9: Kromatogrami slepe plazme, IS in stand. produkta (SP-77B-1) pri sestavi MF A:B = 42:58 (V/V), izokratska ločba (kromatografski pogoji: $\lambda = 420$ nm, kolona: 5 μ , C18, 150 x 4,6 mm, Gemini, volumen injiciranja: 20 μ l, pretok: 1,5 ml/min, čas analize: 27 min).

Preglednica XIII: retencijski časi IS in raztopine stand. produkta (SP-77B-1) v plazemski reakcijski zmesi pri različnem deležu acetonitrila (B).

Sestava MF	Retencijski čas (min)	
	IS	Stand. produkta (SP-77B-1)
A:B = 42:58	12,741	19,947
A:B = 35:65	6,972	10,282
A:B = 30:70	4,831	6,824

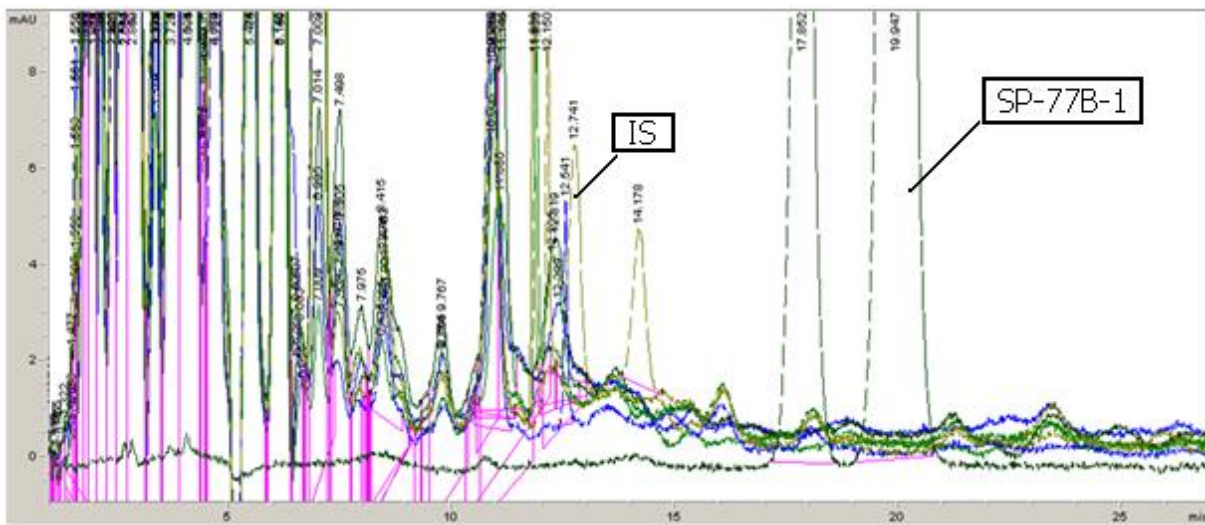
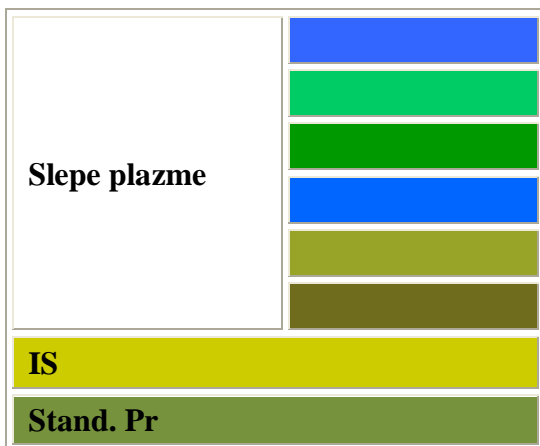
Na vseh treh kromatogramih (**Slika 9-11**) vidimo, da so se vrhovi IS in standarda produkta vidno ločili od vrhov v slepi plazmi. Hkrati lahko opazimo, da imata tako IS kot standard produkta prisotna dodatna vrhova, kar pomeni, da nastajata stranska produkta. S povečanjem deleža acetonitrila v MF smo povzročili krajšo elucijo vseh vrhov, med drugim tudi našega produkta (SP-77B-1). Za nas sta bili pomembnejši metodi s 65 % in 70 % deležem acetonitrila, saj smo želeli skrajšati analitski čas metode.

Na obeh kromatogramih (**Slika 10-11**) smo pod vrhom IS in vrhom SP-77B-1 še vedno opazili elucijo primesi iz slepe plazme. Vendar smo pri prvem kromatogramu (**Slika 10**) zasledili večjo interferenco dodatne koelucije iz slepe plazme pod vrhom IS, pri drugem kromatogramu (**Slika 11**) pa pod vrhom SP-77B-1. Glede na to, da sta to bili še zadnji optimalni metodi, smo izbrali metodo s 65 % deležem acetonitrila v MF. Pri tej je bila koelucija iz slepe plazme pod vrhom SP-77B-1 rahlo zamaknjena in 2-krat manjša v primerjavi z isto na **Sliki 11**.

