

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJ ŠTURM

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



ANDREJ ŠTURM

**RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE ZA
KVANTIFIKACIJO LEVETIRACETAMA V PLAZMI S
TEKOČINSKO KROMATOGRFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL
METHOD FOR QUANTIFICATION OF LEVETIRACETAM
IN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

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

Zahvala

Za mentorstvo in strokovno pomoč se zahvaljujem doc. dr. Tomažu Vovku. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Robertu Roškarju za vse strokovne nasvete in vsem sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi s svojimi nasveti pomagali pri izdelavi magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka.

Andrej Šturm

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Odon Planinšek

Članica magistrske komisije: doc. dr. Lucija Peterlin Mašič

Ljubljana, 2012

VSEBINA

POVZETEK	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD	1
1.1 EPILEPSIJA	1
1.1.1 Klasifikacija in klinična slika epileptičnih napadov	1
1.1.2 Patofiziologija epileptičnih napadov	3
1.1.3 Zdravljenje epilepsije	4
1.2 PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA	5
1.2.1 Željene lastnosti protiepileptičnega zdravila	5
1.2.2 Osnovna farmakologija protiepileptičnih zdravil	5
1.3 LEVETIRACETAM	7
1.3.1 Terapevtske indikacije	7
1.3.2 Mehanizem delovanja	8
1.3.3 Farmakokinetične lastnosti	8
1.4 TERAPEVTSKO SPREMLJANJE KONCENTRACIJE ZDRAVIL	10
1.4.1 Odvisnost učinka zdravila od odmerka	10
1.4.2 Terapevtsko spremljanje koncentracije protiepileptičnih učinkovin	11
1.5 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI	11
1.5.1 Reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti	14
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 Biološki material	17
3.1.2 Standardi	17
3.1.3 Interni standardi	17
3.1.4 Reagenti in topila	17
3.1.5 Naprave in pribor	18
3.2 METODE	19
3.2.1 Priprava mobilne faze	19
3.2.2 Hranjenje stacionarne faze	19
3.2.3 Priprava vzorcev za razvoj RP-HPLC metode za analitiko levetiracetama	20
3.2.4 Priprava vodnih in bioloških vzorcev	20
3.2.5 Razvoj metode za pripravo plazemskih vzorcev za analizo s HPLC	20
3.2.6 Kromatografski pogoji	22
3.3 VALIDACIJA	22

3.3.1	<i>Selektivnost</i>	22
3.3.2	<i>Linearnost</i>	22
3.3.3	<i>Točnost</i>	23
3.3.4	<i>Ponovljivost</i>	23
3.3.5	<i>Območje linearnosti</i>	23
3.3.6	<i>Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ)</i>	23
3.3.7	<i>Priprava plazemskih vzorcev za validacijo</i>	24
3.3.8	<i>Obdelava podatkov</i>	25
4	REZULTATI	26
4.1	PRIPRAVA VZORCEV Z OBARJANJEM PLAZEMSKIH PROTEINOV	26
4.1.1	<i>Prvi postopek priprave plazemskega vzorca</i>	26
4.1.2	<i>Drugi postopek priprave plazemskega vzorca</i>	26
4.2	IZBIRA INTERNEGA STANDARDA	26
4.3	KROMATOGRAFIJA	28
4.3.1	<i>Izbira kolone</i>	28
4.3.2	<i>Temperatura kolone</i>	28
4.3.3	<i>Optimalna mobilna faza</i>	28
4.3.4	<i>Kromatografska ločba</i>	28
4.4	VALIDACIJA	29
4.4.1	<i>Selektivnost</i>	29
4.4.2	<i>Linearnost</i>	30
4.4.3	<i>Točnost</i>	32
4.4.4	<i>Ponovljivost metode</i>	33
4.4.5	<i>Območje linearnosti</i>	35
4.4.6	<i>Izkoristek ekstrakcije</i>	35
4.4.7	<i>Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ)</i>	35
4.4.8	<i>Stabilnost plazemskih vzorcev po zamrzovanju in odtaljevanju</i>	35
4.4.9	<i>Stabilnost osnovnih raztopin</i>	36
4.4.10	<i>Post-preparativna stabilnost</i>	37
5	RAZPRAVA	39
5.1	IZBIRA INTERNEGA STANDARDA	39
5.2	PRIPRAVA VZORCEV Z OBARJANJEM PLAZEMSKIH PROTEINOV	39
5.2.1	<i>Prvi postopek priprave plazemskega vzorca</i>	39
5.2.2	<i>Drugi postopek priprave plazemskega vzorca</i>	39
5.3	KROMATOGRAFIJA	40
5.4	VALIDACIJA	40
5.4.1	<i>Selektivnost</i>	40
5.4.2	<i>Linearnost</i>	41
5.4.3	<i>Točnost</i>	41

5.4.4	<i>Ponovljivost</i>	41
5.4.5	<i>Izkoristek ekstrakcije</i>	41
5.4.6	<i>Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ)</i>	41
5.4.7	<i>Stabilnost plazemskih vzorcev po zamrzovanju in odtaljevanju</i>	42
5.4.8	<i>Stabilnost osnovnih raztopin</i>	42
5.4.9	<i>Post-preparativna stabilnost</i>	42
6	SKLEPI	43
7	LITERATURA	44

POVZETEK

V okviru magistrske naloge smo razvili analizno metodo za določanje plazemske koncentracije novejših protiepileptičnih učinkovin, levetiracetama. Večina analiznih metod, ki so podane v literaturi, uporablja interni standard, ki ni komercialno dostopen (UCB 17025). Takšnih metod ni mogoče neposredno uporabljati v praksi. Prednost naše metode je, da za interni standard uporablja komercialno dostopno spojino, adenzin. Pri razvoju metode se je izkazalo, da je uporaba endogene spojine kot internega standarda v analitiki bioloških vzorcev do neke mere problematična. V našem primeru smo se soočili z zelo slabo stabilnostjo adenozina po njegovem dodatku v plazemski vzorec. Težavo smo rešili z ustrezno pripravo plazemskih vzorcev za analizo s tekočinsko kromatografijo. Pred dodatkom adenozina smo k plazemskemu vzorcu dodali ledeno hladen metanol in na ta način denaturirali poleg ostalih plazemskih proteinov tudi encime, ki katalizirajo razgradnjo adenozina. Po dodatku metanola smo denaturirane proteine ločili s centrifugiranjem, da smo dobili supernatant, ki smo ga nato injicirali v kromatografsko kolono. Kromatografska ločba je potekala na koloni Synergi Hydro RP, 250 x 4,6 mm 4 μ m (Phenomenex), ki je bila termostatorirana na 30 °C. Mobilna faza je bila sestavljena iz 92% 50 mM K₂HPO₄ pH 4,5 in 8% acetonitrila, na kolono smo jo črpali izokratsko s pretokom 1,0 mL/min. Pri teh pogojih se je levetiracetam eluiral po času 10,4 min, interni standard pa po času 6,2 min, obe spojini smo detektirali pri 205 nm. Analiza je trajala 12 minut. Metoda ustreza validacijskim kriterijem, ki jih predpisujejo smernice FDA. Metoda je bila linearna v območju od 5,01 do 134 μ g/mL, s spodnjo mejo kvantifikacije 5,01 μ g/mL. Metoda se je izkazala kot točna (vsa odstopanja znotraj 12,8%) in ponovljiva (koeficient variacije je bil znotraj 3,99% pri znotrajdnevni oz. znotraj 4,32% pri meddnevni ponovljivosti). Pripravljeni vzorci so stabilni najmanj 24 ur, če so hranjeni v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C. Glede na to, da znaša predlagana terapevtska koncentracija levetiracetama v plazmi od 12 do 46 μ g/mL, je metoda dovolj občutljiva za terapevtsko spremljanje koncentracije levetiracetama, hkrati pa tudi enostavna in s stališča izvedbe primerna za rutinsko uporabo v praksi.

ABSTRACT

In the thesis we have developed an analytical method for determination of plasma concentration of one of the newer AEDs, levetiracetam. Most of the methods given in literature are using an internal standard, which is not commercially available (UCB 17025). In practice such methods can not be directly applied. The advantage of our method is that the internal standard used is a commercially available compound, adenosine. It has been shown that in a process of method development the use of endogenous compound as the internal standard in analysis of biological samples is quite problematic. In our case we were faced with very poor stability of adenosine after its addition to a plasma sample. The problem with stability of adenosine was solved with a proper preparation of the plasma samples prior to analysis by HPLC. Before the addition of adenosine to the plasma sample ice-cold methanol was added. Methanol denaturated plasma proteins and enzymes that catalyze the breakdown of adenosine. After addition of methanol, denaturated proteins were separated by centrifugation, the supernatant obtained was then injected in the chromatography column. Chromatographic separation was achieved on a Synergi Hydro RP column, 250 x 4.6 mm 4 μ m (Phenomenex), which was thermostated at 30 °C. An isocratic mobile phase was composed of 92% of 50 mM K₂HPO₄ pH 4.5 and 8% acetonitrile. The mobile phase was pumped at a flow rate of 1.0 mL/min. Under these conditions, the retention time of levetiracetam was 10.4 min and of internal standard 6.2 min, both compounds were detected at 205 nm. The analysis lasted 12 minutes. The method meets the criteria defined by FDA guidelines. It is linear over the range from 5.01 to 134 μ g/mL and has lower limit of quantification 5.01 μ g/mL. The method is accurate (all deviations within 12.8%) as well as reproducible (coefficient of variation was within 3.99% in an intra assay and within 4.32% in an inter assay precision, respectively). Prepared samples are stable for at least 24 hours if held in an automatic sampler at 4 °C. Given the fact that the proposed therapeutic concentration interval of levetiracetam in plasma is from 12 to 46 μ g/mL the method is sufficiently sensitive for therapeutic drug monitoring. It is also simple and therefore suitable for routine use.

SEZNAM OKRAJŠAV

AMPA	alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionska kislina
ATC	anatomsko-terapevtsko-kemijska klasifikacija zdravil
ATP	adenozin trifosfat
AUC	površina pod krivuljo (ang. Area Under Curve)
AVG	povprečna vrednost
CRMP-2	kolapsin odzivni mediatorski protein 2 (ang. collapsin response mediator protein-2)
CV	koeficient variacije
EEG	elektroencefalogram
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration)
GABA	γ -aminomaslena kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)
ICH	Mednarodna konferenca o harmonizaciji (ang. International Conference on Harmonization)
IS	interni standard
IUPAC	Mednarodno združenje za čisto in uporabno kemijo (ang. International Union of Pure and Applied Chemistry)
LLOQ	spodnja meja kvantifikacije
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
NMDA	N-metil-D-aspartat
PEZ	protiepileptično zdravilo
r	Pearsonov koeficient
R ²	determinacijski koeficient
RP-HPLC	reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)
SD	standardni odklon
SF	stacionarna faza
SV ₂ A	sinaptični vezikularni protein 2A (ang. synaptic vesicle protein 2A)

TDM	terapevtsko spremljanje koncentracije zdravil (ang. Therapeutic Drug Monitoring)
UV	ultravijolična svetloba
VIS	vidna svetloba
ZU	zdravilna učinkovina

1 UVOD

1.1 Epilepsija

Epilepsija je ena izmed najpogostejših nevroloških bolezni, ki prizadene približno 0,5 do 1% svetovne populacije (1, 2). Mednarodna liga proti epilepsiji (ILAE - International League Against Epilepsy) in Mednarodni urad za epilepsijo (IBE - International Bureau for Epilepsy) sta leta 2005 predlagala definicijo epileptičnega napada ter definicijo epilepsije. Epileptični napad je praviloma kratkotrajen, prehodni znak nenormalnega delovanja možganov, ki običajno spontano preneha. Epilepsija je motnja, za katero je značilna trajna nagnjenost k epileptičnim napadom z vsemi nevrobiološkimi, kognitivnimi in psihosocialnimi posledicami; pri tem je za diagnozo potreben vsaj en epileptični napad (3).

1.1.1 Klasifikacija in klinična slika epileptičnih napadov

Klasifikacija epileptičnih napadov temelji na vedenjskih in elektrofizioloških podatkih ter na času trajanja epileptičnega napada (preglednica I).

Preglednica I: Poenostavljena klasifikacija epileptičnih napadov (prirejeno po 4, 5)

Samo-omejujoči epileptični napadi	
I. Žariščni napadi	A. Enostavni parcialni napadi z motoričnimi, senzoričnimi, psihičnimi ali avtonomnimi simptomi B. Kompleksni parcialni napadi C. Parcialni napadi s sekundarno generalizacijo
II. Generalizirani napadi	A. Tonično-klonični napadi (grand mal) B. Absénce napadi (petit mal) C. Ostali (mioklonični, tonični, klonični, atonični)
Kontinuirani epileptični napadi	
III. Žariščni epileptični status	
IV. Generalizirani epileptični status	A. Generalizirani tonično-klonični epileptični status B. Klonični epileptični status C. Absénce epileptični status D. Tonični epileptični status E. Mioklonični epileptični status
Vzbujeni refleksni epileptični napadi	
V. Vzbujevalci (stimulatorji) epileptičnega napada	A. Vizualni vzbujevalci B. Ostali vzbujevalci (razmišljanje, glasba, hranjenje, vroča voda, ipd.)

Epileptični napadi so v osnovi razdeljeni v tri skupine. V prvo skupino spadajo epileptični napadi, ki spontano prenehajo po nekaj minutah (samo-omejujoči). V drugi skupini so kontinuirani epileptični napadi, ki v približno polovici primerov ne prenehajo spontano v času 10-29 minut, brez medikamentoznega zdravljenja. Tretja skupina zajema vzbujene refleksne epileptične napade, ki jih sproži nek prehodni in sporadični endo- ali eksogeni dejavnik. Znotraj posamezne skupine so epileptični napadi razvrščeni še na več podskupin, glede na specifične lastnosti posameznega epileptičnega napada (4, 6).

1.1.1.1 Samo-omejujoči epileptični napadi

Parcialni epileptični napadi

Parcialne epileptične napade povzročajo lokalne okvare v možganih, zato je pri bolnikih z enostavnimi ali kompleksnimi parcialnimi epileptičnimi napadi smiselno iskati potencialne možganske lezije. Enostavni parcialni epileptični napadi se lahko kažejo z motoričnimi, senzoričnimi, vizualnimi, psihičnimi in/ali avtonomnimi znaki in simptomi, odvisno od lokacije žarišča napada v možganih. Zavest je med napadom prisotna, razen v primeru, če se žarišče napada razširi na sosednja območja možganov, v tem primeru pride do tonično-kloničnega napada (parcialni napad s sekundarno generalizacijo). Kompleksni parcialni epileptični napadi so opredeljeni z nenadnim nastopom motenj zavesti s stereotipnimi, koordiniranimi, nehotenimi gibi (avtomatizmi). Nekaj trenutkov pred nastopom motenj zavesti lahko bolnik doživi neobičajne abdominalne občutke, olfaktorne ali senzorne halucinacije, nerazložljiv strah ali občutek "dépá-vu" (4).

Generalizirani epileptični napadi

Generalizirani tonično-klonični epileptični napadi (grand mal) so napadi za katere je značilna izguba zavesti, ki ji takoj sledijo tonične kontrakcije mišic. Tonična faza traja 10-30 sekund, sledi ji klonična faza s trzajočimi gibi, ki traja 30-60 sekund. Bolnik nato ostane nezavesten še nekaj minut, ko pride k zavesti je zmeden še naslednjih nekaj minut. Pri bolnikih s ponavljajočimi napadi oziroma pri bolnikih s presnovnimi nenormalnostmi lahko zmedenost traja nekaj ur. Absénca (petit mal) je epileptični napad s kratko izgubo zavesti, mežikanjem, rahlimi premiki glave ter trzanjem obraznih mišic in se pojavlja zlasti pri otrocih. Takoj ko napad preneha, je bolnik povsem priseben. Absénca se lahko pojavi tudi večkrat na dan in je lahko vzrok za slabši uspeh v šoli (4, 6).

