

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEA BEZNEC

MAGISTRSKA NALOGA

**RAZVOJ ENOSTAVNE ANALIZNE METODE ZA TERAPEVTSKO
SPREMLJANJE KONCENTRACIJE VALPROJSKE KISLINE V POSUŠENIH
KRVNIH MADEŽIH**

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEA BEZNEC

MAGISTRSKA NALOGA

**RAZVOJ ENOSTAVNE ANALIZNE METODE ZA TERAPEVTSKO
SPREMLJANJE KONCENTRACIJE VALPROJSKE KISLINE V POSUŠENIH
KRVNIH MADEŽIH**

**DEVELOPMENT OF A SIMPLE ANALYTICAL METHOD FOR THERAPEUTIC
DRUG MONITORING OF VALPROIC ACID IN DRIED BLOOD SPOTS**

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko pod mentorstvomizr. prof. dr. Tomaža Vovka.

ZAHVALA

Hvala mentorjuizr. prof. dr. Tomažu Vovku za vso posredovano znanje, koristne nasvete in strokovno pomoč med laboratorijskim delom in pri pisanju te magistrske naloge. Hvala tudi ostalim sodelavcem Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Janezu Mravljaku za prijazno pomoč pri sintezi kumarina.

Posebna zahvala gre staršema in sestri za nenehno podporo in vzpodbudo v času študija. Najboljši ste.

Hvala Martinu za potrpežljivost in skrb, hvala Maji za brezmejno pomoč in prijazne besede ter hvala Pii za neštete presmejane trenutke. Hvala tudi ostalim prijateljem, ki ste mi v času študija stali ob strani in verjeli vame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorjaizr. prof. dr. Tomaža Vovka.

Tea Bez nec

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	VALPROJSKA KISLINA	1
1.1.1	Zgodovina odkritja valprojske kisline	2
1.1.2	Farmakodinamika valprojske kisline	2
1.1.3	Farmakokinetika valprojske kisline	5
1.1.4	Neželeni učinki valprojske kisline	8
1.2	TERAPEVTSKO SPREMLJANJE ZDRAVLJENJA Z AED	8
1.2.1	Učinkovitost TDM pri valprojski kislini	10
1.3	ALTERNATIVNI NAČINI VZORČENJA BIOLOŠKIH VZORCEV	11
1.3.1	Posušeni krvni madeži	11
2	HIPOTEZA IN NAČRT ZA DELO	14
3	MATERIALI	16
3.1	BIOLOŠKI MATERIAL	16
3.2	STANDARDI	16
3.3	REAGENTI IN TOPILA	16
3.4	NAPRAVE IN PRIBOR	17
4	METODE	19
4.1	IZHODIŠČNA PLAZEMSKA METODA	19
4.1.1	Priprava osnovnih raztopin (OR) valprojske kisline in 4-en VPA	19
4.1.2	Priprava internega standarda	19
4.1.3	Priprava delovnih raztopin	20
4.1.4	Priprava plazemskih vzorcev	21
4.1.5	Ekstrakcija	21
4.1.6	Derivatizacija	21
4.1.7	Sušenje	22
4.1.8	Kromatografska analizna metoda	22
4.2	OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCA	23
4.2.1	Priprava posušenih krvnih madežev	23
4.2.2	Izbira kartice za DBS	23
4.2.3	Ekstrakcijski pogoji	24
4.2.4	Izbor internega standarda	25
4.2.5	Optimizacija derivatizacije	26