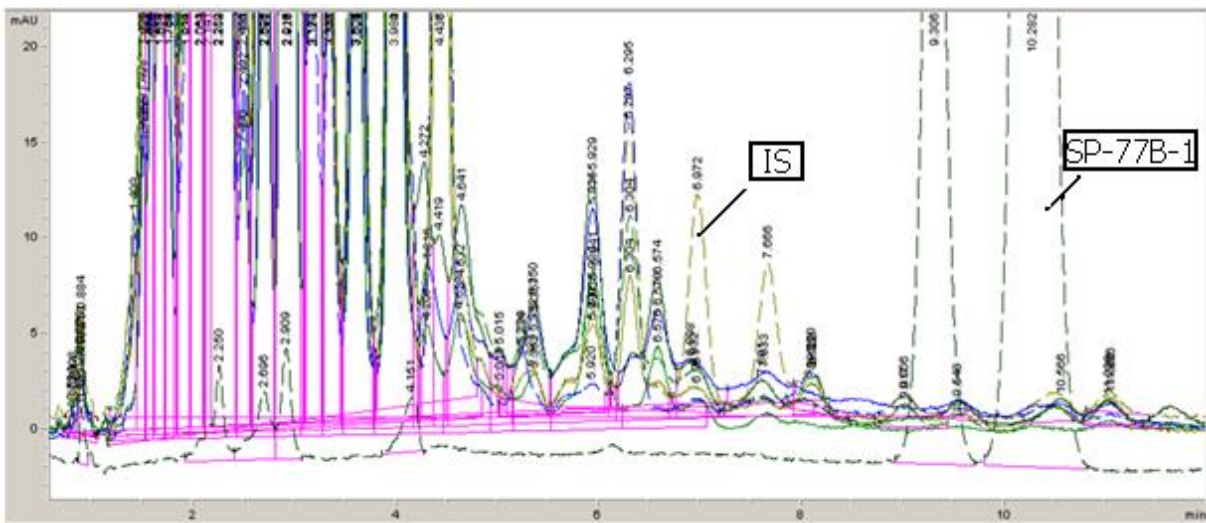
4.2.7 Selektivnost

Kromatograma IS in standarda produkta smo primerjali s šestimi različnimi plazmami (1878738, 1866003, 2237102, 2164544, 2205271 in 2164559) pri treh različnih metodah (glej Preglednico V).

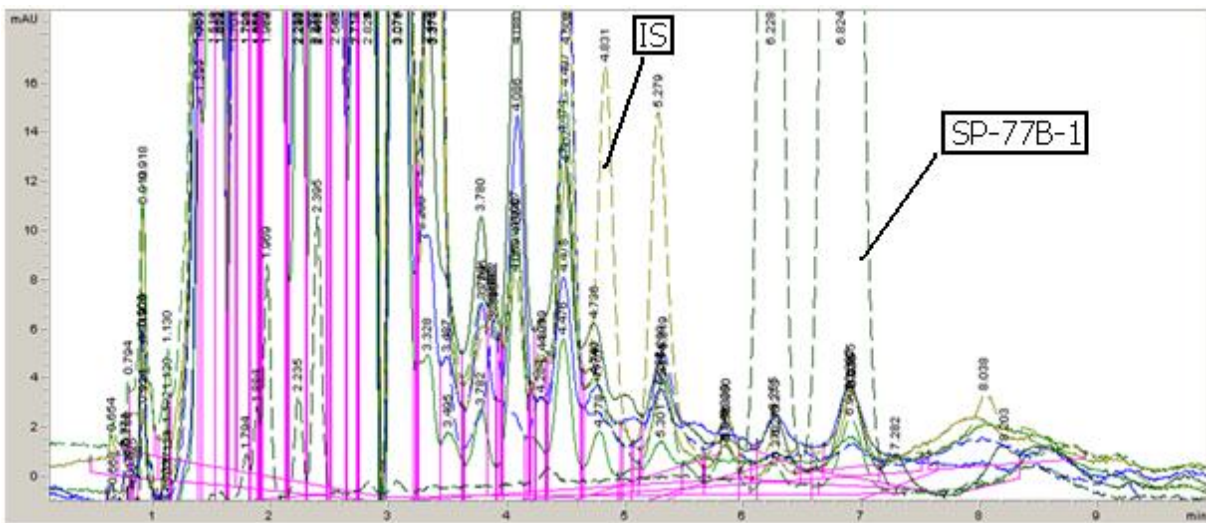
Preglednica XIV: Legenda barvnih vrhov IS in stand. Pr (SP-77B-1) na kromatogramu.



