

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BOŠTJAN GUŠTIN

## MAGISTRSKA NALOGA

Univerzitetni znanstveni podiplomski študij Biomedicina  
(znanstveno področje Farmacija)

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BOŠTJAN GUŠTIN

**RAZVOJ ANALIZNIH METOD ZA TERAPEVTSKO  
SPREMLJANJE KONCENTRACIJ LAMOTRIGINA IN  
NJEGOVEGA METABOLITA 2-N-GLUKURONIDA V  
PLAZMI IN KRVNIH MADEŽIH**

**DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODS FOR  
THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF LAMOTRIGINE  
AND ITS METABOLITE 2-N-GLUCORONIDE IN PLASMA  
AND DRIED BLOOD SPOTS**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Magistrsko naložko sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka, mag. farm.

Zahvaljujem se svoji družini, prijateljem in celotnemu osebju Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko za njihovo pomoč.

**Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka, mag. farm.

Ljubljana, januar 2014

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.  
Članica komisije: doc. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

VSEBINA

<b>1.</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>UVOD</b>	<b>4</b>
3.1.	EPILEPSIJA .....	4
3.1.1.	Epileptični napadi .....	4
3.1.2.	Terapevtski pristop .....	5
3.1.3.	AED in interakcije .....	9
3.1.4.	Spremljanje terapevtskih koncentracij AED .....	11
3.2.	LAMOTRIGIN .....	12
3.2.1.	Mehanizem delovanja .....	14
3.2.2.	Farmakokinetične lastnosti lamotrigina .....	14
3.2.3.	Farmakokinetične interakcije z drugimi zdravili .....	15
3.2.4.	Spremljanje plazemskih koncentracij lamotrigina .....	16
<b>4.</b>	<b>NAMEN DELA</b>	<b>17</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>18</b>
5.1.	MATERIALI .....	18
5.1.1.	Biološki materiali .....	18
5.1.2.	Standardi .....	18
5.1.3.	Reagenti in topila .....	19
5.2.	RAZTOPINE .....	19
5.3.	OBOGATENI BIOLOŠKI VZORCI .....	20
5.4.	APARATURE .....	21
5.5.	METODE .....	22
5.5.1.	Metoda določanja analitov iz krvne plazme s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem .....	22
5.5.2.	Metoda določanja analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem .....	25
5.5.3.	Metoda določanja analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije ultra visoke ločljivosti s tandemsko masno spektrometrijo .....	28
5.5.4.	Validacija analiznih metod .....	30

5.5.5.	Analiza vzorcev bolnikov .....	37
<b>6.</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>38</b>
6.1.	Metoda določanja analitov iz krvne plazme s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem .....	38
6.1.1.	Razvoj ekstrakcijske metode .....	38
6.1.2.	Razvoj metode tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z uporabo internega standarda.....	38
6.1.3.	Rezultati validacije analizne metode za določanje analitov iz plazme s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem ..	39
6.1.4.	Primerjava razvite metode z objavljenimi analiznimi metodami .....	44
6.1.5.	Rezultati meritev vzorcev bolnikov.....	45
6.2.	Metoda določanja analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem .....	46
6.2.1.	Razvoj ekstrakcijske metode tekoče-tekoče .....	46
6.2.2.	Razvoj ekstrakcijske metode na trdnem nosilcu.....	48
6.2.3.	Rezultati validacije analizne metode za določanja analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem ..	49
6.2.4.	Primerjava razvite metode z objavljenimi analiznimi metodami .....	54
6.2.5.	Rezultati meritev vzorcev bolnikov.....	54
6.3.	Metoda določanja analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije ultra visoke ločljivosti s tandemsko masno spektrometrijo.....	55
6.3.1.	Rezultati validacije analizne metode za določanje analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije ultra visoke ločljivosti s tandemsko masno spektrometrijo .....	56
6.3.2.	Primerjava razvite metode z objavljenimi analiznimi metodami .....	62
6.3.3.	Rezultati meritev vzorcev bolnikov.....	62
<b>7.</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>67</b>
<b>9.</b>	<b>PRILOGE.....</b>	<b>75</b>
9.1.	Reprezentativni kromatogrami analizne metode za določanje analitov v plazemskih vzorcih .....	75
9.2.	Reprezentativni kromatogrami analizne metode z UV detekcijo za določanje analitov v posušenih krvnih madežih .....	76

---

9.3. Reprezentativni kromatogrami analizne metode s tandensko masno spektrometrijo za določanje analitov v posušenih krvnih madežih.....	78
--	----

## 1. POVZETEK

V okviru magistrskega dela smo razvili tri občutljive, točne in natančne analizne metode za določevanje protiepiletične učinkovine lamotrigina in njegovega glavnega metabolita 2-N-glukuronida iz plazme in krvnih madežev. V eksperimentalnem delu naloge smo razvili in optimizirali postopek ekstrakcije analitov iz plazme in posušenih krvnih madežev ter kromatografsko analizno metodo.

Končni postopek ekstrakcije analitov iz plazme temelji naobarjanju proteinov z metanolom, čemur sledi separacija analitov s pomočjo tekočinske kromatografije z UV detektorjem (220 nm) na reverzno-fazni koloni Zorbax Eclipse XDB-C8. Analizna metoda je primerna za določanje obeh analitov iz 165 µL plazme v območju od 0,1 do 20 µg/mL za lamotrigin oziroma od 0,1 do 15 µg/mL za njegov metabolit.

Ekstrakcijo analitov iz DBS vzorcev smo izvedli na trdnem nosilcu Strata X-C®, saj z uporabo ekstrakcije tekoče-tekoče nismo uspeli ločiti lamotrigin 2-N-glukuronida od spojin iz biološke matrice v takšni meri, da bi jih lahko kvantificirali. Analite smo ločili od ostalih komponent vzorca s pomočjo reverzno-fazne kolone Gemini® C18 in jih določili z UV detektorjem, nastavljenim na 220 nm. S to analizno metodo lahko tako točno določamo oba analita iz 15 µL posušene krvi v območju od 1 do 20 µg/mL.

Nižjo mejo določljivosti analitov smo dosegli z uporabo tekočinske kromatografije ultra visoke zmogljivosti, sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo. Ločevanje analitov je potekalo na reverzno-fazni koloni Kinetex C18 z uporabo gradientne mobilne faze, sestavljene iz 0,1-odstotne raztopine mravljične kisline v vodi in acetonitrila. Analita in interni standard smo določili z metodo ESI-MS, pri čemer je bil ionizator nastavljen na pozitivni način. Z masno spektrometrijo smo uspeli točno določiti koncentracije analitov iz 10 µL vzorca posušene krvi v območju od 0,1 do 20 µg/mL.

**Ključne besede:** lamotrigin, metabolit, TDM, plazemski vzorci, DBS vzorci, tekočinska kromatografija, UV detektor, masna spektrometrija

## ABSTRACT

Three sensitive, accurate, and precise analytical methods were developed and validated for quantification of antiepileptic drug substance lamotrigine and its main metabolite 2-N-glucuronide from plasma and dried blood spots. In the experimental part of the thesis, development and optimization of sample preparation techniques for plasma and DBS samples, and chromatographic analysis are described.

The optimized extraction procedure of analytes is based on deproteinisation performed by methanol. The extracted analytes are analyzed by HPLC system with UV detection (220 nm) using Zorbax Eclipse XDB-C8 reverse phase column. The analytical method is suitable for determination of lamotrigine and its main metabolite from 165 µL of plasma in ranges from 0.1 to 20 µg/mL and 0.1 to 15 µg/mL, respectively.

Extraction of analytes from DBS samples was performed using solid phase extraction with Strata X-C® adsorbent. The use of liquid-liquid extraction did not provide suitable separation of lamotrigine 2-N-glucuronide from the biomatrix. Separation of analytes from other sample components was performed on the reverse phase HPLC column Gemini® C18. For their detection, UV detector set at 220 nm was used. This analytical method is suitable for accurate determination of both analytes from 15 µL DBS sample in ranges from 1 to 20 µg/mL.

Lower limit of detection was achieved by UHPLC-MS/MS method. For separation of analytes, Kinetex C18 column and gradient mobile phase consisted of 0.1% formic acid and acetonitrile were used. Analytes and internal standard were ionized by electrospray ion source operating in a positive ion mode. By the use of mass spectrometry, analytes were accurately determined in ranges from 0.1 to 20 µg/mL from 10 µL DBS sample.

**Keywords:** lamotrigine, metabolite, TDM, plasma sample, DBS sample, liquid chromatography, UV detector, mass spectrometry

## 2. SEZNAM OKRAJŠAV

AED	protiepileptično zdravilo (ang. antiepileptic drug)
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku (ang. atmospheric-pressure chemical ionization)
ATC	anatomsko-terapevtsko-kemični
ASTED	ang. automated sequential trace enrichment of dialysates
CV	koeficient variacije (ang. coefficient of variation)
DAD	detektor z diodnim nizom (ang. diode array detector)
DBS	posušeni krvni madeži (ang. dried blood spots)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FLD	fluorescenčni detektor (ang. fluorescence detector)
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration)
ESI	ionizacija z razprševanjem raztopin v električnem polju (ang. electrospray ionization)
GABA	$\gamma$ -aminomaslena kislina oz. gama-aminomaslena kislina
HLOQ	zgornja meja določljivosti
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IS	interni standard
LC	tekočinska kromatografija
LLOQ	spodnja meja določljivosti
LOD	meja zaznavnosti
ME	učinek matrice (ang matrix effect)
MRM	multirezidualna analiza (ang. multiple reaction monitoring)
MS	masni spektrometer
QC	kontrolni vzorec
SPE	ekstrakcija na trdnem nosilcu (ang. solid phase extraction)
UHPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke zmogljivosti
UGT	uridin difosfat glukuronozil transferaza
UV	ultravijolična svetloba
V/V	volumski odstotek
TDM	spremljanje plazemske koncentracije učinkovine (ang. therapeutic drug monitoring)

## 3. UVOD

### 3.1. EPILEPSIJA

Definicija epilepsije kot bolezni se nekoliko razlikuje od definicije klasične bolezni. Opredeljuje jo namreč množica bolezenskih znakov, ki izvirajo iz zelo različnih vzrokov in vodijo do čezmernega vzdraženja živčnih celic. Slovenski medicinski slovar jo definira kot kronično motnjo možganske funkcije, za katero so značilni ponavljajoči se napadi nezavesti ali motnje zavesti in motnje motoričnih, senzoričnih in psihičnih funkcij (1). Epilepsija se najpogosteje razvije pri otrocih in mladostnikih ter starostnikih.

Nenormalno delovanje možganov, ki spremlja epileptični napad, je lahko posledica poškodb glave, virusnih ali bakterijskih okužb možganov, možganskih tumorjev, možganskih kapi možganskih okvar pri novorojenčkih, ki nastanejo ob porodu, ter presnovnih bolezni. Vzroki pa so lahko tudi zastrupitve z zdravili in prenehanje uživanja mamil ali alkohola (2).

Odkrili so, da je lahko vzrok za nastanek epilepsije tudi genetska predispozicija. Epilepsijo tako povezujejo z mutacijo genov za transmembranske beljakovine, kot so ionski kanali (na primer kalcijevi kanali ali natrij-kalijevi kanali) (3).

#### 3.1.1. *Epileptični napadi*

Poznamo dve glavni skupini epileptičnih napadov, generalizirane in fokalne (parcialne), ter tretjo, kamor spadajo napadi, ki jih ne moremo definirati niti kot generalizirane niti fokalne. Vrsto napada določimo na podlagi možganskega dela, ki je žarišče napada, in na podlagi specifičnih lastnosti napada (obsežnost in hitrost širjenja napada iz točke žarišča).

Najpomembnejša značilnost generaliziranih napadov so izgube zavesti, ki so posledica prizadetosti večje površine možganov. Pri obliki s tonično-kloničnimi krči (*grand mal*) bolnikove mišice otrdijo in nenadzorovano trzajo, dihanje pa je neenakomerno. Po napadu je bolnik zmeden in se ga ne zaveda. Drugo obliko generaliziranih napadov poznamo pod imenoma absence in *petit mal*, je bolj prikrita, značilna pa je predvsem za otroke. Nezavest

traja do 30 sekund, bolnik pa ne kaže klasičnih znakov epileptičnega napada, saj se nenadzorovani mišični trzljaji ne pojavijo. Pri fokalnih napadih so motnje v področju možganov veliko manj obsežne. Bolniki navadno ostanejo pri zavesti, pojavijo pa se naslednji znaki: mravljinčenje, nehoteni gibi, tudi halucinacije (2).

Najhujša oblika generaliziranega epileptičnega napada je epileptični status. Gre za več kot petminutno izgubo zavesti ali pa za hitro si sledče napade, med katerimi bolnik sploh ne pride do zavesti (4).

### ***3.1.2. Terapevtski pristop***

Zdravljenje s protiepileptičnimi zdravili (AED) začnemo šele po drugem ali tretjem epileptičnem napadu. Vrsto zdravila določimo na podlagi različnih dejavnikov, ki upoštevajo individualne značilnosti bolnika, kot so starost, spol, oblika epilepsije, in značilnosti AED, kot so na primer mehanizem delovanja in neželeni učinki (5).

Od uspešnosti zdravljenja je odvisno, ali bo bolnik prejemal le eno protiepileptično zdravilo ali pa kombinacijo več protiepileptičnih zdravil. V splošnem velja, da moramo pred odločitvijo za zdravljenje z več protiepileptičnimi zdravili pretehtati možne farmakokinetične in farmakodinamične interakcije (interakcije med posameznimi zdravili, vpliv na jetrne funkcije, vezavo na plazemske proteine) (5).

Mehanizem nastanka epilepsije prav tako kot tudi način delovanja nekaterih AED še dandanes ni dokončno pojasnjen. Glavni mehanizmi delovanja so:

- inhibicija natrijevih in kalcijevih kanalov,
- odpiranje kalijevih kanalov,
- povečanje aktivnosti inhibitornega GABA-nergičnega sistema in
- zmanjšanje aktivnosti ekscitatornega glutamatnega sistema (6, 7).

Podrobni pregled mehanizmov delovanja za posamezne protiepileptične učinkovine prikazuje preglednica I.

## Preglednica I: Mehanizmi delovanja AED (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14)

Učinkovina	Inhibicija napetostno odvisnega $\text{Na}^+$ kanala	Inhibicija T tipa $\text{Ca}^{2+}$ kanala	Inhibicija ne T-tipa $\text{Ca}^{2+}$ kanala	$\uparrow$ aktivnosti GABA-nergičnega sistema	$\downarrow$ aktivnosti glutamatnega sistema	Odpiranje $\text{K}^+$ kanalov
<b>Blokatorji natrijevih kanalov</b>						
Eslikarbazepin	+++					
Fenitoin	+++		+	+		
Karbamazepin	+++			+	+	
Lakozamid	++					
Lamotrigin	+++		+	+	+	
Okskarbazepin	+++		+		+	
Rufinamid	+++					
<b>Učinkovime z več mehanizmi delovanja</b>						
Fenobarbital/primidon <sup>1</sup>	++		+	++	++	
Gabapentin	+		+	++		
Topiramat	++		+	++	++	
Valprojska kislina	++	+		++	+	
<b>GABA-nergične učinkovine</b>						
Klonazepam/diazepam	++		+	+++		
Stiripentol				+++		
Tiagabin				+++		
Vigabatrin				+++		
<b>Ostale učinkovine</b>						
Etosuksimid		+++				
Felbamat	+		+	+	++	
Levetiracetam			+	++		
Perampanel					+++	
Pregabalin			+++			
Retigabin						+++
Zonisamid	++	++				
<b>Legenda:</b> + učinek, ki je oklevajoče opisan ali nastopal le ob odmerkih, ki so večji od terapevtskih ++ klinično pomembni učinek +++ dobro dokumentiran učinek, ki je v večini primerov nosilec antikonvulzivnega učinka						

Na mehanizem delovanja posameznih protiepiletičnih zdravil moramo biti še posebej pozorni, ko se odločamo za načrtovanje politerapije. Izsledki kliničnih raziskav na primer kažejo na prednost sočasne uporabe blokatorjev natrijevih kanalov in aktivatorjev GABA-nergičnega sistema. Takšna kombinacija daje boljši klinični odziv kot na primer sočasna uporaba dveh različnih blokatorjev natrijevih kanalov (6).

Ker še vedno ne poznamo natančnih mehanizmov delovanja niti ne vemo, v kolikšni meri vplivajo učinki posamezne učinkovine na celoten klinični odziv, se poslužujemo načela ocenjevanja učinka kombinacije zdravil. Tako so se kombinacije valprojske kisline in

<sup>1</sup> Fenobarbital je najpomembnejši aktivni metabolit primidona. Ni še mogoče določiti kolikšen delež učinkovitosti in toksičnosti nosi primidon in kolikšen delež nosi fenobarbital.

lamotrigina, valprojske kisline in karbamazepina, karbamazepina in gabapentina ter fenitoina in fenobarbitona izkazale za učinkovite pri zdravljenju epilepsije (6, 15).

V preglednici II navajamo seznam protiepileptičnih zdravil, ki smo jih razdelili na starejše (razviti pred letom 1990) in novejše protiepileptike (razviti po letu 1990) ter po kemizmu.

Preglednica II: Pregled AED iz Centralne baze zdravil Republike Slovenije

ATC klasifikacija	Starejši protiepileptiki	Novejši protiepileptiki
Barbiturati in njihovi derivati	Fenobarbital, metilfenobarbital in primidon	
Derivati hidantoina	Fenitoin in fosfenitoin	
Derivati sukcinimida	Etosuksimid	
Benzodiazepini	Klonazepam	
Derivati karboksamida	Karbamazepin	Eslikarbazepin, okskarbazepin in rufinamid
Derivati prostih maščobnih kislin	Valprojska kislina	Vigabatrin
Ostali protiepileptiki		Gabapentin, lakozamid, lamotrigin, levetiracetam, perampanel, pregabalin, retigabin, stiripentol, topiramat in zonisamid

**Opomba:** Izmed novejših učinkovin v Sloveniji nista prisotna felbamat in tiagabin.

Generacija starejših protiepileptičnih zdravil (v literaturi se označuje tudi kot prva generacija protiepileptičnih zdravil (16)) ima z vidika farmakokinetičnih lastnosti precej pomanjkljivosti. Če izpostavimo dve najpomembnejši: v veliki meri se vežejo na plazemske proteine in dajejo nelinearne farmakokinetične plazemske odzive. Ker se presnavljajo predvsem preko citokroma P450 in ga inducirajo, so zelo problematične tudi interakcije z drugimi učinkovinami, ki so substrati ali inhibitorji oz. induktorji teh encimov.

Terapevtsko uporabo protiepileptikov starejše generacije zato izpodrivajo novejše učinkovine. Če jih glede na farmakokinetične lastnosti primerjamo s starejšimi protiepileptiki, lahko izpostavimo nekaj bistvenih prednosti. Na plazemske proteine se vežejo v bistveno manjši meri (izjeme so perampanel, stiripentol in tiagabin). Imajo tudi veliko krajši razpolovni čas in se v manjši meri presnavljajo in imajo zato manj možnosti za interakcijo z drugimi učinkovinami. Najpomembnejše farmakokinetične lastnosti starejših in novejših protiepileptičnih zdravil predstavljamo v preglednicah III in IV.

Preglednica III: Farmakokinetične lastnosti starejših AED (17-23)

Učinkovina	Biološka uporabnost (%)	Vezava na proteine (%)	Biološka razpolovna doba (h)	Presnavljanje	Izločanje	TDM območje (mg/l)
Fenobarbital	≥ 95	55	70-140	Jetra: glukuronidacija in hidroksilacija	Z urinom (20-50 % nespremenjen)	10-40
Metilfenobarbital	≥ 95	40	100	Jetra: demetilacija in glukuronidacija	Z urinom (25 % nespremenjen)	Ni podatka
Primidon	≥ 90	10	7-22	Jetra: se pretvori v fenobarbital	Z urinom	5-10
Fenitoin	Odvisno od oblike	90	30-100	Jetra: se intenzivno presnavlja	Z urinom (2 % nespremenjen)	10-20
Etosuksimid	≥ 90	0	40-60	Jetra: se intenzivno presnavlja v neaktivne metabolite	Večji delež se počasi izloči z urinom ostalo z blatom	40-100
Klonazepam	90	82-86	30-40	Jetra: redukcija, N-acetiliranje in hidroksilacija in nato glukuronidacija	50-70 % z urinom in 10-30 % z blatom	0,02-0,07
Karbamazepin	85	70-80	36	Jetra: epoksidacija in druge poti	72 % z urinom, 28 % z blatom	4-12
Valprojska kislina	≈ 100	80-90 (odvisno od odmerka)	8-20	Jetra: se intenzivno presnavlja (glukuronidacija, β-oksidacija, ...)	Z urinom (30-50 % v glukuronirani obliki, 3% nespremenjen)	50-100

Preglednica IV: Farmakokinetične lastnosti novejših AED (17, 24-40)

Učinkovina	Biološka uporabnost (%)	Vezava na proteine (%)	Biološka razpolovna doba (h)	Presnavljanje	Izločanje	TDM območje (mg/l)
Eslikarbazepin (v obliki acetata)	> 90	30	< 2 (eslikarbazepin acetat) 10-20 (eslikarbazepin)	Jetra: hidroliza (eslikarbazepin), pretvorba v R-likarbazepin in okskarbazepin in nato glukuronidacija	Z urinom (60 % nespremenjen)	3-35 (eslikarbazepin)
Felbamat	> 90	25	16-22	Jetra: hidroksilacija v neaktivne metabolite	Z urinom (40-50 % nespremenjen)	30-60
Gabapentin	< 60	0	5-9	Se ne presnavlja	Z urinom	2-20
Lakozamid	100	< 30	13	Jetra: demetilacija (O-desmetilni metabolit) in druge poti	Z urinom (40% nespremenjen in 30% O-desmetilni metabolit)	10-20
Lamotrigin	≥ 95	55	15-35	Jetra: glukuronidacija v neaktivne metabolite	Z urinom (10 % nespremenjen)	2,5-15
Levetiracetam	≥ 95	0	6-8	Kri: hidroliza v neaktivne metabolite	Z urinom (66 % nespremenjen)	12-46
Okskarbazepin	100	60 (okskarbazepin) 40 (eslikarbazepin)	2 (okskarbazepin) 8-15 (eslikarbazepin)	Hitra in popolna pretvorba v aktivni metabolit eslikarbazepin	Z urinom (1 % nespremenjen)	3-35 (eslikarbazepin)
Perampanel	100	≈ 95	105	Jetra: močna oksidacija in nato glukuronidacija	30 % z urinom in 70 % z blatom	Ni še določeno
Pregabalin	≥ 90	0	5-7	Se ne presnavlja	Z urinom (nespremenjen)	Ni še določeno
Retigabin	60	80	8-10	Jetra: hidroliza/N-acetiliranje in nato glukuronidacija	84 % z urinom (36 % nespremenjen) in 14 % z blatom	Ni še določeno
Rufinamid	≥ 85	35	6-10	Jetra: hidroliza v neaktivni metabolit	85 % z urinom	30-40

Učinkovina	Biološka uporabnost (%)	Vezava na proteine (%)	Biološka razpolovna doba (h)	Presnavljanje	Izločanje	TDM območje (mg/l)
Stiripentol	≥ 70	99	4,5–13	Jetra: demetilacija in glukuronidacija	73 % z urinom in 13-24 % z blatom (nespremenjen)	Ni še določeno
Tiagabin	≥ 90	96	5-9	Jetra: Skoraj popolno se pretvori v neaktivne metabolite	25 % z urinom in 63 % z blatom	0.02-0.2
Topiramat	≥ 80	15	20–30	Delno se pretvori v neaktivne metabolite	Z urinom (40-50 % nespremenjen)	5-20
Vigabatrin	60-80	0	5–8	Se ne presnavlja	Z urinom (nespremenjen)	0.8-36
Zonisamid	> 90	40	50–70	Jetra: acetilacija, redukcija in nato glukuronidacija	Pretežno z urinom (30 % nespremenjen)	10-40

### 3.1.3. AED in interakcije

O farmakokinetičnih interakcijah govorimo, kadar neka učinkovina spremeni koncentracijo druge učinkovine in/ali koncentracijo njega metabolita. Farmakodinamične interakcije pa izražajo učinke na celični ravni in niso povezane s spremembo koncentracije učinkovine. Gre za interakcije med učinkovinami s podobnimi ali z nasprotnimi mehanizmi delovanja (24).

#### 3.1.3.1. Farmakokinetične interakcije

Glavne farmakokinetične interakcije se pokažejo v procesu presnavljanja. Najpomembnejša izmed metabolnih pretvorb je oksidativna presnova preko sistema citokroma P450. Gre za encimski sistem, ki ga najdemo v mitohondrijih in endoplazemskem retikulumu v skoraj vseh celicah našega organizma. Glavno mesto njegovega delovanja pa so jetra. Učinkovine, tudi protiepileptiki, lahko inducirajo ali inhibirajo različne izoencime sistema citokrom P450. V kolikšni meri bo izražen ta učinek pa je odvisno od odmerka učinkovine (24). Vplive protiepileptikov na sistem citokroma P450 navajamo v preglednici V. Oksidacija pod vplivom citokroma P450 je izrazita med drugimi tudi pri fenitoinu, karbamazepinu, tiagabinu in felbamatu. Protiepileptične učinkovine se presnavljajo tudi preko drugih mehanizmov. Lamotrigin, valprojska kislina in eslikarbazepin se konjugirajo z glukuronsko kislino, valprojska kislina tudi z  $\beta$ -oksidacijo.

Poleg interakcij med posameznimi AED so pomembne tudi interakcije z drugimi učinkovinami, ki interagirajo s sistemom citokroma P450. To so na primer peroralni kontraceptivi, kortikosteroidi, antibiotiki in antimikotiki.