1.1.1.2 Kontinuirani epileptični napadi

Generalizirani in žariščni epileptični status

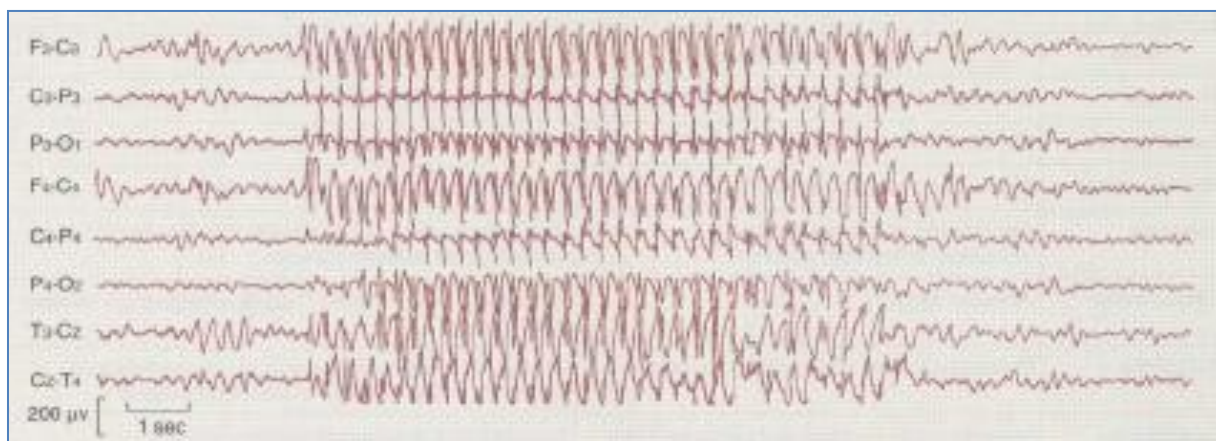
Med kontinuirane epileptične napade spada epileptični status, ki se deli na dve glavni skupini; generalizirani in žariščni epileptični status. Epileptični status je definiran kot epileptični napad, ki traja več kot 30 minut oziroma več zaporednih epileptičnih napadov, brez povratka zavesti med posameznimi napadi, ki trajajo skupaj več kot 30 minut (7).

1.1.1.3 Vzburjeni refleksni epileptični napadi

Te epileptične napade sproži nek prehodni in sporadični endo- ali eksogeni dejavnik, najpogosteje so ti napadi sproženi z vizualnimi dražljaji, kot je utripajoča luč. Napad je lahko žariščni ali generaliziran.

1.1.2 Patofiziologija epileptičnih napadov

Normalna aktivnost nevronov poteka v obliki nesinhrono dejavnosti, pri čemer se tekom prenosa informacij med različnimi regijami možganov posamezne skupine nevronov zaporedno inhibirajo in vzbujajo. Do epileptičnega napada pride, če se nevroni v določenem žarišču (fokalno) ali v celotnem območju možganov aktivirajo sinhrono. Vrsta epileptičnega napada je odvisna od lokacije patološke aktivnosti nevronov v možganih in vzorca razširitve te aktivnosti v različna območja možganov, kar se kaže v različnih kliničnih znakih in različnih vzorcih časovnih potekov akcijskih potencialov v elektroencefalogramu (4). Slika 1 prikazuje elektroencefalogram (EEG) v primeru pacienta s tipičnim absénce epileptičnim napadom (petit mal).



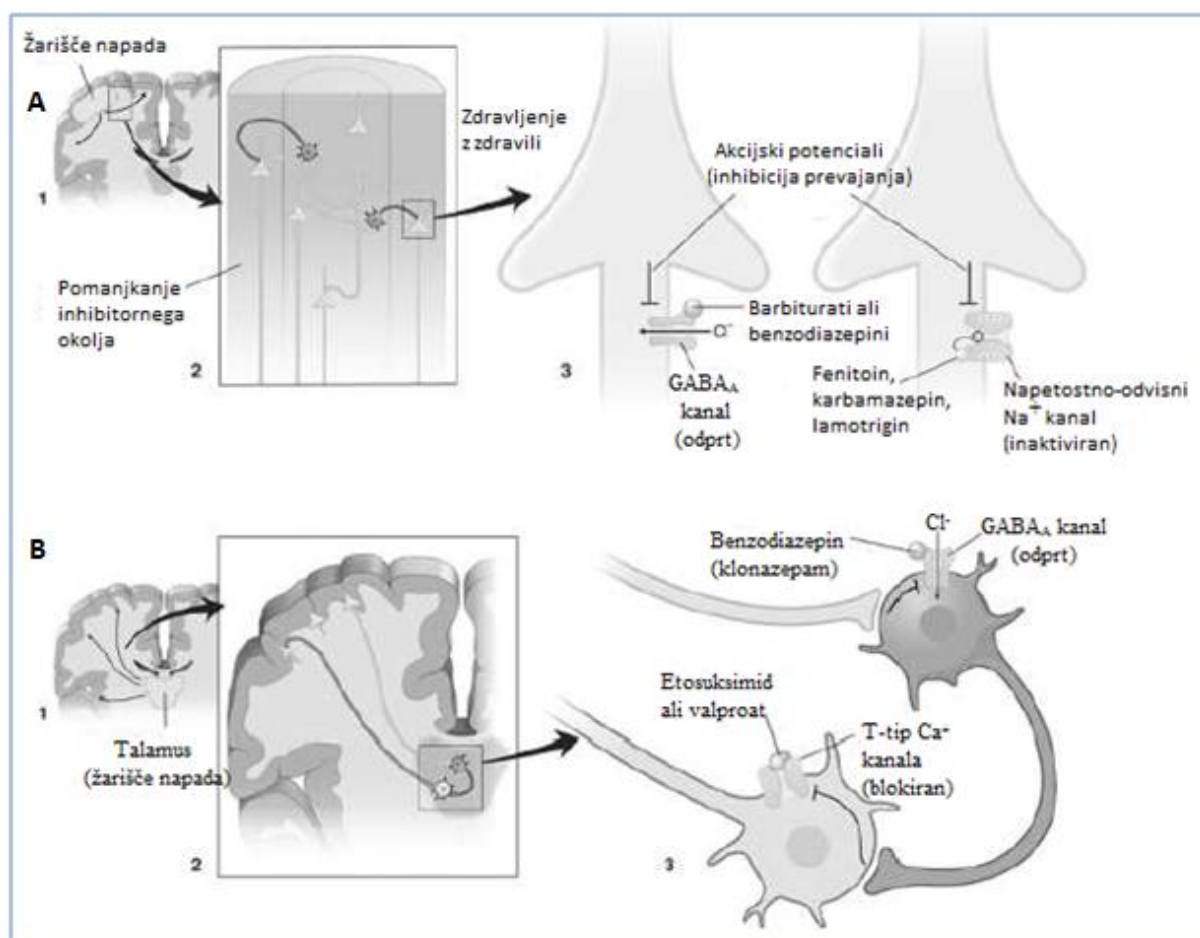
Slika 1: EEG pacienta s tipičnim absénce epileptičnim napadom, viden je izbruh generaliziranih trn-val kompleksov (3 Hz) v centru posnetka (4).

Pri normalnem delovanju možganov ekscitatorni nevroni s svojo depolarizacijo aktivirajo poleg ekscitatornih interneuronov tudi bližnje inhibitorne internevrone, ki zavrejo aktivnost

ekscitatornega nevrona in njegovih sosedov. Večina inhibitornih sinaps uporablja živčni prenašalec γ -aminomasleno kislino (GABA). Poleg tega so v depolariziranem ekscitatornem nevronu aktivirani tudi napetostno-odvisni ter od kalcija-odvisni kalijevi kanalčki, ki zavrejo vzdražnost. Med ekscitacijo nevronov se v njih iz adenzin trifosfata proizvede adenzin, ki se sprosti iz nevrona in dodatno zmanjša vzdražnost nevronov s svojo vezavo na adenzinske receptorje bližnjih nevronov. Kakršnakoli motnja teh inhibitornih mehanizmov zaradi sprememb ionskih kanalčkov ali zaradi poškodb inhibitornih nevronov in sinaps lahko vodi do razvoja žarišča, ki vodi v epileptični napad (4).

1.1.3 Zdravljenje epilepsije

Epileptični napadi nastanejo zaradi nenormalnega sinhronega delovanja mreže nevronov, ki je posledica nepravilnega delovanja nevronskih ionskih kanalčkov ter porušenega ravnotežja med sinaptično inhibicijo in ekscitacijo. Različna protiepileptična zdravila (PEZ) imajo različne mehanizme vplivanja na delovanje mreže nevronov in zato kažejo različno selektivno učinkovitost preprečevanja različnih vrst epileptičnih napadov (slika 2) (8).



Slika 2: Mehanizmi delovanja različnih protiepileptičnih zdravil (PEZ). (A) PEZ za zdravljenje žariščnih epileptičnih napadov: 1) Aktivnost napada se širi zaradi pomanjkanja

inhibitornega okolja; 2) PEZ deluje na okoljno območje tako, da 3) ojača inhibitorno delovanje GABA ali podaljšuje čas inaktivacije Na^+ kanalčkov. (B) PEZ za zdravljenje epileptičnih napadov tipa abséce: 1) napad je rezultat ciklične aktivnosti med talamusom in korteksom; 2) PEZ preprečuje sinhronizacijo 3) z deaktivacijo inhibitornih retikularnih nevronov ali z blokado Ca^{2+} kanalčkov tipa T in posledičnim preprečevanjem proženja signalov s strani talamičnih preklopnih nevronov (13).

1.2 Protiepileptična zdravila

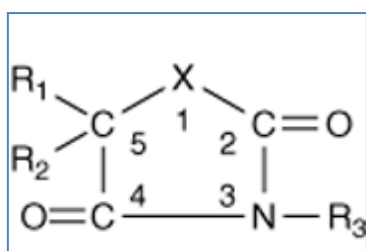
1.2.1 Željene lastnosti protiepileptičnega zdravila

S protiepileptičnimi zdravili (PEZ) preprečujemo in kontroliramo epileptične napade. Teoretično bi moralo idealno PEZ popolnoma preprečiti nastanek epileptičnih napadov pri odmerkih, ki še ne povzročajo sedacije ali drugih neželenih učinkov na centralni živčni sistem. PEZ bi se moralo dobro prenašati in biti visoko učinkovito proti različnim tipom epileptičnih napadov. Za učinkovito kontrolo epileptičnega statusa bi moral zdravilni učinek PEZ po parenteralni aplikaciji nastopiti hitro, po peroralni aplikaciji pa bi moral imeti dolgotrajen učinek za preprečevanje ponovnih epileptičnih napadov (8).

1.2.2 Osnovna farmakologija protiepileptičnih zdravil

1.2.2.1 Kemizem in farmakodinamika

Do leta 1990 je bilo dostopnih okoli 16 različnih protiepileptičnih zdravil, 13 od teh lahko uvrstimo v 5 zelo podobnih kemijskih skupin: barbiturati, hidantoini, oksazolidindioni, sukcinimidi in acetiluree. Te skupine zdravil vsebujejo zdravilne učinkovine s podobno heterociklično strukturo, a z različnimi substituentami (slika 3).

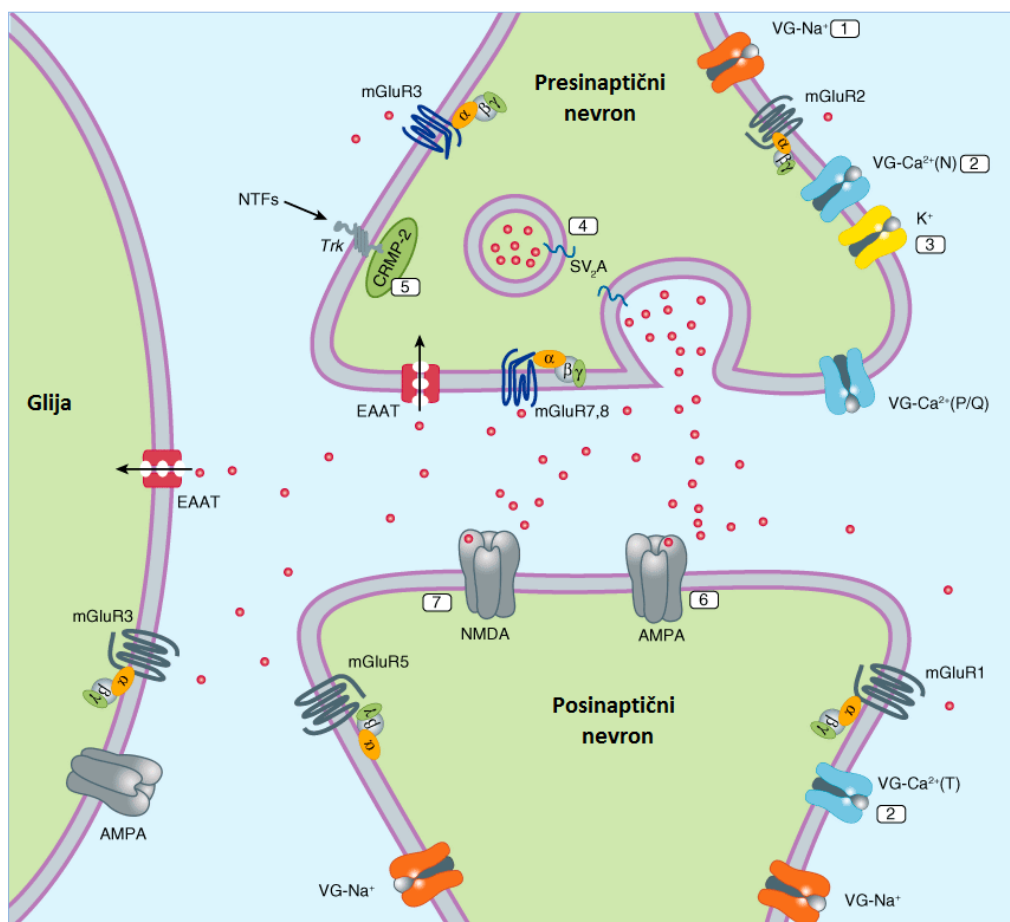


Slika 3: Heterociklična struktura protiepileptičnih zdravilnih učinkovin. X predstavlja različne substituentne: hidantoini derivati, -N-; barbiturati, -C-N-; oksazolidindioni, -O-; sukcinimidi, -C-; acetiluree, -NH₂ (N je povezan s C₂). R₁, R₂ in R₃ varirajo v posamezni podskupini ZU (9).

Značilno za te kemijske strukture je, da že z zelo majhno spremembo kemijske strukture, povzročimo velike spremembe v mehanizmu delovanja in kliničnih lastnostih zdravilne učinkovine. Preostala starejša protiepileptična zdravila – karbamazepin, valprojska kislina in

benzodiazepini – so strukturno drugačna od omenjenih 13, drugačno strukturo imajo tudi zdravilne učinkovine, ki so prišle na trg po letu 1990: felbamat, gabapentin, lakozamid, lamotrigin, levetiracetam, okskarbazepin, pregabalin, tiagabin, topiramat, vigabatrin in zonizamid.

Glede natančnih mehanizmov delovanja posameznih PEZ obstajajo še vedno nejasnosti. Na sliki 3 so shematsko prikazani poenostavljeni mehanizmi delovanja posameznih skupin PEZ. Določena PEZ lahko delujejo na več različnih tarč hkrati a v različnem obsegu.



Slika 3: Na sliki so prikazane molekularne tarče PEZ na ekscitatorni sinapsi. S PEZ znižujemo sproščanje ekscitatornega živčnega prenašalca – glutamata z delovanjem na: **1** napetostno-odvisne (VG - voltage gated) Na^+ kanalčke (fenitoin, karbamazepin, lamotrigin in lakozamid); **2** VG- Ca^{2+} kanalčke (etosuksimid, lamotrigin, gabapentin in pregabalin); **3** K^+ kanalčke (retigabin); **4** sinaptične vezikularne proteine 2A (SV₂A - synaptic vesicle protein 2A) (levetiracetam); in **5** kolapsin odzivni mediatorski protein 2 (CRMP-2 - collapsin response mediator protein-2) (lakozamid). Postsinaptične tarče so: **6** AMPA (alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionska kislina) receptorji (blokirani s fenobarbitalom,

topiramatom in lamotriginom) in γ NMDA (N-metil-D-aspartat) receptorji (blokirani s felbamatom). Rdeče pike predstavljajo glutamat (9).