Slika 12: Kromatogrami 6 različnih slepih plazem, IS in stand. produkta (SP-77B-1) pri sestavi MF A:B = **42:58** (V/V), izokratska ločba (kromatografski pogoji: $\lambda = 420$ nm, kolona: 5μ , C18, $150 \times 4,6$ mm, Gemini, volumen injiciranja: 20μ l, pretok: $1,5$ ml/min, čas analize: 27 min). Za tr IS in SP-77B-1 glej Preglednico XIII.



Slika 13: Kromatogrami 6 različnih slepih plazem, IS in stand. produkta (SP-77B-1) pri sestavi MF A:B = **35:65** (V/V), izokratska ločba (kromatografski pogoji: $\lambda = 420$ nm, kolona: 5μ , C18, $150 \times 4,6$ mm, Gemini, volumen injiciranja: $20 \mu\text{l}$, pretok: $1,5$ ml/min, čas analize: 12 min). Za tr IS in SP-77B-1 glej Preglednico XIII.



Slika 14: Kromatogrami 6 različnih slepih plazem, IS in stand. produkta (SP-77B-1) pri sestavi MF A:B = **30:70** (V/V), izokratska ločba (kromatografski pogoji: $\lambda = 420$ nm, kolona: 5μ , C18, $150 \times 4,6$ mm, Gemini, volumen injiciranja: $20 \mu\text{l}$, pretok: $1,5$ ml/min, čas analize: 10 min). Za tr IS in SP-77B-1 glej Preglednico XIII.

Selektivnost je sposobnost analitske metode, da analit loči in ga hkrati določi v prisotnosti ostalih komponent v vzorcu. Med optimizacijo metode smo tudi selektivnost ločbe preverili s tremi različnimi metodami (glej **Preglednico V**). Kromatogram raztopine stand. produkta in IS smo primerjali s šestimi različnimi slepimi plazmami. V primeru 65 in 70 % deleža acetonitrila v mobilni fazi smo analitski čas, v primerjavi s prvo metodo (58 % acetonitrila, 27 min), skrajšali na 12 oz. 10 minut. Pri vseh treh metodah (**Slika 12-14**) so bili vrhovi IS in vrhovi SP-77B-1 dobro vidni v primerjavi s slepimi plazmami. Kljub uporabi dodatnih slepih vzorcev plazem se rezultati manjših koelucij pod vrhovi IS in SP-77B-1 niso razlikovali od tistih na **Sliki 9-11**.

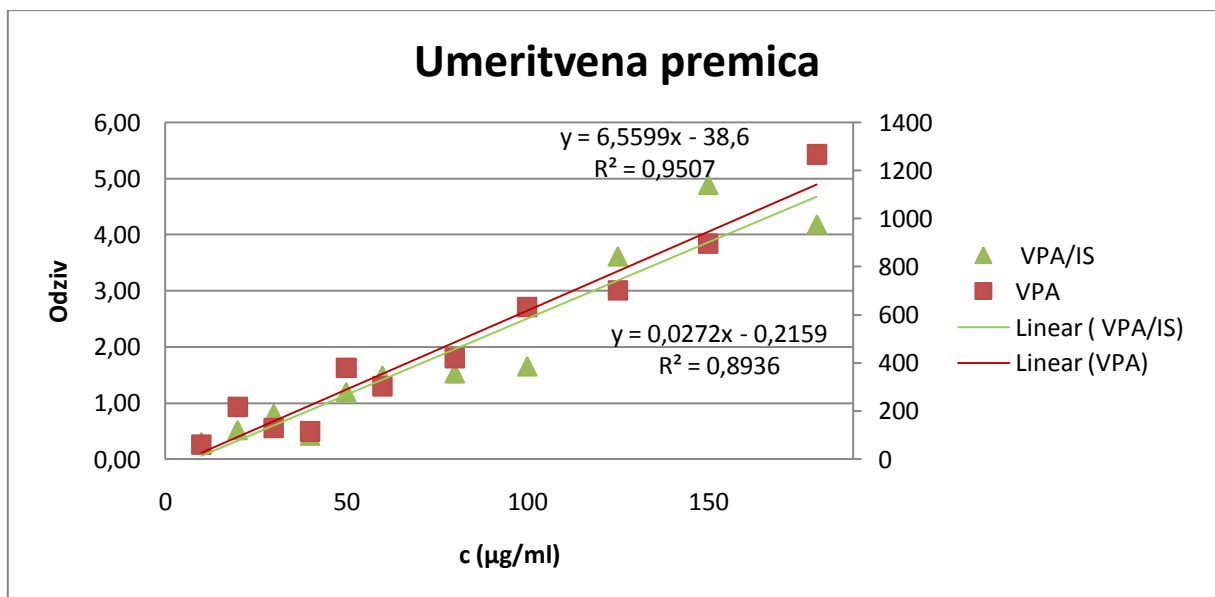
Glede na položaj lis slepih plazemskih vzorcev v primerjavi z IS in SP-77B-1 smo za nadaljnje analize izbrali metodo s 65 % deležem acetonitrila v MF.