4.2.6	Izbor topila za rekonstitucijo suhega ostanka	27
4.2.7	Vpliv časa priprave obogatene krvi na kromatografski odziv valprojske kisline	27
4.2.8	Vpliv temperature sušenja na kromatografski odziv valprojske kisline	28
4.3	OPTIMIZACIJA KROMATOGRAFSKE ANALIZNE METODE	28
4.3.1	Mobilna faza.....	28
4.3.2	Stacionarna faza	29
4.3.3	Sprememba pretoka.....	30
4.3.4	Sprememba valovne dolžine	30
4.4	OPTIMALNA METODA	30
4.4.1	Priprava vzorca.....	31
4.4.2	Kromatografska analizna metoda.....	32
4.5	VALIDACIJA	32
4.5.1	Priprava standardov za kontrolo kakovosti	32
4.5.2	Selektivnost.....	33
4.5.3	Linearnost, meja kvantifikacije (LLOQ) in umeritvene krivulje	33
4.5.4	Točnost.....	34
4.5.5	Ponovljivost.....	35
4.5.6	Delež ekstrakcije valprojske kisline iz kartice	35
4.5.7	Stabilnost.....	36
4.6	VPLIV HEMATOKRITA	36
5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	38
5.1	OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCA	38
5.1.1	Izbira kartice.....	38
5.1.2	Vpliv časa nanosa krvnih madežev	38
5.1.3	Vpliv temperature sušenja krvnih madežev	39
5.1.4	Volumen ekstrakcijskega topila	39
5.1.5	Izbor internega standarda	40
5.1.6	Optimizacija derivatizacije.....	40
5.1.7	Izbor topila za rekonstitucijo suhega ostanka	41
5.2	OPTIMIZACIJA KROMATOGRAFSKE ANALIZNE METODE	41
5.2.1	Mobilna faza.....	41
5.2.2	Stacionarna faza	42
5.2.3	Sprememba pretoka.....	45
5.2.4	Sprememba valovne dolžine	46
5.3	VALIDACIJA	46
5.3.1	Selektivnost.....	46

5.3.2	Spodnja meja določljivosti, umeritvene krivulje in območje linearnosti.....	47
5.3.3	Točnost.....	49
5.3.4	Ponovljivost.....	50
5.3.5	Delež ekstrakcije valprojske kisline iz kartice	51
5.3.6	Stabilnost.....	51
5.4.	VPLIV HEMATOKRITA	53
5.5	PREDLOGI IZBOLJŠAV	54
6	SKLEP	55
7	LITERATURA.....	56

Kazalo preglednic

Preglednica I: Fizikalno-kemijske lastnosti valprojske kisline (VPA).....	1
Preglednica II: Farmakokinetične lastnosti VPA	7
Preglednica III: Postopek priprave osnovne raztopine VPA (OR1).....	19
Preglednica IV: Postopek priprave osnovne (OR2) in delovne raztopine 4-en VPA	19
Preglednica V: Postopek priprave delovnih raztopin VPA.....	20
Preglednica VI: Postopek priprave delovnih raztopin 4-en VPA	20
Preglednica VII: Postopek priprave derivatizacijskih reagentov	21
Preglednica VIII: Kromatografski pogoji izhodiščne metode.....	23
Preglednica IX: Različni volumni ekstrakcijskega topila.....	24
Preglednica X: Strukturne formule in logP testiranih IS in valprojske kisline	25
Preglednica XI: Različne kombinacije derivatizacijskih reagentov	27
Preglednica XII: Sestava topila za rekonstitucijo suhega ostanka	27
Preglednica XIII: Preiskovane mobilne faze.....	28
Preglednica XIV: Lastnosti testiranih kolon.....	29
Preglednica XV: Valovne dolžine.....	30
Preglednica XVI: Priprava delovnih raztopin VPA - optimalna metoda.....	31
Preglednica XVII: Optimalni kromatografski pogoji	32
Preglednica XVIII: Postopek priprave delovnih raztopin za pripravo krvnih kontrolnih vzorcev.....	33
Preglednica XIX: Postopek priprave vzorcev za določanje izkoristka ekstrakcije	35
Preglednica XX: Priprava krvi z različnimi vrednostmi hematokrita	36
Preglednica XXI: Površine analitov na posameznih karticah za DBS	38
Preglednica XXII: Vpliv temperature sušenja krvnih madežev	39
Preglednica XXIII: Vpliv volumna ekstrakcijskega topila	40
Preglednica XXIV: Vpliv koncentriranosti AcN na kromatografske odzive analitov	41
Preglednica XXV: Odstotek nečistoče v slepem vzorcu glede na VPA in IS	43
Preglednica XXVI: Točnost metode za vsak dan validacije.....	49
Preglednica XXVII: Dnevna ponovljivost	50
Preglednica XXVIII: Meddnevna ponovljivost	50
Preglednica XXIX: Izkoristek ekstrakcije	51
Preglednica XXX: Post preparativna stabilnost kontrolnih vzorcev po 24h	52
Preglednica XXXI: Dolgoročna stabilnost analita na kartici za DBS	52