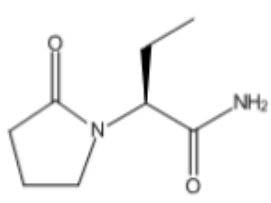
1.2.2.2 Farmakokinetika

V splošnem imajo vsa protiepileptična zdravila (zdravilne učinkovine) podobne farmakokinetične lastnosti – večinoma se aplicirajo peroralno in vsa morajo doseči centralni živčni sistem. Čeprav je večina teh zdravilnih učinkovin slabo topnih, je njihova absorpcija običajno dobra, 80 do 100% aplicirane ZU doseže centralni krvni obtok. Vezava protiepileptičnih ZU na plazemske proteine je nizka, izjema sta fenitoin in valprojska kislina. Njihov plazemski očistek je relativno nizek, zato je večina protiepileptičnih ZU srednje do dolgo delujočih. Nekatere ZU imajo razpolovni čas daljši od 12 ur. Mnoge starejše protiepileptične ZU zvišujejo aktivnost jetrnih mikrosomalnih encimov. Z znižanjem potrebne frekvence aplikacij protiepileptičnih zdravil se zvišuje complianca, zato so bolj zaželjene farmacevtske oblike s podaljšanim sproščanjem, ki omogočajo dajanje enkrat do dvakrat na dan (9).

1.3 Levetiracetam

Levetiracetam je nova zdravilna učinkovina za zdravljenje epilepsije. Od obstoječih protiepileptičnih zdravilnih učinkovin se razlikuje tako po kemijski strukturi, kot tudi po mehanizmu delovanja, ki pa še ni docela razjasnjen (10, 12).

Preglednica II: Levetiracetam – osnovni podatki o zdravilni učinkovini (11)

Sistematično (IUPAC) ime	(S)-2-(2-oksopirrolidin-1-il)butanamid	Strukturna formula 
Mednarodno nelastniško ime	levetiracetam	
Molekulska formula	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₂	
Molekulska masa	170.21 g/mol	
ATC oznaka	N03AX14	

1.3.1 Terapevtske indikacije

Levetiracetam je indiciran za samostojno zdravljenje napadov parcialnega izvora s sekundarno generalizacijo ali brez nje pri bolnikih, od 16. leta starosti, z na novo diagnosticirano epilepsijo.

Levetiracetam je indiciran za dopolnilno zdravljenje:

- Napadov parcialnega izvora s sekundarno generalizacijo ali brez nje pri odraslih, otrocih in

dojenčkah od 1 meseca starosti, z epilepsijo.

- Miokloničnih napadov pri odraslih in mladostnikih, od 12. leta starosti, z juvenilno mioklonično epilepsijo.
- Primarno generaliziranih tonično-kloničnih napadov pri odraslih in mladostnikih, od 12. leta starosti, z idiopatsko generalizirano epilepsijo (12).

1.3.2 Mehanizem delovanja

Mehanizem delovanja levetiracetama še vedno ni popolnoma pojasnjen, vendar kaže, da je drugačen od mehanizmov drugih protiepileptičnih zdravil. Poskusi *in vitro* in *in vivo* kažejo, da levetiracetam ne spreminja osnovnih značilnosti celic in normalnega živčnega prenosa.

In vitro študije so pokazale, da levetiracetam vpliva na nivo Ca^{2+} znotraj nevrona preko delne inhibicije N-tipa Ca^{2+} kanalov (na sliki 3 označeni kot VG- Ca^{2+} (N)) in znižanjem sproščanja Ca^{2+} iz zaloga znotraj nevrona. Poleg tega delno preprečuje inhibicijo GABA in glicinskih kanalov povzročeno s Zn^{2+} in β -karbolini. Nadalje se je za levetiracetam v *in vitro* študijah pokazalo, da se veže na specifično mesto v možganskem tkivu glodalcev. To vezavno mesto je sinaptični vezikularni protein 2A (na sliki 3 označen kot SV_2A), ki naj bi bil udeležen pri fuziji veziklov in eksocitozi nevrottransmiterjev.

Levetiracetam in sorodni analogi kažejo afinitetno vrsto za vezavo na sinaptični vezikularni protein 2A, ki korelira z jakostjo protiepileptične zaščite pri mišjem audiogenem modelu epilepsije. Ta odkritja kažejo, da bi lahko interakcija med levetiracetamom in sinaptičnim vezikularnim proteinom 2A prispevala k protiepileptičnemu delovanju zdravila (12).

1.3.3 Farmakokinetične lastnosti

Levetiracetam je zelo lahko topna in permeabilna snov. Ima linearni farmakokinetični profil, z majhno intra- in interindividualno variabilnostjo. Očistek se po ponavljajočem dajanju ne spremeni. Med spoloma, rasami ali cirkadiano ni znakov pomembne variabilnosti. Farmakokinetični profil pri bolnikih z epilepsijo je primerljiv s farmakokinetičnim profilom pri zdravih prostovoljcih. Zaradi popolne in linearne absorpcije je koncentracijo levetiracetama v plazmi mogoče predvideti na podlagi peroralnega odmerka, izraženega v mg/kg telesne mase.

Pri odraslih in otrocih so pokazali pomembno povezavo med koncentracijo v plazmi in slini. Razmerje koncentracij slina/plazma se giblje med 1 in 1,7 za tableto za peroralno uporabo in za peroralno raztopino 4 ure po odmerku (12).

1.3.3.1 Absorpcija

Levetiracetam se po peroralni aplikaciji hitro absorbira. Absolutna biološka uporabnost peroralno uporabljenega zdravila je skoraj 100 %. Največjo koncentracijo v plazmi (C_{\max}) dosežemo 1,3 ure po odmerku. Ob uporabi dvakrat na dan dosežemo stacionarno stanje v dveh dneh. Po enkratnem 1000 mg odmerku je največja povprečna koncentracija v plazmi (C_{\max}) ponavadi 31 $\mu\text{g/ml}$, po ponavljajočih odmerkih 1000 mg dvakrat na dan pa 43 $\mu\text{g/ml}$. Obseg absorpcije ni odvisen od odmerka; hrana ga ne spremeni (12).

1.3.3.2 Porazdelitev

Pri ljudeh ni podatkov o porazdelitvi levetiracetama v tkivih. Tako levetiracetam kot njegov primarni presnovek se ne vežeta pomembno na beljakovine v plazmi (manj kot 10 %). Volumen porazdelitve levetiracetama je približno 0,5 do 0,7 l/kg, kar je blizu vrednosti celotnega volumna vode v telesu (12).

1.3.3.3 Biotransformacija

Levetiracetam se pri ljudeh ne presnavlja obsežno. Glavna presnovna pot (24 % odmerka) je encimska hidroliza acetamidne skupine. Izooblike jetrnega citokroma P 450 ne sodelujejo pri nastajanju primarnega presnovka ucb L057. Hidrolizo acetamidne skupine so izmerili v številnih tkivih vključno s krvnimi celicami. Presnovek ucb L057 ni farmakološko aktiven. Odkrili so še dva manj pomembna presnovka. Eden nastane s hidroksilacijo pirolidonskega obroča (1,6 % odmerka), drugi z odprtjem pirolidinskega obroča (0,9 % odmerka). Druge, neidentificirane sestavine predstavljajo le 0,6 % odmerka (12).

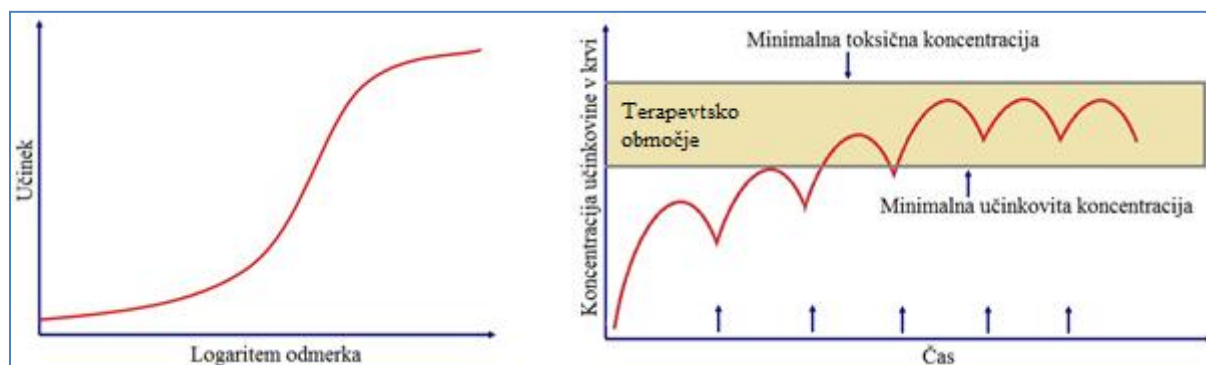
1.3.3.4 Izločanje

Plazemski razpolovni čas pri odraslih je 7 ± 1 ur in se ne spreminja z odmerkom, potjo uporabe ali ponavljajočo se uporabo. Povprečni celokupni očistek je 0,96 ml/min/kg. Glavna pot izločanja je z urinom, s katerim se izloči povprečno 95 % odmerka (približno 93 % odmerka se izloči v 48 urah). Z blatom se izloči le 0,3 % odmerka. V prvih 48 urah se s kumulativnim izločanjem z urinom izloči 66 % odmerka levetiracetama ter 24 % odmerka njegovega primarnega presnovka. Ledvični očistek levetiracetama 0,6 ml/min/kg in njegovega primarnega presnovka ucb L057 4,2 ml/min/kg kažeta na to, da se levetiracetam izloča z glomerulno filtracijo, ki ji sledi tubularna reabsorpcija, primarni presnovek pa se poleg glomerulne filtracije izloča tudi z aktivno tubularno sekrecijo. Izločanje levetiracetama korelira z očistkom kreatinina, zato je priporočljivo dnevni vzdrževalni odmerek zdravila pri bolnikih z zmerno in hudo ledvično okvaro prilagoditi očistku kreatinina (12).

1.4 Terapevtsko spremljanje koncentracije zdravil

1.4.1 Odvisnost učinka zdravila od odmerka

Učinek določenega zdravila je sorazmeren odmerku, vendar le do določene točke. To odvisnost ilustrira krivulja odvisnosti učinka zdravila od odmerka (slika 4 desno). V določeni točki povečevanje odmerka zdravila ne bo več povzročilo tudi večjega biološkega učinka (14).



Slika 4: Levo: krivulja odvisnosti učinka zdravila od odmerka. Desno: naraščanje koncentracije zdravilne učinkovine v krvi (po peroralnem dajanju zdravila) tekom naraščanja celokupnega števila odmerkov, vse do dosega stacionarnega stanja pri petem odmerku (14).

Biološka uporabnost zdravilne učinkovine je namreč lahko odvisna od odmerka, na primer zaradi nasitljive narave različnih transportnih sistemov, ki zdravilni učinkovini omogočajo prehajanje preko celične membrane in s tem dostop do različnih tarčnih mest. Na drugi strani so lahko nasitljivi tudi mehanizmi (encimi – predvsem različni citokromi), ki zdravilno učinkovino presnavljajo v neaktivno obliko. V tem primeru bo učinek zdravila, po presegu točke nasičenja omenjenih mehanizmov, s povečevanjem odmerka zdravilne učinkovine naraščal veliko hitreje kot je naraščal do točke nasičenja. Obstaja še mnogo drugih razlogov za to, da določen odmerek zdravila ne povzroči pričakovanega terapevtskega odziva, npr. fiziološke razlike med posamezniki, genetska heterogenost, prisotnost različnih patoloških stanj, stil življenja, sočasno zdravljenje z drugimi zdravili, ipd. Zaradi tega lahko dobimo boljšo korelacijo med plazemsko koncentracijo zdravilne učinkovine in njenim učinkom, kot pa med odmerkom zdravilne učinkovine in njenim učinkom. Na tem mestu je potrebno poudariti razliko med referenčnim in terapevtskim območjem. Referenčno območje je območje koncentracij zdravilne učinkovine znotraj katerega je zdravljenje optimalno pri večini bolnikov v populaciji. Terapevtsko območje je območje koncentracij zdravilne učinkovine znotraj katerega je pri določenem bolniku doseženo optimalno zdravljenje. Terapevtsko območje je torej lahko tudi drugačno od referenčnega, saj lahko pri določenem

bolniku zaradi individualne variabilnosti dosežemo optimalno zdravljenje pri koncentracijah zdravilne učinkovine zunaj referenčnega območja (15).

1.4.2 Terapevtsko spremljanje koncentracije protiepileptičnih učinkovin

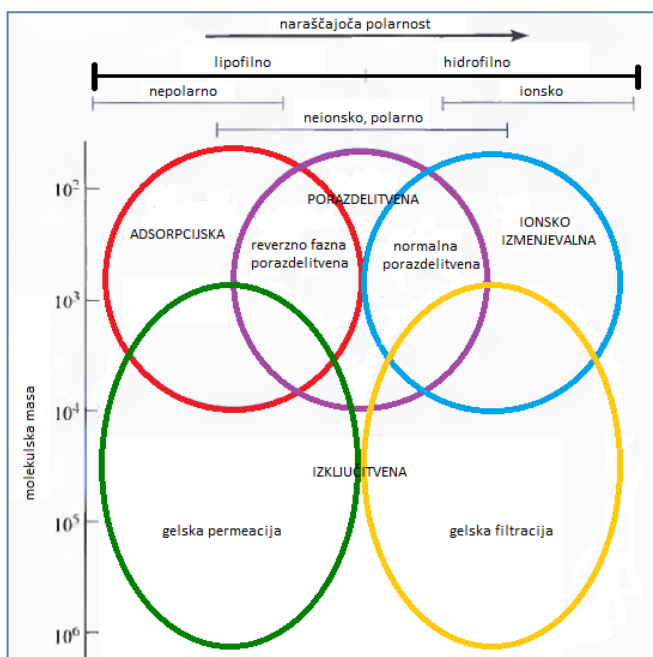
Pri zdravljenju epilepsije je naš cilj, da dosežemo ustrezno - terapevtsko koncentracijo protiepileptika na mestu njegovega delovanja (tarčnem mestu) – centralnem živčnem sistemu, kamor prispe po krvi. Koncentracija protiepileptične učinkovine na njenem tarčnem mestu je torej neposredno odvisna od njene koncentracije v krvi, to koncentracijo pa lahko spremljamo s takoimenovanim terapevtskim spremljanjem koncentracije zdravil (Therapeutic Drug Monitoring – TDM). S TDM v določenih časovnih razmakih spremljamo koncentracijo protiepileptične učinkovine v krvi bolnika in na ta način omogočamo prilagoditev odmerka PEZ, glede na potrebe. Učinkovito zdravljenje je doseženo, ko je koncentracija protiepileptične učinkovine v terapevtskem območju, kot prikazuje slika 4. Terapevtsko območje je območje koncentracij zdravilne učinkovine, ki ga omejujeta dve koncentraciji. Spodnja mejna koncentracija je minimalna učinkovita koncentracija, t.j. koncentracija zdravilne učinkovine, ki je potrebna za nastop terapevtskega učinka. Zgornja mejna koncentracija pa je minimalna toksična koncentracija, t.j. koncentracija zdravilne učinkovine, pri kateri nastopijo neželeni ali toksični učinki in je torej ne smemo doseči. Na začetku zdravljenja epilepsije s TDM ugotovimo odmerek ustrezne protiepileptične učinkovine, ki zagotovi optimalne rezultate zdravljenja brez toksičnih učinkov. To naredimo tako, da bolniku v kratkem časovnem obdobju odmerimo protiepileptično učinkovino v različno velikih odmerkih. Pri izbiri ustreznih odmerkov upoštevamo lastnosti posameznika in zdravila. Po vsakem odmerku spremljamo raven koncentracije protiepileptične učinkovine v krvi organizma. Če je koncentracija po predhodnem odmerku previsoka, velikost naslednjega odmerka ustrezno zmanjšamo. Ko enkrat najdemo ustrezen terapevtski odmerek, skušamo doseženo terapevtsko koncentracijo protiepileptika v krvi bolnika ohranjati vse do zaključka zdravljenja (14, 15).