#### Preglednica V: Vpliv AED na sistem citokrom P450 (15, 24)

AED	Presnavljanje	Izoencimi citokroma P450, ki so povezani z presnavljanjem AED							
		CYP1A2	CYP2A6	CYP2B	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2E1	CYP3A4
<b>Starčiji AED</b>									
Diazepam	Citokrom P450	Ni podatka	Ni podatka	Možni substrat	Ni podatka	Ni podatka	Substrat	Ni podatka	Substrat
Etosuksimid	Citokrom P450	Ni podatka	Ni podatka	Substrat	Ni podatka	Možni substrat	Ni podatka	Substrat	Substrat
Fenobarbiton	Citokrom P450	Induktor	Ni podatka	Induktor	Induktor	Možni substrat in induktor	Možni substrat in induktor	Substrat	Induktor
Fenitoin	Citokrom P450	Induktor		Induktor	Substrat	Možni substrat in induktor	Substrat in induktor		Induktor
Karbamazepin	Citokrom P450	Substrat in induktor			Substrat	Induktor	Možni induktor ali inhibitor		Substrat in induktor
Klobazam	Citokrom P450	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka
Klonazepam	Citokrom P450	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Substrat
Primidon	Citokrom P450	Induktor	Ni podatka	Induktor	Induktor	Možni substrat in induktor	Možni substrat in induktor	Substrat	Induktor
Valprojska kislina	Citokrom P450, glukuroniranje, $\beta$ -oksidacija		Substrat	Ni podatka	Ni podatka	Substrat in inhibitor	Substrat		Možni substrat in možni inhibitor
<b>Novejši AED</b>									
Eslikarbazepin (v obliki acetata)	Hidroliza in glukuroniranje				Ni podatka	Inhibitor	Inhibitor		Induktor (šibak)
Felbamat	Citokrom P450			Ni podatka	Ni podatka		Inhibitor	Substrat	Substrat in induktor
Gabapentin	Se ne presnavlja	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka
Lakozamid	Demetilacija						Substrat		
Lamotrigin	Glukuroniranje	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka
Levetiracetam	Nehepatična hidroliza			Ni podatka	Ni podatka				
Okskarbazepin	Glukuroniranje in hidroksiliranje eslikarbazepina, delno presnavljanje s citokromom P450	Ni podatka o možni indukciji	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka o možni indukciji	Inhibitor	Ni podatka o možni indukciji	Inhibitor
Perampanel	Oksidacija (citokrom P450) in glukuroniranje				Inhibitor (šibak) CYP2B6	Inhibitor (šibak)			Inhibitor (šibak)
Pregabalin	Se ne presnavlja	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka
Retigabin	Hidroliza/-acetiliranje in glukuronidacija		Ni podatka o možni indukciji	Ni podatka	Ni podatka o možni indukciji				
Rufinamid	Hidroliza	Ni podatka o možni indukciji	Ni podatka o možni indukciji	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka o možni indukciji			
Stiripentol	Demetilacija in glukuronidacija	Substrat in inhibitor	Ni podatka o možni indukciji	Ni podatka o možni indukciji	Ni podatka o možni indukciji	Inhibitor	Substrat in inhibitor	Ni podatka o možni indukciji	Substrat in inhibitor
Tiagablin	Citokrom P450	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Substrat
Topiramat	Citokrom P450, Glukuroniranje	Ni podatka o možni indukciji	Ni podatka o možni indukciji	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka o možni indukciji	Inhibitor	Ni podatka o možni indukciji	Ni podatka o možni indukciji
Vigabatrin	Se ne presnavlja	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka	Ni podatka
Zonisamid	Acetilacija, redukcija (citokrom P450) in glukuroniranje	Ni podatka o možni indukciji	Inhibitor	Ni podatka	Ni podatka	Inhibitor	Inhibitor	Inhibitor	Substrat, ni podatka o možni indukciji

### **3.1.3.2. Farmakodinamične interakcije**

Farmakodinamične interakcije so v primerjavi s farmakokinetičnimi bolj specifične, saj jih težje odkrijemo. Velikokrat se zgodi, da nanje pomislimo šele, ko izključimo vse farmakokinetične interakcije. Farmakodinamične interakcije so zaželene, kadar izboljšajo učinkovitost zdravljenja (v tem primeru govorimo o sinergizmu) in zmanjšajo neželene učinke.

Potencialni sinergistični učinki se pojavijo pri kombinaciji:

- valprojske kisline in etosuksimida,
- klonazepama in valprojske kisline,
- karbamazepina in valprojske kisline,
- tiagabina in vigabatrina,
- vigabatrina in lamotrigina,
- lamotrigina in topiramata,
- valprojske kisline in lamotrigina (15, 24).

Raziskovalci še niso potrdili, da so omenjeni sinergistični učinki posledica izključno farmakodinamskih interakcij, zato obstajajo domneve, da so v končne učinke morda vključene tudi farmakokinetične interakcije (24).

### **3.1.4. Spremljanje terapevtskih koncentracij AED**

Spremljanje terapevtskih koncentracij (TDM) protiepileptikov v plazmi nam omogoča individualno prilagoditev odmerjanja, kar se odrazi v povečani učinkovitosti zdravljenja. Poleg tega, da TDM pomaga vzpostaviti čim bolj izraženo protiepileptično delovanje, pa hkrati tudi omeji pojavljanje neželenih učinkov.

Vedeti moramo, da se za spremljanje plazemskih koncentracij odločimo le v primeru, ko odmerek ne korelira dobro z učinkom, ampak sta v ustrezнем odnosu učinek in plazemska koncentracija. Ugotovili so, da je uporaba te metode zaželena tudi, ko sta za protiepileptično učinkovino značilni veliki intra- in interindividualna farmakokinetična variabilnost (24).

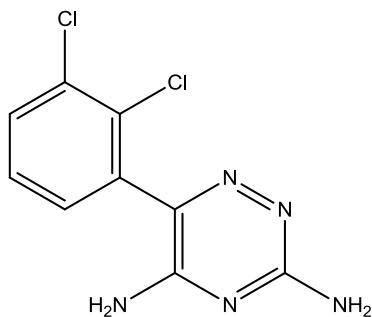
Za spremeljanje plazemskih koncentracij tradicionalno uporabljamo krvno plazmo, pridobljeno iz venske krvi. V zadnjih letih se je pojavila tudi alternativna metoda, t. i. metoda suhih madežev krvi (DBS), pri kateri se bolnik z lanceto zbode v prst in nato shrani kapljice krvi na posebne papirčke. Ta metoda priprave vzorca ima naslednje prednosti:

- Bolnik pripravi vzorce sam, zato ni potreben obisk bolnice ali laboratorija,
- Rezultati analiz so na voljo ob rednem pregledu pri zdravniku ali specialistu,
- Odvzem krvi je enostaven in bolniku prijazen,
- Pošiljanje vzorca v laboratorij ne predstavlja tveganja za biološko nevarnost,
- Posušena kri stabilizira mnoge učinkovine (41).

Vendar majhni volumni vzorcev krvi, pridobljeni z metodo suhih lis krvi, zahtevajo zelo občutljivo analitiko, kar omejuje uporabo te metode za rutinsko spremeljanje plazemskih koncentracij AED.

### **3.2. LAMOTRIGIN**

Lamotrigin (kemijsko ime je 6-(2,3-diklorofenil)-1,2,4-triazin-3,5-diamin) je novejši protiepileptik s širokim spektrom delovanja. Odkrili so ga med raziskovanjem derivatov fenitoina, ki bi zmanjšali ali blokirali presnavljanje folne kisline (42). Zato je tudi struktura lamotrigina podobna inhibitorjem dihidrofolat reduktaze.



Slika 1: Struktura lamotrigina

Lamotrigin je odobren za zdravljene epilepsije, kot dodatno zdravilo ali monoterapija za parcialne in generalizirane napade in napade, povezane z Lennox-Gastautovim sindromom, in tudi za zdravljenje bipolarnih motenj (29).

## Preglednica VI: Priporočeni režim odmerjanja lamotrigina za zdravljenje epilepsije (29)

	Priporočeni režim odmerjanja lamotrigina		
	1. in 2. teden	3. in 4. teden	Običajni vzdrževalni odmerek
Zdravljene epilepsije z monoterapijo pri odraslih osebah in mladostnikih od 13. leta naprej	25 mg/dan (enkrat na dan)	50 mg/dan (enkrat na dan)	100-200 mg/dan (enkrat na dan ali v dveh deljenih odmerkih) Odmerki se zvišujejo postopoma (za največ 50-100 mg na en do dva tedna). Nekateri bolniki so za želeni odziv potrebovali 500 mg/dan.
Zdravljene epilepsije z politerapijo z valproatom pri odraslih osebah in mladostnikih od 13. leta naprej	12,5 mg/dan (kot 25 mg vsak drugi dan)	25 mg/dan (enkrat na dan)	100-200 mg/dan (enkrat na dan ali v dveh deljenih odmerkih) Odmerki se zvišujejo postopoma (za največ 25-50 mg na en do dva tedna).
Zdravljene epilepsije z politerapijo z induktorji glukuronidacije lamotrigina pri odraslih osebah in mladostnikih od 13. leta naprej	50 mg/dan (enkrat na dan)	100 mg/dan (v dveh deljenih odmerkih)	200-400 mg/dan (v dveh deljenih odmerkih) Odmerki se zvišujejo postopoma (za največ 100 mg na en do dva tedna). Nekateri bolniki so za želeni odziv potrebovali 700 mg/dan.
Zdravljene epilepsije (napadov tipičnih absenc) z monoterapijo pri otrocih in mladostnikih od 2. do 12. leta starosti	0,3 mg/kg/dan (enkrat na dan ali v dveh deljenih odmerkih)	0,6 mg/kg/dan (enkrat na dan ali v dveh deljenih odmerkih)	1-10 mg/kg/dan (enkrat na dan ali v dveh deljenih odmerkih) Odmerki se zvišujejo postopoma (za največ 0,6 mg/kg/dan na en do dva tedna). Nekateri bolniki so za želeni odziv potrebovali večje odmereke (do 15 mg/kg/dan).
Zdravljene epilepsije z politerapijo z valproatom pri otrocih in mladostnikih od 2. do 12. leta starosti	0,15 mg/kg/dan (enkrat na dan)	0,3 mg/kg/dan (enkrat na dan)	1-5 mg/kg/dan (enkrat na dan ali v dveh deljenih odmerkih) Odmerki se zvišujejo postopoma (za največ 0,3 mg/kg na en do dva tedna). Največji vzdrževalni odmerek ne sme preseči 200 mg/dan.
Zdravljene epilepsije z politerapijo z induktorji glukuronidacije lamotrigina pri otrocih in mladostnikih od 2. do 12. leta starosti	0,6 mg/kg/dan (v dveh deljenih odmerkih)	1,2 mg/kg/dan (v dveh deljenih odmerkih)	5-15 mg/kg/dan (enkrat na dan ali v dveh deljenih odmerkih) Odmerki se zvišujejo postopoma (za največ 1,2 mg/kg na en do dva tedna). Največji vzdrževalni odmerek ne sme preseči 400 mg/dan.

**Opomba:** Učinkovine, ki pomembno inducirajo glukuronidacijo lamotrigina, so: fenitoin, karbamazepin, fenobarbiton, primidon, rifampicin, opinavir/ritonavir.

### ***3.2.1. Mehanizem delovanja***

Lamotrigin inhibira presinaptične napetostno odvisne natrijeve kanale in tako zmanjša sproščanje ekscitatornih aminokislín (glutamata in aspartata). V manjši meri tudi blokira napetostno odvisne kalcijeve kanale (predvsem tipa N in P/Q) (43). Potrebno je poudariti, da v celoti mehanizem delovanja še dandanes ni pojasnjen.

### ***3.2.2. Farmakokinetične lastnosti lamotrigina***

#### Absorpcija

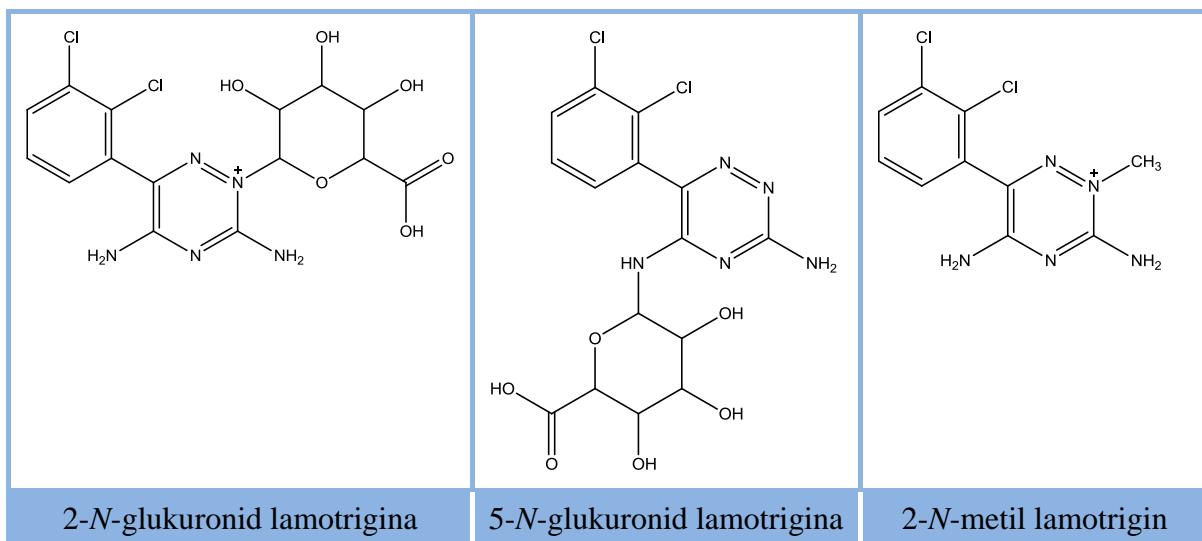
Lamotrigin se po peroralnem vnosu zelo hitro in v celoti absorbira iz prebavil. Najvišjo plazemsko koncentracijo dosežemo že med prvo in tretjo uro po zaužitju. Hrana nima vpliva na obseg absorpcije lamotrigina, a lahko povzroči rahel zamik pri doseganju najvišje plazemske koncentracije, ki se v stacionarnem stanju giblje med 3,45 in 9,44 µg/mL; podatek velja za zdrave odrasle osebe, po zaužitju odmerkov med 50 in 150 mg enkrat dnevno (43).

#### Porazdelitev

Po prehodu v kri se okoli 55 % učinkovine veže na plazemske proteine. O porazdeljevanju v različna tkiva imamo na voljo zelo malo informacij. Vendar pa dosedanji rezultati raziskav nakazujejo, da je koncentracija lamotrigina v cerebrospinalni tekočini primerljiva s koncentracijo nevezane učinkovine v krvi. Porazdeljevanje lamotrigina tako najenostavnejše opišemo s farmakokinetiko enoprostorskega modela z navideznim volumnom 1,14 L/kg in z izločanjem prvega reda (43).

#### Presnavljanje

Lamotrigin se presnavlja z vezavo glukuronske kisline v neaktivne metabolite. Ta proces omogočajo encimi UGT (UGT1A4 in UGT1A3), ki so prisotni v jetrih in tankem črevesju. Tako predstavlja 2-N-glukuronid glavni presnovni produkt (76 %) lamotrigina, medtem ko 5-N-glukuronid (10 %) in 2-N-metil lamotrigin (0,14 %) nastajata v manjši meri (slika 2) (43).



Slika 2: Znani metaboliti lamotrigina

Lamotrinin v zmerni meri inducira svojo lastno presnovo (za 17,3 % večji očistek pri dolgotrajni terapiji), pri čemer je ta učinek odvisen od odmerka (29).

### Izločanje

Lamotrinin se izloča preko ledvic. Le zelo majhen delež učinkovine (okoli 2 %) so določili v blatu. Navidezni plazemski očistek se giblje med 30 in 40 mL/min in razpolovni čas med 24 in 35 urami (43).

### Razmerje med odmerkom in plazemsko koncentracijo

Farmakokinetika lamotrigina je linearja do odmerka 450 mg, ki je največji preizkušeni posamični odmerek (29).

### **3.2.3. Farmakokinetične interakcije z drugimi zdravili**

Lamotrinin se zelo intenzivno presnavlja z glukuronidacijo, na katero močno vplivajo inhibitorni in indukcijski učinki drugih učinkovin. Tako zdravila, ki inducirajo encime (med protiepileptiki so to karbamazepin, fenitoin, fenobarbital, primidon in okskarbamazepin), povečajo plazemski očistek in zmanjšajo razpolovni čas lamotrigina. Nasprotni učinek imajo zdravila, ki inhibirajo encime (kot je valprojska kislina).

### ***3.2.4. Spremljanje plazemskih koncentracij lamotrigina***

Velika možnost interakcij z drugimi učinkovinami med presnavljanjem kot tudi nezanemarljiv delež vezane učinkovine na plazemske proteine sta le dva izmed razlogov, zaradi katerih je terapevtsko spremeljanje plazemskih koncentracij lamotrigina smiselno ob uvajanju novih zdravil bolniku. Vendar je uporaba TDM lahko smiselna že ob samem uvajanju lamotrigina, saj opazimo velike razlike med samim odmerkom in kliničnim učinkom. Tako so ob prihodu zdravila na trg priporočali plazemske koncentracije med 2 in 4 mg/L, medtem ko je danes uveljavljeno terapevtsko območje med 2,5 in 15 mg/L. Izrazita je interindividualna variabilnost. Tako lahko pri nekaterih starejših bolnikih opazimo plazemske koncentracije lamotrigina tudi do 18 mg/L, po drugi strani pa so poročali o primerih, v katerih so že koncentracije nad 1 mg/L povzročile neželene učinke (43). Izmed teh je potrebno izpostaviti izpuščaje na koži, ki so povezani s prehitrim uvajanjem lamotrigina in sočasnim zdravljenjem z valproatom (29). Zato je pri otrocih, kjer je incidenca nastanka tega neželenega učinka višja kot pri odraslih, uporaba TDM smiselna.

Del populacije, kjer lahko uporaba TDM pripomore k izboljšanju kliničnih učinkov, so tudi nosečnice. Med nosečnostjo pride v ženskem telesu do fizioloških sprememb, ki vplivajo na plazemsko koncentracijo lamotrigina. Zaradi upočasnitve praznjenja želodca in motilitete tankega črevesja, slabosti in bruhanja se zmanjša absorpcija zdravila. Zaradi večjega volumna krvi in zunajcelične tekočine ter zmanjšane vezave učinkovin se poveča distribucija. Povečata se tudi presnavljanje (reprodukтивni hormoni inducirajo encime UGT in citokrom P450) ter izločanje lamotrigina (povečan krvni pretok skozi ledvice in glomelunarna filtracija) (44, 45). Tako se povprečno plazemske koncentracije lamotrigina zmanjšajo za 68 %, kar lahko vodi v ponovni pojav epileptičnih napadov (46).

Podobno kot pri nosečnicah tudi pri starejši populaciji pride do fizioloških sprememb, ki vplivajo na plazemske koncentracije zdravil. Tako se običajno zmanjša plazemski očistek (za 20 do 30 %), če ga primerjamo z mlajšo odraslo populacijo (47). To lahko vodi do potrebe po optimizaciji odmerjanja lamotrigina pri nekaterih starejših bolnikih in s tem tudi do terapevtskega spremeljanja plazemskih koncentracij.

## 4. NAMEN DELA

Razvili bomo analizno metodo za določanje lamotrigina iz vzorcev krvne plazme. Poleg koncentracije same učinkovine bomo določali tudi koncentracijo njegovega primarnega metabolita, 2-N-glukuronida, ki bo omogočal vpogled v sam proces presnavljanja lamotrigina v bolniku in iskanju dejavnikov, ki na ta proces presnavljanja vplivajo. V ta namen bomo krvno plazmo obogatili z znano koncentracijo lamotrigina in lamotrigin 2-N-glukuronida. Analita bomo nato iz biološkega vzorca ekstrahirali s pomočjo najprimernejšega topila oziroma kombinacijo več topil. Vzorce bomo analizirali s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detekcijo. Razvoj nove metode bomo potrdili z validacijo. Uporabnost metode bomo potrdili z analizno vzorcev bolnikov, ki se zdravijo z lamotriginom.

Po razvoju analizne metode za določanje lamotrigina in njegovega primarnega metabolita iz krvne plazme bomo razvili analizno metodo za določanje analitov iz polne krvi s pomočjo vzorcev krvnih madežev. Za razvoj analiznih metod bomo uporabili polno kri, ki jo bomo obogatili z znanimi koncentracijami lamotrigina in lamotrigin 2-N-glukuronida tako kot pri krvni plazmi. Kri bomo nanesli na papirček, s katerega bomo nato analita ekstrahirali z najprimernejšim ekstrakcijskim topilom oziroma z uporabo ekstrakcije na trdnem nosilcu. V procesu optimizacije ekstrakcijskih metod bomo raziskali tudi vpliv različnih vrst DBS papirčkov. Po optimizaciji ekstrakcijskega postopka in metode tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem bo sledila validacija metode in aplikacija na krvne vzorce bolnikov zdravljenih z lamotriginom.

Sklepni del razvoja analiznih metod bo usmerjen k razvoju analizne metode s čim nižjo mejo določljivosti analitov, pri kateri bi lahko uporabili enako pripravo vzorca kot pri metodi za določanje koncentracije analitov v polni krvi. V ta namen bomo uporabili detekcijo s tandemsko masno spektrometrijo. Proučili bomo ustreznost pogojev priprave vzorcev, uporabljenih pri analizni metodi z UV detekcijo, in jih po potrebi optimizirali. V zadnjem koraku bomo metodo validirali in uporabili za analizo krvnih vzorcev bolnikov na terapiji z lamotriginom.

## 5. MATERIALI IN METODE

### 5.1. MATERIALI

#### 5.1.1. Biološki materiali

Plazemske vzorce in vzorce polne krvi, ki smo jih uporabili za pripravo obogatenih vzorcev, smo pridobili od zdravih prostovoljcev, vključenih v raziskovalni program »Razvoj analiznih metod za določanje učinkovin in njihovih metabolitov v človeški krvi«, ki ga je odobrila Komisija za medicinsko etiko Republike Slovenije (odločba št. 77/1/07).

Krvne vzorce bolnikov, ki se zdravijo z lamotriginom, smo pridobili iz klinične raziskave »Napovedni dejavniki za variabilnost farmakokinetike lamotrigina pri nosečnicah z epilepsijo«, ki jo je odobrila Komisija za medicinsko etiko (odločba št. 92/06/13).

#### 5.1.2. Standardi

Pri pripravi plazemskih vzorcev smo uporabili lamotrigin ( $C_9H_7Cl_2N_5$ ),  $M = 256,09$  g/mol, proizvajalca Sequoia Research Products Ltd. (Pangbourne, Združeno kraljestvo Velike Britanije in Severne Irske) in lamotrigin 2-N-glukuronid, ( $C_{15}H_{16}Cl_2N_5O_6$ ),  $M = 432,22$  g/mol, ki smo ga sintetizirali na Fakulteti za farmacijo. Pri pripravi krvnih vzorcev smo namesto lamotrigin 2-N-glukuronida, ( $C_{15}H_{16}Cl_2N_5O_6$ ),  $M = 432,22$  g/mol, ki smo ga pripravili Fakulteti za farmacijo uporabili standard proizvajalca Sussex Research (Ottawa, Kanada).

Kot interne standarde pri tekočinski kromatografiji, sklopljeni z UV detektorjem, smo uporabili:

- metformin ( $C_4H_{11}N_5$ ),  $M = 129.16$  g/mol,
- kloramfenikol ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ),  $M = 323,13$  g/mol,
- benzogvanamin ali 2,4-diamino-6-fenil-1,3,5-triazin ( $C_9H_9N_5$ ),  $M = 187,20$  g/mol,
- melamin ( $C_3H_6N_6$ ),  $M = 126.12$  g/mol,
- tiramin hidroklorid ( $C_8H_{11}NO \cdot HCl$ ),  $M = 173.64$  g/mol in
- 2,4-diamin-6-fenil-1,3,5-triazin ( $C_9H_9N_5$ ),  $M = 187.20$  g/mol,

ki smo jih naročili pri proizvajalcu Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija). Pri kromatografiji, sklopljeni s tandemskim masnim spektrometrom, smo uporabili lamotrigin, označen z izotopom C<sup>13</sup> ((<sup>13</sup>C)<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>C<sub>12</sub>N<sub>5</sub>), M = 259,07 g/mol, proizvajalca Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Kalifornija, ZDA).

### **5.1.3. Reagenti in topila**

Pri delu smo uporabili naslednje reagente in topila:

- Prečiščena voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore Corporation, Bedford, MA, ZDA),
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH) in acetonitril (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N), čistote »za kromatografijo« (Chromasolv®) proizvajalca Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija),
- Pufrske raztopine s pH 2, 3, 4, 6 in 7 proizvajalcev Kefo (Ljubljana, Slovenija) in Merck (Darmstadt, Nemčija),
- Trietilamin (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N) proizvajalca Merck (Hohenbrunn, Nemčija) in
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), mravljična kislina (HCOOH), 25-odstotni amonijak v vodi in 85-odstotna ortofosforna kislina proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija).

## **5.2. RAZTOPINE**

Iz omenjenih reagentov in topil smo pripravili raztopine fosfatnih pufrov, ki smo jih uporabili za pripravo mobilne faze:

- 25 mM fosfatni pufer s pH 2,0; 2,2; 2,5; 3,0 in 4,0,
- 25 mM fosfatni pufer s pH 3,5, ki vsebuje 0,17 % trietilamina (V/V),
- 0,45 mM fosfatni pufer s pH 3,5; 6,0 in 7,0, ki vsebuje 0,17 % trietilamina (V/V),

ter raztopine uporabljene pri ekstrakciji analitov iz biološke matrice:

- 4-odstotna fosforna kislina v vodi,
- 2-odstotna mravljična kislina v vodi (raztopina »spiranje 1«),

- Raztopina 25-odstotnega amonijaka v vodi in metanola v razmerju 1 : 4 (V/V) (začetna raztopina »elucija«),
- Raztopina 25-odstotnega amonijaka v vodi, metanola in acetonitrila v razmerju 2 : 3 : 5 (V/V/V) (končna raztopina »elucija«).