Preglednica XXXII: Vpliv hematokrita	53
---	----

Kazalo slik

Slika 1: Struktura valprojske kisline	1
Slika 2: Mehanizmi delovanja VPA.	5
Slika 3: Presnovki VPA.	7
Slika 4: VAMS	13
Slika 5: Shematski pregled načrta dela	15
Slika 6: Sinteza kumarina	22
Slika 7: Območje linearnosti in LLOQ	34
Slika 8: Kromatogram pri sestavi mobilne faze 50:50 (AcN:H₂O)	42
Slika 9: Kromatogram vzorca s koncentracijo VPA 75µg/mL – kolona phenyl-hexyl	43
Slika 10: Slep vzorec in vzorec VPA s koncentracijo 75 µg/mL – kolona C18	44
Slika 11: Kromatogram slepega vzorca in vzorca s koncentracijo 50 µg/mL VPA	45
Slika 12: Sprememba pretoka	46
Slika 13: Kromatogram slepega vzorca in vzorca s koncentracijo VPA 2,5 µg/mL	47
Slika 14: Umeritvena krivulja 1. dneva validacije	48
Slika 15: Umeritvena krivulja 2. dneva validacije	48
Slika 16: Umeritvena krivulja 3. dneva validacije	49

POVZETEK

Valprojska kislina (VPA) je široko sprektoralno protiepileptično zdravilo, ki se uporablja za zdravljenje vseh vrst epilepsije, bipolarni motnje, kot preventiva pri migrenah in za zdravljenje nevropatske bolečine. Pri zdravljenju epilepsije in bipolarni motnje z valprojsko kislino je potrebno spremljanje njenih plazemskih koncentracij (terapevtsko spremljanje koncentracij – TDM). Kot alternativa tradicionalnemu terapevtskemu spremljanju koncentracij v plazmi prihaja v ospredje nova oblika vzorčenja krvnih vzorcev, tehnika posušenih krvnih madežev (DBS).

V okviru magistrskega dela smo uspešno razvili analizo metodo za določanje koncentracije valprojske kisline v posušenih krvnih madežih. Ekstrakcijo analitov iz 10 μ L posušenih krvnih madežev smo izvedli z etilacetatom in 10 mM klorovodikovo kislino. Za interni standard smo uporabili oktanojsko kislino. Ekstrakcijo smo pospešili z inkubacijo vzorcev v ultrazvočni kadički. Organsko fazo z analitoma smo derivatizirali s kumarinom ter sklopitvenimi reagenti HOBt in EDC v 0,50 M fosfatnem pufri pH 7,0. Po centrifugiranju smo del organske faze posušili s segrevanjem in prepihanjem z dušikom. Suh ostanek smo nato rekonstituirali z acetonitrilom in vodo (60:40, v/v). Vzorec smo analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti s fluorescenčno detekcijo, pri čemer smo uporabili kolono Luna 3 μ m, C18, ki smo jo segreli na 30 °C. Mobilna faza je bila sestavljena iz acetonitrila in 1,5% očetne kisline v vodi, v razmerju 50:50 (v/v). Volumen injiciranja je bil 5 μ L, pretok 1 mL/min. Izbrani analit smo detektirali pri ekscitacijski valovni dolžini 300 nm in emisijski valovni dolžini 400 nm.