4.2.8 Umeritvena premica

Priprava plazemskih vzorcev je potekala po protokolu pod točko 3.2.2 (Priprava plazemskih vzorcev).

Preglednica XV: Površine vrhov IS in nastalega produkta v plazemskih reakcijskih mešanicah pri koncentracijah 10 – 180 µg/ml VPA (uporaba Na-valproata).

c (µg/ml)	Odziv		
	IS	VPA	VPA/IS
10	194,9	59,5	0,31
20	420,8	218,1	0,52
30	160,4	129,7	0,81
40	273,7	114,9	0,42
50	317,5	379,7	1,20
60	202,7	301,8	1,49
80	274,3	419,3	1,53
100	381,9	631,4	1,65
125	194,2	701,3	3,61
150	183,5	896,4	4,89
180	302,9	1266,4	4,18

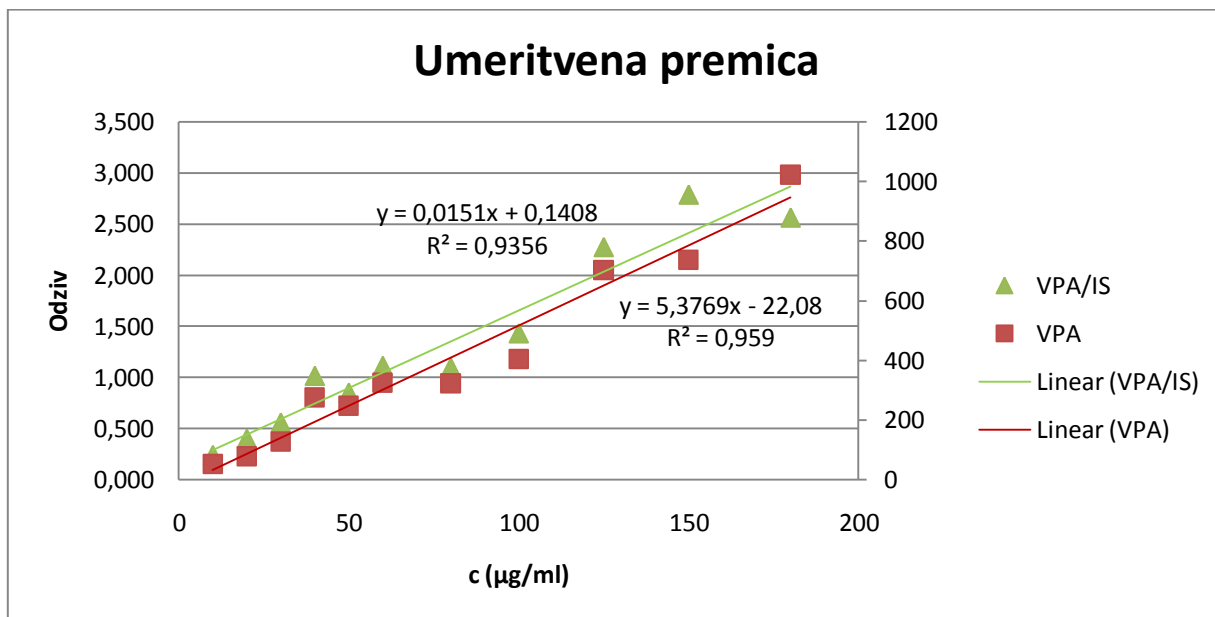


Slika 15: Umeritvena premica plazemskih vzorcev za Na-valproat ($c_{VPA} = 10 - 180 \mu\text{g/ml}$).

Glede na to, da nam rezultati plazemskih vzorcev niso zagotovili pričakovane linearnosti, smo naredili korak nazaj in jo preizkusili še v **nebiološki reakcijski mešanici**: pripravili smo vzorce z **Na-valproatom** (priprava vzorcev in ekstrakcija po protokolu pod točko 3.2.2, namesto plazme smo uporabili milli-Q vodo) in posebej vzorce z **VPA** (standardno raztopino VPA smo dodali direktno v 200 µl organske faze in izvedli derivatizacijo).

c (µg/ml)	Odziv		
	IS	VPA	VPA/IS
10	219,1	52,9	0,241
20	198,6	79,6	0,401
30	229,2	128,1	0,559
40	272	276,5	1,017
50	290,8	247,8	0,852
60	292,3	325,6	1,114
80	294,8	323,9	1,099
100	282,4	404,5	1,432
125	308,6	702,6	2,277
150	264,2	737,2	2,790
180	398,3	1021,9	2,566