1.5 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

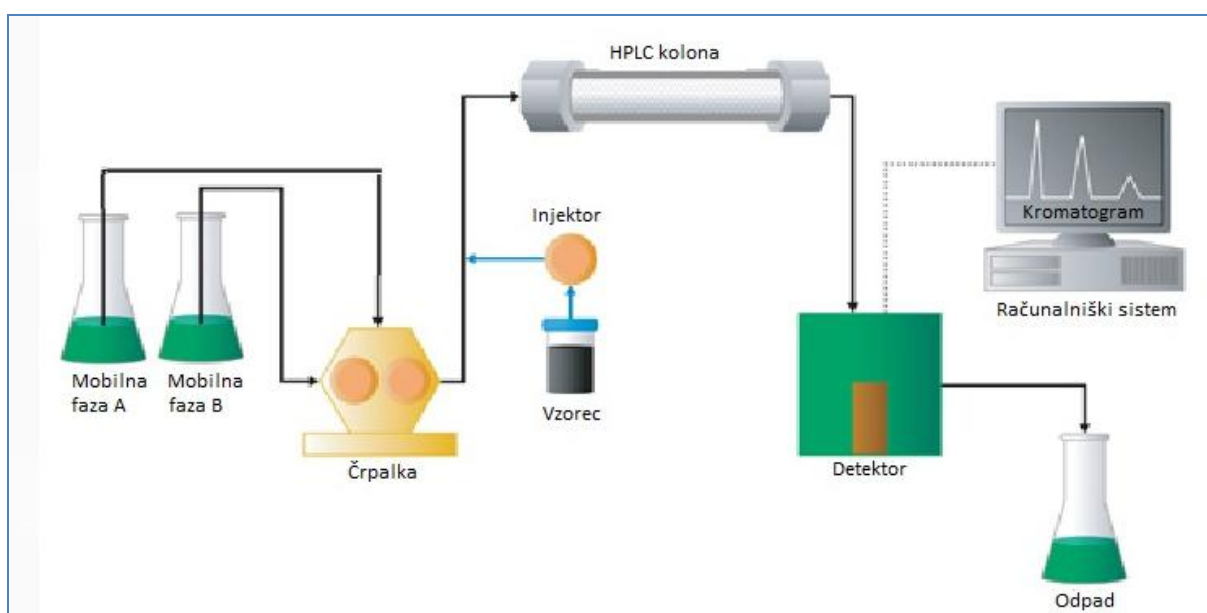
Tekočinska kromatografija, predvsem tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), je najpogosteje in najširše uporabljana kromatografska metoda. Glede na mehanizem ločevanja komponent v vzorcu jo razdelimo na porazdelitveno, adsorpcijsko, ionsko izmenjevalno, izključitveno, afinitetno in kiralno kromatografijo (slika 5).

Osnovna kromatografska oprema je sestavljena iz:

- sistema za injiciranje, ki komponente vzorca potisne v kromatografsko kolono,
- kromatografske kolone, v kateri poteka ločevanje,
- črpalke, ki pod določenim tlakom v kolono poganja mobilne faze,
- detektorja in
- rezervoarjev za odpadna topila (slika 6).



Slika 5: Vrste tekočinske kromatografije in njihova uporabnost. Metode na desni strani diagrama so primernejše za ločevanje polarnih molekul. Metode na spodnjem delu diagrama so primernejše za ločevanje molekul z velikimi molekulskimi masami (16, 17).



Slika 6: Osnovne komponente kromatografskega sistema (17, 18).

Vsebniki za topila mobilne faze in razplinjevalec

Topila za mobilno fazo so običajno shranjena v steklenih vsebnikih, ki morajo biti zaprti, da iz njih ne izhajajo hlapi topila. Prisotni raztopljeni plini v mobilni fazi lahko vplivajo na učinkovitost separacije, saj pride do nastanka mehurčkov, ki povzročijo razširitev kromatografskih pikov ali motijo samo detekcijo analitov. Iz tega razloga so HPLC analizatorji opremljeni z razplinjevalcem topil, ki odstrani mehurčke preden topilo vstopi v kromatografski sistem. Ne glede na to, pa v praksi izvedemo še predhodno razplinjevanje kromatografskih topil z uporabo ultrazvočne kadičke (16).

Črpalka

Črpalka mora omogočati učinkovit pretok mobilne faze skozi celoten kromatografski sistem. Črpanje mobilne faze poteka pod visokim tlakom, z minimalnim nihanjem tlaka in z nastavljivim pretokom od 0,1 do 10 mL/min. Vse komponente črpalnega sistema morajo biti odporne proti koroziji. Črpanje mobilne faze v kromatografsko kolono lahko poteka izokrasko – pri tem načinu črpanja se razmerje dveh ali več uporabljenih topil, ki sestavljajo mobilno fazo tekom časa ne spreminja. Običajno dosežemo boljšo ločljivost z uporabo gradientnega črpanja mobilne faze, ko se medsebojno razmerje dveh ali več uporabljenih topil z različno polarnostjo tekom kromatografije spreminja (16).

Injektor

Vzorec vbrizgamo na kolono preko posebne zanke z iglo (injektor). Injektor mora omogočati dobro ponovljivost injiciranja in čim manjšo kontaminacijo med zaporednimi vzorci. Omogočati mora tudi injiciranje različnih volumnov vzorcev. Danes se uporabljajo injektorji, ki omogočajo injiciranje poljubnega in točno določenega volumna vzorca. Volumen takšnih zank je od 1 do 100 μ L za analitsko delo in od 100 μ L do nekaj mL za preparativno delo (19).

Kromatografska kolona

Kromatografska kolona je ravna, 3-30 cm dolga cevka, izdelana iz nerjavečega jekla, z notranjim premerom od 1 do 10 mm. Kolona je polnjena s poroznimi mikrodelci stacionarne faze, velikosti od 3 do 10 μ m. Delci so največkrat iz silikagela, njihova površina pa je pri različnih kolonah različno kemijsko modificirana – z dodajanjem različnih funkcionalnih skupin. Danes je najpogosteje v uporabi kolona z dolžino 50-150 mm, z notranjim premerom 4,6 mm in polnjena z delci stacionarne faze s premerom 5 μ m. Pred analitsko kromatografsko kolono je običajno nameščena predkolona, ki odstranjuje delce in ostale nečistoče iz mobilne

faze ter sestavine matriksa vzorca, ki bi se lahko ireverzibilno vezali na stacionarno fazo kromatografske kolone. S tem predkolona podaljša življenjski čas analitske kromatografske kolone. Lastnosti delcev, s katerimi je polnjena predkolona, morajo biti podobne lastnostim delcev analitske kolone, le da so delci v predkoloni večji. Ko je predkolona izrabljena se zamenja z novo ali pa se le obnovi z menjavo izrabljenih delcev z novimi. Sodobni HPLC analizatorji omogočajo termostatiranje predkolone in analitske kolone, kar omogoča boljšo ponovljivost kromatogramov, v določenih primerih pa tudi boljšo separacijo (16).

Detektor

Za kromatografsko kolono je nameščen detektor, ki omogoča zaznavo ločenih komponent vzorca v mobilni fazi, ko le-ta prehaja skozi merilno celico. Detektor meri spremembe fizikalno – kemijskih lastnosti:

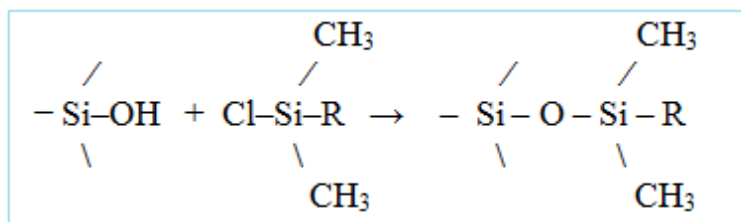
- a) mobilne faze kot celote (t.i. "*bulk property*" detektorji): lomni količnik, dielektrična konstanta, gostota; kot posledica prisotnosti različnih topljencev iz vzorca,
- b) substanc iz vzorca, raztopljenih v mobilni fazi (t.i. "*solute property*" detektorji): absorpcija ultravijolične (UV) in vidne (VIS) svetlobe, fluorescenca, ...

Najpogosteje so v uporabi UV-VIS detektorji in detektorji z nizom diod, sledijo fluorescenčni, elektrokemični detektor ter detektor, ki meri refraktivni indeks. Detektor mora biti občutljiv, stabilen, imeti mora linearen odziv čez široko območje koncentracij merjenega analita, kratek odzivni čas – neodvisen od hitrosti pretoka mobilne faze, biti mora zanesljiv in enostaven za uporabo (16, 19).

Prve kromatografske analize so za ločevanje uporabljale fazne, polarne kolone in nepolarne mobilne faze. Primerne so bile za ločevanje polarnih analitov, pri čemer so imele bolj polarne komponente vzorca večjo afiniteto do stacionarne faze in so se v koloni zadrževale dlje časa. Normalno fazna kromatografija danes v analizi nima več velikega pomena (17).

1.5.1 Reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Reverzno fazno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (RP-HPLC) so razvili v osemdesetih letih dvajsetega stoletja in danes predstavlja nepogrešljivo opremo v vsakem analiznem laboratoriju. Stacionarno fazo predstavlja organosiloksanaska porozna površina (slika 7), kot mobilno fazo pa najpogosteje uporabljamo vodne raztopine metanola, acetonitrila ali tetrahidrofurana.



Slika 7: Stacionarna faza reverzno fazne kromatografske kolone. Silanolne skupine silikagelnih delcev zaetrimo z organoklorosilani. Organska skupina je najpogosteje veriga osmih ali osemnajstih ogljikovih atomov.

Pri RP-HPLC moramo biti pozorni na pH vrednost mobilne faze, saj če le-ta preseže vrednost 7,5, na delcih stacionarne faze poteče hidroliza etrskih vezi, kar vodi v uničenje stacionarne faze. Ločevanje komponent vzorca se odvija zaradi porazdeljevanja molekul med stacionarno in mobilno fazo, pri čemer se bolj polarne molekule iz kolone eluirajo prej, manj polarne pa se bolj intenzivno porazdeljujejo v stacionarno fazo, zato je njihov retencijski čas daljši (16, 17).

2 NAMEN DELA

V zdravljenju epilepsije imajo ključno vlogo protiepileptična zdravila, saj z njimi uspešno preprečujemo pojavljanje epileptičnih napadov pri 70 – 80 % bolnikov. Terapevtsko spremljanje koncentracije zdravil (Therapeutic Drug Monitoring – TDM) je splošno sprejeta metoda za izboljšanje učinkovitosti in varnosti starejše generacije protiepileptičnih zdravil, ter določitve posameznikovega optimalnega terapevtskega območja. Tako kot starejša generacija protiepileptičnih zdravil, tudi novejša, izkazuje značilne farmakokinetične variabilnosti, zato je smiselno izvajanje TDM tudi pri novejši generaciji.

Cilji magistrske naloge

V magistrski nalogi bomo razvili analizno metodo za določanje plazemske koncentracije novejše protiepileptične učinkovine, levetiracetama. Metoda bo predstavljala osnovo za TDM. Uporabili bomo reverzno fazno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (RP-HPLC).

Glavne hipoteze magistrske naloge

Magistrska naloga je sestavljena iz dveh delov. V prvem delu bomo za levetiracetam razvili enostavno reverzno fazno HPLC analizno metodo. Glavni hipotezi tega dela sta:

- Razvita analizna metoda za določanje koncentracije levetiracetama v plazmi bo enostavna in zadosti občutljiva za TDM.
- Razvita analizna metoda bo s stališča izvedbe primerna za rutinsko uporabo v praksi.

V drugem delu bomo razvito metodo validirali po FDA (Food and Drug Administration) smernicah. Določili bomo točnost, ponovljivost, spodnjo mejo kvantifikacije, linearnost, območje linearnosti, učinkovitost ekstrakcije in določili stabilnost plazemskih vzorcev po treh krogih zamrzovanja in odtaljevanja, stabilnost osnovne raztopine levetiracetama in internega standarda ter stabilnost pripravljenih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku.

Glavni hipotezi tega dela sta:

- Razvito metodo za določanje koncentracije levetiracetama v plazmi bo mogoče validirati po smernicah FDA.
- Razvito metodo za določanje koncentracije levetiracetama v plazmi bo mogoče uporabljati za terapevtsko spremljanje koncentracije levetiracetama v praksi.

Pričakovani rezultati

Razvili in validirali bomo občutljivo in enostavno reverzno fazno HPLC metodo za določanje koncentracije levetiracetama v plazmi. Metodo bo v praksi mogoče uporabljati za TDM.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Biološki material

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

3.1.2 Standardi

- Levetiracetam, $C_8H_{14}N_2O_2$, $M = 170,21$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

3.1.3 Interni standardi

- Adenozin, $C_{10}H_{13}N_5O_4$, $M = 267,24$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Tirozin, $4-(HO)C_6H_4CH_2CH(NH_2)CO_2H$, $M = 181,19$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Interni standard iz kita Chromsystems, podatki o molekulski strukturi, molekulski masi in koncentraciji niso podani (Chromsystems, Instruments and Chemicals GmbH, Nemčija, kataloška številka 24004)

3.1.4 Reagenti in topila

- Ultračista voda s specifično upornostjo $18,2$ M Ω cm; pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore), Fakulteta za farmacijo,
- Prečiščena voda, pridobljena na Fakulteti za farmacijo,
- Metanol CH_3OH $M = 32,04$ g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija),
- Acetonitril C_2H_3N $M = 41,05$ g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija),
- Kalijev dihidrogen fosfat pro analysi KH_2PO_4 ; $M=136,09$ g/mol (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- Natrijev hidroksid NaOH - Titrisol[®], za pripravo 1 M NaOH (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- Klorovodikova kislina HCl - Titrisol[®], za pripravo 1 M HCl (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- Puferske raztopine pH = 2, pH = 3, pH = 4, pH = 5 in pH = 6 (Kefolab, Ljubljana, Slovenija)

3.1.5 Naprave in pribor

- HPLC sistem Agilent Series 1100: kvarterna črpalka, razplinjevalec, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV-VIS detektor ChemStation, programska oprema (Agilent technologies, Santa Carla, Kalifornija, Združene države Amerike),
- Kromatografski koloni:
 - o Synergi Polar RP, 250 x 4,6 mm, delci 4 μm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike),
 - o Synergi Hydro RP, 250 x 4,6 mm, delci 4 μm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike),
- HPLC predkolona: Security Guard C18 4x3 mm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike),
- pH meter MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija),
- Zamrzovalnik -20°C (Gorenje, Velenje, Slovenija),
- Hladilnik (LTH, Škofja Loka, Slovenija),
- Digestorij,
- Ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra, Kranj, Slovenija),
- Magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Póvoa de Varzim, Portugalska),
- Polavtomatske pipete 2-20 μl , 20-200 μl in 200-1000 μl (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- Mešalnik Vibromix 114EV (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- Tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica),
- Tehtnica H 54 AR (Mettler, Greinfansee, Švica),
- Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf, ZDA),
- Steklovina: čaše, merilne bučke, merilni valji, epruvete, čolnički za tehtanje, vialo, inserti za vialo,
- Sistem za filtriranje mobilne faze: vodna črpalka, erlenmajerica, stekleni lij, gumijast zamašek, prižema, filter mrežica, filter papir (celulozno acetatni filter, pore 0,45 μm ; Sartorius),
- Ostali inventar: nastavki za pipete, plastične epruvete 1,5 mL in 2,0 mL, Parafilm M, kovinske spatule, puhalke, zamaški za vialo, magnetek.

3.2 Metode

3.2.1 Priprava mobilne faze

Mobilno fazo smo dnevno pripravljali svežo, ločeno vodno in organsko komponento. Vodna komponenta je bila v času razvoja HPLC metode 50 mM fosfatni pufer z različnimi pH vrednostmi, od pH 2,5 do 6,0. Pri končno razviti metodi uporabljamo 50 mM fosfatni pufer s pH = 4,5. Organski komponenti, HPLC kakovosti, sta bili v času razvoja metode metanol in acetonitril. Pri končno razviti metodi uporabljamo acetonitril HPLC kakovosti z 2% dodatkom ultračiste vode.