Metodo smo validirali po smernicah za bioanalizne metode Ameriške agencije za hrano in zdravila. Dokazali smo, da je metoda selektivna in linearna v izbranem koncentracijskem območju (2,5 μ g/mL-250 μ g/mL). Točnost metode se giblje med 90,6-103%, dnevna ponovljivost znaša 2,75-8,28% in meddnevna ponovljivost 1,2-7,5%, tako da parametri ustrezajo postavljenim kriterijem. Tudi izkoristek ekstrakcije je bil ponovljiv in v vseh primerih enak ali večji od 74%. Vzorci so po ekstrakciji stabilni vsaj 24 h pri 5 °C, posušeni krvni madeži z analitom pa so pri vseh treh testiranih pogojih stabilni 1 teden (sobna temperatura, -20°C, 45 °C). Validacijski parametri nakazujejo, da je metoda uporabna za določanje valprojske kisline v krvi bolnikov.

KLJUČNE BESEDE: valprojska kislina, terapevtsko spremljanje koncentracij, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, posušeni krvni madeži, fluorescenčni detektor

ABSTRACT

Valproic acid (VPA) is a broadspectrum antiepileptic drug, used in the treatment of all types of epilepsy, bipolar disorders, in migraine prophylaxis and for the treatment of neuropathic pain. When treating epilepsy and bipolar disorders with valproic acid it is necessary to monitor its plasma concentration (therapeutic drug monitoring – TDM). As an alternative to the traditional therapeutic drug monitoring there is a novel technique of sampling blood samples available, the technique of dried blood spots (DBS).

In master thesis we have successfully developed the analytical method for determining the concentration of valproic acid in dried blood spots. Extraction of analytes from the dried blood spots was performed with ethyl acetate and 10 mM hydrochloric acid. For internal standard octanoic acid was used. Extraction was accelerated by incubating the samples in ultrasound bath. Organic phase with the analytes was derivatized with coumarine and coupling agents HOBt and EDC in 0,5 M phosphate buffer with pH 7,0. Following centrifugation a portion of the organic phase was dried by heating under nitrogen stream. The dry residue was then reconstituted with acetonitrile and water (60:40, v/v). Chromatographic separation of the analyte was achieved with high performance liquid chromatography and fluorescence detection, where we used column Luna 3 μ m, C18, which was heated to 30 °C. Mobile phase consisted of acetonitrile and 1,5% acetic acid in water in a ratio 50:50 (v/v). Injection volume was 5 μ L, flow rate 1 mL/min. The analyte was detected at an excitation wavelength of 300 nm and an emission wavelength of 400 nm.

The method was validated according to the guidelines for bio-analytical methods of Food and Drug Administration. We proved that the method is selective and linear in the chosen concentration range (2,5 mg/mL–250 mg/mL). The accuracy of the method was between 90,6 to 103%, relative standard deviation of within run repeatability ranged between 2,75 to 8,28% and between-run repeatability between 1,2 to 7,5%. Also, the recovery was reproducible and in all cases equal or greater than 74%. At 5 °C, samples are stable for at least 24 h after extraction and the dried blood spots with the analyte are stable for 1 week in all three conditions (room temperature, -20 °C, 45 °C). Validation parameters indicate that the method is applicable for the determination of valproic acid in patients blood.

KEY WORDS: valproic acid, therapeutic drug monitoring, high performance liquid chromatography, dried blood spots, fluorescence detector