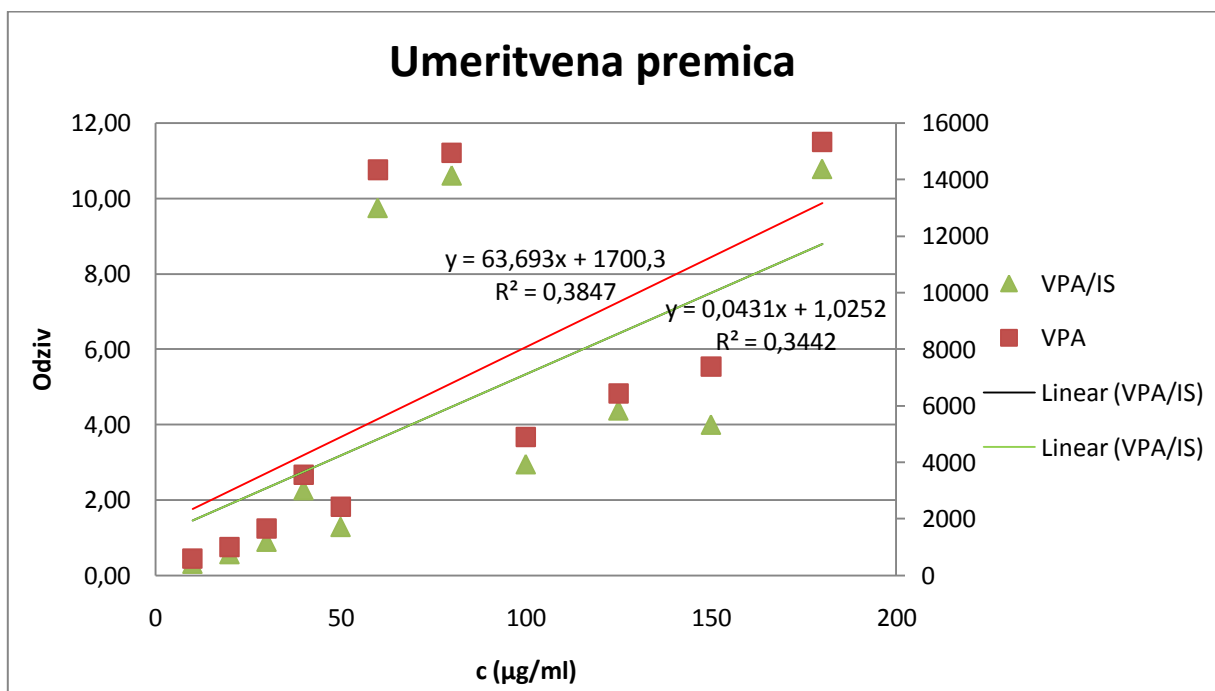
Preglednica XVI: Površine vrhov IS in nastalega produkta v *nebiološki reakcijski mešanici* za Na-valproat ($c_{VPA} = 10 - 180$ µg/ml).



Slika 16: Umeritvena premica nebiološke reakcijske mešanice za Na-valproat ($c_{VPA} = 10 - 180$ µg/ml).

Preglednica XVII: Površine vrhov IS in nastalega produkta v *nebiološki reakcijski mešanici* pri koncentracijah 10 – 180 µg/ml VPA.

c (µg/ml)	Odziv		
	IS	VPA	VPA/IS
10	1906,7	580,9	0,30
20	1778,7	994,7	0,56
30	1855,7	1648,2	0,89
40	1579,9	3562,7	2,26
50	1897,6	2431,3	1,28
60	1472	14345,6	9,75
80	1408,8	14943,4	10,61
100	1658,6	4884,7	2,95
125	1470,2	6428,1	4,37
150	1846,5	7376,1	3,99
180	1421,8	15327,8	10,78



Slika 17: Umeritvena premica nebiološke reakcijske mešanice za VPA (c = 10 – 180 µg/ml).

Slike 15- 17 prikazujejo umeritvene premice za razmerje odziva VPA (Na-valproat)/IS in AUC VPA (Na-valproat) za koncentracije v območju 10 – 180 µg/ml.

S testiranjem linearnosti v nebiološki reakcijski mešanici smo želeli preveriti ali je nelinearnost metode posledica plazemske nečistote ali je reakcija že sama po sebi nelinearna.

Iz primerjave **Slik 15-17** smo ugotovili, da so t.i. ubežniki linearne premice zmeraj druge koncentracije VPA. Kar pomeni, da reakcijo z izbranim derivatizacijskim reagentom (SP-7B-1) težko nadzorujemo. Posledica je neponovljivost reakcije.