Osnovne raztopine standardov smo pripravili tako, da smo približno 1 mg lamotrigina ali internega standarda raztopili v ustrezeni količini metanola do končne koncentracije 1 mg/mL, in jo nato shranili v hladilniku pri 4°C. Osnovno raztopino 2-N-glukuronida lamotrigina smo pripravili na dva načina:

- 1 mg 2-N-glukuronid lamotrigina smo raztopili v 1 mL 60-odstotnega metanola v vodi (V/V),
- Posušeni liofilizat, dobljen pri biosintezi glukuronidov lamotrigina iz diplomske naloge Boštjana Piltaverja z naslovom »Določanje plazemskih koncentracij lamotrigina in njegovih metabolitov z validirano metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti«, smo raztopili v 2 mL 60-odstotnega metanola v vodi ( $c_{\text{lamotrigin 2-N-glukuronid}} = 173 \mu\text{g/mL}$ ).

Obe osnovni raztopini 2-N-glukuronid lamotrigina in tako pripravljeno osnovno raztopino smo shranili v zamrzovalniku pri -80°C.

### **5.3. OBOGATENI BIOLOŠKI VZORCI**

Obogatene plazemske vzorce smo pripravili tako, da smo 165 µL plazme dodali 20 µL razredčene osnovne raztopine lamotrigina, 15 µL razredčene osnovne raztopine lamotrigin 2-N-glukuronida ter 20 µL razredčene osnovne raztopine internega standarda oziroma metanola (priprava slepega vzorca).

Pri pripravi obogatenih krvnih vzorcev smo iz osnovnih raztopin lamotrigina in njegovega 2-N-glukuronida pripravili najprej razredčeno raztopino obeh standardov v metanolu v enakih koncentracijah. Nato smo tako pripravljeno razredčeno raztopino standardov dodali venski krvi v razmerju 1 : 10 (V/V). V primeru priprave slepega krvnega vzorca smo namesto razredčene raztopine standardov uporabili metanol.

## 5.4. APARATURE

Pri delu smo uporabili naslednji material in naprave:

- Plastične epruvete velikosti 0,5 mL; 1,5 mL in 2,0 mL proizvajalcev Eppendorf (Hamburg, Nemčija) in Sarstedt (Nümbrecht, Nemčija),
- Stekleni inventar različnih proizvajalcev: merilne bučke, čaše in valji različnih velikosti, tehtiči, HPLC viale in inserti za viale, presesalni buča in lij,
- Spatule, magneti za magnetna mešala, nastavki za pipete in parafinski film Parafilm® M proizvajalca Pechiney Plastic Packaging Company (Chicago, Illinois, ZDA),
- Celulozno acetatni filter velikosti por 0,45 µm proizvalca Sartorius AG (Göttingen, Nemčija),
- DBS papirčki Whatman 903, FTA DMPK-A, FTA DMPK-B in FTA DMPK-C proizvajalca Whatman, ki je del GE Healthcare (Piscataway, New Jersey, ZDA),
- SPE kartuša Strata-X-C, 33 µm, 60 mg / 3 mL, proizvajalca Phenomenex (Torrance, Kalifornija, ZDA),
- Hladilnik proizvajalca LTH (Škofja Loka, Slovenija),
- Zamrzovalnik za hlajenje pri -20°C proizvajalca Gorenje (Velenje, Slovenija) in zamrzovalnik za hlajenje pri -80°C model MDF-U50V proizvajalca Sanyo Electric Biomedical (Japonska),
- Tehnica AG 245 proizvajalca Mettler Toledo (Schwarzenbach, Švica) in tehnicka H 54 AR proizvajalca Mettler (Greinfansee, Švica),
- pH meter MA 5750 proizvajalca Iskra (Kranj, Slovenija),
- Magnetno mešalo HI 190M proizvajalca Hanna instruments (Póvoa de Varzim, Portugalska),
- Koncentrator in evaporator Turbovap® LV proizvajalca Caliper Life Sciences (Hopkinton, Massachusetts, ZDA),
- Mešalnik Vibromix 114EV proizvajalca Tehnica (Železniki, Slovenija),
- Ultrazvočna kadička Sonis 4 proizvajalca Iskra (Kranj, Slovenija),
- Polavtomatske pipete Eppendorf Research® in Eppendorf Research® plus velikosti 2-20 µL, 20-200 µL in 200-1000 µL proizvajalca Eppendorf (Hamburg, Nemčija),

- Vakuumska kadička s pokrovom in dvanajstimi mest za SPE kolone proizvajalca Macherey-Nagel (Düren, Nemčija),
- Oljna vakuumska črpalka DOA-P504-BN proizvajalca Gast Manufacturing (Benton Harbor, Michigan, ZDA)
- HPLC sistem Agilent technologies 1100 series z UV in FLD detektorjem proizvajalca Agilent technologies (Santa Clara, Kalifornija, ZDA),
- UPLC-MS/MS sistem Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole Jetstream® LC/MS proizvajalca Agilent technologies (Santa Clara, Kalifornija, ZDA),
- HPLC kolone Gemini® C6 Phenyl, 110 Å, 3 µm, 150 × 4,6 mm; Luna® C8 5 µm, 150 × 4,6 mm, in Gemini® C18, 5 µm, 150 × 4,6 mm proizvajalca Phenomenex (Torrance, Kalifornija, ZDA),
- LC kolona Kinetex™ C18, 50 × 2,1 mm, 2,6 µm proizvajalca Phenomenex (Cheshire, Združeno kraljestvo Velike Britanije in Severne Irske),
- HPLC kolona Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 µm, 150 × 4,6 mm, proizvajalca Agilent technologies (Santa Clara, Kalifornija, ZDA),
- HPLC kolona Chromolith® Performance RP-8, 100 × 4,6 mm, proizvajalca Merck Chemicals (Darmstadt, Nemčija),
- HPLC kolona Symmetry® C8 5 µm, 150 × 4,6 mm, proizvajalca Waters (Milford, Massachusetts, ZDA),
- HPLC predkolona Gemini® C18, 5 µm, proizvajalca Phenomenex (Torrance, Kalifornija, ZDA) in
- HPLC predkolona Opti-Guard® C8, 1 mm, proizvajalca Optimize Technologies (Oregon City, Oregon, ZDA).

## 5.5. METODE

### 5.5.1. Metoda določanja analitov iz krvne plazme s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem

Pri pregledu objavljenih raziskav lamotrigina iz krvne plazme ali seruma s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem smo ugotovili, da je večina

raziskovalcev določala lamotrigin kot edini analit (48-59) ali pa skupaj z drugimi protiepiletičnimi zdravili (60-66). Samo dva raziskovalca sta določala poleg lamotrigina tudi njegove metabolite (67, 68).

Raziskovalci so plazemske vzorce pripravljali s pomočjo ekstrakcije tekoče-tekoče (48-61, 63-65, 68), pri čemer so za odstranjevanje proteinov iz plazme uporabili različne obarjalne reagente, kot so metanol, acetonitril, etilacetat in druga. Le redko smo zasledili uporabo ekstrakcije na trdnem nosilcu (62, 66) ali druge metode (67).

Za analizo vzorcev je večina raziskovalcev uporabila metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z uporabo internega standarda (npr. kloramfenikola, gvanabenacetata, nortriptilina, BW725C78<sup>b</sup> ...). Za ločevanje analitov so uporabili različne kromatografske kolone (Symmetry® C18, Zorbax C8, LiChroCART-RP18e, ...) in različne mobilne faze (fosfatne pufre različnih pH v kombinaciji z organskimi topili kot so metanol, acetonitril ...).

#### 5.5.1.1. Razvoj ekstrakcijske metode

Zaradi enostavnosti postopka in hitre priprave vzorcev smo se tudi mi odločili za ekstrakcijo tekoče-tekoče. Kot izhodišče smo uporabili metodo, objavljeno v raziskavi z naslovom »Rapid HPLC analysis of the antiepileptic lamotrigine and its metabolites in human plasma« Saracina in sodelavcev (68), ki so uporabili metanol kot obarjalni reagent.

Tako smo vzorcem plazme, ki smo jim predhodno dodali analite, dodali ohlajeni metanol v razmerju 1 : 3 (V/V). Temu je sledilo intenzivno mešanje, kar je omogočilo prehod analitov iz vodne v organsko fazo. Obarjanje proteinov smo poskusili pospešiti z ohladitvijo vzorca na -70°C. Nato smo vzorec centrifugirali pri 5°C in hitrosti 16,000 obratov na minuto. Organsko fazo smo posušili v dušikovi atmosferi pri povišanem tlaku. Temu je sledilo še raztpljanje suhega vzorca v mobilni fazi.

Ker smo želeli postopek ekstrakcije poenostaviti smo proučevali različne čase obarjanja (0, 1, 3, 6 in 24 ur) kot tudi čas centrifugiranja (10, 15 in 20 minut).

---

<sup>b</sup> 3,5-diamino-6-(2-metoksifenil)-1,2,4-triazin

### 5.5.1.2. Razvoj metode tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z uporabo internega standarda

Kot interne standarde (IS) smo preizkusili kloramfenikol, gvanabenz acetat in metformin. Njihovo ustreznost smo vrednotili iz vidika ločitve kromatografskih vrhov, retencijskih časov in cenovne dostopnosti.

Za razvoj kromatografske metode smo uporabili vodne vzorce analitov, različne kromatografske kolone in mobilne faze na HPLC sistemu Agilent technologies 1100 series, sklopljenim z UV in FLD detektorjem. Proučevali smo sledeče kromatografske kolone:

- Gemini® C6 Phenyl, 110 Å, 3 µm, 150 × 4,6 mm,
- Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 µm, 150 × 4,6 mm in
- Chromolith® Performance RP-8, 100 × 4,6 mm.

Kot vodni del mobilne faze smo uporabili fosfatne pufre različnih pH vrednosti in ionskih moči ter dodajali trietilamin. Tako smo preizkušali sledeče pufre:

- 25 mM fosfatni pufer s pH 2,5; 3,0 in 3,5,
- 25 mM fosfatni pufer s pH 3,5 z 0,17 % trietilamina (V:V) in
- 0,45 mM fosfatni pufer s pH 3,5; 6,0 in 7,0 z 0,17 % trietilamina.

Kot organski del smo uporabili metanol, ki smo ga mešali z vodnim delom v razmerjih 20-40 % organske faze pri izokratskih metodah in 21-48 % organske faze pri gradientnih metodah.

Ker smo stremeli k čim krajšemu času analize smo preizkušali tudi različne pretoke mobilne faze (1,0; 1,2; 1,4 in 1,6 mL/min) in različne temperature kolone (30, 40, 45 in 50°C).

Odzive analitov smo zaznavali s pomočjo DAD detektorja pri valovnih dolžinah 220, 240, 250, 260 in 270 nm.

### **5.5.2. Metoda določanja analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem**

#### **5.5.2.1. Razvoj ekstrakcijske metode tekoče-tekoče**

Ker je objavljenih raziskav za določanje lamotrigina iz polne krvi s pomočjo vzorcev krvnih madežev zelo malo (69, 70), smo se pri razvoju ekstrakcijske metode iz DBS papirčkov opirali predvsem na pregledna članka, ki sta predstavila do tedaj objavljene raziskave vzorcev krvnih madežev (71, 72).

Razvoj postopka ekstrakcije smo pričeli s preizkušanjem ekstrakcije tekoče-tekoče. Vzorec polne krvi smo nanesli na DBS papirček in ga pustili posušiti čez noč. Nato smo posušen krvni madež izrezali in mu dodali ekstrakcijsko topilo. Raztpljanje analitov v topilu smo pospešili z mešanjem vzorca na mešalu na ekscenter. Nato smo vzorec centrifugirali in predpisano količino posušili v dušikovi atmosferi pri povišanem tlaku. Temu koraku je sledilo raztpljanje suhega vzorca v mobilni fazi s pomočjo mešanja na mešalu na ekscenter.

Pri optimizaciji postopka ekstrakcije smo proučevali vpliv različnih DBS papirčkov (Whatman 903, FTA DPMK-A, FTA DPMK-B in FTA DPMK-C) in različnih ekstrakcijskih topil. Tako smo preizkusili sledeča topila:

- 10 % vode v metanolu (V/V),
- 20 % vode v metanolu (V/V),
- metanol,
- 25 % acetonitrila v metanolu (V/V) in
- 0,1-odstotna vodna raztopina metanojske kisline in metanol v razmerju 1 : 9 (V/V).

Proučevali smo tudi vplive volumna ekstrakcijskega topila (500, 750 in 1000 µL), ekstrakcijskega časa (15, 30 in 60 minut) in časa intenzivnega mešanja na mešalu na ekscenter (3, 5 in 10 minut).

### **5.5.2.2. Razvoj metode tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z uporabo internega standarda**

Ker kromatografski pogoji, razviti za določanje analitov iz krvne plazme, niso bili več primerni zaradi drugačne sestave biološke matrice, smo morali razviti novo kromatografsko metodo.

Pri iskanju ustrezne kromatografske kolone smo se osredotočili na kolone C8 in C18, namenjene reverzno-fazni kromatografiji. Tako smo preizkusili sledeče kolone:

- Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 µm, 150 × 4,6 mm,
- Symmetry® C8 5 µm, 150 × 4,6 mm,
- Luna® C8 5 µm, 150 × 4,6 mm in
- Gemini® C18, 5 µm, 150 × 4,6 mm.

Pri iskanju optimalne sestave mobilne faze smo se opirali na izkušnje pridobljene pri razvoju kromatografskih pogojev za določanje analitov iz krvne plazme. Preizkusili smo 25 mM fosfatni pufer različnih pH vrednosti (2,0; 2,2; 2,5; 3,0 in 4,0) in ga mešali z metanolom v razmerjih 18-25 % organske faze. Pretok mobilne faze smo ohranjali konstanten (1 mL/min).

Retencijske čase analitov in čas analize smo poskušali skrajšati s povišanjem temperature kolone (sobna temperatura in 55°C) in iskanjem novega internega standarda, ki bi se eluiral med kromatografskima vrhovoma lamotrigina in njegovega 2-N-glukuronida. Tako smo proučevali melamin, tiramin hidroklorid in 2,4-diamin-6-fenil-1,3,5-triazin.

### **5.5.2.3. Razvoj ekstrakcije na trdnem nosilcu**

Pri izboru primerenega trdnega nosilca smo uporabili program Strata Sample Preparation Method Development Software (version 1.x) podjetja Phenomenex Inc. Program je na osnovi fizikalno-kemijskih lastnosti obeh analitov priporočil uporabo mešanega reverznofaznega ionsko-izmenjevalnega SPE adsorbenta Strata X-C® proizvajalca Phenomenex.

Pri ekstrahiranju analitov z DBS paprička smo uporabili izkušnje iz ekstrakcije tekoče-tekoče. Zato smo kot primerno ekstrakcijsko topilo ohranili metanol, ki smo mu dodali interni standard. Vzorec smo po dodatku 0,5 mL ekstrakcijskega topila pustili stati 30 minut. Po intenzivnem mešanju na mešalu na ekscenter za 1 minuto smo raztopini dodali 1,5 mL 4-odstotne raztopine fosforne kisline. Prehod analitov z DBS paprička smo pospešili z uporabo mešala na ekscenter za 1 minuto in uporabo ultrazvočne kopeli za 15 minut. Sledila sta 10-minutno centrifugiranje pri hitrosti 16,000 obratov na minuto pri sobni temperaturi in separacija analitov s pomočjo SPE kartuše (preglednica VII). Zbrani eluat smo posušili v dušikovi atmosferi pri povišanem tlaku in tako dobljeni suhi vzorec raztopili v mobilni fazi.

Preglednica VII: Osnovni postopek separacije s SPE kartušo Strata X-C

Kondicioniranje	omočenje kartuše z 2 mL metanola ekvilibracija z 2 mL prečiščene vode
Nanos	1,8 mL vzorca
Spiranje 1	1 mL 2-odstotne mravljične kisline (V:V)
Spiranje 2	1 mL metanola
Sušenje	1 min pri podtlaku 5 mm Hg
Elucija	1 mL raztopine 25-odstotnega amonijaka v vodi in metanola v razmerju 1 : 4 (V/V)

Pri optimizaciji ekstrakcije smo proučevali vpliv pospeševanja razapljanja analitov v ekstrakcijskem topilu s pomočjo intenzivnega mešanja s pomočjo mešala na ekscenter ob različnih fazah ekstrakcije in količino (1 in 2 mL) in sestavo elucijske raztopine (raztopina 25-odstotnega amonijaka v vodi in metanola v razmerju 1 : 4 z ali brez dodanega acetonitrila) pri ekstrakciji analitov s SPE kartušo.

#### 5.5.2.4. Razvoj metode tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z internim standardom

Uporabili smo kolono Gemini® C18, 5 µm, 150 × 4,6 mm in mešanico metanola in 25 mM fosfatnega pufra pH 3,0 kot mobilno fazo. Metodo smo optimizirali z iskanjem primernega gradiента mobilne faze, ki bi omogočala kraši čas analize ob ustreznih ločitvih kromatografskih vrhov analitov in internega standarda od kromatografskih vrhov spojin iz biološke matrice.

### **5.5.3. Metoda določanja analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije ultra visoke ločljivosti s tandemsko masno spektrometrijo**

Pri razvoju metode UHPLC-MS/MS smo za pripravo vzorca uporabili končno optimizirano metodo ekstrakcije na trdnem nosilcu. Ker smo s poskusi potrdili, da je tako pripravljen biološki vzorec primeren, smo se pri razvoju metode določanja analitov iz polne krvi usmerili predvsem v iskanje optimalnih pogojev kromatografije in nastavitev masnega detektorja.

Za dokončni razvoj in validacijo metode smo uporabili UHPLC Agilent 1290 Infinity in masni detektor Agilent 6460 vrste trojni kvadrupol proizvajalca Agilent Technologies. Kromatografski del sistema Agilent 1290 Infinity je sestavljen iz vakuumskega razplinjevalca, binarne črpalke, avtomatskega vzorčevalnika, termostata za kolono in UV detektorja DAD. Ločevanje analitov smo izvedli na reverzno-fazni koloni Kinetex C18, 50 × 2,1 mm in z 2,6 µm delci proizvajalca Phenomenex pri temperaturi 50°C. Mobilna faza je bila sestavljena iz dveh topil. Topilo A je predstavljala 0,1-odstotna raztopina mravljične kisline v prečiščeni vodi, medtem ko je topilo B predstavljal acetonitril. Elucija je bila gradientna z odstotki topila B in s pretoki, kot so navedeni v preglednici VIII.

Pred analizo so vzorci stali v avtomatskem vzorčevalniku, hlajenem na 5°C. Injicirali smo 1,0 µL vzorca. Po injiciranju smo zunanjost vzročevalne igle spirali 8 sekund z 80-odstotno raztopino metanola. Skupni čas analize vzorca je skupaj z re-ekvilibracijo znašal 2,2 minuti. Ker smo želeli zaščititi masni spektrometer pred neželenimi komponentami vzorca (npr. solmi, peptidi in lipidi), je bil tok mobilne faze usmerjen v masni detektor le med časoma 0,7 minute in 1,3 minute.

Preglednica VIII: Program gradientne elucije za kromatografsko separacijo lamotrigina in njegovega 2-N-glukuronida

Čas [min]	Pretok [mL/min]	% topila B
0,15	0,65	5
0,25	0,65	5
0,70	0,65	30
1,00	0,65	60
1,50	0,65	60
1,70	0,65	5
2,00	0,65	5

Kromatografski sistem je bil sklopljen z Agilentovim masnim analizatorjem 6460 QQQ in ionskim izvorom z elektrorazprševanjem JetStream®, ki je bil nastavljen na pozitivni način. Nekateri pomembnejši parametri masnega detektorja so podani v preglednici IX.

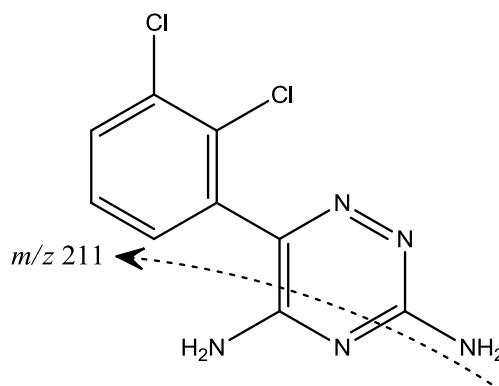
Preglednica IX: Nastavitev masnega spektrometra

Temperatura in pretok sušilnega plina	275°C, 5 L/min
Tlak nebulizacijskega plina	45 psi (0,31 MPa)
Temperatura in pretok plaščnega plina (ang. sheath gas)	320°C, 11 L/min
Napetost na kapilari	4000 V
Napetost na šobi (ang. Nozzle voltage®)	1000 V
Ločljivost na prvem kvadrupolu	»wide« oziroma 1,2 amu
Širina masne ločljivosti na tretjem kvadrupolu	»wide« oziroma 1,2 amu
Čas vzorčenja enega kanala (ang. dwell time)	25 ms
Polarnost ionizacije	pozitivna

Kvantifikacijo analitov smo izvedli s pomočjo programske opreme MassHunter Workstation B.04.01 proizvajalca Agilent Technologies. Uporabili smo multirezidualno analizo (MRM), pri kateri spremljamo več starševskih in hčerinskih ionov. Masne prehode, kolizijske energije ter napetosti fragmentorja smo za vsak analit določili s pomočjo orodja Optimizer, ki je del programske opreme MassHunter (preglednica X).

Preglednica X: Pogoji MRM prehodov, napetost fragmentorja in kolizijska energija

	MRM $m/z$ prehodi [amu]	Napetost fragmentorja [V]	Kolizijska energija [eV]
Lamotrigin 2-N-glukuronid	432,1 → 256,1	90	21
Lamotrigin	256 → 211	170	25
Lamotrigin $^{13}\text{C}_3$	259,1 → 145	170	37



Slika 3: Predvidena fragmentacija ionizirane oblike lamotrigina, ki daje produktni ion z  $m/z$  211 (73)

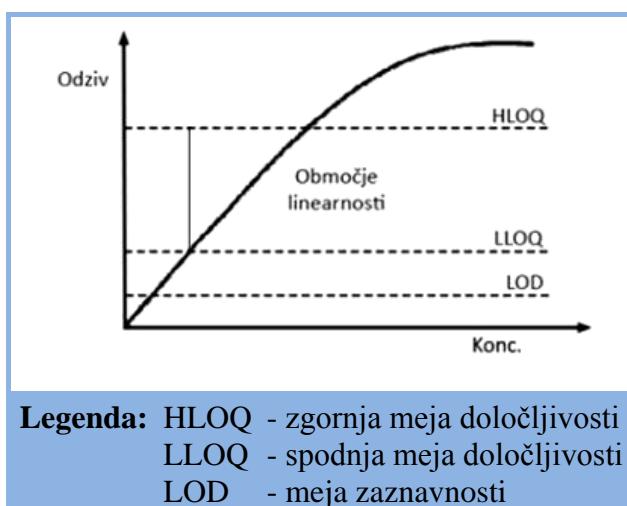
### 5.5.4. Validacija analiznih metod

Validacijo analizne metode smo izvedli skladno s priporočili Ameriške agencije za hrano in zdravila FDA (74). Ocenjevali smo točnost, ponovljivost, specifičnost, linearost, mejo določljivosti in stabilnost. Poleg FDA-jevih smernic za validacijo bioanalizne metode smo v sklopu validacije ocenili tudi izkoristek ekstrakcije ter v primeru metode UHPLC-MS/MS še učinek matrice. Pri ocenjevanju teh dveh parametrov smo se opirali na postopke in navodila raziskovalca Matuszewskega (75, 76).

#### 5.5.4.1. Selektivnost, linearost in meja določljivosti

**Selektivnost** je sposobnost analizne metode, da loči analit od ostalih komponent, prisotnih v vzorcu, in tako omogoča njegovo določanje (74). Da bi potrdili selektivnost analizne metode, smo analizirali slepo plazmo ozziroma kri in proučili kromatogram, ali se ob retencijskem času analita pojavijo kakšne moteče substance (morebitne endogene komponente biološkega vzorca, razpadni produkti analitov ...).

Za določanje koncentracije analitov v vzorcih potrebujemo umeritveno ozziroma kalibracijsko krivuljo, ki jo sestavimo za vsak analit posebej. Kalibracijsko območje predstavlja pričakovane koncentracije analita v vzorcih. Za to območje želimo, da je odziv inštrumenta ozziroma detektorja neposredno sorazmeren koncentraciji analita v vzorcu in temu pravimo območje linearnosti analizne metode (slika 4).



Slika 4: Hipotetični graf odziva inštrumenta v odvisnosti od koncentracije analita (77)

**Občutljivost** predstavlja sposobnost analizne metode, da razlikuje med majhnimi razlikami v koncentracijah analita v vzorcu. Pri umeritveni krivulji to lastnost analizne metode ponazarja naklon premice.