SEZNAM OKRAJŠAV

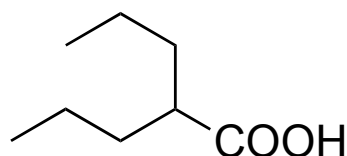
4-en VPA	2-propilpent-4-enojska kislina
A	površina
A_A	površina analita
AcN	acetonitril
AED	protiepileptična zdravila (<i>antiepileptic drugs</i>)
A_{IS}	površina internega standarda
c	koncentracija
CYP	citokrom P450 (<i>cytochrome P450</i>)
CŽS	centralni živčni sistem
DBS	posušeni krvni madeži (<i>dried blood spots</i>)
DCM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
DPPE	etilenbis(difenilfosfin)
EDC	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarboimid
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EMIT	multiencimska imunološka tehnika
EtAc	etil acetat
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (<i>Food and Drug Administration</i>)
FLD	fluorescenčni detektor
GABA	γ -aminomaslena kislina (<i>γ-aminobutyric acid</i>)
GABA_A	podtip GABA receptorja
GHB	γ -hidroksibutirat
HDAC	histonska deacetilaza
HLOQ	zgornja meja kvantifikacije (<i>higher limit of quantification</i>)
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>high performance liquid chromatography</i>)
Ht	hematokrit
IS	interni standard
k	smerni koeficient
kumarin	4-(aminometil)-7-metoksi-kumarin

LLOQ	spodnja meja kvantifikacije (<i>lower limit of quantification</i>)
LOD	meja detekcije (<i>limit of detection</i>)
logP	logaritem porazdelitvenega koeficienta
M	molska masa
m	masa
MF	mobilna faza
MF_A	vodni del mobilne faze
MF_B	organski del mobilne faze
n	presečišče z ordinatno osjo
NMDA	podtip glutamatnega receptorja
OR	osnovna raztopina
QC	kontrolni vzorec (<i>quality control</i>)
QC_H	kontrolni vzorec visoke koncentracije (<i>high</i>)
QC_L	kontrolni vzorec nizke koncentracije (<i>low</i>)
QC_M	kontrolni vzorec srednje koncentracije (<i>medium</i>)
R²	determinacijski koeficient
RSD	relativna standardna deviacija
RT	sobna temperatura (<i>room temperature</i>)
SD	standardna deviacija
TDM	terapevtsko spremljanje koncentracij (<i>therapeutic drug monitoring</i>)
THF	tetrahidrofuran
t_{max}	čas potreben za doseg maksimalne koncentracije
TMS	trimetilklorosilan
t_R	retencijski čas
V	volumen
v/v	razmerje volumnov
VAMS	volumetrični absorptivni mikrovzorčevalnik (<i>volumetric absorptive microsampler</i>)
V_D	volumen porazdelitve
VPA	valprojska kislina
γ	masna koncentracija
λ	valovna dolžina

1 UVOD

1.1 VALPROJSKA KISLINA

Valprojska kislina (2-propilvalerijanska kislina, 2-propilpentanojska kislina, n-dipropilacetna kislina), katere struktura je prikazana na sliki 1, je enostavna, razvejana karboksilna kislina sestavljena iz osmih ogljikovih atomov. Izpeljana je iz valerijanske kisline, ki je naravno prisotna v baldrijanu (*Valeriana officinalis*) (1).



Slika 1: Struktura valprojske kisline

Danes je eno izmed najpogosteje uporabljenih širokospektralnih protiepileptičnih zdravil. Predpisuje se za vse vrste napadov pri epilepsiji, tako pri odraslih kot pri otrocih, in se lahko uporablja v mono in politerapiji. Uporablja se tudi pri zdravljenju bipolarnе motnje ter kot preventiva pri migrenah (2, 3). Trenutno potekajo klinične študije o uporabi pri terapiji raka (4). Osnovne fizikalno-kemijske lastnosti so predstavljene v preglednici I.

Preglednica I: Fizikalno-kemijske lastnosti valprojske kisline (VPA) (3)

Kemijska formula	C ₈ H ₁₆ O ₂
Molekulska masa	144,21 g/mol
pKa	4,56
Topnost v vodi	50 mg/mL
Temperatura tališča	120-121 °C
Izgled	brezbarvna tekočina pri sobni temperaturi

Valprojsko kislino najpogosteje uporabljamo v obliki natrijeve soli, ki je bel higroskopen prah, dobro topen v polarnih topilih. Po zaužitju natrijev valproat hitro disociira v valprojsko kislino (3).