Ne glede na to ali smo uporabili Na-valproat (izvedli ekstrakcijo po protokolu priprave vzorcev z uporabo IS) ali VPA (direkten dodatek v organsko fazo, posledično na voljo vsa VPA), je bila metoda v nebiološkem sistemu nelinearna.

Analizna metoda določanja VPA preko derivatizacije s fluorescenčnim reagentom 3-(2-bromo acetil)-7-(dietilamino)kumarinom, se je izkazala za nelinearno in neponovljivo.

Prva težava, s katero smo se na začetku soočali, je bila topnost kumarina. V acetonitrilu se je kumarin zelo slabo topil. Najverjetneje sta tako slaba topnost kot hitrost raztapljanja, tudi v organskih topilih, posledica zelo stabilne kristalne rešetke, ki jo tvori kumarin.

Za izvedbo testiranj v nebiološkem sistemu smo kumarin poskušali raztopiti s pomočjo ultrazvočne kadičke in dodatne toplotne obdelave za 10 min pri 50 °C. Med uporabo plazemskih vzorcev pa smo ga raztapljali v diklorometanu, kjer je bila njegova topnost veliko boljša. Pri tem smo derivatizacijo izvajali v organskem topilu (etil acetatu). Pred injiciranjem vzorca v HPLC sistem smo reakcijski zmesi uparili topila (etil acetat, diklorometan), saj lahko ta poškodujejo kolono. Posušen ostanek smo raztopili v acetonitrilu in izvedli analizo.

Za izbran kumarin smo derivatizacijo izvajali 2 uri pri 60 °C. Med testiranjem vzorcev nebiološkega sistema smo s predhodno temperaturno obdelavo (10 min pri 50 °C) kumarina pospešili raztapljanje in hkrati razpadanje občutljivega reagenta. Slednje se je kazalo v pojavu dodatnih vrhov na kromatogramu. Sicer je znano, da analogi kumarina prenesejo temperaturne obremenitve vse do 80 °C, vendar pri krajših reakcijskih časih kot smo ga določili v našem primeru (15, 34). Dodatni vrhovi na kromatogramu so se pojavili tudi zaradi nečistosti reagenta. Prisotnost reaktivnih nečistot je povzročila nastanek stranskih produktov, ki so motili detekcijo našega produkta.

Produkt reakcije med VPA in derivatizacijskim reagentom je ester, ti pa so v primerjavi z amidi precej manj stabilni. Poleg tega je, zaradi elektron privlačnih funkcionalnih skupin, ester še dodatno destabiliziran – gre pravzaprav za aktiviran ester, ki še hitreje vstopa v reakcije hidrolize, preestrenja, aminolize itd.

Omenjene stranske reakcije so verjetno potekale med samo derivatizacijo, lahko pa tudi med ločbo na koloni; mobilna faza vsebuje vodo, kar omogoča hidrolizo, in očetno kislino, ki lahko vstopa v reakcijo preestrenja.

Glede na literaturne podatke, najpogosteje tvorijo estre z valprojsko kislino preko reaktivne bromometilne ali klorometilne funkcionalne skupine na mestu 4 kumarina. V kolikor je mogoče sklepati iz količine literature, ki opisuje tovrstno reakcijo, so verjetno estri, ki nastanejo po reakciji z opisanimi derivati, bolj stabilni in reakcije bolj ponovljive. Zato bi bilo

v prihodnje smiselno razmišljati o derivatizacijskih reagentih s podobnimi lastnostmi (16, 17, 19, 20).

Negativna lastnost našega produkta je tudi odsotnost kisljih ali bazičnih centrov pri produktu, dietilamino skupina na kumarinu je zelo šibko bazična in zanemarljivo protonirana v območju pH-jev, ki so še sprejemljivi za HPLC sistem. Prisotnost takšnih skupin bi zagotovo povečala topnost v vodi, zmanjšala retencijske čase, ki so bili v našem primeru relativno visoki in omogočila več možnosti pri izbiri pH mobilne faze in nabora pufrov z namenom izboljšanja ločbe.

5 SKLEPI

V diplomski nalogi smo poskušali razviti hitro in učinkovito HPLC-FLD metodo s predhodno derivatizacijo za določanje VPA v človeški plazmi. Derivatizacijski reagent 3-(2-bromo acetil)-7-(dietilamino)kumarin, ki smo ga uporabili, nam je povzročal veliko težav. Kljub nekaterim derivatizacijskim parametrom (reakcijski čas in T, množinsko razmerje reagentov) in kromatografskim pogojem (sestava mobilna faze, pretok, T kolone, analitski čas), ki smo jih določili, se je metoda izkazala za nelinearno in neponovljivo.