Umeritveno krivuljo smo pripravili vsak dan tri-dnevne validacije posebej. Za določanje umeritvene krivulje smo pripravili in določili odzive slepega vzorca in vsaj šestih koncentracij kalibratorjev, izbranih skozi celotno kalibracijsko območje. Umeritveno krivuljo je predstavljal graf odvisnosti površine vrha analita (relativno glede na IS) od koncentracije analita. Podatke smo analizirali s pomočjo linearne regresije in po metodi najmanjših kvadratov določili enačbo umeritvene premice (enačba 1).

$$\text{Odziv} = b \times \text{konc.} + a \quad (1)$$

Pri določanju umeritvene premice se lahko zgodi, da standardna napaka napovedi (razpršitev dejanskih vrednosti okoli napovedanih) ni enaka skozi celotno koncentracijsko območje. Tedaj govorimo o heteroscedastičnosti. Do tega pojava lahko pride, kadar imamo širok razpon med najvišjim in najnižjim kalibracijskim standardom. Ker imajo večji odkloni pri višjih koncentracijah večji vpliv na enačbo premice, se točke pri teh koncentracijah bolje prilegajo umeritveni premici kot točke pri nizkih koncentracijah. To lahko popravimo z uporabo utežene linearne regresije, kjer povečamo vpliv meritev pri nižjih koncentracijah. Na ta način izboljšamo točnost metode na spodnjem delu kalibracijske krivulje (78).

Pri izračunu umeritvene krivulje v primeru UHPLC-MS/MS metode smo preverili morebitno izboljšanje točnosti meritev z uporabo uteži  $1/C$  in  $1/C^2$ . Naklon (b) in odsek (a) utežene umeritvene premice smo optimizirali s pomočjo dodatka v programu Microsoft Excel, imenovanega Reševalec (ang. Solver). Program je oba regresijska parametra (a in b) določil tako, da je bila vsota (SS) produkta uteži pri določeni koncentraciji ( $w_i$ ) in kvadrata odstopanja dejanskega odziva ( $Y_i$ ) od odziva, izračunanega iz umeritvene premice ( $Y'_i$ ), najmanjša (enačba 2).

$$SS = \sum w_i \times (Y_i - Y'_i)^2 \quad (2)$$

Za najboljši model smo izbrali tisti, pri katerem so bile točnosti povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev najbliže 100 %. Točnost smo izračunali tako, da smo koncentracije posameznih kalibracijskih standardov, določenih iz umeritvene krivulje primerjali z nominalnimi vrednostmi (enačba 3) (79).

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

FDA smernice dovoljujejo največ 20-odstotno odstopanje točnosti pri koncentraciji spodnje meje določljivosti (LLOQ), medtem ko je pri ostalih koncentracijah to odstopanje lahko samo 15-odstotno. Ta kriterij morajo dosegati vsaj širje od šestih kalibracijskih standardov, standard pri LLOQ in standard pri najvišji koncentraciji. Kot dodatni kriterij za sprejemljivost enačbe umeritvene krivulje smo upoštevali tudi vrednost determinacijskega koeficiente ( $r^2$ ), ki je morala biti visoka.

**Spodnjo mejo določljivosti** (LLOQ) predstavlja najmanjša koncentracija kalibratorja v umeritveni krivulji, ki ima ustrezno točnost in ponovljivost. Smernice FDA priporočajo, da je to koncentracija, pri kateri je:

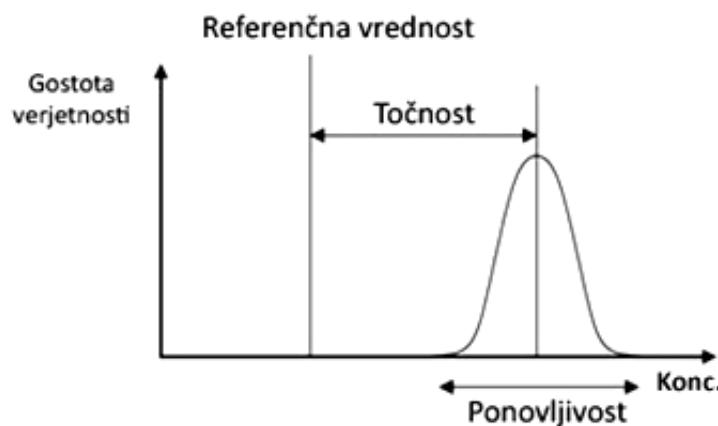
- odziv standarda vsaj petkrat višji od odziva slepega vzorca,
- koeficient variacije (CV) največ 20 % in
- točnost med 80 in 120 %.

#### 5.5.4.2. Točnost in ponovljivost

**Točnost analizne metode** (ang. accuracy) predstavlja ujemanje srednje vrednosti rezultatov koncentracije analita, ki smo jih določili z analizno metodo, in pravo vrednost koncentracije analita (74). FDA priporoča, da se za določanje točnosti uporabijo vsaj tri koncentracije izbrane skozi celotno območje, ki se analizirajo v vsaj petih ponovitvah, in da povprečna izmerjena vrednost ne odstopa od nominalne vrednosti za več kot 15 % (pri LLOQ pa to odstopanje ne presega 20 %).

**Ponovljivost analizne metode** (ang. precision) predstavlja natančnost našega dela in opisuje ujemanje večkratnih meritev posameznih koncentracij analita, pripravljenih in izmerjenih na identičen način (74). Ameriške smernice govorijo, da koeficient variacije

(CV) rezultatov petih ponovitev vsaj treh različnih koncentracij ne sme presegati 15 %. Izjema je le LLOQ, kjer CV ne sme biti večji od 20 %. Definiciji točnosti in ponovljivosti sta shematsko predstavljeni na sliki 5.



Slika 5: Prikaz točnosti in ponovljivosti na hipotetičnem grafu (77)

Pri validacijah analiznih metod smo točnost in ponovljivost določali s pomočjo umeritvenih krivulj in odzivov kontrolnih vzorcev treh različnih koncentracij ( $QC_L$ ,  $QC_M$  in  $QC_H$ ) v petih ponovitvah (znotraj-dnevna ponovljivost). Meritve smo izvedli v treh različnih dnevih v časovnem obdobju, ki ni bil daljši od petih dni (med-dnevna ponovljivost). Točnost smo izračunali po enačbi 3, ponovljivost pa izrazili s koeficientom variacije (CV) (enačba 4).

$$CV [\%] = \frac{sd}{\bar{C}} \times 100 \quad (4)$$

#### 5.5.4.3. Učinek matrice in izkoristek ekstrakcije

Pri uporabi tekočinske kromatografije, sklopljene s tandemso masno spektrometrijo, se srečujemo s problemom učinka matrice, ki ima lahko velik vpliv na točnost, ponovljivost in občutljivost analizne metode. Učinek matrice pomeni, da komponente iz matrice vzorca, ki se eluirajo sočasno z analitom, motijo ionizacijo le-tega v masnem spektrometru. Tako lahko pride do zmanjšanja učinkovitosti ionizacije analita (ang. ion suppression) ali pa nasprotno do njenega povečanja (ang. ion enhancement). Odsotnost kromatografskih vrhov v kromatogramu slepega vzorca še ne pomeni odsotnosti tega pojava (75, 80).

Učinke matrice lahko zmanjšamo že s skrbnim načrtovanjem analiznega postopka. Literatura priporoča sledeče ukrepe:

- zmanjšanje volumnov in redčenje vzorca (če to dopušča občutljivost metode),
- izbira učinkovitega in selektivnega postopka ekstrakcije (najmanjši učinek matrice je pri uporabi mešane ionsko izmenjevalne ekstrakcije na trdnem nosilcu),
- izvedba APCI (kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku), saj je ta način ionizacije manj dovzeten za učinek matrice kot pa ESI (če to dopuščajo polarnost analita in drugi parametri),
- uporaba nižjega pretoka mobilne faze,
- uporaba kromatografije UHPLC in
- uporaba primerenega internega standarda (priporoča se uporaba izotopno označenega standarda) (75, 80-82).

Ker FDA-jeve smernice ne navajajo načina kako dokazati odsotnost učinka matrice, smo se pri validaciji opirali na priporočila raziskovalca Matuszewskega (75, 76) in določali absolutni in relativni učinek matrice.

**Absolutni učinek matrice** smo ocenili tako, da smo med seboj primerjali:

- odzive v ekstrahiranih vzorcih slepe krvi iz DBS papirčkov, ki smo jih rekonstituirali v 100 µL raztopine analitov in IS v mobilni fazi (set A) in
- odzive čiste raztopine analitov in IS v mobilni fazi (set B) (enačba 5).

$$ME [\%] = \frac{A}{B} \times 100 \quad (5)$$

Absolutni učinek matrice smo izračunali za pet različnih slepih vzorcev krvi. Raztopino analitov in IS v rekonstitucijskem topilu smo pripravili na način, da smo ustreznim razredčenim standardnim raztopinam analitov in IS dodali količino topila (v našem primeru mobilne faze), ki je tvorila koncentracijo  $QC_L$  (0,3 µg/mL) in  $QC_H$  (15 µg/mL) analitov. Pri poskusu smo pripravili pet ponovitev za vsako slepo kri in pet ponovitev za vsako raztopino standardov v čistem topilu oz. mobilni fazi v našem primeru. Kot kriterij sprejemljivosti absolutnega učinka matrice je predlagana vrednost  $100 \pm 15\%$ .

Pri ***relativnem učinku matrice*** pa primerjamo kri različnih oseb in je po mnenju raziskovalca Matuszewskega (75, 76) pomembnejši kot pa absolutni učinek matrice. Z uporabo vsaj petih krvnih vzorcev različnih oseb znatno povečamo verjetnost, da nam analizna metoda daje točne podatke.

Relativni učinek matrice smo določili na podlagi variabilnosti vzorcev seta A (postekstrakcijsko dodajanje standarda) pri krvnih vzorcih različnih oseb. Tako smo za oceno relativnega učinka matrice uporabili odzive vzorcev seta A in B, pridobljene ob določanju absolutnega učinka matrice. Relativni učinek matrice smo izrazili s koeficientom variacije odzivov seta A (postekstrakcijsko dodan standard) pri petih različnih krvnih vzorcih, nato pa smo to vrednost primerjali s koeficientom variacije odzivov seta B (standard v čistem topilu). Za potrditev odsotnosti relativnega učinka matrice koeficient variacije seta A ne sme presegati koeficiente variacije seta B oziroma mora biti primerljive vrednosti (75).

***Izkoristek ekstrakcije*** (ang. recovery) določamo s primerjavo odzivov analitov iz biološkega vzorca z odzivi analitov standardov (75). Tako smo pri plazemskih vzorcih in DBS vzorcih, analiziranih z metodo HPLC-UV, določili izkoristek ekstrakcije na osnovi primerjave odzivov analitov v obogatenih plazemskih oz. DBS QC vzorcih z odzivi standardov v mobilni fazi (enačba 6).

$$\text{Re} [\%] = \frac{\text{Odziv obogatenega plazemskega ali DBS vzorca}}{\text{Odziv standardov v mobilni fazi}} \times 100 \quad (6)$$

Pri DBS vzorcih, ki smo jih analizirali z metodo UHPLC-MS/MS, pa smo primerjali odzive vzorcev, ki smo jim dodali standarde analitov in IS pred ekstrakcijo (set vzorcev C), z odzivi vzorcev, pri katerih smo standarde analitov in IS dodali ekstrahiranemu suhemu preostanku slepe krvi po ekstrakciji (set vzorcev A). Z uporabo rekonstituirane slepe krvi namesto mobilne faze pri pripravi vzorca A, dobimo pravilnejše vrednosti, saj na ta način eliminiramo učinek matrice (75). Izkoristek ekstrakcije (Re) smo v tem primeru izračunali s pomočjo enačbe 7.

$$\text{Re} [\%] = \frac{C}{A} \times 100 \quad (7)$$

Izkoristek ekstrakcije smo določili s petimi ponovitvami kontrolnih vzorcev  $QC_L$ ,  $QC_M$  in  $QC_H$ , pri metodi UHPLC-MS/MS pa smo uporabili le vzorce  $QC_L$  in  $QC_H$ . Set C so predstavljali vzorci QC, pripravljeni na običajen način.

#### **5.5.4.4. Stabilnost**

V sklopu validacije analizne metode smo proučevali kratkoročno stabilnost analitov v plazemskih in DBS vzorcih, dolgoročno stabilnost analitov v DBS vzorcih in stabilnost osnovnih raztopin analitov. Pri oceni prvih dveh tipov stabilnosti smo uporabili vzorce QC. Za proučevanje stabilnosti osnovnih raztopin analitov pa smo uporabili raztopine analitov s koncentracijo 1 mg/mL. Stabilnost smo določili kot spremembo odziva po določenem času ( $t_x$ ) glede na začetni čas ( $t_0$ ) (enačba 8).

$$\text{Relativna sprememba [\%]} = \frac{\text{odziv } t_x - \text{odziv } t_0}{\text{odziv } t_0} \times 100 \quad (8)$$

##### **Kratkoročna stabilnost**

Za oceno kratkoročne stabilnosti analitov smo pripravili pet ponovitev kontrolnih vzorcev nizke in visoke koncentracije, postavljenih v avtomatski vzorcevalnik, termostatiran na 4°C. Vzorce smo nato analizirali takoj, po pretečenih 12-ih urah in po pretečenih 24-ih urah.

##### **Dolgoročna stabilnost**

FDA v svojih smernicah priporoča, da se test dolgoročne stabilnosti izvaja v enakih razmerah, kot shranjujemo realne vzorce bolnikov, in za obdobje, ki presega čas od odvzema prvega vzorca do analize zadnjega vzorca.

Zato smo skladno s priporočili FDA-ja pripravili količino vzorcev  $QC_L$  in  $QC_H$ , ki je zadostovala za tri ponovitve analiz vsake koncentracije, in jih shranili na sobni temperaturi. Vzorce smo analizirali po pripravi, po dveh in po štirih tednih ter rezultate primerjali z nominalnimi vrednostmi.

### ***Stabilnost osnovnih raztopin***

Preizkušali smo stabilnost osnovne raztopine lamotrigina in njegovega 2-N-glukuronida. Osnovna raztopina lamotrigina je bila pripravljena v metanolu in smo jo shranjevali v hladilniku (pri 4°C) en teden. Za razliko od lamotrigina je bila osnovna raztopina njegovega 2-N-glukuronida pripravljena v mešanici metanola in vode v razmerju 60 : 40 (V/V) in smo jo shranjevali v zamrzovalniku (pri –80°C). Analizo smo izvedli na HPLC aparatu z UV detektorjem in primerjali odzive sveže pripravljenih osnovnih raztopin z odzivi raztopin, shranjenih v hladilniku oz. zamrzovalniku.

#### ***5.5.5. Analiza vzorcev bolnikov***

Metodo smo uporabili za določevanje plazemskih oz. krvnih koncentracij analitov pri 9 bolnikih, ki so se zdravili z lamotriginom. Koncentracije lamotrigina so bile v času odvzema v stacionarnem stanju. Vzorce krvi smo pridobili v dveh časovnih točkah, tik pred jutranjim jemanjem zdravila (čas 0) in po 2 do 4 urah od zaužitja jutranjega odmerka. Pridobljene plazemske vzorce smo do pričetka analize hranili v polipropilenskih epruvetah na –80°C, medtem ko smo DBS vzorce pripravili iz sveže krvi in jih nato shranili v plastičnih vrečkah s sušilnim sredstvom na sobni temperaturi. Koncentracije analitov v vzorcih bolnikov smo izračunali na osnovi sočasno analiziranih vzorcev umeritvene krivulje.

## 6. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 6.1. Metoda določanja analitov iz krvne plazme s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem

#### 6.1.1. Razvoj ekstrakcijske metode

Pri optimizaciji ekstrakcijske metode smo proučevali vplive različnih časov obarjanja pri  $-70^{\circ}\text{C}$  in centrifugiranja. Ugotovili smo, da je obarjanje proteinov pri  $-70^{\circ}\text{C}$  nepotreben korak. Izkazalo se je tudi, da ekstrakcije ne izboljšamo z daljšim časom centrifugiranja.

Priprava obogatenih plazemskih vzorcev po končani optimizaciji je potekala tako, da smo  $165 \mu\text{L}$  plazme dodali  $20 \mu\text{L}$  razredčene osnovne raztopine lamotrigina,  $15 \mu\text{L}$  razredčene osnovne raztopine lamotrigin  $2-N$ -glukuronida ter  $20 \mu\text{L}$  razredčene osnovne raztopine internega standarda. Raztopino smo mešali 15 sekund na mešalu na ekscenter.  $200 \mu\text{L}$  tako pripravljenemu vzorcu plazme smo dodali  $600 \mu\text{L}$  ohlajenega metanola. Dobijeno tekočino smo ponovno mešali na mešalu na ekscenter za eno minuto in nato centrifugirali 10 minut s hitrostjo 16,000 obratov na minuto pri temperaturi  $5^{\circ}\text{C}$ .  $600 \mu\text{L}$  organske faze smo posušili v dušikovi atmosferi pri povečanem tlaku. Dobjeni suhi ostanek smo raztopili v  $100 \mu\text{L}$  mobilne faze. Končno raztopino smo mešali 15 sekund na mešalu na ekscenter in jo nato prenesli v HPLC vialo z insertom.

#### 6.1.2. Razvoj metode tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z uporabo internega standarda

Iskanje ustreznega internega standarda je razkrilo, da se metformin eluira skupaj z biološko matrico, zaradi česar neprimeren za analizo. Nasprotno pa sta se kloramfenikol in gvanabenz acetat eluirala za preiskovanima spojinama in brez koelucije s komponentami plazme. Za interni standard smo izbrali kloramfenikol zaradi krajšega retencijskega časa.

Najboljšo ločitev kromatogramskih vrhov lamotrigina in njegovega  $2-N$ -glukuronida smo dosegli z uporabo kolone Zorbax Eclipse XDB-C8 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ) proizvajalca

Agilent technologies in uporabo mobilne faze sestavljene iz 24 % metanola in 76 % 25 mM fosfatnega pufra s pH 2,5.

Z višjim pretokom mobilne faze in povišano temperaturo kolone smo dosegli relativno kratek čas analize (10,5 minute) zaradi česar ni bilo potrebno uvajati gradientne elucije. Tako sta se kot optimalna izkazala pretok 1,6 mL/min in temperatura kolone 50°C. Dejavnike končne kromatografske metode prikazuje preglednica XI.

Preglednica XI: Končna kromatografska metoda

Kolona	Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 µm, 150 × 4,6 mm
Mobilna faza	24 % metanola in 76 % 25 mM fosfatnega pufra s pH 2,5 (V/V)
Pretok mobilne faze	1,6 mL/min
Temperatura kolone	50°C
Valovna dolžina UV detektorja	220 nm
Volumen injiciranja	10 µL
Čas analize	10,5 minut

Reprezentativni kromatogrami slepega plazemskega vzorca in obogatenega plazemskega so podani v poglavju 9.1.

### **6.1.3. Rezultati validacije analizne metode za določanje analitov iz plazme s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem**

#### **6.1.3.1. Selektivnost, linearnost in meja določljivosti**

Kromatografsko selektivnost metode smo določali z analizo ekstraktov slepih plazemskih vzorcev šestih različnih oseb. Ker v področju retencijskega časa analitov nismo opazili motečih vrhov endogenih substanc oziroma so bili petkrat manjši od vrha najnižjega standarda, smo potrdili selektivnost naše metode.

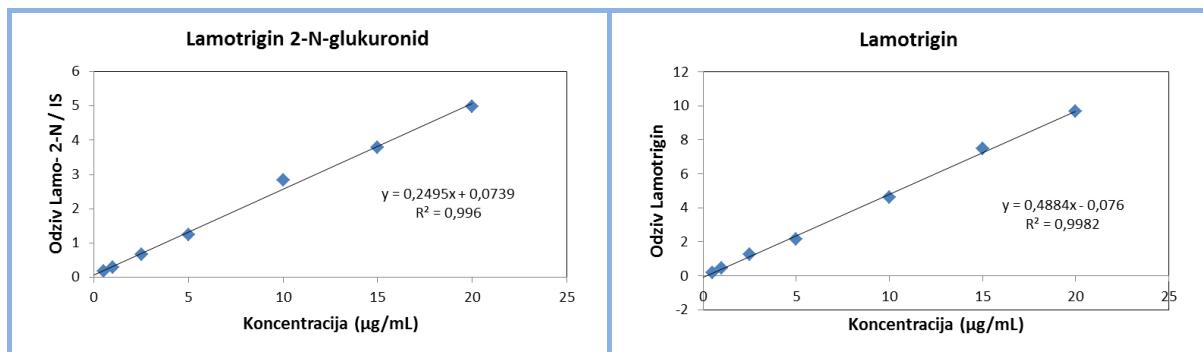
Linearnost kalibracijskih krivulj smo določili z metodo najmanjših kvadratov. V preglednici XII so zbrani regresijski parametri za oba analita (lamotrigin in njegov 2-N-glukuronid) skupaj z vsoto relativnih napak povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev, s katero smo ocenili točnost tako izračunanih podatkov.

Preglednica XII: Regresijski parametri izbranih kalibracijskih krivulj analitov in vsote relativnih napak povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev ( $\Sigma |\%RE|$ );  $n = 7$

Analit	b (mL/µg)	a	r <sup>2</sup>	$\Sigma  \%RE^* $
Lamotrigin 2-N-glukuronid	0,250	0,0739	0,9938	48,8
Lamotrigin	0,488	-0,0760	0,9982	49,6

$$* \text{ RE } [\%] = \frac{C_{\text{izmerjena}} - C_{\text{nominalna}}}{C_{\text{nominalna}}} \times 100$$

Odziv kalibracijskih standardov analitov je bil proporcionalen njihovi koncentraciji v koncentracijskem območju 0,1-20 µg/mL (slika 6).



Slika 6: Reprezentativna umeritvena krivulja pri določanju lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina v plazmi

Točnosti povratno izračunanih koncentracij kalibracijskih standardov lamotrigina in njegovega 2-N-glukuronida so zbrani v preglednicah XIII in XIV za tri dni validacije. Nobena izmed vrednosti ni odstopala za več kot 15 % (oziroma 20 % pri LLOQ) kar ustreza kriterijem FDA-jevih smernic.

Preglednica XIII: Točnost kalibracijskih standardov lamotrigin 2-N-glukuronida v treh dnevih validacije

C <sub>nominal.</sub> [µg/mL]	1. dan		2. dan		3. dan	
	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]
0,1	0,103	102,5	*	*	0,113	112,8
0,25	0,271	108,5	0,220	88,0	0,247	98,7
0,5	0,569	113,8	0,464	92,7	0,566	113,3
1	0,939	93,9	0,935	93,5	1,05	104,8
2,5	2,66	106,5	2,54	101,7	2,39	95,5
5	4,92	98,4	4,93	98,5	4,58	91,6

		1. dan		2. dan		3. dan	
C <sub>nominal.</sub> [µg/mL]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	
10	*	*	10,6	105,6	10,7	107,1	
12,5	11,8	94,5	12,8	102,1	12,6	100,9	
15	15,6	103,8	14,4	96,2	14,6	97,3	

Opomba: \* izločena oz. manjkajoča meritev

Preglednica XIV: Točnost kalibracijskih standardov lamotrigina v treh dnevih validacije

		1. dan		2. dan		3. dan	
C <sub>nominal.</sub> [µg/mL]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	
0,1	0,0883	88,3	0,100	99,6	0,101	101,4	
0,25	0,236	94,2	0,248	99,4	0,241	96,4	
0,5	0,505	101,1	0,448	89,6	0,474	94,8	
1	0,961	96,1	1,00	100,3	0,994	99,4	
2,5	2,63	105,0	2,44	97,6	2,33	93,3	
5	4,84	96,8	*	*	4,75	94,9	
10	10,1	101,4	10,1	100,8	10,6	105,8	
15	*	*	15,2	101,6	15,3	102,3	
20	20,0	99,8	19,8	98,9	19,5	97,7	

Opomba: \* izločena oz. manjkajoča meritev

Determinacijski faktor ( $r^2$ ) je bil visok za vse tri dni in je znašal nad 0,995 (preglednica XV). Preglednica XV prikazuje tudi ostale parametre kalibracijskih krivulj za vse tri dni validacije.

Preglednica XV: Regresijski parametri umeritvene premice v treh dneh validacije

		1. dan	2. dan	3. dan
<b>Lamotrinin 2-N-glukuronid</b>				
b (mL/µg)		0,2993	0,244	0,293
a		-0,001	0,0222	0,00380
r <sup>2</sup>		0,9988	0,9973	0,9968
<b>Lamotrinin</b>				
b (mL/µg)		0,477	0,483	0,523
a		0,0234	0,0370	0,0330
r <sup>2</sup>		0,9995	0,9997	0,9982

Spodnjo mejo določljivosti (LLOQ) je predstavljala najmanjša koncentracija kalibratorja v umeritveni krivulji z ustrezno točnostjo ( $\pm 20\%$ ) ter z vsaj petkrat večjim odzivom, kot je bil odziv slepe plazme. LLOQ za lamotrinin 2-N-glukuronid je znašala 0,25 µg/mL, za lamotrinin pa 0,1 µg/mL.

### 6.1.3.2. Točnost in ponovljivost

Točnost in ponovljivost smo določali v treh dnevih s pomočjo kontrolnih vzorcev treh različnih koncentracij in s petimi ponovitvami vsake meritve. Rezultati zbrani v preglednicah XVI in XVII, prikazujejo, da se znotraj-dnevna točnost giblje med 96 in 101 % za lamotrigin 2-N-glukuronid, medtem ko je pri lamotriginu to območje širše in znaša od 88 do 104 %. Med-dnevna točnost za lamotrigin 2-N-glukuronid znaša 93-104 % in 96-107 % za lamotrigin. Koeficienti variacije za lamotrigin 2-N-glukuronid niso presegali 4 % znotraj dneva in 8 % med dnevi. Za lamotrigin so bili koeficienti variacije nekoliko višji (znotraj dneva niso presegali 13 % oziroma 9 % med tremi dnevi), kljub temu pa so vsi znotraj FDA-jevih kriterijev, zato lahko potrdimo ustrezno točnost in natančnost naše metode.