3.2.1.1 Priprava pufrov za mobilno fazo

Priprava 50 mM fosfatnih pufrov pri pH 2,5, 2,9, 3,0, 4,5 in 6,0: Za pripravo teh fosfatnih pufrov smo zatehtali 3,402 g KH_2PO_4 in dopolnili do 500 mL z vodo. Da smo dobili pufer s pH 2,5, 2,9 in 3,0, smo umerili pH meter med 2 in 3 s standardnimi puferskimi raztopinami in nato našo raztopino KH_2PO_4 nakisali do željenega pH s pomočjo klorovodikove kisline. Za pripravo pufra s pH 4,5 smo pH meter umerili med 4 in 5 ter nato raztopino KH_2PO_4 po potrebi titrirali s klorovodikovo kislino oziroma z raztopino natrijevega hidroksida, da smo dosegli pH 4,5. Da smo dobili pufer s pH 6,0, smo umerili pH meter s standardnimi puferskimi raztopinami med 5 in 6 ter nato našo raztopino KH_2PO_4 titrirali z raztopino natrijevega hidroksida do želenega pH.

Pred uporabo smo tako pripravljene puferske raztopine filtrirali preko 0,45 μm celulozno acetatnega filtra in jih 15 minut razplinjevali v ultrazvočni kadički.

3.2.1.2 Priprava organske komponente mobilne faze

MeOH HPLC kakovosti smo pred uporabo razplinjevali 15 minut v ultrazvočni kadički. Acetonitrilu HPLC kakovosti smo pred uporabo dodali 2% ultračiste vode in ga 15 minut razplinjevali v ultrazvočni kadički.

3.2.2 Hranjenje stacionarne faze

Po končanem delu smo kolono Synergi Polar RP spirali 40 minut z 10 % MeOH / H_2O pri pretoku 1,0 mL/min, da smo odstranili večino fosfatnega pufra in nato še 40 minut s 65% MeOH / H_2O pri pretoku 1,0 ml/min. Kolono Synergi Hydro RP smo spirali 60 minut z 10 % acetonitrilom / H_2O , da smo odstranili večino fosfatnega pufra in nato še 60 minut s 65% acetonitrilom/ H_2O .

3.2.3 Priprava vzorcev za razvoj RP-HPLC metode za analitiko levetiracetama

3.2.3.1 Priprava osnovnih in delovnih raztopin

Levetiracetam:

Osnovna raztopina levetiracetama (2005 µg/mL): v 2 mL plastično epruveto smo natehtali 4,01 mg levetiracetama, nato smo v plastično epruveto odpipetirali 2000 µL ultračiste vode ter vsebino plastične epruvete mešali, dokler se ni ves levetiracetam popolnoma raztopil.

Delovna raztopina levetiracetama 4x (501 µg/mL): v 1,5 mL plastično epruveto smo odpipetirali 50 µL osnovne raztopine levetiracetama in 150 µL ultračiste vode ter raztopino premešali z vorteksom.

Osnovni raztopini internega standarda:

- *Adenozin (495 µg/mL):* v 10 mL merilno bučko smo natehtali 4,95 mg adenozina, dopolnili z ultračisto vodo do oznake ter raztopino dobro premešali.
- *Tirozin (199 µg/mL) :* v 10 mL merilno bučko smo natehtali 1,99 mg tirozina, dopolnili z ultračisto vodo do oznake ter raztopino dobro premešali.

3.2.4 Priprava vodnih in bioloških vzorcev

Vodni vzorec levetiracetama (50,1 µg/mL): v 2 mL plastično epruveto smo odpipetirali 50 µL delovne raztopine levetiracetama in 450 µL ultračiste vode ter raztopino premešali z vorteksom.

Biološki vzorec levetiracetama (50,1 µg/mL): v 2 mL plastično epruveto smo odpipetirali 50 µL delovne raztopine levetiracetama in 450 µL plazme zdravega preiskovanca.

Slepi vzorec plazme: v 2 mL plastično epruveto smo odpipetirali 50 µL ultračiste vode in 450 µL plazme zdravega preiskovanca.

3.2.5 Razvoj metode za pripravo plazemskih vzorcev za analizo s HPLC

Plazemske vzorce smo pred analizo s HPLC analizatorjem pripravili z enostavnim obarjanjem plazemskih proteinov z uporabo ledeno hladnega metanola (-20 °C). Obarjanje plazemskih proteinov smo izvedli v plastični epruveti. Najprej smo plazemskemu vzorcu dodali ledeno hladen MeOH in vsebino plastične epruvete dobro premešali na vorteksu ter centrifugirali. Dobljeni supernatant smo nato prenesli v insert, ki smo ga vložili v vialo. Pripravo plazemskih vzorcev smo izvedli z dvema različnima postopkoma, ki se razlikujeta v zaporedju dodajanja ledeno hladnega MeOH in internega standarda (IS).

3.2.5.1 Prvi postopek priprave plazemskega vzorca

Delamo v 2 mL plastični epruveti:

- 500 μ L (plazemskega) vzorca + 50 μ L IS,
- 10 s mešamo na vorteksu,
- + 1450 μ L ledeno hladnega MeOH,
- 30 s mešamo na vorteksu,
- 20 min centrifugiramo pri 16100 g, pri 4 °C,
- 90 μ L supernatanta prenesemo v insert, katerega vložimo v vialo.

3.2.5.2 Drugi postopek priprave plazemskega vzorca

Delamo v 2 mL plastični epruveti:

- 500 μ L (plazemskega) vzorca + 1450 μ L ledeno hladnega MeOH,
- 30 s mešamo na vorteksu,
- + 50 μ L IS,
- 30 s mešamo na vorteksu,
- 20 min centrifugiramo pri 16100 g, pri 4 °C,
- 90 μ L supernatanta prenesemo v insert, katerega vložimo v vialo.

3.2.5.3 Pregled uporabljenih mobilnih faz

V preglednici III so predstavljene metode, mobilne faze (MF) in kromatografski koloni, ki smo jih uporabljali pri razvoju RP-HPLC metode za analizo levetiracetama.

Preglednica III: Pregled uporabljenih mobilnih faz in kromatografski koloni pri razvoju metode.

Metoda	Kolona	Raztopina MF	Delež MeOH (%) v MF
1	Synergi Polar-RP	50 mM fosfatni pufer, pH = 4,5	25
2	Synergi Polar-RP	50 mM fosfatni pufer, pH = 4,5	30
3	Synergi Polar-RP	50 mM fosfatni pufer, pH = 3,0	25
4	Synergi Polar-RP	50 mM fosfatni pufer, pH = 3,0	30
5	Synergi Polar-RP	50 mM fosfatni pufer, pH = 2,5	30
6	Synergi Polar-RP	50 mM fosfatni pufer, pH = 2,9	22
7	Synergi Polar-RP	50 mM fosfatni pufer, pH = 2,9	30
Metoda	Kolona	Raztopina MF	Delež acetonitrila (%) v MF
8	Synergi Polar-RP	50 mM fosfatni pufer, pH = 3,0	10
9	Synergi Hydro-RP	50 mM fosfatni pufer, pH = 4,5	6
10	Synergi Hydro-RP	50 mM fosfatni pufer, pH = 4,5	8
11	Synergi Hydro-RP	50 mM fosfatni pufer, pH = 4,5	10

3.2.6 Kromatografski pogoji

Kromatografsko ločbo smo izvajali na dveh različnih kromatografskih kolonah:

- Synergi Polar-RP (250 mm x 4,6 mm, 4 μ m),
- Synergi Hydro-RP (250 mm x 4,6 mm, 4 μ m)

3.2.6.1 Kromatografski pogoji pri koloni Synergi Polar-RP

Kolona je bila ves čas termostatorana na temperaturo 30 °C. V kolono smo injicirali 10 μ L vzorcev. Kromatografski spekter smo snemali z UV-detektorjem pri valovni dolžini 205 nm. Za analizo smo uporabili metode 1-8 iz preglednice III. Pretok mobilne faze je bil pri metodah 1-6 nastavljen na 1 mL/min, pri metodah 7 in 8 pa na 0,9 mL/min.

3.2.6.2 Kromatografski pogoji pri koloni Synergi Hydro-RP

Kolona je bila ves čas termostatorana na temperaturo 30 °C. V kolono smo injicirali 10 μ L vzorcev. Kromatografski spekter smo snemali z UV-detektorjem pri valovni dolžini 205 nm. Za analizo smo uporabili metode 9-11 iz preglednice III. Pretok mobilne faze je bil pri vseh treh metodah nastavljen na 1,0 mL/min.

3.3 Validacija

Validacija bioanalizne metode je dokumentiran sistematičen proces, s katerim dokažemo, da je analizna metoda sposobna kontinuirano dajati zanesljive in ponovljive rezultate kvantitativnih meritev analitov v danem biološkem matriksu, kot je, plazma, serum, urin (20).

3.3.1 Selektivnost

Selektivnost je sposobnost analizne metode, da loči analit od ostalih komponent, ki so prisotne v vzorcu (plazma, urin ali drug matriks). Selektivnost naše metode smo preverili tako, da smo analizirali 6 slepih plazemskih vzorcev, pridobljenih od šestih različnih zdravih preiskovancev. Nato smo ovrednotili kromatograme plazem pri meji kvantifikacije (20).

3.3.2 Linearnost

Metoda je linearna, če znotraj danega območja obstaja direktna linearna, ali preko ustreznega matematičnega izračuna (npr. log, ln), povezava med koncentracijo analita v vzorcu in odzivom. Linearnost razmerja med obema spremenljivkama preverimo s pomočjo umeritvene oziroma regresijske premice, ki jo dobimo po metodi najmanjših kvadratov. Rezultat podamo v obliki premice $y = kx + n$, pri čemer y predstavlja bodisi površino pod kromatografskim vrhom analita bodisi razmerje površin pod kromatografskima vrhovoma analita in uporabljenega internega standarda. Odsek na ordinati je označen s črko n , x je koncentracija

analita, k je naklon premice. Korelacijo med odzivom in koncentracijo podamo s Pearsonovim koeficientom R oziroma njegovim kvadratom R^2 . Linearnost naše metode smo preverili na območju koncentracij levetiracetama med 2,00 in 134 $\mu\text{g/mL}$.

3.3.3 Točnost

Točnost analizne metode je definirana kot ujemanje med izmerjeno in dejansko vrednostjo (koncentracijo). Točnost ovrednotimo tako, da najmanj 5 krat analiziramo vzorec z znano koncentracijo analita. Analizirati moramo najmanj 3 vzorce z različnimi koncentracijami, v območju pričakovanih koncentracij analita v realnih vzorcih. Točnost metode je ustrezna, če je povprečje izmerjenih vrednosti znotraj 15% dejanske vrednosti. Izjema je spodnja meja kvantifikacije (LLOQ), kjer je dovoljeno odstopanje znotraj 20% dejanske vrednosti (20).

3.3.4 Ponovljivost

Ponovljivost je sposobnost analizne metode, da konstantno daje enake rezultate pri istem homogenem vzorcu. Ponovljivost smo določali z analizo kontrolnih vzorcev, tako, da smo vsak dan injicirali pet vzorcev pri isti koncentraciji. Ponovljivost ovrednotimo s standardnim odklikom in koeficientom variacije (%). Koeficient variacije ne sme odstopati za več kot 15%, razen pri spodnji meji kvantifikacije, kjer ne sme odstopati za več kot 20% (20). Pri vrednotenju naše metode smo določili znotrajdnevno ponovljivost in meddnevno ponovljivost za tri dni.

3.3.5 Območje linearnosti

Območje linearnosti analizne metode je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu (vključno s tema koncentracijama) v katerem analizna metoda še ustreza zahtevanim kriterijem - ponovljivosti, točnosti in linearnosti (21).

3.3.6 Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ)

FDA smernice definirajo spodnjo mejo kvantifikacije kot standard z najnižjo koncentracijo v umeritveni krivulji, ki še ustreza sledečim pogojem:

- Odziv analita pri najnižji koncentraciji je vsaj 5 krat višji od odziva pri analizi praznega vzorca.
- Odziv analita pri najnižji koncentraciji mora imeti ponovljivost znotraj 20% in točnost med 80 in 120% (20).

3.3.7 Priprava plazemskih vzorcev za validacijo

Najprej smo pripravili vodni raztopini levetiracetama in internega standarda (adenozin). Zatehte so prikazane v preglednici IV.

Preglednica IV: Zatehta standardnih raztopin

Spojina	Masa (mg)	Volumen vode(mL)	Koncentracija (mg/mL)
Levetiracetam	10,01	5	2,00
Adenozin	4,95	10	0,495

Za postopek validacije smo pripravili sledeče plazemske vzorce:

Za pripravno umeritvene krivulje: osem plazemskih standardov z različnimi koncentracijami levetiracetama, vzorec z IS, brez levetiracetama ter vzorec brez levetiracetama in IS. Za kontrolo kakovosti: tri plazemske kontrolne vzorce (QC) s koncentracijo levetiracetama: 5,01 $\mu\text{g/mL}$ (QCl), 24,6 $\mu\text{g/mL}$ (QCm) in 77,0 $\mu\text{g/mL}$ (QCh).

Postopek priprave standardnih plazemskih vzorcev za umeritveno krivuljo

Najprej smo iz osnovne raztopine levetiracetama pripravili standardne vodne raztopine levetiracetama, postopek priprave je opisan v preglednici V.

Preglednica V: Priprava standardnih vodnih raztopin levetiracetama

Zaporedna številka vodnega standarda	Koncentracija levetiracetama v vodnem standardu ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen dodane osnovne raztopine levetiracetama (μL)	Volumen dodane H_2O (μL)	Koncentracija levetiracetama v plaz. standardu ($\mu\text{g/mL}$)**
std.LEVE ₁	0	0	300	0
std.LEVE ₂	20,0	20	1980	2,00
std.LEVE ₃	50,0	25	975	5,01
std.LEVE ₄	100,1	25	475	10,0
std.LEVE ₅	200,2	25	225	20,0
std.LEVE ₆	500,5	50	150	50,1
std.LEVE ₇	667,3	62,5	125	66,7
std.LEVE ₈	1001	50	50	100
std.LEVE ₉	1335	50	25	134

**Plazemski standard je pripravljen na sledeč način: 50 μL vodnega standarda + 450 μL prazne plazme.

Tako pripravljene vodne standarde levetiracetama smo uporabili za pripravo standardnih plazemskih vzorcev levetiracetama. Le-te smo pripravili tako, da smo v 2 mL plastično epruveto odpipetirali 450 μL plazme zdravega preiskovanca (prazna plazma) ter dodali 50 μL ustreznega vodnega standarda levetiracetama in 30 mešali na vorteksu.

Postopek priprave plazemskih kontrolnih vzorcev

Najprej smo iz osnovne raztopine levetiracetama pripravili ustrezne vodne raztopine levetiracetama, postopek priprave je opisan v preglednici VI.

Preglednica VI: Priprava vodnih raztopin levetiracetama za pripravo plazemskih QC vzorcev

	Koncentracija levetiracetama v vodni raztopini ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen dodane osnovne raztopine levetiracetama (μL)	Volumen dodane vode (μL)	Koncentracija levetiracetama v plazemskem QC vzorcu **
Nizka QC koncentracija (QCl)	50,1	25,0	975	5,01
Srednja QC koncentracija (QCm)	246	84,0	600	24,6
Visoka QC koncentracija (QCh)	770	250	400	77,0

**Plazemski kontrolni (QC) vzorec je pripravljen na sledeč način: 50 μL vodne raztopine levetiracetama + 450 μL prazne plazme.

Tako pripravljene vodne raztopine levetiracetama smo uporabili za pripravo plazemskih QC vzorcev. Le-te smo pripravili tako, da smo v posamezno 2 mL plastično epruveto odpipetirali 450 μL plazme zdravega preiskovanca (prazna plazma) ter dodali 50 μL ustrezne vodne raztopine levetiracetama in 30 sekund mešali na vorteksu.

3.3.8 Obdelava podatkov

Za urejanje in obdelavo podatkov smo uporabili program Excel (Microsoft Office 2010). Za lažje razumevanje in predstavitev dobljenih rezultatov smo oblikovali preglednice in grafe.