Medtem ko reagent, ki smo ga uporabljali med testiranjem, določena literatura navaja kot derivatizacijski reagent za maščobne kisline, se v primeru derivatizacije VPA ni izkazal za optimalno izbiro. Pri nadaljnjem razvoju metod določanja VPA v plazmi s kumarinskimi analogi, bi bilo potrebno uporabiti reagent, ki je bolj polaren, stabilen in čist, vsebuje bromometilno (ali kakšno drugo elektron donorsko) skupino na mestu 4 ter z VPA tvori stabilnejši produkt.

6 LITERATURA

1. Chandran K. B., Yoganathan A. P., Rittgers S. E.: Biofluid Mechanics: The Human Circulation. Boca Raton, FL, United States of America, CRS Taylor & Francis Group, 2007: 123.
2. Hillyer C. D., Hillyer K. L., Strobl F. J., Jefferies L. C., Silberstein L. E.: Handbook of Transfusion Medicine. San Diego, California, USA, Academic Press, 2001: 39-40.
3. Panayiotopoulos C. P., Benbadis S. R., Beran R. G., Berg A. T., Engel Jr. J., Galanopoulou A. S., Kaplan P. W., Koutroumanidis M., Moshe S. L., Nordli Jr. D. R., Serratos J. M., Sisodiya S. M., Tatum IV W. O., Valeta T., Wilner A. N.: Atlas of Epilepsies. London, United Kingdom, Springer-Verlag; 2010: 1861, 1864.
4. http://www.medmerits.com/index.php/article/valproic_acid, Historical note and nomenclature; 5.5.2014
5. Wyllie E., Gupta A., Lachhwani D. K.: The Treatment of Epilepsy: Principles & Practice, Fourth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2006: 775, 779.
6. Aschenbrenner D. S., Venable S. J.: Drug therapy in nursing, Third Edition. Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009: 341.
7. Wheless J. W., Willmore L. J., Brumback R. A.: Advanced Therapy in Epilepsy. People's Medical Publishing House, Shelton, USA, 2009: 343 - 344, 346 -347.
8. Panayiotopoulos C. P.: A Clinical Guide to Epileptic Syndromes and their Treatment, Second Edition. Based on the ILAE classifications and practice parameter guidelines. Springer Healthcare Ltd, United Kingdom, 2010: 606, 608.
9. Browne T. R., Holmes G. L.: Handbook of Epilepsy, Fourth Edition. Lippincott Williams & Wilkins-a Wolters Kluwer business, Philadelphia, USA, 2008: 216-217.
10. Wallace S. J., Farrell K.: Epilepsy in children. Second edition, Taylor & Francis Group, LLC, United States of America, 2004: 390.
11. Mutschler E., Derendorf H., Schäfer-Korting M., Elrod K., Estes K. S.: Drug Actions: Basic Principles And Therapeutic Aspects. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1995: 44.
12. Patsalos P. N., Berry D. J., Bourgeois B. F. D., Cloyd J. C., Glauser T. A., Johannessen S.I., Leppik I. E., Tomson T., Perucca E.: Antiepileptic drugs – best practice guidelines

- for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies, *Epilepsia*, 2008; 49: 1239-76.
13. Schachter S. C.: Evidence-based Management of Epilepsy. Tfm Publishing Limited, Castle Hill Barns, Harley, Nr Shrewsbury, UK, 2011: 12.
 14. Kang J., Park Y. S., Kim S. H., Kim S. H., Jun M. Y.: Modern Methods for Analysis of Antiepileptic Drugs in the Biological Fluids for Pharmacokinetics, Bioequivalence and Therapeutic Drug Monitoring. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, Apr 2011; 15: 67-81.
 15. Mukherjee P. S., Karnes H. T.: Ultraviolet and Fluorescence Derivatization Reagents for Carboxylic Acids Suitable for High Performance Liquid Chromatography: a Review. *Biomedical Chromatography*, 1996; 10: 193-204.
 16. Toyo'oka T.: Fluorescent tagging of physiologically important carboxylic acids, including fatty acids, for their detection in liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 2002; 465: 111-130.
 17. Lima E. S., Abdalla D. S. P.: High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 2002; 465: 81-91.
 18. Toyo'oka T: Use of derivatization to improve the chromatographic properties and detection selectivity of physiologically important carboxylic acids. *Journal of Chromatography B*, 1995; 671: 91-112.
 19. Wolf J. H., Korf J.: 4-bromomethyl-7-metoxycoumarin and analogues as derivatization agents for high-performance liquid chromatography determinations: a review. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 1992, vol. 10, No. 2/3: 99-107.
 20. Chen S. H., Chuang Y. J.: Analysis of fatty acids by column liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 2002; 465: 145-155.