Preglednica XVI: Znotraj-dnevna in med-dnevna ponovljivost in točnost določanja lamotrigin 2-N-glukuronida v plazmi

	Vzorec	$C_{\text{nominal.}} [\mu\text{g/mL}]$	$\bar{C}_{\text{izračun.}} [\mu\text{g/mL}]$	CV [%]	Točnost [%]
Znotraj dneva (n = 5)	QC <sub>L</sub>	0,3	0,304	1,53	101,2
	QC <sub>M</sub>	5	4,77	3,27	95,5
	QC <sub>H</sub>	12	11,9	4,42	98,8
Med dnevi (n = 15)	QC <sub>L</sub>	0,3	0,280	8,24	93,2
	QC <sub>M</sub>	5	5,18	6,57	103,6
	QC <sub>H</sub>	12	12,4	5,68	103,3

Preglednica XVII: Znotraj-dnevna in med-dnevna ponovljivost in točnost določanja lamotrigina v plazmi

	Vzorec	$C_{\text{nominal.}} [\mu\text{g/mL}]$	$\bar{C}_{\text{izračun.}} [\mu\text{g/mL}]$	CV [%]	Točnost [%]
Znotraj dneva (n = 5)	QC <sub>L</sub>	0,3	0,278	7,56	92,6
	QC <sub>M</sub>	5	4,40	13,4	88,0
	QC <sub>H</sub>	18	18,7	4,05	103,7
Med dnevi (n = 15)	QC <sub>L</sub>	0,3	0,287	6,30	95,8
	QC <sub>M</sub>	5	4,79	9,00	95,7
	QC <sub>H</sub>	18	19,3	4,46	107,2

### 6.1.3.3. Izkoristek ekstrakcije

Izkoristek ekstrakcije smo določili tako, da smo primerjali povprečni odziv analitov v treh kontrolnih vzorcih in petih ponovitvah z odzivi standardov, pripravljenih v mobilni fazi

(preglednica XVIII). Povprečni izkoristek ekstrakcije je znašal 89 % za lamotrigin 2-N-glukuronid, medtem ko je bil za lamotrigin nekoliko višji (96 %).

Preglednica XVIII: Izkoristki ekstrakcije (Re) kontrolnih vzorcev lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina (QC<sub>L</sub>, QC<sub>M</sub> in QC<sub>H</sub>; n = 3) iz plazme ter njihova variabilnost (CV)

	A		B		Re [%]	Povprečje [%]	CV [%]
	Povpr. odziv	CV [%]	Povpr. odziv	CV [%]			
<b>Lamotrigin 2-N-glukuronid</b>							
QC <sub>L</sub> (0,3 µg/mL)	7,70	11,3	8,83	9,32	87,2	89,4	2,15
QC <sub>M</sub> (5 µg/mL)	129	7,82	142	7,16	90,9		
QC <sub>H</sub> (12 µg/mL)	309	5,13	343	3,35	90,2		
<b>Lamotrigin</b>							
QC <sub>L</sub> (0,3 µg/mL)	14,8	10,3	14,33	7,16	103,1	95,8	9,82
QC <sub>M</sub> (5 µg/mL)	214	8,46	251	5,01	85,4		
QC <sub>H</sub> (18 µg/mL)	871	5,17	880	4,12	99,0		
Legenda: A – ekstrahiran plazemskih standard B – standard raztopljen v mobilni fazi							

#### 6.1.3.4. Stabilnost

Stabilnost spojine v topilu ali biološki matrici je odvisna od razmer shranjevanja, kemijskih lastnosti spojine in topila oziroma komponent biološke matrice ter vsebnika. Zato rezultatov ne moremo ekstrapolirati na druge maticne ali vsebnike (74). V sklopu validacije smo ocenjevali stabilnost naših dveh analitov v avtomatskem vzorčevalniku v steklenem insertu znotraj HPLC viale in stabilnost osnovnih raztopin v plastičnih epruvetah.

Na osnovi rezultatov predstavljenih v preglednici XIX, lahko sklepamo, da je ekstrahiran plazemski vzorec lamotrigina in njegovega 2-N-glukuronida stabilen vsaj 12 ur, če ga shranjujemo pri 4°C v avtomatskem vzorčevalniku. Osnovna raztopina lamotrigina v plastični epruveti je stabilna vsaj 7 dni, če jo shranjujemo v hladilniku pri 4°C. Pri osnovni raztopini lamotrigin 2-N-glukuronida, smo opazili, da 15 % spojine razпадa v 23 mesecih shranjevanja pri -80°C.

Preglednica XIX: Rezultati stabilnostnih testov kontrolnih vzorcev in osnovnih raztopin lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina

Lamotrigin 2-N-glukuronid	Povprečna sprememba odziva glede na $t_0$ [%]	
	$QC_L$ (0,3 µg/mL)	$QC_H$ (12 µg/mL)
ALS 12 h (n = 3) <sup>a</sup>	-1,29	-0,53
ALS 24 h (n = 3) <sup>b</sup>	0,43	1,62
Primarna osnovna raztopina (n = 3) <sup>c</sup>	15,4	
Lamotrigin	Povprečna sprememba odziva glede na $t_0$ [%]	
	$QC_L$ (0,3 µg/mL)	$QC_H$ (18 µg/mL)
ALS 12 h (n = 3) <sup>a</sup>	-0,63	5,16
ALS 24 h (n = 3) <sup>b</sup>	18,1	29,5
Primarna osnovna raztopina (n = 3) <sup>d</sup>	3,45	

Legenda: <sup>a</sup> Po 12 h v avtomatskem vzorčevalniku na 4°C.  
<sup>b</sup> Po 24 h v avtomatskem vzorčevalniku na 4°C.  
<sup>c</sup> Po 23 mesecih hranjenja osnovne raztopine v zamrzovalniku na -80°C.  
<sup>d</sup> Po 1 tednu hranjenja osnoven raztopine v hladilniku na 4°C.

#### 6.1.4. Primerjava razvite metode z objavljenimi analiznimi metodami

Dve leti po izdaji prvega dovoljenja za promet z zdravilom s strani FDA so bile objavljene prve raziskave o določanju lamotrigina iz vzorcev plazme s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti sklopljene z UV detektorjem. V naslednjih letih so si sledile še v večjem številu, raziskovalci pa so se posvetili predvsem zmanjšanju velikosti vzorca plazme iz začetnih 200 µL (59) do 50 µL, ki jih potrebujemo pri uporabi analizne metode Morgana in sodelavcev (49). Poleg zmanjšanja volumna vzorca in poenostavitev priprave plazemskih vzorcev so se raziskovalci posvetili tudi hkratnemu določanju drugih protiepiletičnih zdravil. Prva takšna raziskava je bila objavljena leta 1999 (61) in je določala poleg lamotrigina tudi pet drugih protiepiletičnih zdravil in celo dva njihova metabolita.

Do pričetka razvoja naše analizne metode smo zasledili samo dve objavljeni raziskavi kjer so poleg lamotrigina raziskovalci določali tudi njegove metabolite. Prvo so objavili leta 1997 Cooper in sodelavci (67), uporabljali pa so pripravo vzorcev z uporabo ASTED sistema. Deset let kasneje so v raziskovalni skupini Saracina (68) uporabili ekstrakcijo tekoče-tekoče ter metanol kot reagent zaobarjanje proteinov.

Ker je razvoj naše analizne metode izhajal iz druge raziskave, je priprava krvnih vzorcev zelo podobna: obarjanje proteinov z metanolom čemur sledijo intenzivno mešanje in centrifugiranje, sušenje metanolne faze in razapljanje v mobilni fazi. Naša analizna metoda se od objavljene metode razlikuje predvsem v kromatografski analizi. Za razliko od Saracina smo uspeli na reverzno-fazni HPLC koloni C8 uspešno določiti lamotrigin in njegov 2-N-glukuronid iz polovico manjšega volumna injiciranega vzorca (10 µL). Zaradi visoke interindividualne variabilnosti lamotrigina in objavljenih podatkov, da pri nekaterih bolnikih plazemske koncentracije lamotrigina dosegajo tudi koncentracije 18 µg/mL, smo razširili območje linearnosti naše metode od 0,1 do 20 µg/mL. To je tudi bistvena prednost naše metode, saj Saracinova metoda ne omogoča določanja tako visokih plazemskih koncentracij lamotrigina.

#### **6.1.5. Rezultati meritev vzorcev bolnikov**

Z uporabo validirane metode smo uspešno določili plazemsko koncentracijo lamotrigina in njegovega glavnega metabolita pri devetih bolnikih, ki so prejemali dnevne odmerke 100-400 mg lamotrigina razdeljene v dveh odmerkih (zjutraj in zvečer). Posamezne plazemske koncentracije za vsakega bolnika so zbrane v preglednici XX.

Preglednica XX: Izmerjene plazemske koncentracije lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina [µg/mL] ob 0 h in 4 h po *per os* aplikaciji zdravila z lamotriginom

Šifra bolnika	Dnevni odmerek [mg]	C <sub>lamotrigin 2-N-glukuronid</sub> [µg/mL] <sup>a</sup>		C <sub>lamotrigin</sub> [µg/mL] <sup>b</sup>	
		0 h	4 h	0 h	4 h
B83	100	0,54	0,51	3,73	4,40
B84	200	1,95	2,01	2,36	3,87
B85	250	2,14	2,26	4,65	6,04
B86	400	3,64	3,86	2,97	4,74
B87	100	0,96	0,95	1,69	2,27
B88	300	3,08	3,13	4,62	6,76
B89	100	0,52	0,68	1,70	2,11
B90	250	*	*	*	*
B91	400	6,16	6,72	8,01	10,54

Opomba: \*napaka pri analizi vzorca

<sup>a</sup> Plazemske koncentracije lamotrigin 2-N-glukuronida so bile izračunane na podlagi umeritvene krivulje z enačbo:  
odziv (lamo-2-N/IS) = 0,250 × konc. - 0,076; r<sup>2</sup> = 0,9981

<sup>b</sup> Plazemske koncentracije lamotrigina so bile izračunane na podlagi umeritvene krivulje z enačbo:  
odziv (lamo/IS) =  $0,488 \times \text{konc.} - 0,0760$ ;  $r^2 = 0,9982$

Pri bolnikih B83, B87 in B89, ki prejemajo 50-miligramske odmerke lamotrigina dvakrat dnevno in ne prejemajo drugih protiepileptičnih zdravil, opazimo veliko variabilnost.

Vpliv drugih protiepileptičnih zdravil na presnavljanje lamotrigina opazimo pri bolnikih pod oznako B86, ki prejema sočasno še 100 mg fenitoina (razdeljenega v dveh odmerkih), in bolniku B91, ki prejema 75 mg pregabalina v vsak večer. Bolnik B86, ki sočasno prejema fenitoin, ki je induktor jetrnih encimov, ima bistveno nižje koncentracije lamotrigina kot pa bolnik B91, ki ne prejema induktorja. Kljub temu pa je lahko opažena razlika posledica tudi drugih vplivov na farmakokinetiko lamotrigina.

## **6.2. Metoda določanja analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem**

### **6.2.1. Razvoj ekstrakcijske metode tekoče-tekoče**

Pri razvoju ekstrakcijske metode smo proučevali dejavnike, ki lahko vplivajo na sam postopek ekstrakcije. Eden najpomembnejših izmed njih je ekstrakcijsko topilo. Zato smo preizkušali različna topila oziroma mešanice le-teh. Rezultati vzorcev, pripravljenih na DBS papirčkih Whatman 903, so pokazali, da omogoča metanol ekstrakcijo lamotrigina in njegovega 2-N-glukuronida v največjem deležu.

Proučevali smo tudi razlike med različnimi vrstami papirčkov za nanašanje polne krvi. DBS papirčka Whatman 903 in FTA DPMK-C sta bila primerljiva, medtem ko sta se papirčka FTA DPMK-A in FTA DPMK-B izkazala za povsem neustrezna, saj so kemikalije, prisotne na teh dveh papirčkih, motile kromatografsko ločbo analitov. Zaradi nekoliko boljšega izkoristka ekstrakcije in večje razširjenosti uporabe smo se odločili, da za nadaljnje poskuse uporabljamo DBS papirčke Whatman 903.

V okviru optimizacije samega postopka ekstrakcije tekoče-tekoče smo spremenjali volumen ekstrakcijskega topila (500, 750 in 1000 µL), čas ekstrakcije (15, 30 in 60 minut)

in čas intenzivnega mešanja na mešalu na ekscenter (3, 5 in 10 minut). Večji volumen ekstrakcijskega topila, podaljšanje časa ekstrakcije in časa intenzivnega mešanja niso povečali izkoristka ekstrakcije.

Po končani optimizaciji je postopek ekstrakcije tekoče-tekoče potekal tako, da smo liso s posušenim krvnim madežem izrezali in ji dodali 0,5 mL metanola. Raztopino smo pustili stati 30 minut, nato pa 5 minut mešali na mešalu na ekscenter. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje vzorca pri sobni temperaturi (22°C) in pri hitrosti 16,000 obratov na minuto. 450 µL raztopine smo posušili v dušikovi atmosferi pri povečanem tlaku. Suhi ostanek smo raztopili v 100 µL mobilne faze. Končno raztopino smo mešali 120 sekund na mešalu na ekscenter in jo prenesli v HPLC vialo z insertom.

Iskanje ustreznih kromatografskih pogojev na reverzno-faznih kolonah C8 različnih proizvajalcev in z uporabo mobilnih faz iz metanola in 25 mM fosfatnega pufra s pH 2,0; 2,2 in 2,5 se je izkazalo za neuspešno zaradi slabe ločbe lamotrigin 2-N-glukuronida od sestavin biološke matrice. Ločevanje lamotrigin 2-N-glukuronida od sestavin biološke matrice je bilo boljše pri uporabi reverzno-fazne kolone C18 in mobilne faze iz metanola in 25 mM fosfatnega pufra s pH 3,0. 25 mM fosfatna pufra s pH 2,2 in 4,0 nista omogočala ustrezne ločbe 2-N-glukuronida od sestavin biološke matrice.

Sočasno s spremjanjem kromatografskih pogojev smo iskali tudi najprimernejši IS. Izbirali smo med melaminom, tiramin hidrokloridom in 2,4-diamin-6-fenil-1,3,5-triazinom. Melamin in tiramin hidroklorid sta se eluirala pred lamotrigin 2-N-glukuronidom in med spojinami biološke matrice in topili, medtem ko se je 2,4-diamin-6-fenil-1,3,5-triazin eluiral za lamotrigin 2-N-glukuronidom in sestavinami biološke matrice a pred lamotriginom. Zato smo uporabili tirazinski derivat kot interni standard.

Povišanje temperature kolone iz sobne temperature na 55°C je skrajšalo čas analize vendar se je ločba 2-N-glukuronida od biološke matrice poslabšala. Zato smo višanje temperature kolone opustili.

Žal vsi poskusi ločevanja lamotrigin 2-N-glukuronida od spojin iz biološke matrice niso uspeli, zato smo usmerili nadaljnji razvoj analizne metode v izboljšanje ekstrakcije analitov iz krvnega vzorca s pomočjo ekstrakcije na trdnem nosilcu.

### **6.2.2. Razvoj ekstrakcijske metode na trdnem nosilcu**

Optimizacija ekstrakcijske metode s pomočjo SPE kartuše je stremela predvsem v zmanjšanje ekstrakcije motečih spojin biološke matrice, poenostavitev postopka in povečanje izkoristka ekstrakcije. Zato smo v pripravi opustili večkratno intenzivno mešanje raztopine vzorca s pomočjo mešala na ekscenter. Analize vzorcev so pokazale, da ustrezeno ekstrakcijo dosežemo že samo z enkratnim intenzivnim mešanjem za 1 minuto pred 15-minutnim stresanjem na ultrazvočni kopeli. Izkoristek ekstrakcije lahko povečamo s povečanjem volumna elucijske raztopine za SPE kartušo in z dodatkom acetonitrila v elucijsko raztopino.

Tako je končni postopek ekstrakcije sledeč: 15 µL vzorcu posušenega krvnega madeža smo dodali 0,5 mL ekstrakcijskega topila, ki je vseboval interni standard, in pustili stati 30 minut. Nato smo dodali 1,5 mL 4-odstotne raztopine fosforne kisline. Tako dobljeno raztopino smo intenzivno mešali na mešalu na ekscenter 1 minuto. Vzorec smo stresali v ultrazvočni kopeli nadaljnjih 15 minut. Sledila sta 10-minutno centrifugiranje pri hitrosti 16,000 obratov na minuto pri sobni temperaturi in separacija analitov s pomočjo SPE kartuše Strata X-C (preglednica XXI). Zbrani eluat smo posušili v dušikovi atmosferi pri povišanem tlaku in tako dobljeni suhi vzorec raztopili v 0,1 mL mobilne faze. Končno raztopino smo mešali 60 sekund na mešalu na ekscenter in jo prenesli v HPLC vialo z insertom.

Preglednica XXI: Povzetek postopka separacije s SPE kartušo Strata X-C

Kondicioniranje	omočenje kartuše z 2 mL metanola ekvilibracija z 2 mL prečiščene vode
Nanos	1,8 mL vzorca
Spiranje 1	1 mL 2-odstotne mravljične kisline
Spiranje 2	1 mL metanola
Sušenje	1 min pri podtlaku 5 mm Hg
Elucija	2 mL 5-odstotnega amonijaka v mešanici metanola in acetonitila v razmerju 30 : 70 (V/V)

Kromatografija je potekala na koloni Gemini C18, 5 µm, 150 × 4,6 mm in mobilni fazi sestavljeni iz metanola in 25 mM fosfatnega pufra s pH 3,0. Optimizacija kromatografskih pogojev je bila osredotočena na iskanje primerenega gradiента mobilne faze, ki bi omogočal

krajši čas analize ob ustreznih ločitvih kromatografskih vrhov analitov in internega standarda od kromatografskih vrhov biološkega matrice. Optimizirana kromatografska metoda je povzeta v preglednici XXII.

Preglednica XXII: Končna kromatografska metoda

Kolona	Gemini C18, 5 µm, 150 × 4,6 mm			
Mobilna faza	Topilo A: metanol Topilo B: 25 mM fosfatni pufer s pH 3,0			
Pretok mobilne faze	Gradientni			
Gradient	Čas (min)	Topilo A (%)	Topilo B (%)	Pretok (mL/min)
Gradient	0,00	20	80	1,0
	6,00	20	80	1,0
	10,00	38	62	1,0
	10,05	38	62	1,5
	12,00	38	62	1,5
	12,10	20	80	1,5
Temperatura kolone	30°C			
Valovna dolžina UV detektorja	220 nm			
Volumen injiciranja	40 µL			
Čas analize	15 minut			

Reprezentativni kromatogrami slepega DBS vzorca in obogatenega krvnega vzorca na DBS papirčku so podani v poglavju 9.2.

### **6.2.3. Rezultati validacije analizne metode za določanja analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem**

#### **6.2.3.1. Selektivnost, linearnost in meja določljivosti**

Kromatografsko selektivnost smo določili z analizo ekstraktov slepih krvnih madežev šestih različnih oseb iz DBS papirčkov. V področju retencijskega časa analitov nismo opazili motečih vrhov endogenih substanc oziroma so bili petkrat manjši od vrha najnižjega standarda, zato je selektivnost te metode ustrezna.

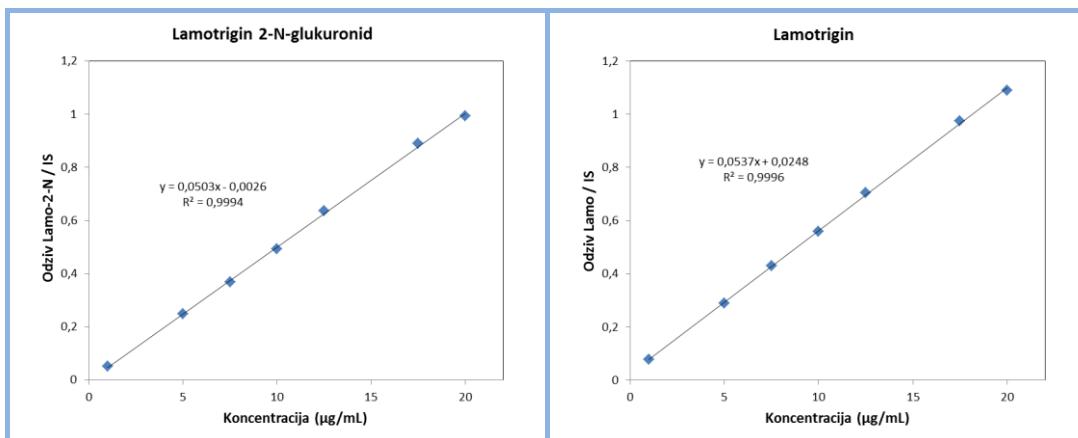
Odziv kalibracijskih standardov analitov je bil sorazmeren njihovi koncentraciji v koncentracijskem območju 1-20 µg/mL. Za izračun linearnosti kalibracijskih krivulj smo uporabili metodo najmanjših kvadratov. V preglednici XXIII smo povzeli izračunane

podatke za regresijske parametre za oba analita skupaj z vsoto relativnih napak povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev. Slika 7 pa prikazuje umeritveni krivulji za določanje lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina.

Preglednica XXIII: Regresijski parametri izbranih kalibracijskih krivulj analitov in vsote relativnih napak povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev ( $\Sigma | \% \text{RE}|$ );  $n = 7$

Analit	b (mL/µg)	a	$r^2$	$\Sigma   \% \text{RE}^* $
Lamotrigin 2-N-glukuronid	0,0503	-0,0026	0,9994	13,6
Lamotrigin	0,0537	0,0248	0,9996	7,0

$$* \text{ RE } [\%] = \frac{C_{\text{izmerjena}} - C_{\text{nominalna}}}{C_{\text{nominalna}}} \times 100$$



Slika 7: Reprezentativna umeritvena krivulja za določanje lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina v posušenih krvnih madežih za metodo HPLC-UV

Točnosti povratno izračunanih koncentracij kalibracijskih standardov lamotrigina in njegovega 2-N-glukuronida so zbrane v preglednicah XXIV in XXV za tri dni validacije. Ker nobena izmed vrednosti ni odstopala za več kot 15 % (ozioroma 20 % pri LLOQ) kot predpisujejo smernice FDA, smo potrdili točnost metode.

Preglednica XXIV: Točnost kalibracijskih standardov lamotrigin 2-N-glukuronida v treh dnevnih validacijah

$C_{\text{nominal.}}$ [µg/mL]	1. dan		2. dan		3. dan	
	$C_{\text{izračun.}}$ [µg/mL]	točnost [%]	$C_{\text{izračun.}}$ [µg/mL]	točnost [%]	$C_{\text{izračun.}}$ [µg/mL]	točnost [%]
1	1,03	103,3	0,98	97,9	0,96	96,1
5	5,53	110,5	4,65	93,1	4,82	96,3
7,5	7,57	101,0	8,27	110,3	7,90	105,4

10	9,64	96,4	10,2	102,0	10,1	101,4
12,5	11,7	93,8	11,8	94,3	12,3	98,1
17,5	*	*	17,2	98,4	17,0	97,3
20	20,5	102,5	20,4	102,0	20,4	102,0

Opomba: \* izločena meritev

Preglednica XXV: Točnost kalibracijskih standardov lamotrigina v treh dnevih validacije

$C_{\text{nominal.}}$ [ $\mu\text{g/mL}$ ]	$C_{\text{izračun.}}$ [ $\mu\text{g/mL}$ ]	1. dan		2. dan		3. dan	
		točnost [%]	$C_{\text{izračun.}}$ [ $\mu\text{g/mL}$ ]	točnost [%]	$C_{\text{izračun.}}$ [ $\mu\text{g/mL}$ ]	točnost [%]	$C_{\text{izračun.}}$ [ $\mu\text{g/mL}$ ]
1	0,92	91,6	0,91	90,9	0,92	92,2	
5	5,32	106,5	4,88	97,6	4,90	98,1	
7,5	7,55	100,7	8,11	108,1	7,89	105,2	
10	10,4	103,8	10,2	101,8	9,8	98,2	
12,5	11,5	91,9	11,7	93,9	12,5	100,3	
17,5	*	*	17,5	99,7	17,3	99,1	
20	20,4	101,8	20,2	101,2	20,1	100,4	

Opomba: \* izločena meritev

Parametre kalibracijskih krivulj za vse tri dni smo zbrali v preglednici XXVI.

Preglednica XXVI: Regresijski parametri umeritvene premice v treh dneh validacije

	1. dan	2. dan	3. dan
Lamotrinin 2-N-glukuronid			
b ( $\text{mL}/\mu\text{g}$ )	0,0622	0,0537	0,0483
a	-0,0010	-0,0196	0,0263
$r^2$	0,9942	0,9945	0,9976
Lamotrinin			
b ( $\text{mL}/\mu\text{g}$ )	0,0540	0,0557	0,0547
a	0,0464	0,0114	0,0285
$r^2$	0,9935	0,9961	0,9991

Spodnja meja določljivosti (LLOQ) za lamotrinin in njegov 2-N-glukuronid znaša 1  $\mu\text{g/mL}$  in ustreza FDA-jevim kriterijem.

### 6.2.3.2. Točnost in ponovljivost

Rezultate točnosti in ponovljivosti za tri dni smo zbrali v preglednicah XXVII in XVIII. Znotraj-dnevna točnost se giblje med 94 in 98 % za lamotrinin 2-N-glukuronid in med 98 in 100 % za lamotrinin. Med-dnevna točnost lamotrinin 2-N-glukuronida znaša 94-101 %

in 97-102 % za lamotrigin. Koeficienti variacije za lamotrigin in njegov 2-N-glukuronid niso presegali 7 % znotraj dneva in 5 % med dnevi. Ker vsi rezultati ustrezajo FDA-jevim kriterijem, lahko potrdimo točnost in natančnost naše metode.