4 REZULTATI

4.1 Priprava vzorcev z obarjanjem plazemskih proteinov

V poglavju 3.2.5 sta opisana dva postopka priprave plazemskih vzorcev z enostavnim obarjanjem proteinov z uporabo ledeno hladnega MeOH.

4.1.1 Prvi postopek priprave plazemskega vzorca

Pri prvem postopku priprave smo plazemskemu vzorcu v prvi fazi dodali 50 μ L internega standarda in 10 s mešali vzorec na vorteksu. V končno razviti metodi smo kot interni standard uporabili adenzin. Sledil je dodatek ledeno hladnega metanola in 30 s mešanje na vorteksu.

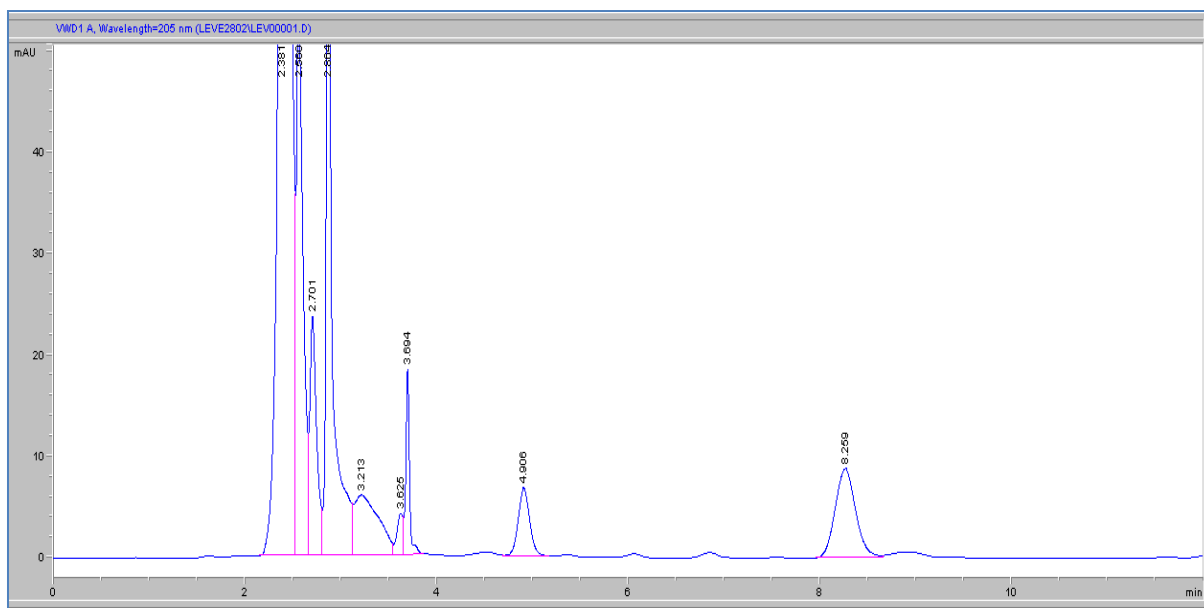
Prvi postopek priprave vzorca se je pri prvem poskusu validacije metode izkazal kot neustrezen, zato smo validacijo prekinili po obdelavi rezultatov prvega in drugega dne validacije. Obdelani rezultati prvih dveh dni validacije so pokazali, da metoda ustreza zahtevanim kriterijem validacije le po rezultatih brez upoštevanja IS, ne pa tudi z upoštevanjem IS.

4.1.2 Drugi postopek priprave plazemskega vzorca

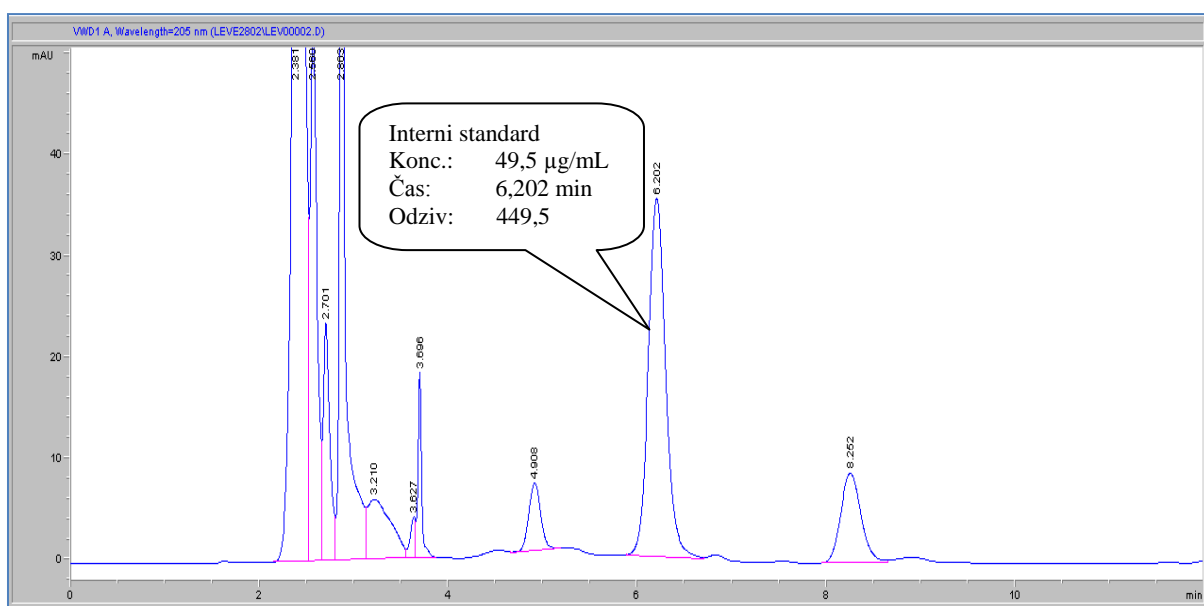
Drugi postopek priprave plazemskega vzorca se je izkazal za ustreznega, saj je metoda v drugem poskusu validacije ustrezala validacijskim kriterijem.

4.2 Izbira internega standarda

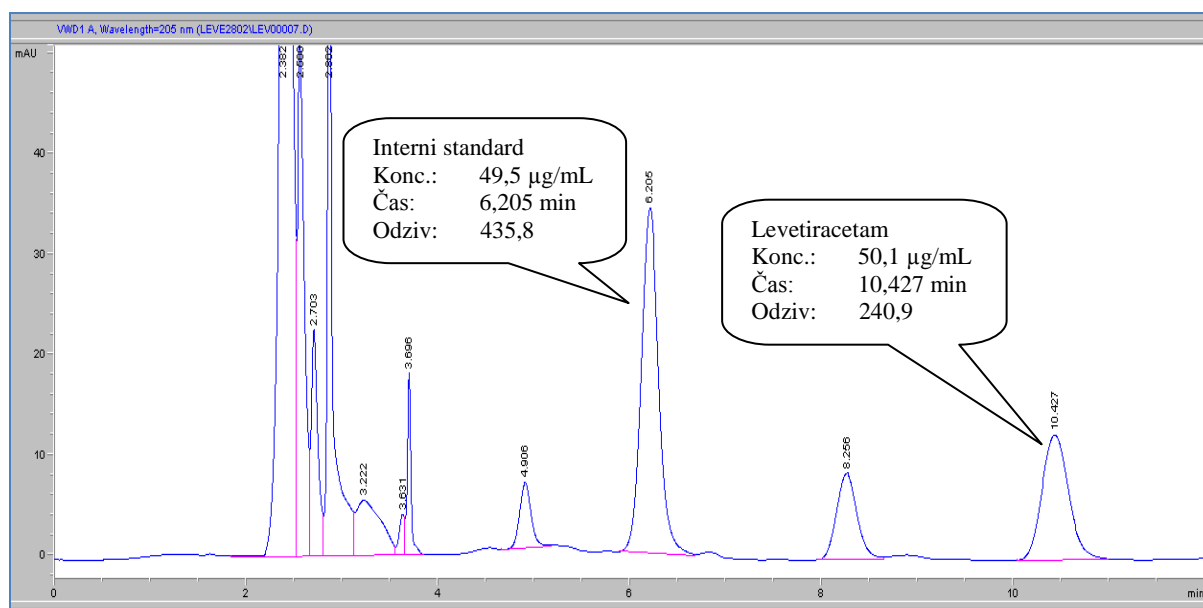
Kot interni standard smo preizkusili tri različne spojine. Prvi interni standard, ki smo ga preizkusili je bil komercialni interni standard neznane kemijske sestave in koncentracije. Ta IS je sestavni del kita Chromsystems[®] za določanje koncentracije levetiracetama s HPLC metodo, ki v svojem postopku vključuje ekstrakcijo na trdnih nosilcih. IS smo dodali vzorcu po opisanem postopku v poglavju 3.2.5.1. V dobljenem kromatogramu po izvedeni analizi nismo zaznali kromatografskega vrha dodanega IS. Tudi poizkus z uporabo tirozina v koncentraciji, ki je bila približno enaka koncentraciji naših vzorcev ni bil uspešen, kromatografskega vrha tirozina nismo zaznali. Adenzin se je izkazal kot ustrezen interni standard, njegov kromatografski vrh se je časovno umestil pred vrhom levetiracetama, tako se zahtevan čas analize zaradi IS ni podaljšal. Umestitev vrha adenozina je bila ustrezna tudi s stališča vrhov koelucij iz matriksa vzorca, saj v območju vrha adenozina ni bilo koelucij endogenih snovi iz biološkega vzorca (slike 7, 8 in 9).



Slika 7: Kromatogram plazemskega vzorca brez dodanih spojin (slepa plazma).



Slika 8: Kromatogram plazemskega vzorca z dodanim internim standardom (adenozin) v koncentraciji 49,5 µg/mL.



Slika 9: Kromatogram plazemskega vzorca z dodanim internim standardom (adenozin) v koncentraciji 49,5 µg/mL in levetiracetamom v koncentraciji 50,1 µg/mL.

4.3 Kromatografija

4.3.1 Izbira kolone

Kot ustrezna kolona za izvajanje kromatografske ločbe se je izkazala kolona Synergi Hydro-RP 250 mm x 4,6 mm 4 µm. S to kolono smo dosegli dobro ločbo merjenih vrhov v času 12 minut.

4.3.2 Temperatura kolone

Kromatografsko ločbo smo izvajali pri temperaturi kolone 30 °C.

4.3.3 Optimalna mobilna faza

Pri razvoju kromatografske metode smo preizkusili različne mobilne faze (glej poglavje 3.2.5.3 Pregled uporabljenih mobilnih faz). Kot optimalna mobilna faza se je izkazala mobilna faza, kjer je vodni del predstavljal 50 mM fosfatni pufer s pH = 4,5, v deležu 92 %. Kot organski del mobilne faze smo uporabili acetonitril z dodatkom vode v 2 %.

4.3.4 Kromatografska ločba

Kromatografska ločba končno razvite metode traja 12 minut. Mobilna faza se v kolono dovaja izokratsko. Uporabljeni pogoji omogočajo zadostno ločljivost vrhov koelucij, internega standarda in levetiracetama (slika 9).

4.4 Validacija

Validacijo metode smo izvedli v sedmih dneh. Prve tri dni validacije smo vsak dan najprej analizirali 8 standardnih plazemskih vzorcev z znanimi koncentracijami levetiracetama, ki so zajemale vrednosti od 2,00 $\mu\text{g/mL}$ do 134 $\mu\text{g/mL}$, poleg tega smo analizirali tudi plazemski vzorec brez levetiracetama z IS, skupaj torej 9 standardnih plazemskih vzorcev. S pomočjo rezultatov meritev smo vsak dan izdelali umeritveni premici; premico brez upoštevanja odzivov IS in premico z upoštevanjem odzivov IS. Vsak dan smo analizirali še 15 kontrolnih (QC) vzorcev v treh koncentracijskih nivojih: nizki (QCl), srednji (QCm) in visoki (QCh). QC vzorce smo dnevno pripravili in analizirali v 5-ih serijah na sledeč način:

1. pripravili smo 3 vzorce (QCl, QCm in QCh) in
2. jih analizirali po razviti metodi s HPLC,

Poleg teh meritev smo posamezni dan izvedli tudi meritve dodatnih vzorcev za določitev učinkovitosti ekstrakcije, 24-urno postpreparativno stabilnost ter za stabilnost vzorcev plazme z levetiracetamom po treh krogih zamrzovanja in odtaljevanja vzorca. Prvi in sedmi dan validacije smo izvedli analizo dveh vodnih vzorcev, enega pripravljenega iz osnovne raztopine levetiracetama in enega pripravljenega iz osnovne raztopine internega standarda. S tem smo določili 7 dnevno stabilnost omenjenih dveh osnovnih raztopin pri danih pogojih shranjevanja.

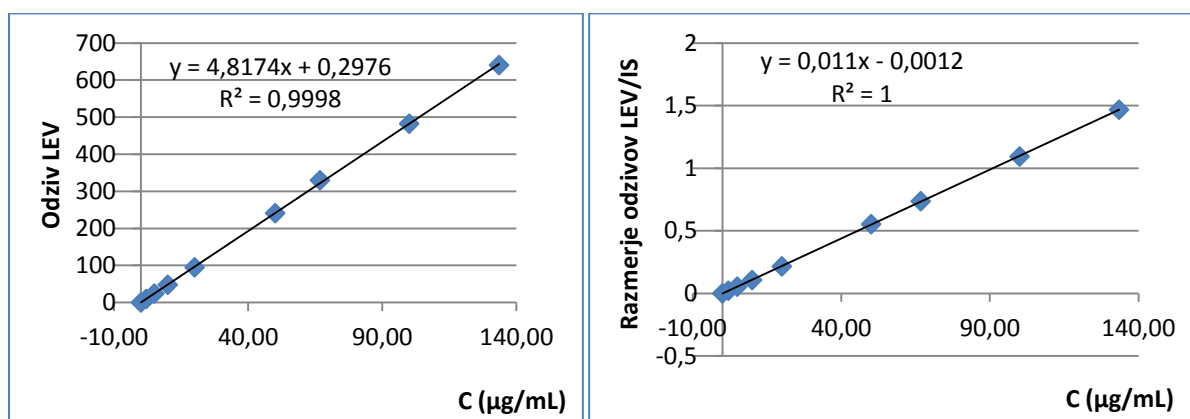
4.4.1 Selektivnost

Analizirali smo šest plazemskih vzorcev, pridobljenih od šestih različnih zdravih preiskovancev. Dobili smo šest kromatogramov, na katerih smo preverili, če so pri času elucije našega internega standarda in levetiracetama prisotni vrhovi spojin (koelucij) iz matriksa vzorca. Pet analiziranih plazemskih vzorcev ni imelo prisotnih vrhov pri času elucije IS in levetiracetama. Le pri enem plazemskem vzorcu je bil prisoten vrh spojine iz matriksa vzorca s časom elucije 10,5 min in površino pod krivuljo 3,9. Čas elucije levetiracetama znaša približno 10,4 min, zato je ta koelucija problematična s stališča selektivnosti metode oziroma spodnje meje kvantifikacije metode. Odziv levetiracetama pri plazemskem standardu za pripravo umeritvene krivulje z najnižjo koncentracijo (2,00 $\mu\text{g/mL}$) znaša 9,6, odziv levetiracetama pri standardu z drugo najnižjo koncentracijo (5,01 $\mu\text{g/mL}$) pa znaša 24,0. FDA smernice predpisujejo, da mora biti odziv analita (levetiracetama) pri koncentraciji, ki definira spodnjo mejo kvantifikacije metode, vsaj 5 krat večji od odziva spojine, ki izhaja iz matriksa vzorca. Iz tega sledi, da je zaradi odziva pri času 10,5 min, ki smo ga izmerili pri analizi plazemskega vzorca enega izmed šestih zdravih preiskovancev, spodnja meja kvantifikacije

naše metode namesto 2,00 $\mu\text{g/mL}$ zvišana na 5,01 $\mu\text{g/mL}$. To je druga najnižja koncentracija standardnega plazemskega vzorca za pripravo umeritvene krivulje in prva najnižja koncentracija levetiracetama v plazmi, pri kateri metoda ustreza vsem zahtevanim kriterijem FDA za spodnjo mejo kvantifikacije.