21. Rompotis S., Parissi-Poulou M., Gikas E., Kazanis M., Vavayannis A., Panderi I.: Determination of valproic acid in human plasma by HPLC with fluorescence detection. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 2002; vol. 25, No. 18: 2833-2847.
22. Lin M. C., Kou H. S., Chen C. C., Wu S. M., Wu H. L.: Simple and sensitive fluorimetric liquid chromatography method for the determination of valproic acid in plasma. *Journal of Chromatography B*, 2004; 810: 169-172.
23. Zhong Y., Jiao Z., Yu Y.: Simultaneous determination of mycophenolic acid and valproic acid based on derivatization by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomedical chromatography*, 2006; 20: 319-326.
24. Amini H., Javan M., Ahmadiani A.: Development and validation of a sensitive assay of valproic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography without prior derivatization. *Journal of Chromatography B*, 2006; 830: 368-371.
25. Jain D. S., Subbaiah G., Sanyal M., Shrivastav P.: A high throughput and selective method for the estimation of valproic acid an antiepileptic drug in human plasma by tandem LC-MS/MS. *Talanta*, 2007; 72: 80-88.
26. Reddy A. V. B., Venugopal N., Madhavi G.: Simultaneous determination of asenapine and valproic acid in human plasma using LC-MS/MS: Application of the method to support pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2013.04.008>
27. Gao S., Miao H., Tao X., Jiang B., Xiao Y., Cai F., Yun Y., Li J., Chen W.: LC-MS/MS method for simultaneous determination of valproic acid and major metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 2001; 879: 1939-1944.
28. Matsuura K., Ohmori T., Nakamura M., Itoh Y., Hirano K.: A simple and rapid determination of valproic acid in human plasma using a non-porous silica column and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Biomedical Chromatography*, 2008; 22: 387-393.

29. Shibata M., Hashi S., Nakanishi H., Masuda S., Katsura T., Yano I.: Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. *Biomedical Chromatography*, 2012; 26: 1519-1528.
30. Ramakrishna N. V. S., Vishwottam K. N., Manoj S., Koteswara M., Santosh M., Chidambara J., Ravi Kumar B.: Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification of valproic acid in human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005; 19: 1970-1978.
31. Kim K. B., Seo K. A., Kim S. E., Bae S. K., Kim D. H., Shin J. G.: Simple and accurate quantitative analysis of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011; 56: 771-777.
32. Kishore P., Rajani Kumar V., Satyanarayana V., Krishna D. R.: HPLC determination of valproic acid in human serum. *Pharmazie*, 2003; 58: 378-380.
33. Shahdousti P., Mohammadi A., Alizadeh N.: Determination of valproic acid in human serum and pharmaceutical preparations by headspace liquid-phase microextraction gas chromatography-flame ionization detection without prior derivatization. *Journal of Chromatography B*, 2007; 850: 128-133.
34. Mohammadi B., Majnooni M. B., Khatabi P. M., Jalili R., Bahrami G.: 9-Fluorenylmethyl chloroformate as a fluorescence-labeling reagent for derivatization of carboxylic acid moiety of sodium valproate using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for binding characterization: A human pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 2012; 880:12-18.
35. Salomone A., Di Corcia D., Gerace E., Vincenti M.: A Fatal Case of Simultaneous Ingestion of Mirtazapine , Escitalopram, and Valproic Acid. *Journal of Analytical Toxicology*, 2011; 35: 519-523.

36. Proença P., Franco J. M., Mustra C., Marcos M., Pereira A. R., Corte-Real F., Vieira D. N.: An UPLC-MS/MS method for the determination of valproic acid in blood of a fatal intoxication case. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 2011; 18: 320-324.
37. Joo K. M., Choi D., Park Y. H., Yi C. G., Jeong H. J., Cho J. C., Lim K. M.: A rapid and highly sensitive UPLC-MS/MS method using pre-column derivatization with 2-picolylamine for intravenous and percutaneous pharmacokinetics of valproic acid in rats. *Journal of Chromatography B*, 2013; 938: 35-42.
38. Pucci V., Monteagudo E., Bonelli F.: High sensitivity determination of valproic acid in mouse plasma using semi-automated sample preparation and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005; 19: 3713-3718.
39. Nakajima M., Yamato S., Shimada K., Sato S., Kitagawa S., Honda A., Miyamoto J., Shoda J., Ohya M., Miyazaki H.: Assessment of Drug Concentrations in Tears in Therapeutic Drug Monitoring: I. Determination of Valproic Acid in Tears by Gas Chromatography/Mass Spectrometry With EC/NCI Mode. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2000; 22 (6): 716-722.
40. Deng C., Li N., Ji J., Yang B., Duan G., Zhang X.: Development of water-phase derivatization followed by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry for fast determination of valproic acid in human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006; 20 (8): 1281-1287.