Preglednica XXVII: Znotraj-dnevna in med-dnevna ponovljivost in točnost določanja lamotrigin 2-N-glukuronida v krvnih vzorcih

	Vzorec	C <sub>nominal</sub> . [µg/mL]	$\bar{C}$ izračun. [µg/mL]	CV [%]	Točnost [%]
Znotraj dneva (n = 5)	QC <sub>L</sub>	2,5	2,36	6,58	94,3
	QC <sub>M</sub>	7	6,87	3,23	98,1
	QC <sub>H</sub>	15	14,6	2,08	97,5
Med dnevi (n = 15)	QC <sub>L</sub>	2,5	2,36	5,17	94,3
	QC <sub>M</sub>	7	6,88	3,87	98,2
	QC <sub>H</sub>	15	15,1	4,70	100,7

Preglednica XXVIII: Znotraj-dnevna in med-dnevna ponovljivost in točnost določanja lamotrigina v krvnih vzorcih

	Vzorec	C <sub>nominal</sub> . [µg/mL]	$\bar{C}$ izračun. [µg/mL]	CV [%]	Točnost [%]
Znotraj dneva (n = 5)	QC <sub>L</sub>	2,5	2,45	6,58	97,8
	QC <sub>M</sub>	7	6,98	3,23	99,7
	QC <sub>H</sub>	15	14,9	2,08	99,1
Med dnevi (n = 15)	QC <sub>L</sub>	2,5	2,42	5,42	96,7
	QC <sub>M</sub>	7	7,10	4,40	101,5
	QC <sub>H</sub>	15	15,3	4,06	101,8

### 6.2.3.3. Izkoristek ekstrakcije

Izkoristek ekstrakcije smo določili tako, da smo primerjali povprečni odziv analitov v treh kontrolnih vzorcih in treh ponovitvah z odzivi standardov pripravljenih v mobilni fazi (preglednica XXIX). Povprečni izkoristek ekstrakcije je znašal 89 % za lamotrigin 2-N-glukuronid, medtem ko je bil za lamotrigin nekoliko višji (106 %).

Preglednica XXIX: Izkoristki ekstrakcije (Re) kontrolnih vzorcev za lamotrigin 2-N-glukuronid in lamotrigin (QC<sub>L</sub>, QC<sub>M</sub> in QC<sub>H</sub>; n = 3) iz DBS ter njihova variabilnost (CV)

	C		A		Re [%]	Povprečje [%]	CV [%]
	Povpr. odziv	CV [%]	Povpr. odziv CV [%]				
<b>Lamotrigin 2-N-glukuronid</b>							
QC <sub>L</sub> (2,5 µg/mL)	62,2	12,5	74,4	83,6		89,1	6,11
QC <sub>M</sub> (7 µg/mL)	181,2	8,1	202,8	89,3			

$QC_H$ (15 µg/mL)	407,1	3,6	431	94,5		
<b>Lamotrigin</b>						
$QC_L$ (2,5 µg/mL)	76,3	4,68	73,1	104,3		
$QC_M$ (7 µg/mL)	200,1	7,94	192,6	103,9		
$QC_H$ (15 µg/mL)	430,4	7,02	395,3	108,9	105,7	2,62

Legenda: C – ekstrahiran DBS standard  
A – standard raztopljen v mobilni fazi

#### 6.2.3.4. Stabilnost

Ker smo uporabljali enake osnovne raztopine kot pri metodi za določevanje analitov iz plazemskih vzorcev, smo v sklopu validacije ocenjevali predvsem stabilnost naših dveh analitov v posušenih krvnih madežih na papirju in ekstrahiranih in raztopljenih vzorcih hranjenih v avtomatskem vzorčevalniku v steklenem insertu znotraj HPLC viale.

Na osnovi rezultatov, zbranih v preglednici XXX, lahko sklepamo, da je vzorec posušenega krvnega madeža na papirju, ki je shranjen v PVC vrečki s sušilnim sredstvom, stabilen vsaj štiri tedne pri sobni temperaturi. Ekstrahiran vzorec lamotrigina in njegovega 2-N-glukuronida v steklenem insertu znotraj HPLC viale je stabilen vsaj 24 ur, če je shranjen pri 4°C v avtomatskem vzorčevalniku.

Preglednica XXX: Rezultati stabilnostnih testov kontrolnih vzorcev lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina

Lamotrigin 2-N-glukuronid	Povprečna sprememba odziva glede na $t_0$ [%]	
	$QC_L$ (2,5 µg/mL)	$QC_H$ (15 µg/mL)
ALS 24 h (n = 3) <sup>a</sup>	13,5	3,72
Dolgoročna (n = 3) <sup>b</sup>	- 1,19	- 4,54
Dolgoročna (n = 3) <sup>c</sup>	- 4,32	- 8,52
Lamotrigin	Povprečna sprememba odziva glede na $t_0$ [%]	
	$QC_L$ (2,5 µg/mL)	$QC_H$ (15 µg/mL)
ALS 24 h (n = 3) <sup>a</sup>	1,46	1,24
Dolgoročna (n = 3) <sup>b</sup>	3,77	- 0,28
Dolgoročna (n = 3) <sup>c</sup>	- 11,8	- 7,20

Legenda: <sup>a</sup> Po 24 h v avtomatskem vzorčevalniku na 4 °C.

<sup>b</sup> Po dveh tednih na sobni temperaturi; primerjava glede na nominalno vrednost.

<sup>c</sup> Po štirih tednih na sobni temperaturi; primerjava glede na nominalno vrednost.

#### **6.2.4. Primerjava razvite metode z objavljenimi analiznimi metodami**

V zadnjih letih se za spremeljanje terapevtskih koncentracij učinkovin čedalje bolj uveljavlja metoda DBS. To je bilo opaziti tudi v objavah raziskav analiz lamotrigina iz DBS vzorcev s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem. Do danes smo zasledili 5 objavljenih raziskav. Prva objavljena raziskava iz leta 2006 je proučevala poleg plazemskih tudi krvne koncentracije lamotrigina, shranjene na DBS papirčkih (83). V raziskavah iz let 2009 in 2010 so Wenger in sodelavci določevali lamotrigin (84) ali pa lamotrigin in okskarbazepin (85) iz DBS vzorcev. Žal pa v omenjenih dveh člankih niso navedene podrobnosti o uporabljeni analizni metodi. Letos je bila objavljena še ena raziskava, v kateri so raziskovalci Mohamed Shah in sodelavci določali poleg lamotrigina še tri druge protiepileptične učinkovine (86). Samo skupina raziskovalcev pod vodstvom AbuRuza, je poleg lamotrigina preizkušala določanje njegovega 2-N-glukuronida iz DBS vzorcev s pomočjo ekstrakcije tekoče-tekoče z uporabo etil acetata (87). Vendar njihova metoda samo razlikuje ta presnovni produkt od same učinkovine in ni namenjena določanje le-tega v samih DBS vzorcih.

#### **6.2.5. Rezultati meritev vzorcev bolnikov**

Primernost metode za določanje krvne koncentracije lamotrigina in njegovega glavnega metabolita smo potrdili na krvnih vzorcih devetih bolnikov, ki smo jim plazemske koncentracije analitov že predhodno določili. Rezultate analiz posameznih krvnih koncentracij smo zbrali v preglednici XXXI.

Preglednica XXXI: Izmerjene krvne koncentracije lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina [ $\mu\text{g/mL}$ ] ob 0 h in 4 h po *per os* aplikaciji zdravila z lamotriginom

Šifra bolnika	Dnevni odmerek [mg]	$C_{\text{lamotrigin 2-N-glukuronid}} [\mu\text{g/mL}]^a$		$C_{\text{lamotrigin}} [\mu\text{g/mL}]^b$	
		0 h	4 h	0 h	4 h
B83	100	< LLOQ <sup>c</sup>	< LLOQ <sup>c</sup>	4,69	5,30
B84	200	1,03	< LLOQ <sup>c</sup>	2,84	4,59
B85	250	1,22	1,08	6,42	7,55
B86	400	1,87	1,35	3,73	6,19
B87	100	< LLOQ <sup>c</sup>	< LLOQ <sup>c</sup>	1,81	2,69
B88	300	1,60	1,48	6,20	8,38

B89	100	< LLOQ <sup>c</sup>	< LLOQ <sup>c</sup>	1,95	2,23
B90	250	< LLOQ <sup>c</sup>	< LLOQ <sup>c</sup>	3,14	4,96
B91	400	3,06	2,73	9,76	12,42

Opomba: <sup>a</sup> Krvne koncentracije lamotrigin 2-N-glukuronida so bile izračunane na podlagi umeritvene krivulje z enačbo:

$$\text{odziv (lamo-2-N/IS)} = 0,0503 \times \text{konz.} - 0,0026; r^2 = 0,9994$$

<sup>b</sup> Krvne koncentracije lamotrigina so bile izračunane na podlagi umeritvene krivulje z enačbo:

$$\text{odziv (lamo/IS)} = 0,0537 \times \text{konz.} + 0,0248; r^2 = 0,9996$$

<sup>c</sup> Kromatografski vrh analita v vzorcu je viden (večji od šuma), vendar pa je pod spodnjo mejo določljivosti.

Če primerjamo koncentracije analitov, določenih v krvi s pomočjo DBS metode, in koncentracije analitov v plazemskih vzorcev istih bolnikov, lahko opazimo da so vrednosti lamotrigin 2-N-glukuronida nižje v krvi kot v plazmi. Nasprotni učinek pa smo zabeležili pri lamotriginu, saj smo opazili od znatno višje koncentracije v krvi kot pa smo jih določili v plazmi bolnikov. Domnevamo, da so razlogi za te razlike povezani predvsem z fizikalno-kemijskimi lastnostmi obeh analitov (različna lipofilnost) in s tem z različno sposobnostjo prehajanja analitov v krvne celice.

### **6.3. Metoda določanja analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije ultra visoke ločljivosti s tandemsko masno spektrometrijo**

Pri določevanju analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti s tandemsko masno spektrometrijo smo uporabili ekstrakcijski postopek na trdnem nosilcu. Razlike v postopku so bile sledeče:

- Volumen krvnega vzorca na DBS papirčku je bil manjši in je znašal 10 µL.
- Kot interni standard smo uporabili lamotrigin, ki je označen z izotopom C<sup>13</sup>.
- Uporabili smo drugo topilo za raztopljanje suhega eluata po ekstrakciji na SPE kartuši (100 µL 50-odstotne raztopine metanola v vodi (V/V)).

Opis končne optimizirane kromatografske metode je podan v poglavju 5.4.3. Reprezentativni kromatogrami slepega DBS vzorca in obogatenega krvnega vzorca na DBS papirčku analiziranega z metodo UHPLC-MS/MS pa so podani v poglavju 9.3.

### 6.3.1. Rezultati validacije analizne metode za določanje analitov iz polne krvi s pomočjo tekočinske kromatografije ultra visoke ločljivosti s tandemsko masno spektrometrijo

#### 6.3.1.1. Selektivnost, linearnost in meja določljivosti

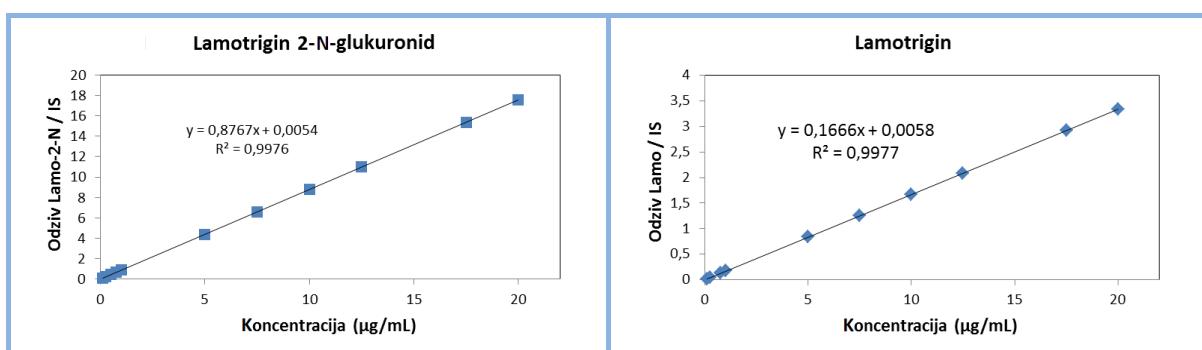
Kromatografsko selektivnost smo tudi pri tej analizni metodi določili z analizo ekstraktov slepih krvnih madežev šestih različnih oseb iz DBS papirčkov. V področju retencijskega časa analitov nismo detektirali motečih vrhov endogenih substanc ozziroma so bili vrhovi petkrat manjši od vrha najnižjega standarda, s čimer je bila selektivnost te metode potrjena.

V koncentracijskem območju od 0,1 do 20 µg/mL je bil odziv kalibracijskih standardov analitov sorazmeren njihovi koncentraciji (slika 8). Linearnost kalibracijskih krivulj smo določili z metodo najmanjših kvadratov in tako dobljene podatke zbrali skupaj z vsoto relativnih napak povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev v preglednici XXXII.

Preglednica XXXII: Regresijski parametri izbranih kalibracijskih krivulj analitov in vsote relativne napake povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev ( $\Sigma |\%RE|$ );  $n = 7$

Analit	b (mL/µg)	a	r <sup>2</sup>	$\Sigma  \%RE^* $
Lamotrigin 2-N-glukuronid	0,877	0,00537	0,9976	38,4
Lamotrigin	0,167	0,00575	0,9977	36,1

$$* \text{ RE } [\%] = \frac{C_{\text{izmerjena}} - C_{\text{nominala}}}{C_{\text{nominala}}} \times 100$$



Slika 8: Reprezentativna umeritvena krivulja za določanje lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina v posušenih krvnih madežih za metodo UHPLC-MS/MS

Točnosti povratno izračunanih koncentracij kalibracijskih standardov lamotrigina in njegovega 2-N-glukuronida za tri dni validacije smo zbrali v preglednicah XXXIII in XXXIV. Ker nobena izmed vrednosti ni presegla FDA-jevega kriterija 15 % (oziroma 20 % pri LLOQ), smo potrdili točnost metode.

Preglednica XXXIII: Točnost kalibracijskih standardov lamotrigin 2-N-glukuronida v treh dnevih validacije

		1. dan		2. dan		3. dan	
C <sub>nominal</sub> [µg/mL]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	
0,1	0,094	94,2	0,098	97,8	0,094	93,9	
0,25	0,280	112,2	0,272	108,6	0,277	110,9	
0,5	*	*	0,485	97,0	0,545	109,0	
0,75	0,766	102,2	0,787	105,0	*	*	
1	1,06	106,2	0,869	86,9	*	*	
5	5,58	111,5	4,77	95,4	4,91	98,3	
7,5	7,39	98,5	8,04	107,2	7,72	102,9	
10	9,98	99,8	10,6	105,9	9,57	95,7	
12,5	11,4	91,0	*	*	11,51	92,1	
17,5	16,8	95,8	17,5	100,3	*	*	
20	17,7	88,7	19,2	96,0	19,44	97,2	

Opomba: \* izločena meritev

Preglednica XXXIV: Točnost kalibracijskih standardov lamotrigina v treh dnevih validacije

		1. dan		2. dan		3. dan	
C <sub>nominal</sub> [µg/mL]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	C <sub>izračun.</sub> [µg/mL]	Točnost [%]	
0,1	0,100	100,3	0,104	103,8	0,101	100,8	
0,25	0,250	100,2	*	*	*	*	
0,5	*	*	0,447	89,5	0,464	92,8	
0,75	0,709	94,5	0,690	92,0	0,776	103,5	
1	1,01	101,1	0,911	91,1	1,03	102,7	
5	5,64	112,8	5,14	102,7	4,86	97,3	
7,5	7,25	96,7	7,87	104,9	7,46	99,5	
10	10,1	101,1	10,3	103,3	10,1	101,0	
12,5	13,6	108,9	12,7	101,5	12,5	99,9	
17,5	15,5	88,5	18,7	106,8	18,1	103,2	
20	19,2	95,9	20,9	104,3	19,9	99,5	

Opomba: \* izločena meritev

V preglednici XXXV smo zbrali regresijske parametre kalibracijskih krivulj za vse tri dni.

Preglednica XXXV: Regresijski parametri umeritvene premice v treh dneh validacije

	1. dan	2. dan	3. dan
<b>Lamotrigin 2-N-glukuronid</b>			
b (mL/µg)	1,20	1,071	1,102
a	0,00966	0,00111	0,0263
r <sup>2</sup>	0,9851	0,9973	0,9956
<b>Lamotrigin</b>			
b (mL/µg)	0,163	0,163	0,179
a	-0,00283	-0,00214	0,00127
r <sup>2</sup>	0,9868	0,9949	0,9993

Spodnja meja določljivosti (LLOQ) za lamotrigin in njegov 2-N-glukuronid znaša 0,1 µg/mL in ustreza FDA-jevim kriterijem za točnost in velikosti odziva.

### 6.3.1.2. Točnost in ponovljivost

Rezultate točnosti in ponovljivosti smo za tri dni zbrali v preglednicah XXXVI in XXXVII. Znotraj-dnevna točnost se giblje med 94 in 100 % za lamotrigin 2-N-glukuronid in med 104 in 111 % za lamotrigin. Med-dnevna točnost lamotrigin 2-N-glukuronida znaša 92-108 % in 99-110 % za lamotrigin. Koeficienti variacije za lamotrigin in njegov 2-N-glukuronid niso presegli 6 % znotraj dneva in 7 % med dnevi in zato lahko potrdimo točnost in natančnost naše metode.

Preglednica XXXVI: Znotraj-dnevna in med-dnevna ponovljivost in točnost določanja lamotrigin 2-N-glukuronida v krvnih vzorcih

	Vzorec	C <sub>nominal</sub> [µg/mL]	Č <sub>izračun</sub> [µg/mL]	CV [%]	Točnost [%]
Znotraj dneva (n = 5)	QC <sub>L</sub>	0,3	0,299	4,39	99,8
	QC <sub>M</sub>	3	2,86	5,79	95,3
	QC <sub>H</sub>	15	14,1	5,81	94,0
Med dnevi (n = 15)	QC <sub>L</sub>	0,3	0,325	6,83	108,3
	QC <sub>M</sub>	3	2,77	3,07	92,2
	QC <sub>H</sub>	15	14,2	0,78	94,8

Preglednica XXXVII: Znotraj-dnevna in med-dnevna ponovljivost in točnost določanja lamotrigina v krvnih vzorcih

	Vzorec	C <sub>nominal</sub> [µg/mL]	Č <sub>izračun</sub> [µg/mL]	CV [%]	Točnost [%]
Znotraj dneva (n = 5)	QC <sub>L</sub>	0,3	0,33	5,86	110,6
	QC <sub>M</sub>	3	2,59	4,54	103,7
	QC <sub>H</sub>	15	15,6	4,70	103,9

	Vzorec	C <sub>nominal</sub> . [µg/mL]	$\bar{C}$ izračun. [µg/mL]	CV [%]	Točnost [%]
Med dnevi (n = 15)	QC <sub>L</sub>	0,3	0,331	0,23	110,4
	QC <sub>M</sub>	3	2,46	5,91	98,5
	QC <sub>H</sub>	15	15,5	1,48	103,4

### 6.3.1.3. Učinek matrice in izkoristek ekstrakcije

Učinek matrice je zelo pomemben tudi pri tekočinski kromatografiji, sklopljeni s tandemsko masno spektrometrijo, saj imajo lahko moteče komponente iz biološkega vzorca zaradi vpliva na ionizacijo in občutljivost detektorja velik vpliv na točnost, selektivnost in občutljivost metode (74). Ta učinek smo poskušali zmanjšati med razvojem analizne metode (z uporabo ionsko-izmenjevalne ekstrakcije na trdnem nosilcu in injiciranjem majhnega volumna vzorca, 1,0 µL). Odsotnost učinka matrice smo dokazali tako, da smo ekstrahiranim slepim vzorcem krvi iz DBS papirčka dodali standard, kot je to predlagal raziskovalec Matuszewski. Najprej smo določili absolutni učinek matrice za krvne vzorce 5 oseb (v preglednicah XXXVIII in XXXIX so označeni kot osebe A do E) in sicer je znašal za lamotrigin 2-N-glukuronid od 86,6 do 118,9 % pri kontrolnem vzorcu s koncentracijo 0,3 µg/mL (QC<sub>L</sub>). Visok učinek matrice, ki smo ga zaznali pri nizkih koncentracijah lamotrigin 2-N-glukuronida, je bil manj izrazit pri kontrolnem vzorcu s koncentracijo 15 µg/mL (QC<sub>H</sub>), saj se je gibal med 89,6 in 115,2 %. Absolutni učinek matrice ni bil tako visok pri lamotriginu saj se je gibal med 92,8 in 102,3 % pri vzorcih QC<sub>L</sub> ozziroma med 93,8 in 106,4 % pri vzorcih QC<sub>H</sub>. Primerjava izračunanih CV vrednosti obeh setov vzorcev za lamotrigin 2-N-glukuronid govori, da je relativni učinek matrice pri vzorcih QC<sub>L</sub> prisoten (CV<sub>(set A)</sub> je znašal 15,8 % medtem ko je CV<sub>(set B)</sub> znašal 10,7 %) in se z višanjem koncentracije lamotrigin 2-N-glukuronida zmanjšuje (CV<sub>(set A)</sub> je 9,84 %; CV<sub>(set B)</sub> pa 5,9 %). In podobno opazimo tudi pri lamotriginu, kjer se visok relativni učinek matrice pri nizkih koncentracijah (QC<sub>L</sub> vzorci: CV<sub>(set A)</sub> = 4,29 %; CV<sub>(set B)</sub> = 10,6 %) z naraščanjem koncentracije zmanjšuje (QC<sub>H</sub> vzorci: CV<sub>(set A)</sub> = 5,05 %; CV<sub>(set B)</sub> = 5,26 %).

Preglednica XXXVIII: Absolutni in relativni učinek matrice za lamotrigin 2-N-glukuronid v posušenih kapljicah krvi

Povprečni odziv Lamo-2-N/IS			
Kri (n = 5)	A	B	ME [%]
A + QC <sub>L</sub>	0,184	0,213	86,6
B + QC <sub>L</sub>	0,253		118,9

Povprečni odziv Lamo-2-N/IS			
Kri (n = 5)	A	B	ME [%]
C + QC <sub>L</sub>	0,187		87,7
D + QC <sub>L</sub>	0,251		117,8
E + QC <sub>L</sub>	0,247		115,9
		CV	15,8
A + QC <sub>H</sub>	12,6		96,4
B + QC <sub>H</sub>	15,1		115,2
C + QC <sub>H</sub>	11,7	13,1	89,6
D + QC <sub>H</sub>	14,1		107,5
E + QC <sub>H</sub>	14,1		107,5
		CV	9,84

Legenda: A – postekstrakcijsko dodan standard  
B – standard v mobilni fazi

Preglednica XXXIX: Absolutni in relativni učinek matrice za lamotrigina v posušenih kapljicah krvi

Povprečni odziv Lamo/IS			
Kri (n = 5)	A	B	ME [%]
A + QC <sub>L</sub>	0,0420		102,3
B + QC <sub>L</sub>	0,0381		92,8
C + QC <sub>L</sub>	0,0407	0,0410	99,3
D + QC <sub>L</sub>	0,0381		92,8
E + QC <sub>L</sub>	0,0394		96,0
		CV	4,29
A + QC <sub>H</sub>	2,38		106,4
B + QC <sub>H</sub>	2,24		100,3
C + QC <sub>H</sub>	2,18	2,24	97,4
D + QC <sub>H</sub>	2,13		95,5
E + QC <sub>H</sub>	2,10		93,8
		CV	5,05

Legenda: A – postekstrakcijsko dodan standard  
B – standard v mobilni fazi

Izkoristek ekstrakcije smo določili tako, da smo primerjali odzive pri vzorcih, ki smo jim dodali standarda analitov in IS krvi pred ekstrakcijo (set vzorcev C), z odzivi vzorcev, pri katerih smo standardno raztopino analitov in IS v mobilni fazi dodali ekstrahiranemu suhemu preostanku slepe krvi po ekstrakciji (set vzorcev B). Z uporabo rekonstituirane slepe krvi namesto mobilne faze pri pripravi vzorca B eliminiramo učinek matrice in tako dobimo pravilnejše vrednosti (53). Tako je povprečni izkoristek ekstrakcije lamotrigin 2-N-glukuronida znašal 106 %, za lamotrigin pa je bila ta vrednost 109 % (preglednica XL).

Preglednica XL: Izkoristki ekstrakcije (Re) kontrolnih vzorcev lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina (QC<sub>L</sub>, QC<sub>M</sub> in QC<sub>H</sub>; n = 5) in IS (n = 15) iz posušenih kapljic krvi ter njihova variabilnost (CV)

	A		B		Re [%]	Povprečje [%]	CV [%]
	Povpr. odziv	CV [%]	Povpr. odziv	CV [%]			
<b>Lamotrigin 2-N-glukuronid</b>							
QC <sub>L</sub> (0,3 µg/mL)	17361	4,15	17299	5,15	100	106	8,06
QC <sub>H</sub> (15 µg/mL)	607653	5,71	540156	3,06	112		
<b>Lamotrigin</b>							
QC <sub>L</sub> (0,3 µg/mL)	2673	4,69	2545	1,86	105	109	5,37
QC <sub>H</sub> (15 µg/mL)	108857	3,23	96053	2,03	113		
Legenda: A – ekstrahiran krvni standard B – postekstrakcijsko dodan standard							

#### 6.3.1.4. Stabilnost

Rezultati, zbrani v preglednici XLI, potrjujejo, da je vzorec posušenega krvnega madeža na papirčku, ki je shranjen v PVC vrečki s sušilnim sredstvom, stabilen vsaj štiri tedne pri sobni temperaturi. Rezultati testiranja ekstrahiranih vzorcev DBS v steklenem insertu znotraj HPLC viale potrjujejo, da je lamotrigin in njegov 2-N-glukuronid stabilen vsaj 24 ur, če je vzorec shranjen pri 4°C v avtomatskem vzorčevalniku.