4.4.2 Linearnost

Linearnost metode smo določali z umeritveno premico, s pomočjo katere smo izračunali vrednosti koncentracij levetiracetama v plazemskih standardih z znano koncentracijo. Izračunane vrednosti smo nato primerjali z dejanskimi in izračunali točnost oziroma odstotek ujemanja izračunanih vrednosti z dejanskimi vrednostmi. Slika 10 prikazuje umeritveni premici prvega dne validacije. Vsak dan smo izdelali umeritveno premico brez in z upoštevanjem internega standarda.



Slika 10: Umeritveni premici prvega dne validacije. Levo brez upoštevanja IS, desno z IS.

Enačbe premice brez upoštevanja IS:

- | | | |
|---------|-------------------------|----------------|
| 1. dan: | $y = 4,8174x + 0,2976,$ | $R^2 = 0,9998$ |
| 2. dan: | $y = 4,7975x + 0,0906,$ | $R^2 = 0,9999$ |
| 3. dan: | $y = 5,1858x - 1,95,$ | $R^2 = 0,9997$ |

Enačbe premice z upoštevanjem IS:

- | | | |
|---------|-------------------------|----------------|
| 1. dan: | $y = 0,011x - 0,0012,$ | $R^2 = 1$ |
| 2. dan: | $y = 0,0111x - 0,0012,$ | $R^2 = 0,9999$ |
| 3. dan: | $y = 0,0101x + 0,0026,$ | $R^2 = 0,9995$ |

V preglednici VII so prikazani odzivi levetiracetama in internega standarda v standardnih plazemskih vzorcih za vse tri dni validacije.

Preglednica VII: Odzivi levetiracetama in IS v standardnih plazemskih vzorcih

C ($\mu\text{g/mL}$)	Odziv analita (površina)					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	leve	IS	leve	IS	leve	IS
0,00	0,00	450	0,00	439	0,00	483
2,00	9,60	446	9,90	440	11,8	495
5,01	24,0	447	23,4	435	24,8	492
10,01	47,7	448	46,7	429	50,9	491
20,02	94,9	440	94,7	433	100	514
50,05	241	436	240	437	258	489
66,73	330	448	327	434	335	495
100,1	482	441	481	437	513	518
133,5	640	437	637	430	698	517

V preglednici VIII je prikazana točnost umeritvene premice.

Preglednica VIII: Točnost odzivov levetiracetama brez in z upoštevanjem IS

C ($\mu\text{g/mL}$)	Točnost (%)					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	leve	z IS	leve	z IS	leve	z IS
0	-	-	-	-	-	-
2,00	96,4	103	102	95,8	94,8	105,8
5,01	98,2	99,8	96,9	94,6	87,9	95,1
10,0	98,2	97,8	96,9	96,9	94,2	100
20,0	98,0	98,7	98,5	97,8	94,7	95,7
50,1	99,7	101	99,9	98,7	98,5	104
66,7	102	101	102	101	96,3	98,1
100,1	100	100	100	98,9	98,5	98,1
133,5	100	100	99,5	100	101	100

Metoda je vse tri dni validacije ustrezala FDA zahtevam za določanje linearnosti.

4.4.3 Točnost

Točnost metode smo določali z analizo QC vzorcev. FDA smernice predpisujejo, da povprečna vrednost petih meritev posameznega nivoja QC vzorca ne sme odstopati za več kot 15% od dejanske oziroma za več kot 20% pri spodnji meji kvantifikacije.

V preglednici IX so izračunane točnosti na podlagi QC vzorcev brez upoštevanja internega standarda. Pri dveh QC vzorcih, ki sta bila pripravljena tretji dan validacije rezultat meritve ni podan, ker tema dvema vzorcema pomotoma ni bil dodan IS.

Preglednica IX: Točnost metode brez upoštevanja internega standarda

c (5,01 µg/mL)			c (24,6 µg/mL)			c (77,0 µg/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
102	102	92,9	102	104	101	103	105	101
98,6	106	92,5	104	106	101	102	107	101
104	104	93,7	102	109	100	103	107	103
100	105	92,9	104	110	101	/	113	99,8
102	106	89,5	102	110	98,1	/	110	96,0
Povprečna vrednost								
102	105	92,3	103	108	100	103	109	100

Točnost metode brez upoštevanja IS je ustrezala predpisu FDA smernic vse tri dni validacije.

V preglednici X so izračunane točnosti na podlagi QC vzorcev z upoštevanjem internega standarda. Pri dveh QC vzorcih, ki sta bila pripravljena tretji dan validacije rezultat meritve ni podan, ker tema dvema vzorcema pomotoma ni bil dodan IS.

Preglednica X: Točnost metode z upoštevanjem internega standarda

c (5,01 µg/mL)			c (24,6 µg/mL)			c (77,0 µg/mL)		
1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan	1.dan	2.dan	3.dan
98,3	96,5	94,7	101	94,8	104	99,6	94,5	102
97,3	88,8	96,5	100	92,5	104	98,7	90,9	99,8
97,5	91,1	95,4	99,9	91,9	102	97,7	89,0	105
96,6	88,5	96,4	92,1	91,4	105	/	95,5	104
91,4	87,2	91,0	98,5	93,5	98,5	/	93,2	101
Povprečna vrednost								
96,2	90,4	94,8	98,3	92,9	103	98,7	92,6	102

Točnost metode z upoštevanjem IS je ustrezala predpisu FDA smernic vse tri dni validacije.

4.4.4 Ponovljivost metode

4.4.4.1 Znotrajdnevna ponovljivost

Za določanje znotrajdnevne ponovljivosti smo uporabili podatke meritev QC vzorcev prvega, drugega in tretjega dne validacije. Najnižjo koncentracijo smo označili s QCl, srednjo s QCm in visoko s QCh. Z uporabo površin odzivov levetiracetama oziroma razmerja odzivov levetiracetama in IS smo določili povprečno vrednost (AVG), standardni odklon (SD) in koeficient variacije (CV) za vsak dan validacije posebej. Določili smo znotrajdnevno ponovljivost brez in z upoštevanjem IS. Podatki izračunane znotrajdnevne ponovljivosti metode so prikazani v preglednicah XI in XII.

Preglednica XI: Podatki znotrajdnevne ponovljivosti metode brez upoštevanja IS

Dan validacije	QCl c (5,01 µg/mL)			QCm c (24,6 µg/mL)			QCh c (77,0 µg/mL)		
	AVG	SD	CV (%)	AVG	SD	CV (%)	AVG	SD	CV (%)
1.	24,8	0,489	1,98	122	1,42	1,16	382	2,33	0,611
2.	25,2	0,427	1,69	127	2,99	2,35	401	11,4	2,83
3.	25,9	0,428	1,65	130	1,50	1,16	402	9,83	2,45

Preglednica XII: Podatki znotrajdnevne ponovljivosti metode z upoštevanjem IS

Dan validacije	c (5,01 µg/mL)			c (24,6 µg/mL)			c (77,0 µg/mL)		
	AVG	SD	CV (%)	AVG	SD	CV (%)	AVG	SD	CV (%)
1.	0,0542	0,00151	2,79	0,267	0,00957	3,59	0,837	0,00798	0,954
2.	0,0515	0,00206	3,99	0,255	0,00366	1,44	0,793	0,0225	2,84
3.	0,0503	0,00113	2,24	0,256	0,00632	2,47	0,795	0,0174	2,18

4.4.4.2 Meddnevna ponovljivost

Za določanje meddnevne ponovljivosti smo uporabili podatke meritev QC vzorcev prvega, drugega in tretjega dne validacije skupaj. Najnižjo koncentracijo smo označili s QCl, srednjo s QCm in visoko s QCh. Z uporabo površin odzivov levetiracetama oziroma razmerja odzivov levetiracetama in IS smo določili povprečno vrednost (AVG), standardni odklon (SD) in koeficient variacije (CV) za vse tri dni validacije skupaj. Določili smo meddnevno ponovljivost brez in z upoštevanjem IS. Rezultati meddnevne ponovljivosti metode so podani v preglednicah XIII in XIV.

Preglednica XIII: Meddnevna ponovljivost metode brez upoštevanja IS

Parameter	QCl	QCm	QCh
	c (5,01 µg/mL)	c (24,6 µg/mL)	c (77,0 µg/mL)
AVG	25,3	126	397
SD	0,641	3,87	12,3
CV (%)	2,53	3,06	3,09

Preglednica XIV: Meddnevna ponovljivost metode z upoštevanjem IS

Parameter	QCl	QCm	QCh
	c (5,01 µg/mL)	c (24,6 µg/mL)	c (77,0 µg/mL)
AVG	0,0519	0,259	0,804
SD	0,00224	0,00848	0,0250
CV (%)	4,32	3,27	3,11

4.4.5 Območje linearnosti

Metoda je linearna v koncentracijskem območju od 5,01 $\mu\text{g/mL}$ do 134 $\mu\text{g/mL}$. V tem koncentracijskem območju metoda ustreza zahtevam smernic FDA za točnost, ponovljivost in linearnost.

4.4.6 Izkoristek ekstrakcije

Izkoristek ekstrakcije pri posamezni koncentraciji levetiracetama (5,01 $\mu\text{g/mL}$, 24,6 $\mu\text{g/mL}$ in 77,0 $\mu\text{g/mL}$) smo izračunali tako, da smo odziv levetiracetama, ki smo ga izmerili v ekstrahiranem vzorcu delili z odzivom levetiracetama v neekstrahiranem vzorcu in množili s 100. Pri vsaki koncentraciji smo analizirali tri vzorce. Na enak način smo določili tudi izkoristek ekstrakcije IS. Izkoristki ekstrakcije so prikazani v preglednici XV.

Preglednica XV: Izkoristek ekstrakcije z metanolom

QC vzorec	QC1 5,01 $\mu\text{g/mL}$	QCm 24,6 $\mu\text{g/mL}$	QCh 77,0 $\mu\text{g/mL}$
Izkoristek ekstrakcije (%)	102 \pm 0,25	103 \pm 3,0	103 \pm 1,0
	IS		
	103 \pm 1,7		

4.4.7 Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ)

Kot spodnjo mejo kvantifikacije po FDA smernicah smo uporabili najnižjo koncentracijo iz umeritvene krivulje, ki ustreza zahtevam, da je odstopanje v točnosti manjše od 20% in da je hkrati odziv pri tej koncentraciji najmanj pet krat večji od odziva pri praznem vzorcu (če je le-ta prisoten). Spodnja meja kvantifikacije naše metode znaša tako 5,01 $\mu\text{g/mL}$.

4.4.8 Stabilnost plazemskih vzorcev po zamrzovanju in odtaljevanju

Stabilnost plazemskih vzorcev z levetiracetamom smo določili v skladu z FDA smernicami, ki določajo, da se stabilnost analita določa po izvedenih treh krogih zamrzovanja in odtaljevanja vzorca. V preizkus stabilnosti smo vključili tri alikvote nizkega in visokega koncentracijskega nivoja analita. V vsakem krogu zamrzovanja in odtaljevanja smo vzorce zamrzili za najmanj 12 ur, odtaljevanje vzorcev pa je potekalo spontano, pri sobni temperaturi. Stabilnost smo določili ločeno brez upoštevanja in z upoštevanjem internega standarda. Rezultati stabilnosti so prikazani v preglednicah XVI in XVII.

Preglednica XVI: Stabilnost vzorcev po zamrzovanju in odtaljevanju brez IS

Alikvot	QCl c (5,01 µg/mL)	QCh c (77,0 µg/mL)
1	5,33	82,1
2	5,33	82,1
3	5,15	81,4
AVG	5,27	81,9
SD	0,11	0,41
CV (%)	2,05	0,50
Razlika v koncentraciji z vzorcem, brez zamrzovanja in odtaljevanja (%)	+ 3,65	+ 3,39
Točnost vzorca analiziranega po treh krogih zamrzovanja in odtaljevanja (%)	105	106

Preglednica XVII: Stabilnost vzorcev po zamrzovanju in odtaljevanju z IS

Alikvot	QCl c (5,01 µg/mL)	QCh c (77,0 µg/mL)
1	4,39	67,7
2	4,35	70,1
3	4,29	69,8
AVG	4,35	69,2
SD	0,05	1,34
CV (%)	1,22	1,93
Razlika v koncentraciji z vzorcem, brez zamrzovanja in odtaljevanja (%)	- 9,84	- 8,97
Točnost vzorca analiziranega po treh krogih zamrzovanja in odtaljevanja (%)	87,7	89,9

4.4.9 Stabilnost osnovnih raztopin

Določili smo 7 dnevno stabilnost osnovnih vodnih raztopin levetiracetama in internega standarda (preglednica XIII). Stabilnost smo določili tako, da smo iz obeh osnovnih raztopin pripravili po tri vodne vzorce, ki so vsebovali enake koncentracije levetiracetama oziroma IS. Te vzorce smo takoj po pripravi analizirali, osnovni raztopini pa smo shranili v hladilniku pri

4 °C. Tako smo hranili osnovni raztopini tekom celotne validacije. Sedmi dan smo na enak način pripravili vodne vzorce iz obeh osnovnih raztopin in jim izmerili odzive.

Preglednica XIII: Stabilnost osnovnih raztopin levetiracetama in internega standarda

Alikvot	Levetiracetam		IS	
	1. dan	7.dan	1. dan	7.dan
1	943	953	2083	2084
2	944	955	2083	2093
3	945	956	2080	2084
AVG	944	954	2082	2087
SD	1,1	1,2	1,8	5,4
CV (%)	0,1	0,1	0,1	0,3
Razlika v odzivu (%)	+ 1,2		+ 0,3	

4.4.10 Post-preparativna stabilnost

Določili smo post-preparativno stabilnost plazemskih vzorcev levetiracetama. Ta stabilnost odraža stabilnost že pripravljenih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku HPLC analizatorja pri 4 °C, za čas, kolikor se predvideva, da bo v rutinski uporabi metode sama analiza serije vzorcev potekala. Po naši metodi traja analiza enega vzorca 12 minut, zato smo se odločili, da bomo analizirali 24-urno post-preparativno stabilnost vzorcev. Vzorce prvega dne validacije smo analizirali takoj po njihovi pripravi ter po njihovem 24-urnem hranjenju v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C. Rezultate post-preparativne stabilnosti smo podali v obliki izmerjenih vrednosti koncentracije levetiracetama v QC vzorcih po 24 urah, ločeno z in brez upoštevanja internega standarda. Podatki so prikazani v preglednicah XIX in XX.

Preglednica XIX: Post-preparativna stabilnost brez upoštevanja IS

Meritev	QCl c (5,01 µg/mL)	QCm c (24,6 µg/mL)	QCh c (77,0 µg/mL)
1	5,27	25,3	80,6
2	5,09	25,6	81,5
3	5,36	25,6	80,6
4	5,33	25,9	/
5	5,36	25,6	/
AVG	5,28	25,6	80,9
SD	0,11	0,19	0,51
CV (%)	2,16	0,78	0,63
Razlika v izmerjeni koncentraciji pri času 0 in po 24^h v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C (%)	+ 3,82	+ 1,29	+ 2,14
Točnost po 24^h v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C (%)	104	101	102

Preglednica XX: Post-preparativna stabilnost z upoštevanjem IS

Meritev	QCl c (5,01 µg/mL)	QCm c (24,6 µg/mL)	QCh c (77,0 µg/mL)
1	4,92	24,8	77,2
2	4,82	23,5	75,4
3	4,64	24,5	69,8
4	4,35	23,5	/
5	4,95	22,9	/
AVG	4,74	23,8	74,2
SD	0,25	0,81	3,83
CV (%)	5,19	3,38	5,17
Razlika v izmerjeni koncentraciji pri času 0 in po 24^h v avtomatskem vzorčevalniku pri 4°C (%)	- 1,75	- 1,33	- 2,49
Točnost po 24^h v avtomatskem vzorčevalniku pri 4°C (%)	94,5	96,9	96,2

5 RAZPRAVA

Razvili smo enostavno analizno metodo za kvantifikacijo levetiracetama v plazmi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z UV detekcijo. Osnova za razvoj metode je bila metoda, ki jo je razvila Continova s sodelavci (23). Osnovni problem metode po Continovi je, da za interni standard uporablja spojino UCB 17025 (α -2,2-trimetil-5-okso-1 piperidin acetamid), ki ni komercialno dostopna. Takšne metode torej ni mogoče neposredno uporabljati v praksi. Metoda, ki smo jo razvili uporablja komercialno dostopen interni standard. Priprava vzorca za analizo je enostavna in hitra.