Preglednica XLI: Rezultati stabilnostnih testov kontrolnih vzorcev lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina

	Povprečna sprememba odziva glede na t <sub>0</sub> [%]	
	QC <sub>L</sub> (0,3 µg/mL)	QC <sub>H</sub> (15 µg/mL)
Lamotrigin 2-N-glukuronid		
ALS 12 h (n = 3) <sup>a</sup>	-1,37	11,4
ALS 24 h (n = 3) <sup>b</sup>	13,7	11,3
Dolgoročna (n = 3) <sup>c</sup>	-13,3	6,88
Dolgoročna (n = 3) <sup>d</sup>	-15,41	-13,1
Lamotrigin		
Povprečna sprememba odziva glede na t <sub>0</sub> [%]		
	QC <sub>L</sub> (0,3 µg/mL)	QC <sub>H</sub> (15 µg/mL)
ALS 12 h (n = 3) <sup>a</sup>	8,76	3,91
ALS 24 h (n = 3) <sup>b</sup>	8,40	4,68
Dolgoročna (n = 3) <sup>c</sup>	4,87	-0,51
Dolgoročna (n = 3) <sup>d</sup>	-7,71	-1,75
Legenda: <sup>a</sup> Po 12 h v avtomatskem vzorčevalniku na 4°C. <sup>b</sup> Po 24 h v avtomatskem vzorčevalniku na 4°C. <sup>c</sup> Po dveh tednih na sobni temperaturi; primerjava glede na nominalno vrednost. <sup>d</sup> Po štirih tednih na sobni temperaturi; primerjava glede na nominalno vrednost.		

### **6.3.2. Primerjava razvite metode z objavljenimi analiznimi metodami**

Številni raziskovalci so razvili analizne metode za določevanje lamotrigina s pomočjo tekočinske kromatografije sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo. Tako smo zasledili več objavljenih raziskav, v katerih so razvili analizne metode za določanje samega lamotrigina ali pa lamotrigina skupaj z drugimi protiepileptičnimi zdravili iz bioloških vzorcev. Večina raziskovalcev je določala lamotrigin iz plazme ali seruma (88-96). Le raziskovalec Sørensen je objavil analizno metodo za sočasno določanje več kislin oziroma nevtralnih spojin (vključno z lamotriginom) iz krvnih vzorcev za potrebe forenzične toksikologije (97). V nobeni izmed objavljenih raziskav nismo zasledili analizne metode za sočasno določanje lamotrigina in njegovega glavnega metabolita iz posušenih krvnih madežev.

### **6.3.3. Rezultati meritev vzorcev bolnikov**

Devetim bolnikom, ki smo jim določili krvne koncentracije lamotrigina in njegovega glavnega metabolita z metodo HPLC-UV, smo znova določili posamezne krvne koncentracije, tokrat s pomočjo metode UHPLC-MS/MS. Rezultati analiz so za posamezne bolnike zbrani v preglednici XLII.

Preglednica XLII: Izmerjene krvne koncentracije lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina [ $\mu\text{g/mL}$ ] ob 0 h in 4 h po *per os* aplikaciji zdravila z lamotriginom

Šifra bolnika	Dnevni odmerek [mg]	$C_{\text{lamotrigin 2-N-glukuronid}} [\mu\text{g/mL}]^a$		$C_{\text{lamotrigin}} [\mu\text{g/mL}]^b$	
		0 h	4 h	0 h	4 h
B83	100	0,37	0,39	4,61	5,46
B84	200	1,41	1,28	3,14	4,49
B85	250	1,63	1,63	6,42	7,69
B86	400	2,14	1,67	3,50	6,20
B87	100	0,60	0,68	1,83	2,85
B88	300	2,10	2,09	6,09	8,08
B89	100	0,31	0,35	1,84	2,45
B90	250	1,09	1,28	3,48	5,40
B91	400	3,22	3,52	9,39	12,95

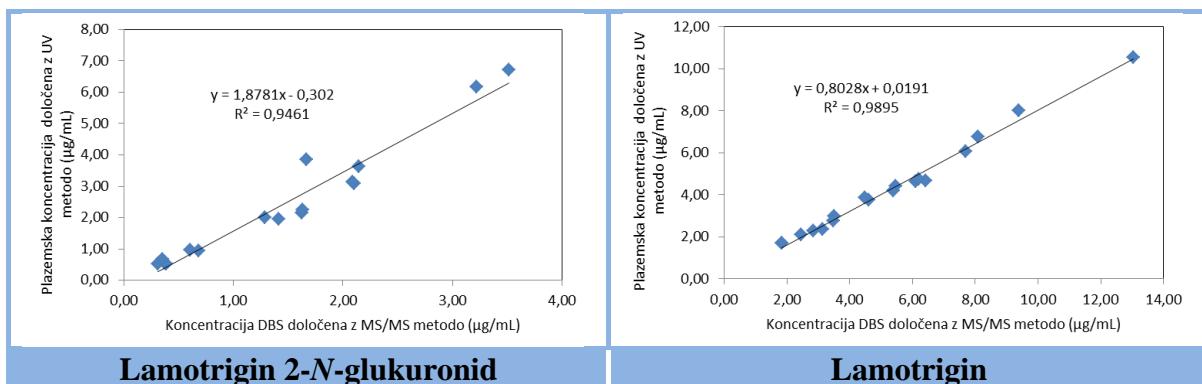
Opomba: <sup>a</sup> Krvne koncentracije lamotrigin 2-N-glukuronida so bile izračunane na podlagi umeritvene krivulje z enačbo:

odziv (lamo-2-N/IS) =  $0,877 \times \text{konz.} + 0,00537$ ;  $r^2 = 0,9976$

<sup>b</sup> Krvne koncentracije lamotrigina so bile izračunane na podlagi umeritvene krivulje z enačbo:

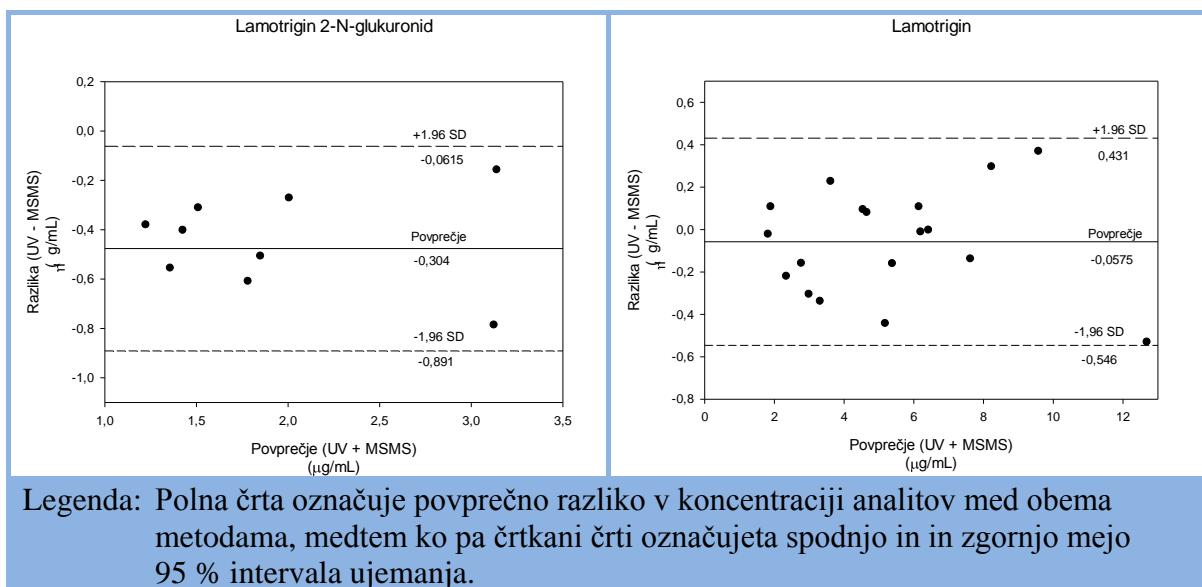
odziv (lamo/IS) =  $0,167 \times \text{konz.} + 0,00575$ ;  $r^2 = 0,9977$

Ko primerjamo rezultate analiz tekočinske kromatografije z UV detekcijo in s tandemsko masno spektrometrijo, opazimo dobro ujemanje med koncentracijami lamotrigina v vzorcih DBS ( $r^2 > 0,99$ ), medtem ko je bilo ujemanje za lamotrigin 2-N-glukuronida nekoliko slabše ( $r^2 > 0,95$ ).



Slika 9: Primerjava rezultatov analiz krvnih vzorcev devetih bolnikov s pomočjo HPLC-UV metode in s pomočjo UHPLC-MS/MS metode

Obe analizni metodi za določanje analitov iz krvnih madežev smo primerjali tudi s pomočjo Bland-Altmanovega testa. Rezultati tega testa so tudi potrdili dobro ujemanje med obema metodama (slika 10), saj nobeden rezultat ni bil izven 95 % intervala ujemanja. Rezultati za lamotrigin so se v povprečju razlikovali za  $0,0575 \mu\text{g/mL}$ , medtem ko je bila ta razlika pri njegovem glukuronidu nekoliko višja in je znašala v povprečju  $0,304 \mu\text{g/mL}$ .



Slika 10: Bland-Altmanova grafa, ki primerjata analizni metodi HPLC-UV in UHPLC-MS/MS za določanje lamotrigin 2-N-glukuronida in lamotrigina v posušenih krvnih madežih

Poleg same primerjave analiznih metod za določanje analitov iz krvnih vzorcev nas zanima tudi primerjava določenih koncentracij analitov v krvni plazmi in polni krvi. Ta primerjava nam omogoča, da lahko na poznavanju terapevtskih intervalov, ki so opredeljeni za krvno plazmo, postavimo terapevtske intervale za polno kri.

Če primerjamo koncentracije analitov, ki smo jih določili v polni krvi in krvni plazmi bolnikov lahko ugotovimo, da so plazemske koncentracije lamotrigin 2-N-glukuronida za približno dvakrat višje od koncentracij določenih v polni krvi (slika 9, naklon regresijske premice za lamotrigin 2-N-glukuronid). Molekula glukuronida spada v skupino zelo polarnih spojin in zato težje prehaja v krvne celice. Posledično so koncentracije v polni krvi nižje kot v krvni plazmi. Nasprotno pa velja za lamotrigin, saj so koncentracije v krvni plazmi za približno 20 % nižje kot v polni krvi (slika 9, naklon regresijske premice za lamotrigin). Lamotrigin večjo lipofilnost in zato laže prehaja v krvne celice.

Omenjene razlike je potrebno upoštevati pri interpretaciji koncentracij določenih v polni krvi. Vendar pa je potrebno za dokončno postavitev odnosa med koncentracijami analitov v polni krvi in krvni plazmi izvesti dodatne eksperimente, ki bi te opažene razlike potrdile.

## 7. SKLEP

Razvili smo tri selektivne in zanesljive analizne metode tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detektorjem ali MS/MS detektorjem, ki so primerne za določevanje plazemskih ali krvnih koncentracij (DBS metoda) lamotrigina in njegovega glavnega metabolita 2-N-glukuronida.

Metoda za določanje plazemskih koncentracij je osnovana na relativno enostavni pripravi vzorca. Optimiziran postopek izhaja iz 165 µl plazme, kjer z dodatkom metanola dosežemo obarjanje plazemskih proteinov. Optimizirani kromatografski pogoji obsegajo ločbo analitov na reverzno-fazni koloni C8 in izokratski mobilni fazi. Metoda ustreza zahtevam za validacijo bioanaliznih metod po smernicah, ki jih je izdala ameriška agencija za hrano in zdravila, v območju od 0,1 do 20 µg/mL za lamotrigin oziroma od 0,1 do 15 µg/mL za njegov glavni metabolit. Razvita metoda je edina, ki omogoča določanje tako visokih koncentracij lamotrigina sočasno z njegovim glavnim metabolitom.

Metoda za določanje izbranih analitov v DBS se je izkazala za kompleksnejšo. Enostavna priprava vzorca, ki je bila uporabljena pri metodi za določanje plazemskih koncentracij analitov, ni bila mogoča pri metodi DBS zaradi prevelikega vpliva ekstrahiranih molekul biološke matrice iz vzorca krvi. Zato je bila potrebna ekstrakcija na trdnih nosilcih mešanega tipa. Iz 15 µl (HPLC UV) oz. 10 µl (HPLC MS/MS) posušene krvi na DBS papirčku Whatman 903 sta se analita specifično vezala na izbrani SPE nosilec s pomočjo lipofilnih in ionskih interakcij. Ta postopek ekstrakcije je bil primeren za določanje analitov s HPLC z UV detektorjem in tandemsko masno spektrometrijo in predstavlja novost v primerjavi z že objavljenimi analiznimi metodami.

Pogoji kromatografije vzorcev DBS z UV detektorjem obsegajo ločbo analitov na reverzno-fazni koloni C18 in z uporabo gradientne mobilne faze. Metoda je ustreza validacijskim zahtevam. Tudi DBS analizna metoda s tekočinsko kromatografijo in tandemsko masno spektrometrijo je potekala na reverzno-fazni koloni C18 z gradientno mobilno fazo. Ločene analite smo kvantificirali z multirezidualno analizo z masnim prehodom za lamotrigin  $m/z$  256 → 211 in masnim prehodom 432 → 256 za njegov

glukuronid. Metoda je ustrezala validacijskim zahtevam in tudi predstavlja novost v primerjavi z že objavljenimi analiznimi metodami.

Območje metode je bilo od 0,1 do 20 µg/mL, z ustreznimi linearnostjo ( $r^2 > 0,985$ ), točnostjo (94,0 – 110,6 %), ponovljivostjo (dnevna 4,39 – 5,86 %; med-dnevna 0,23 – 6,83%), učinkom matrice ter stabilnostjo. Spodnja meja določljivosti je bila za oba analita 0,1 µg/mL.

Območja vseh treh metod za lamotrigin obsegajo terapevtska območja za lamotrigin in so zato primerna za terapevtsko spremljanje koncentracij lamotrigina. To smo tudi potrdili z analizo plazemskih in vzorcev DBS bolnikov na terapiji z lamotriginom, saj smo v vseh vzorcih bolnikov uspeli določiti koncentracije obeh analitov. Rezultati analiz tekočinske kromatografije z UV detekcijo in s tandemско masno spektrometrijo so pokazali dobro ujemanje med koncentracijami lamotrigina v vzorcih DBS ( $r^2 > 0,99$ ), medtem ko je bilo ujemanje za lamotrigin 2-N-glukuronid nekoliko slabše ( $r^2 > 0,95$ ). Za lamotrigin so bile plazemske koncentracije za približno 20 odstotkov nižje od krvnih koncentracij, medtem ko so bile plazemske koncentracije lamotrigin 2-N-glukuronida približno dvakrat višje od koncentracij določenih v polni krvi. Razlike v koncentracijah analitov v plazmi in polni krvi so verjetno posledica različnega porazdeljevanja analitov med plazmo in krvnimi celicami. Ker so terapevtska območja lamotrigina določena za plazemske koncentracije je pri interpretaciji krvnih koncentracij potrebno upoštevati te razlike.

## 8. LITERATURA

1. Kališnik M: Slovenski medicinski slovar. Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2002.
2. Berkow R, Beers MH, Fletcher AJ: Veliki zdravstveni priročnik. MSD, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2000.
3. Ribarič S: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9. Izdaja, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2001.
4. Bassin S, Smith TI, Bleck TP: Clinical review: Status epilepticus. Crit Care, 2002, 6(2): 137-142.
5. The National Institute of Neurological Disorders and stroke of National Institutes of Health: Evolving Directions in the Management of Epilepsy. Clinician, 2002, 20(1): 1-31.
6. Deckers CLP, Knoester PD, de Haan GJ, Keyser A, Renier WO, Hekster YA: Selection Criteria for the Clinical Use of the Newer Antiepileptic Drugs. CNS Drugs, 2003, 17(6): 405-421.
7. Orhan G, Wuttke TV, Nies AT, Schwab M, Lerche H: Retigabine/Ezogabine, a KCNQ/Kv7 channel opener: pharmacological and clinical data. Expert Opin Pharmacother, 2012, 13(12): 1807-1816.
8. Zgonc V, Čebular B: Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. Zdrav Vestn, 2006, 75: 379-388.
9. Heaney D, Walker MC: Rufinamide. Drugs Today (Barc), 2007, 43(7): 455-460.
10. Trojnar MK, Wojtal K, Trojnar MP, Czuczwar SJ: Stiripentol. A novel antiepileptic drug. Pharmacol Rep, 2005, 57(2): 154-160.
11. Verrottia A, Loiacono G, Rossi A, Zaccaraca G: Eslicarbazepine acetate: An update on efficacy and safety in epilepsy. Epilepsy Res, 2013, 108(1): 1-10.
12. Fattore C, Perucca E: Novel Medications for Epilepsy. Drugs, 2011, 71(16): 2151-2178.
13. Asconapé JJ: Epilepsy: new drug targets and neurostimulation. Neurol Clin, 2013, 31(3): 785-798.
14. Prunetti P, Perucca E: New and forthcoming anti-epileptic drugs. Curr Opin Neurol, 2011, 24(2): 159-164.

15. Patsalos PN: Drug Interactions with the Newer Antiepileptic Drugs (AEDs) – Part 1: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions Between AEDs. *Clin Pharmacokinet*, 2013, 52(11): 927-966.
  16. Reimers A, Brodtkorb E: Second-generation antiepileptic drugs and pregnancy: a guide for clinicians. *Expert Rev Neurother*, 2012, 12(6): 707-717.
  17. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, Leppik IE, Tomson T, Perucca E: Antiepileptic drugs – best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 2008, 49(7): 1239-1276.
  18. Patsalos PN, Berry DJ: Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs by Use of Saliva. *Ther Drug Monit*, 2013, 35(1): 4-29.
  19. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Phemiton. Pliva, revizija 7. oktober 2011
  20. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Rivotril. Roche, revizija 21. januar 2013
  21. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Tegretol. Pliva, revizija 27. november 2012
  22. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Depakine chrono. Sanofi-aventis, revizija 15. julij 2013
  23. Lexi Drugs Online: Diazepam, Valproic Acid and Derivatives, Carbamazepine, Phenobarbital, Phenytoin, Primidone, Ethosuximide, Mephobarbital, Clonazepam. Lexi Comp, 2006.
  24. Patsalos PN, Fröscher W, Pisani F, van Rijn CM: The importance of drug interactions in epilepsy therapy. *Epilepsia*, 2002, 43(4): 365-385.
  25. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Zebinix. BIAL, revizija 12. avgust 2013
  26. FDA approved labeling: Felbatol. Meda, revizija 31. avgust 2012
  27. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Neurontin. Pfizer, revizija 3. april 2013
  28. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Vimpat. UCB, revizija 9. avgust 2013
  29. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Lamictal. GSK, revizija 20. julij 2011
  30. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Keppra. UCB, revizija 3. oktober 2013
  31. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Karbox. Generics, revizija 27. november 2011
  32. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Fycompa. Eisai, revizija 27. november 2012
  33. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Lyrica. Pfizer, revizija 6. avgust 2013
  34. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Trobalt. Glaxo, revizija 25. oktober 2013
  35. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Inovelon. Eisai, revizija 6. avgust 2013
-

36. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Diacomit. Biocodex, revizija 31. januar 2013
  37. FDA approved labeling: Gabitril. Cephalon, revizija 11. oktober 2010
  38. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Topamax. Johnson & Johnson, revizija 25. junij 2013
  39. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Sabril. Sanofi-aventis, revizija 31. januar 2011
  40. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Zonegran. Eisai, revizija 18. oktober 2013
  41. Edelbroek PM, van der Heijden J, Stolk LML: Dried Blood Spot Methods in Therapeutic Drug Monitoring: Methods, Assays, and Pitfalls. *Ther Drug Monit*, 2009, 31(3): 327-336.
  42. Britton JW, So EL: New antiepileptic drugs: Prospects for the future. *J Epilepsy*, 1995, 8(4): 267-281.
  43. Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, Perucca E: Antiepileptic Drugs, 5. izdaja. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002.
  44. Dawes M, Chowienczyk PJ: Pharmacokinetics in pregnancy. Best Practise & Research. *Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2001, 15(6): 819-826.
  45. Harden CL: Pregnancy and Epilepsy. *Semin Neurol*, 2007, 27(5): 453-459.
  46. Battino D, Tomson T: Management of Epilepsy during Pregnancy. *Drugs*, 2007, 67(18): 2727-2746.
  47. Italiano D, Perucca E: Clinical Pharmacokinetics of New-Generation Antiepileptic Drugs at the Extremes of Age: An Update. *Clin Pharmacokinet*, 2013, 52(8): 627-645.
  48. Cheng C-L, Chou C-H, Huc OY-P: Determination of lamotrigine in small volumes of plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 817(2): 199-206.
  49. Morgan PE, Fisher DS, Evers R, Flanagan RJ: A rapid and simple assay for lamotrigine in serum/plasma by HPLC, and comparison with an immunoassay. *Biomed Chromatogr*, 2010, 25(7): 775-778.
  50. Sallustio BC, Morris RG: High-performance liquid chromatography quantitation of plasma lamotrigine concentrations: application measuring trough concentrations in patients with epilepsy. *Ther Drug Monit*, 1997, 19(6): 688-693.
  51. Bartoli A, Marchiselli R, Gatti G: A rapid and specific assay for the determination of lamotrigine in human plasma by normal-phase HPLC. *Ther Drug Monit*, 1997, 19(1): 100-107.
-

52. Londero D, Lo Greco P: New micromethod for the determination of lamotrigine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 691(1): 139-144.
53. Matar KM, Nicholls PJ, Bawazir SA, al-Hassan MI, Tekle A: A rapid liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 17(3): 525-531.
54. Angelis-Stoforidis P, Morgan DJ, O'Brien TJ, Vajda FJ: Determination of lamotrigine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, 727(1-2): 113-118.
55. Croci D, Salmaggi A, de Grazia U, Bernardi G: New high-performance liquid chromatographic method for plasma/serum analysis of lamotrigine. *Ther Drug Monit*, 2001, 23(6): 665-668.
56. Barbosa NR, Mídio AF: Validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000, 741(2): 289-293.
57. Castel-Branco MM, Almeida AM, Falcão AC, Macedo TA, Caramona MM, Lopez FG: Lamotrigine analysis in blood and brain by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 755(1-2): 119-127.
58. Rivas N, Zarzuelo A, López FG: Optimisation of a high-efficiency liquid chromatography technique for measuring lamotrigine in human plasma. *Farm Hosp*, 2010, 34(2): 85-89.
59. Forssblad E, Eriksson AS, Beck O: Liquid chromatographic determination of plasma lamotrigine in pediatric samples. *J Pharm Biomed Anal*, 1996, 14(6): 755-758.
60. Heideloff C, Bunch DR, Wang S: A novel HPLC method for quantification of 10 antiepileptic drugs or metabolites in serum/plasma using a monolithic column. *Ther Drug Monit*, 2010, 32(1): 102-106.
61. Matar KM, Nicholls PJ, Tekle A, Bawazir SA, Al-Hassan MI: Liquid chromatographic determination of six antiepileptic drugs and two metabolites in microsamples of human plasma. *Ther Drug Monit*, 1999, 21(5): 559-566.
62. Franceschi L, Furlanut M: A simple method to monitor plasma concentrations of oxcarbazepine, carbamazepine, their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients. *Pharmacol Res*, 2005, 51(4): 297-302.

63. Greiner-Sosanko E, Lower DR, Virji MA, Krasowski MD: Simultaneous determination of lamotrigine, zonisamide, and carbamazepine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(3): 225-228.
  64. Contin M, Mohamed S, Candela C, Albani F, Riva R, Baruzzi A: Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(3-4): 461-465.
  65. Contin M, Balboni M, Callegati E, Candela C, Albani F, Riva R, Baruzzi A: Simultaneous liquid chromatographic determination of lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 828(1-2): 113-117.
  66. Vermeij TA, Edelbroek PM: Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, oxcarbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 857(1): 40-46.
  67. Cooper JD, Shearsby NJ, Taylor JE, Fook Sheung CT: Simultaneous determination of lamotrigine and its glucuronide and methylated metabolites in human plasma by automated sequential trace enrichment of dialysates and gradient high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 702(1-2): 227-233.
  68. Saracino MA, Bugamelli F, Conti M, Amore M, Raggi MA: Rapid HPLC analysis of the antiepileptic lamotrigine and its metabolites in human plasma. *J Sep Sci*, 2007, 30(14): 2249-2255.
  69. Wegner I, Edelbroek P, de Haan GJ, Lindhout D, Sander JW: Drug monitoring of lamotrigine and oxcarbazepine combination during pregnancy. *Epilepsia*, 2010, 51(12): 2500-2502.
  70. Shah NM, Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, McElnay JC: A simple bioanalytical method for the quantification of antiepileptic drugs in dried blood spots. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 923-924: 65-73.
  71. Li W, Tse FL: Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(1): 49-65.
  72. Edelbroek PM, van der Heijden J, Stolk LM: Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls. *Ther Drug Monit*, 2009, 31(3): 327-336.
-

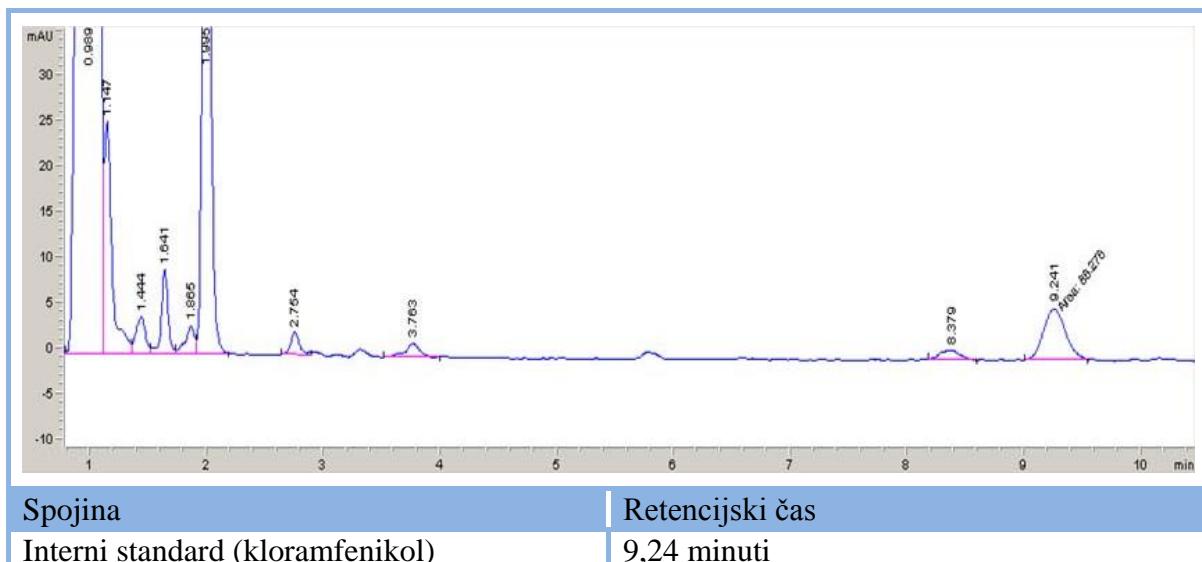
73. Shah HJ, Subbaiah G, Patel DM, Suhagia BN, Patel CN: Rapid quantification of lamotrigine in human plasma by two LC systems connected with tandem MS. *J Chromatogr Sci*, 2010, 48(5): 375-381.
74. FDA Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, končna izdaja, maj 2001
75. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem*, 2003, 75(13): 3019-3030.
76. Matuszewski BK: Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 830(2): 293-300.
77. Ederveen J: A Practical Approach to Biological Assay Validation. Progress report number 08090, Progress Project Management & Engineering, Hoofddorp, 2010.
78. Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcao AC: Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 774(2): 215-222.
79. Vovk T, Trontelj J: Analizne metode v farmakokinetiki (interno gradivo), 2011.
80. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y: Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(23): 2198-2207.
81. Taylor PJ: Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*, 2005, 38(4): 328-334.
82. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR: Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 852(1-2): 22-34.
83. Soons JWPH, van Bree ML, Coumou JH, Hulsman JARJ: Lamotrigine in dried blood spots by HPLC. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*, 2006, 31(3): 238-239.
84. Wegner I, Edelbroek PM, Bulk S, Lindhout D: Lamotrigine kinetics within the menstrual cycle, after menopause, and with oral contraceptives. *Neurology*, 2009, 73(17): 1388-1393.