5.1 Izbira internega standarda

Pri razvoju metode smo kot ustrezeni interni standard izbrali adenzin. Adenzin je ustrezal s stališča časa elucije (retencijski čas = 6,2 min), saj se je njegov kromatografski vrh umestil pred vrhom levetiracetama, na mesto brez prisotnih vrhov spojin iz matriksa vzorca. Adenzin je sicer endogena spojina, vendar je njena koncentracija v plazmi zanemarljivo nizka, približno 17 nM (22).

5.2 Priprava vzorcev z obarjanjem plazemskih proteinov

5.2.1 Prvi postopek priprave plazemskega vzorca

Prvi postopek priprave vzorca se je v času razvoja metode izkazal kot enostaven, učinkovit in neproblematičen. Da temu ni tako smo ugotovili po analizi podatkov prvih dveh dni validacije metode. Metoda je ustrezala validacijskim kriterijem smernic FDA le brez upoštevanja IS, z upoštevanjem IS pa ne. Pričakovali bi, da bodo rezultati z upoštevanjem IS boljši od rezultatov brez upoštevanja IS. Ker IS dodajamo vzorcu v vedno enaki količini, bi moral biti odziv IS v kromatogramu vedno enak. Po natančnejšem pregledu odzivov IS smo ugotovili, da je značilno nihanje odzivov IS odvisno od časa, ki je potekel v fazi po dodatku IS plazemskemu vzorcu in časom dodatka ledeno hladnega MeOH. Ključna ugotovitev je torej bila, da encimi, ki se nahajajo v plazmi, katalizirajo razgradnjo adenzina oziroma naš IS in da ta encimsko katalizirana razgradnja poteka zelo hitro. Končni sklep je bil, da je prvi postopek priprave plazemskega vzorca neustrezen.

5.2.2 Drugi postopek priprave plazemskega vzorca

Poiskati smo morali rešitev, ki bi še vedno omogočala uporabo adenzina kot IS, saj bi v nasprotnem primeru morali poiskati nov IS, kar pa bi bilo časovno zahtevno delo. Rešitev smo našli v drugem postopku priprave plazemskega vzorca, ki pa je le rahla modifikacija

prvega. Edina razlika je v zaporedju dodajanja MeOH in IS. Pri drugem postopku priprave dodamo v prvi fazi plazemskemu vzorcu ledeno hladno MeOH in mešamo na vorteksu 30 sekund. Na ta način denaturiramo in oborimo vse plazemske proteine, s tem inaktiviramo tudi encime, ki katalizirajo razgradnjo adenozeina. Šele nato sledi dodatek IS in ponovno mešanje na vorteksu 30 sekund. Z drugim postopkom priprave plazemskega vzorca je metoda uspešno prestala validacijo.

5.3 Kromatografija

Razvita metoda uporablja kromatografsko kolono Synergi Hydro RP, 250 x 4,6 mm 4 μ m. Čas analize je 12 minut in je razmeroma dolg, a je za eno minuto krajši od primerljive metode po Continovi. Glede na to, da smo s to kolono dosegli dobro ločbo kromatografskih vrhov bi bilo verjetno mogoče uporabiti tudi enako, vendar krajšo, 150 mm dolgo kolono. Takšne kolone nismo imeli na razpolago.

Uporabili smo UV detekcijo, brez derivatizacije levetiracetama, saj že sam absorbira svetlobo v UV območju. Valovna dolžina detekcije je 205 nm, kar skupaj z enostavno pripravo vzorca z obarjanjem proteinov, privede do velikega števila kromatografskih vrhov. UV detekcija in enostavna priprava vzorca, ki vključuje le obarjanje proteinov, sta s stališča razvoja metode oteževalni okoliščini, s stališča uporabnika razvite metode v rutinski uporabi pa je sama enostavnost prednost. Manjše število korakov v postopku pomeni manjšo verjetnost napake in krajši čas priprave vzorcev na analizo.

5.4 Validacija

Metodo smo validirali s pomočjo FDA smernic za določanje analitov v bioloških vzorcih. Določili smo točnost, ponovljivost, spodnjo mejo kvantifikacije, linearnost, območje linearnosti, učinkovitost ekstrakcije in določili stabilnost plazemskih vzorcev po treh krogih zamrzovanja in odtaljevanja, stabilnost osnovne raztopine levetiracetama in internega standarda ter stabilnost pripravljenih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku.

5.4.1 Selektivnost

Selektivnost metode smo preverili z analizo šestih plazemskih vzorcev šestih različnih zdravih preiskovancev. Pri enem vzorcu se je na retencijskem času levetiracetama pojavil vrh spojine iz matriksa vzorca. Odziv te spojine je bil zadosti velik, da smo v skladu s smernicami FDA morali spodnjo mejo kvantifikacije naše metode zvišati iz 2,00 μ g/mL na 5,01 μ g/mL.

5.4.2 Linearnost

Metoda je linearna v območju od 5,01 $\mu\text{g/mL}$ do 134 $\mu\text{g/mL}$, brez upoštevanja IS in z upoštevanjem IS.

5.4.3 Točnost

Točnost metode ustreza smernicam FDA, tako z upoštevanjem IS, kot tudi brez upoštevanja IS. Pri tem upoštevanje IS ni pripomoglo k večji točnosti.

5.4.4 Ponovljivost

Pri določanju znotrajdneve ponovljivosti metode se je metoda izkazala kot ponovljiva. Koeficient variacije je bil tako z upoštevanjem, kot tudi brez upoštevanja IS pod 4 %. Tudi meddnevna ponovljivost metode je bila znotraj zahtevanih meja. Ne glede na upoštevanje IS, koeficient variacije ni presegel 4,32 %.

Odlična ponovljivost metode z upoštevanjem IS izkazuje, da je bila pri prvi validaciji metode s prvim načinom priprave vzorca problematična ravno encimska razgradnja internega standarda, ki smo jo z drugim načinom priprave vzorca z dodajanjem IS po obarjanju proteinov z MeOH uspešno preprečili.

5.4.5 Izkoristek ekstrakcije

Ne glede na koncentracijo levetiracetama je izkoristek ekstrakcije vedno malo čez 100 %. Enako velja tudi za IS. To je verjetno posledica uporabljene valovne dolžine, ki smo jo izbrali za detekcijo. Pri 205 nm absorbira praktično skoraj vsaka sestavina matriksa plazemskega vzorca, ki se tekom postopka obarjanja proteinov z MeOH ni ločila od supernatanta. Takšna sestavina matriksa se torej lahko znajde na retencijskem času našega analita (levetiracetam oz. IS) in prispeva k lažno večjemu odzivu. Slednje se pri neekstrahiranem vzorcu ne more zgoditi, saj v njem ni matriksa vzorca (matriks je voda). Takšna razlaga je sicer mogoča, vendar se zavedamo, da je izmerjen 101 do 103 % izkoristek lahko posledica same točnosti in ponovljivosti metode.

5.4.6 Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ)

Spodnja meja kvantifikacije naše metode znaša 5,01 $\mu\text{g/mL}$. Vzrok za relativno visoko LLOQ je enostavna priprava vzorca, ki vključuje le obarjanje proteinov, v kombinaciji z nespecifično detekcijo. Glede na to, da je predlagana terapevtska plazemska koncentracija levetiracetama od 12 – 46 $\mu\text{g/mL}$, je LLOQ naše metode še vedno ustrezna (22).

5.4.7 Stabilnost plazemskih vzorcev po zamrzovanju in odtaljevanju

Kot je razvidno iz tabel XVI in XVII, zamrzovanje in odtaljevanje plazemskih vzorcev pred analizo vpliva na točnost določanja koncentracije levetiracetama. V primeru, da določamo koncentracijo levetiracetama brez upoštevanja IS, določimo po treh zaporednih krogih zamrzovanja in odtaljevanja za približno 3,5 % višjo koncentracijo levetiracetama. Če pa upoštevamo IS pa za približno 10 % nižjo koncentracijo, kot bi jo določili pred opravljenimi krogi zamrzovanja in odtaljevanja. Ne glede na upoštevanje IS pa je točnost kvantifikacije levetiracetama ustrezna tudi po treh krogih zamrzovanja in odtaljevanja.

5.4.8 Stabilnost osnovnih raztopin

Določili smo ustrezno stabilnost osnovne raztopine levetiracetama in internega standarda. Razlika v izmerjenem odzivu levetiracetama po sedmih dneh hranjenja osnovne raztopine pri 4 °C je znašala 1,2 %, pri IS pa je bila razlika 0,3 %.

5.4.9 Post-preparativna stabilnost

24-urna post-preparativna stabilnost pripravljenih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C je ustrezna, saj je točnost kvantifikacije levetiracetama po 24 urni inkubaciji pri 4 °C ustrezna. V primeru, da ne upoštevamo IS določimo po 24 urah v vzorcih od 1,3 do 3,8 % višjo koncentracijo levetiracetama. Če upoštevamo IS pa po 24 urah določimo od 1,3 do 2,5 % nižjo koncentracijo. Zaključimo lahko, da so pripravljene vzorci v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C stabilni najmanj 24 ur.

6 SKLEPI

V magistrski nalogi smo dosegli predhodno zastavljene cilje. Razvili smo enostavno in hitro HPLC metodo za kvantifikacijo levetiracetama v plazmi z UV detekcijo. Metoda vključuje enostavno pripravo vzorcev z obarjanjem proteinov z MeOH. Enak pristop uporabljajo tudi nekatere metode, podane v literaturi, vendar so pri njihovem razvoju avtorji uporabljali interni standard, ki ni komercialno dostopen (UCB 17025) (23).

Naš namen je bil, da na osnovi nekaterih objavljenih metod razvijemo metodo, ki bo uporabljala komercialno dostopen interni standard. Postavili smo si ustrezne hipoteze; da bo razvita metoda enostavna in zadosti občutljiva za TDM, da bo s stališča izvedbe primerna za rutinsko uporabo v praksi, da bo prestala validacijo po smernicah FDA in da bo s tem uporabna za terapevtsko spremljanje koncentracije levetiracetama v plazmi. Po zaključeni validaciji razvite metode ugotavljamo, da nismo nobene od na začetku postavljenih hipotez ovrgli. Sam razvoj metode pa kljub temu ni potekal brez težav. Razvita metoda uporablja kot interni standard adenzin, ki je endogena spojina, a je v plazmi prisotna v zanemarljivo nizki koncentraciji. S tega stališča ni problematičen, problem s katerim smo se srečali so encimi, ki ga po dodatku v plazemski vzorec izjemno hitro razgradijo. To smo ugotovili drugi dan validacije metode, ker rezultati meritev z upoštevanjem IS niso ustrezali smernicam FDA. Kljub tej ugotovitvi smo vztrajali na adenzinu kot IS, saj bi bilo iskanje novega IS časovno zahtevno. Težave s stabilnostjo adenozina smo rešili z ustrezno spremembo zaporedja dodajanja IS in MeOH v plazemski vzorec. Metodo smo ponovno validirali. Metoda je ustrezala vsem parametrom, ki smo jih vključili v validacijo. Predlagana terapevtska koncentracija levetiracetama v plazmi je 12-46 $\mu\text{g/mL}$ (24). Naša metoda omogoča kvantifikacijo levetiracetama v koncentracijskem območju 5,01 do 134 $\mu\text{g/mL}$.

7 LITERATURA

1. Tan TY, Lu CH, Chuang HY, Lin TK, Liou CW, Chang WN, Chuang YC. Long-term antiepileptic drug therapy contributes to the acceleration of atherosclerosis. *Epilepsia*, 2009, 50: 1579-86.
2. Kudin AP, Zsurka G, Elger CE, Kunz WS. Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy. *Experimental Neurology*, 2009, 218: 326-332
3. Fisher RS, Boas EW, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 2005, 46(4): 470-472.
4. McPhee JS, Hammer DG. Pathophysiology of Disease. An Introduction to Clinical Medicine. 6. izdaja. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, 2010, 14: 153-156.
5. Engel J Jr. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Research*, 2006, 70: 5-10.
6. DeLorenzo RJ, Garnett LK, Towne AR, Waterhouse EF, Boggs JG, Morton L, Choudhry MA, Barnes T, Ko D. Comparison of Status Epilepticus with Prolonged Seizure Episodes Lasting from 10 to 29 Minutes. *Epilepsia*, 1999, 40(2): 164-169.
7. Gastaut H. Classification of status epilepticus. V: DeLorenzo RJ, Garnett LK, Towne AR, Waterhouse EF, Boggs JG, Morton L, Choudhry MA, Barnes T, Ko D. Comparison of Status Epilepticus with Prolonged Seizure Episodes Lasting from 10 to 29 Minutes. *Epilepsia*, 1999, 40(2): 164-169.
8. LeDuc B. Antiseizure Drugs. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 6. izdaja. Williams, D. A.; Lemke, T. L. 2008, 521-541.
9. Porter RJ, Meldrum MS. Poglavje 24. Antiseizure drugs. V: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic & Clinical Pharmacology. 11. izdaja. New York: McGraw-Hill 2011. <http://www.accessmedicine.com/content.aspx?aID=4512294>. Datum dostopa: 12. 11. 2011.
10. Pucci V, Bugamelli F, Mandrioli R, Ferranti A, Kenndler E, Raggi MA. High-performance liquid chromatographic determination of Levetiracetam in human plasma: comparison of different sample clean-up procedures. *Biomedical Chromatography*, 2004, 18: 37-44.
11. <http://www.chemfinder.com/chembiofinder/Forms/Search/ContentArea/ChemBioVizSearch.aspx?FormGroupId=8&AppName=CHEMBIOFINDER&AllowFullSearch=true&KeepRecordCountSynchronized=false&SearchCriteriaId=6&SearchCriteriaValue=levetiracetam&CurrentIndex=0> . Datum dostopa: 14. 11. 2011.

12. Levetiracetam Actavis. Priloga I: Povzetek glavnih značilnosti zdravila. Evropsko javno poročilo o oceni zdravila (EPAR).
http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002355/WC500116596.pdf . Datum dostopa: 14. 11. 2011.
13. Griffin EA, Lowenstein DH. Pharmacology of abnormal electrical neurotransmission in the central nervous system. V: LeDuc B. Antiseizure Drugs. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 6. izdaja. Williams, D. A.; Lemke, T. L. 2008, 521-541.
14. Lyman BA. Therapeutic Drug Monitoring. Clinical Chemistry: Concepts and Applications. W. B. Saunders Company 1993, 438-453.
15. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, et al.: Antiepileptic drugs – best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategie. Epilepsia 2008, 49: 1239-76.
16. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentals of Analytical Chemistry. 8. izdaja. Belmont: Brooks/Cole 2004.
17. Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. 1. Izdaja. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana 2007.
18. http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_SI Datum dostopa: 28. 7. 2011.
19. Horvat M. Vpeljava izključitvene kromatografije (SEC) za vrednotenje proteinov. Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo 2011.
20. Guidance for industry, Bioanalytical method validation, U.S. Department of health and human services, Food and drug administration, Center for drug evaluation and research, Rockville, MD, maj 2001.
21. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Text on Validation of Analytical Procedures, Q2A, 1994; Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, 1996.
22. Hiroshi S, Masaharu N, Hideki S, Hironi M, Ichizo T, Eiji S, Fumihiko S, Kenji M, Yoshikazu K. Plasma Concentration of Adenosine during Normoxia and Moderate Hypoxia in Humans. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 1999; 159: 1014-1018.
23. Contin M, Mohamed S, Albani F, Riva R, Baruzzi A. Simple and validated HPLC-UV analysis of levetiracetam in deproteinized plasma of patients with epilepsy. Journal of Chromatography B 2008; 873: 129-132.

24. Leppik IE, Rarick JO, Walczak TS, Tran TA, White JR, Gumnit RJ. Effective levetiracetam doses and serum concentrations: age effects. *Epilepsia*, 2002, 43(7): 240.