85. Wegner I, Edelbroek P, de Haan GJ, Lindhout D, Sander JW: Drug monitoring of lamotrigine and oxcarbazepine combination during pregnancy. *Epilepsia*, 2010, 51(12): 2500-2502.
86. Shah NM, Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, McElnay JC: A simple bioanalytical method for the quantification of antiepileptic drugs in dried blood spots. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 923-924: 65-73.
87. AbuRuz S, Al-Ghazawi M, Al-Hiari Y: A Simple Dried Blood Spot Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Lamotrigine. *Chromatographia*, 2010, 71(11-12): 1093-1099.
88. Marcelín-Jiménez G, Angeles Moreno ACP, Mendoza-Morales L, Rivera-Espinosa L, Martínez MM: Development of an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry micromethod for quantification of lamotrigine in human plasma and its use in a bioequivalence trial. *Bioanalysis*, 2009, 1(1): 47-55.
89. Shah HJ, Subbaiah G, Patel DM, Suhagia BN, Patel CN: Rapid quantification of lamotrigine in human plasma by two LC systems connected with tandem MS. *J Chromatogr Sci*, 2010, 48(5): 375-381.
90. Lee W, Kim JH, Kim HS, Kwon OH, Lee BI, Heo K: Determination of lamotrigine in human serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Neurol Sci*, 2010, 31(6): 717-720.
91. Juenke JM, Miller KA, Ford MA, McMillin GA, Johnson-Davis KL: A comparison of two FDA approved lamotrigine immunoassays with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(19-20): 1879-1882.
92. Kim KB, Seo KA, Kim SE, Bae SK, Kim DH, Shin JG: Simple and accurate quantitative analysis of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(4): 771-777.
93. Hotha KK, Kumar SS, Bharathi DV, Venkateswarulu V: Rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of lamotrigine in human plasma: application to a human pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26(4): 491-496.
94. Shibata M, Hashi S, Nakanishi H, Masuda S, Katsura T, Yano I: Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem

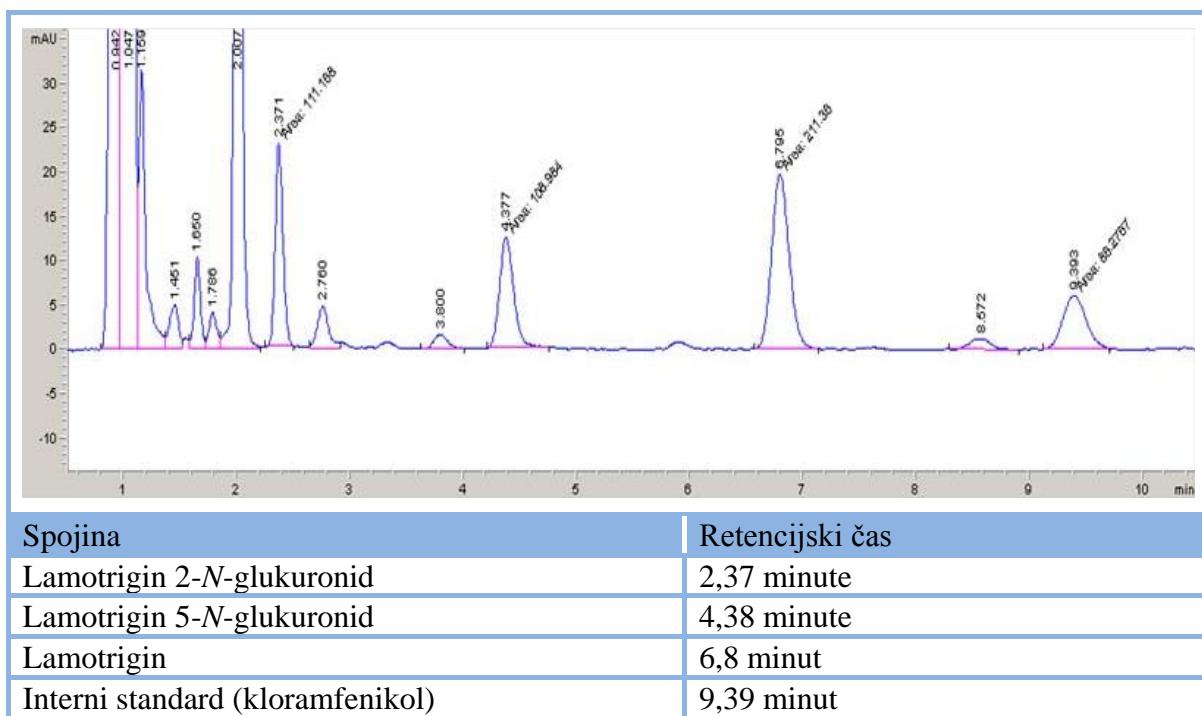
- mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26(12): 1519-1528.
95. Collins JA, Janis GC: Analysis of selected anticonvulsants by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *LC-MS in Drug Analysis: Methods Mol Biol*, 2012, 902: 201-209.
96. Kuhn J, Knabbe C: Fully validated method for rapid and simultaneous measurement of six antiepileptic drugs in serum and plasma using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2013, 110: 71-80.
97. Sørensen LK: Determination of acidic and neutral therapeutic drugs in human blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int*, 2011, 206(1-3): 119-126.

## 9. PRILOGE

### 9.1. Reprezentativni kromatogrami analizne metode za določanje analitov v plazemskih vzorcih

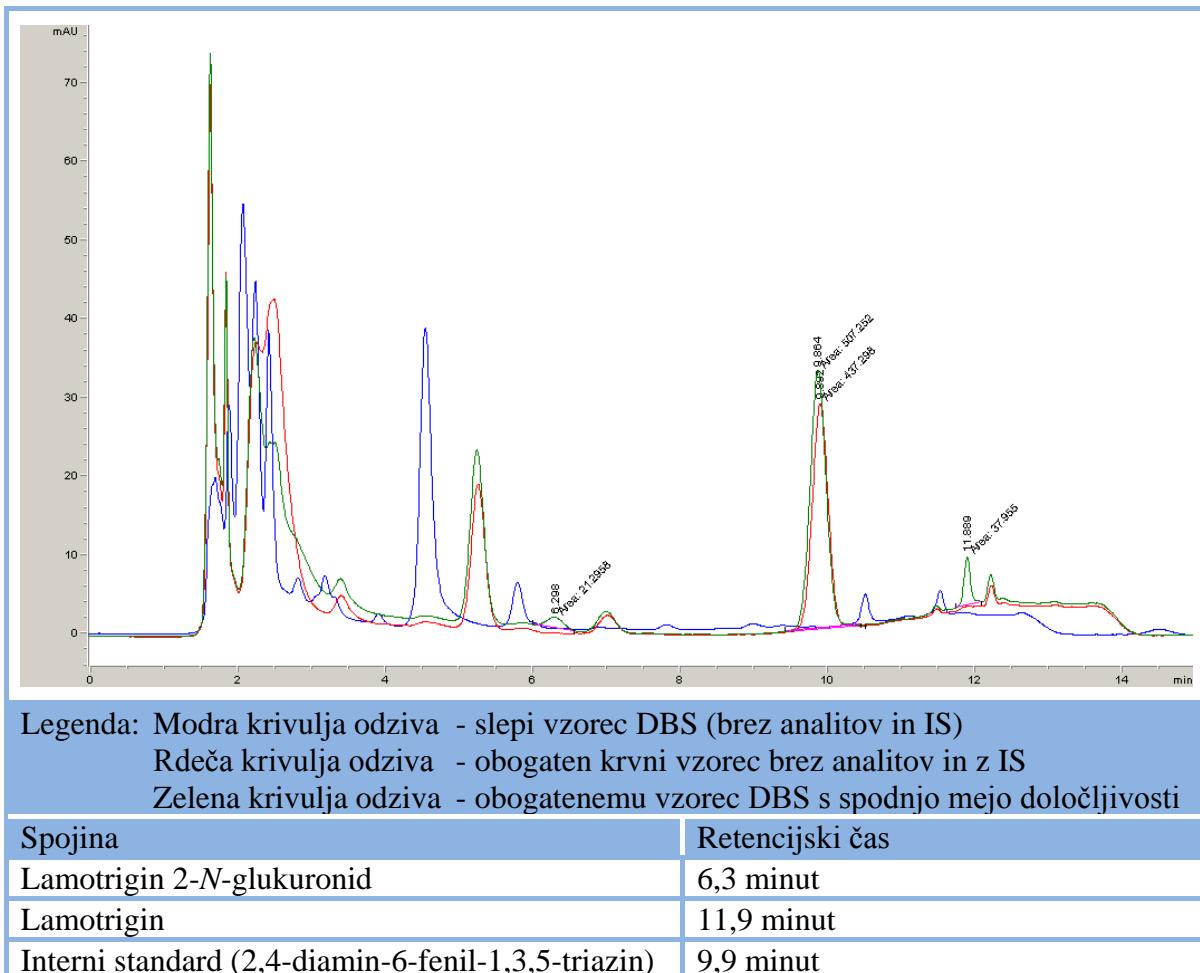


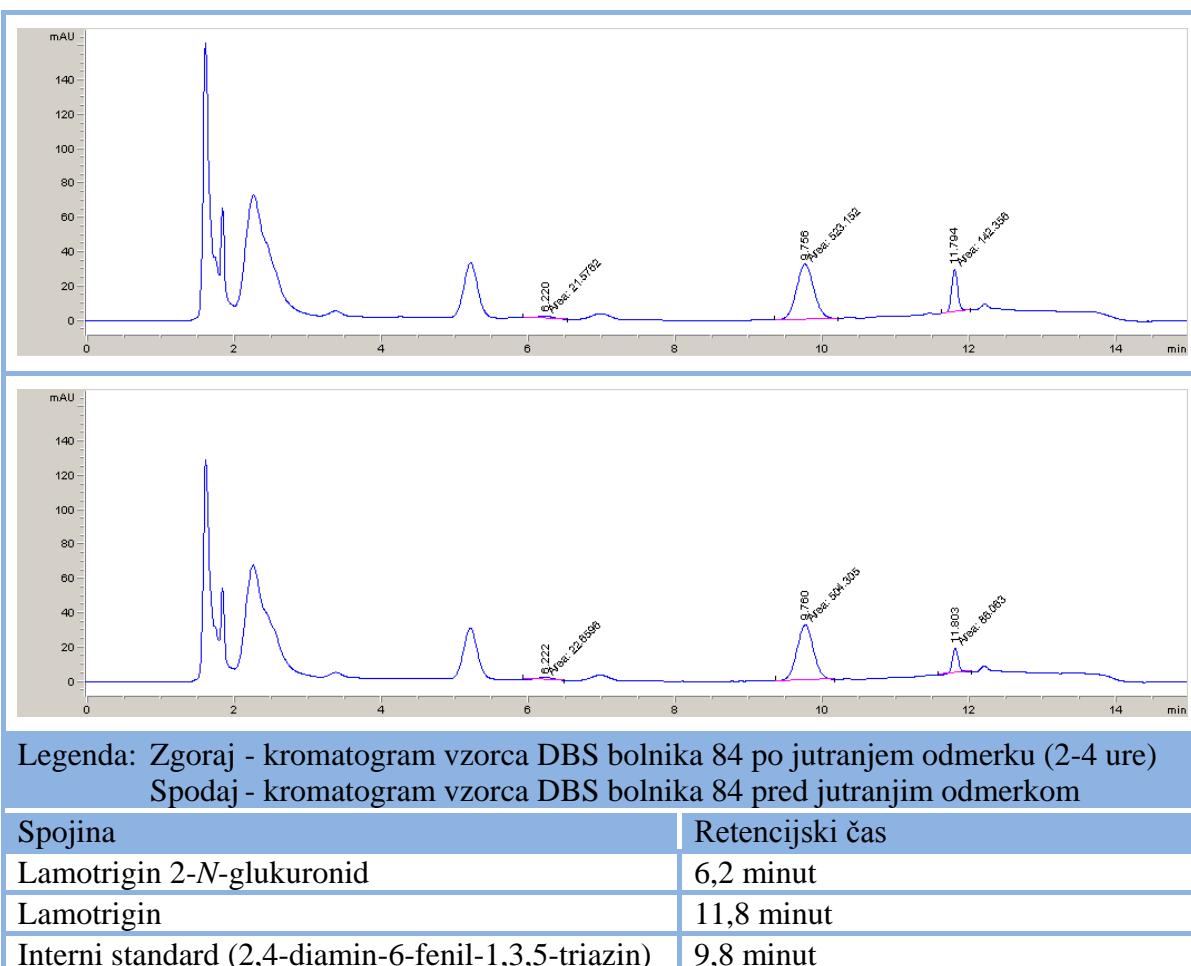
Slika 11: Kromatogram slepega plazemskega vzorca



Slika 12: Kromatogram plazemskega vzorca s preiskovanimi analiti

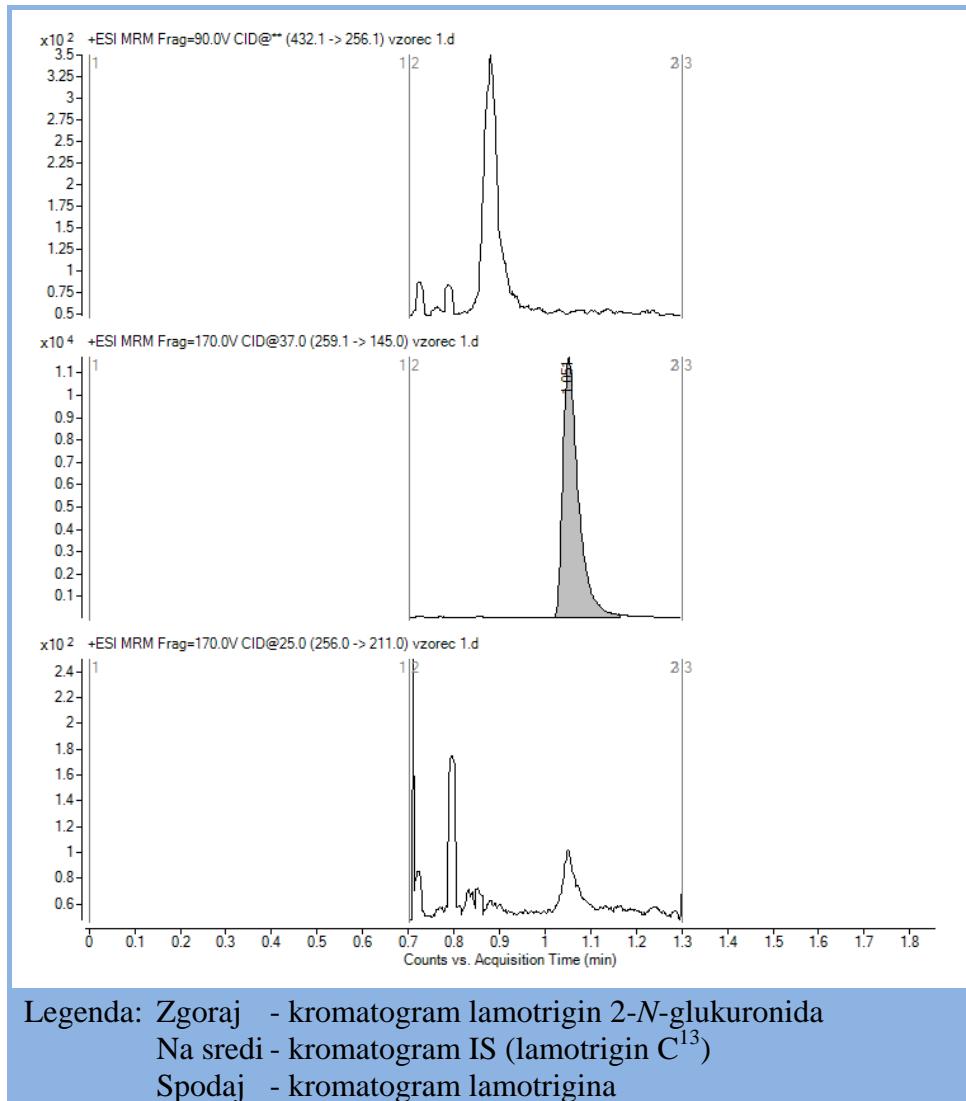
**9.2. Reprezentativni kromatogrami analizne metode z UV detekcijo za določanje analitov v posušenih krvnih madežih**



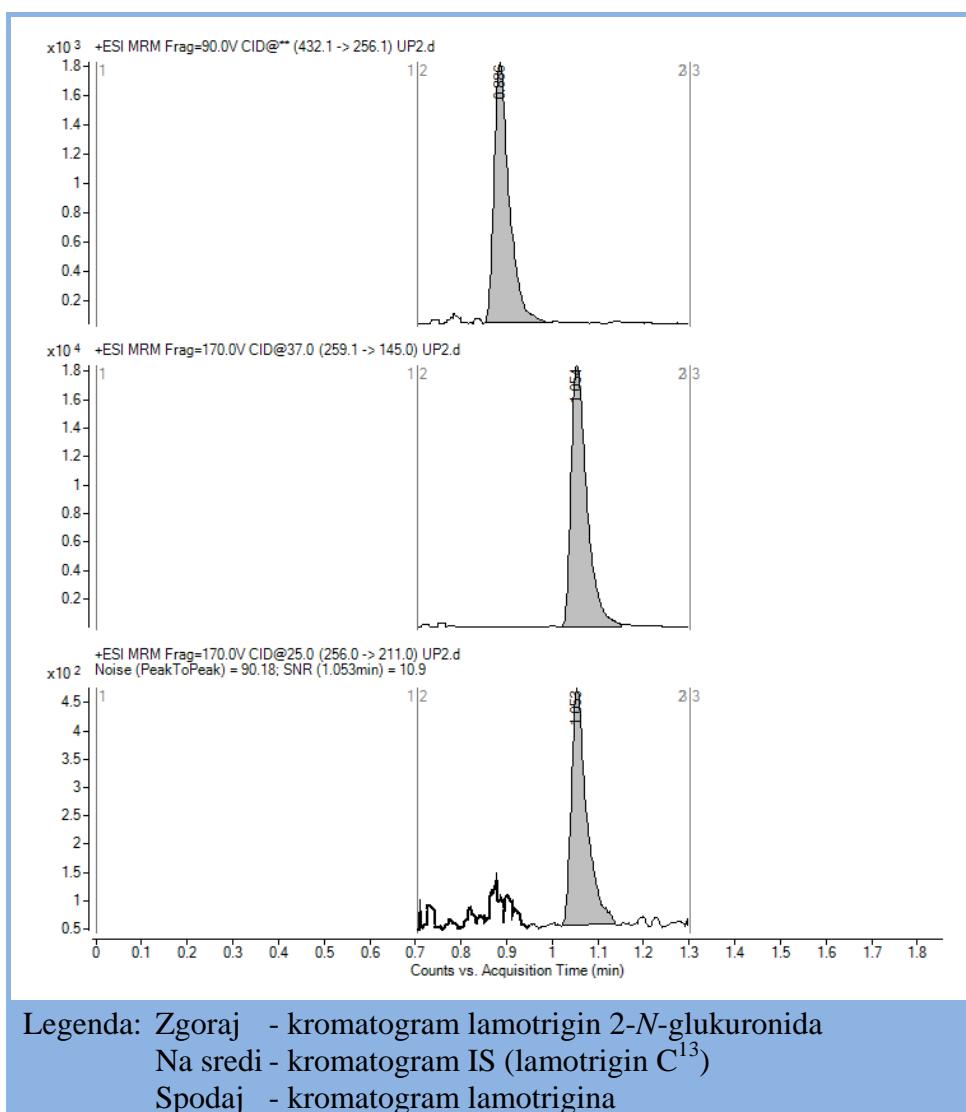


Slika 14: Kromatogrami vzorcev DBS s preiskovanimi analiti

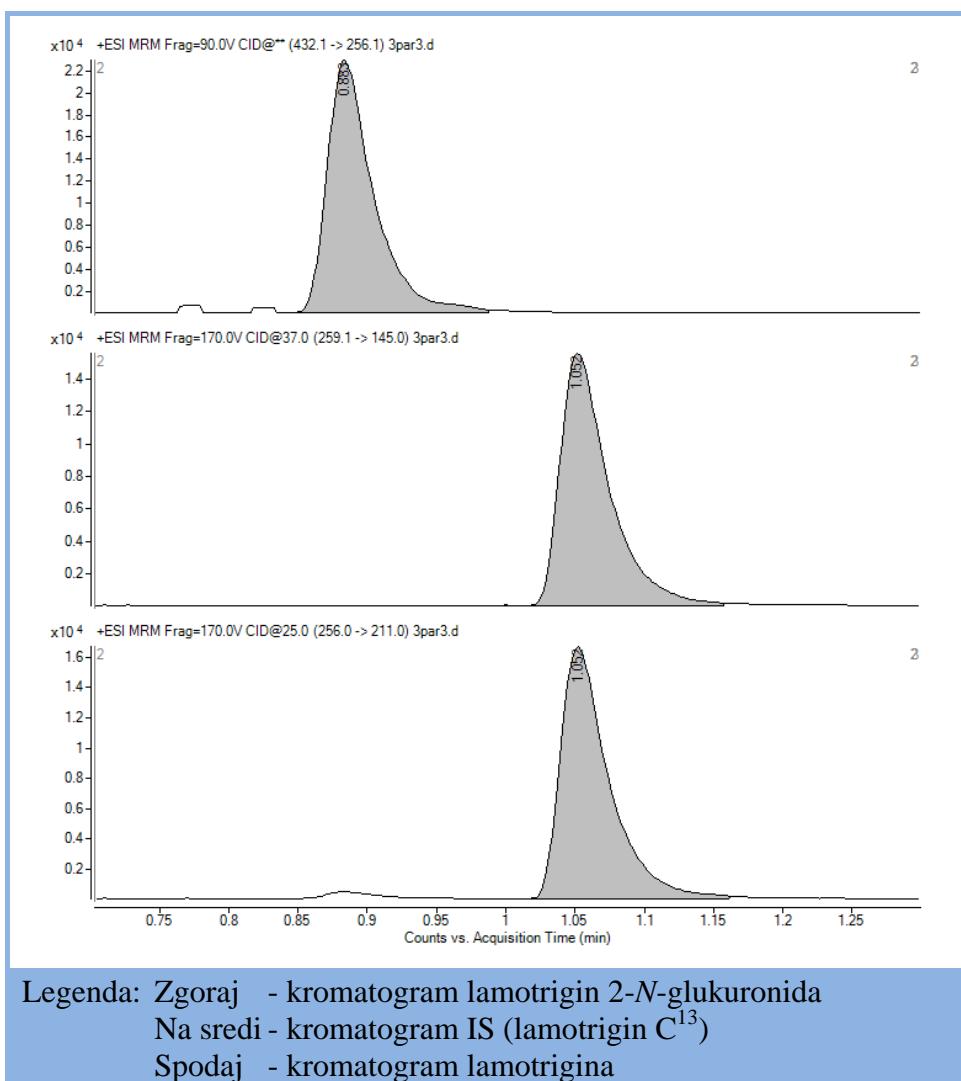
**9.3. Reprezentativni kromatogrami analizne metode s tandensko masno spektrometrijo za določanje analitov v posušenih krvnih madežih**



Slika 15: LC-MS/MS kromatogram slepega DBS vzorca obogatenega z IS



Slika 16: LC-MS/MS kromatogram DBS vzorca obogatenega z analiti na meji določljivosti



Slika 17: LC-MS/MS kromatogram DBS vzorca bolnika, ki je jemal lamotrigin