1.1.1 Zgodovina odkritja valprojske kisline

Zgodovina valprojske kisline je relativno dolga v primerjavi z ostalimi farmakološko aktivnimi substancami. Skoraj stoletje dolgo se je v raziskovalne namene uporabljala kot organsko topilo (5). Tako kot mnoga druga zdravila tudi valprojska kislina ni bila odkrita na podlagi strateškega načrtovanja nove protiepileptične učinkovine, ampak jo je po naključju leta 1962 v Franciji odkril Pierre Eymard. Prvič jo je sintetiziral Burton leta 1882, vendar se, dokler ni njene protiepileptične aktivnosti dokazal Eymard, ni uporabljala v klinične namene (3).

Zaradi tekočega agregatnega stanja so valprojsko kislino uporabljali kot lipofilni medij, v katerem so raztapljali v vodi netopne substance. Sodelavca v Berthier Laboratories H. Meunier in Y. Meunier sta valprojsko kislino uporabljala za raztapljanje bizmutovih soli. Skupaj z Eymardom so razmišljali, da bi valprojsko kislino lahko uporabili za raztapljanje derivatov, ki jih je Eymard sintetiziral v okviru svoje teze na Fakulteti za farmacijo v Grenoblu v Franciji (3). Glodavcem so intravensko vbrizgali pentilentetranidazol, s katerim so izzvali epileptični napad. Nato so aplicirali derivate, raztopljene v valprojski kislini. Pri tem so ugotovili, da valprojska kislina že sama po sebi izkazuje protiepileptično aktivnost. Meunier je isti poskus ponovil na zajcih in prav tako opazil protiepileptično aktivnost. Sledila so nadaljnja testiranja in klinične študije. Valproat se je prvič pojavil na tržišču leta 1967 v Franciji pod imenom "Depakine", kmalu pa še v ostalih državah (3).

Valprojsko kislino so v klinične namene najprej uporabljali v terapiji absenc pri generalizirani epilepsiji. Po dveh desetletjih kliničnih raziskav so jo začeli uporabljati tudi za druge vrste napadov in jo označili kot širokospektralno protiepileptično učinkovino. Kasneje so pri bolnikih, ki so poleg epilepsije boleli tudi za migrenskimi glavoboli, ugotovili, da učinkuje tudi proti migrenam. Še desetletje kasneje so jo uveljavili tudi pri zdravljenju manije. Trenutno potekajo študije o vlogi VPA pri kemoterapiji, uporablja se tudi pri zdravljenju nevropatske bolečine (5).

1.1.2 Farmakodinamika valprojske kisline

Tako kot pri ostalih protiepileptičnih učinkovinah tudi pri valprojski kislini mehanizem delovanja ni popolnoma razjasnjen. Posebnost valprojske kisline je njena struktura, ki se precej razlikuje od ostalih protiepileptičnih zdravil. Ravno zaradi njene strukture ji pripisujemo več mehanizmov delovanja (6).

Učinki VPA na GABA in inhibitorni živčni prenos

Oslabitev živčnega prenosa po GABAergični poti vodi v konvulzije, medtem ko se ojačanje prenosa izraža v antikonvulzivnem učinku (7). V večih študijah je bilo objavljeno, da VPA ojača GABAergične inhibitorne učinke v centralnem živčnem sistemu (CŽS). *In vitro* so pokazali, da VPA zavira GABA transaminazo, sukcin semialdehid dehidrogenazo in α -ketoglutarat dehidrogenazo, ki sodelujejo pri sintezi in razgradnji GABA-e. Nivoji GABA-e se zato zelo povečajo. GABA »turnover« je povišan v določenih regijah možganov, ki so pomembni za iniciacijo in propagacijo napadov, kot je črna substanca (*substantia nigra*). Potencirajoči učinek VPA na GABA bi naj bil koristen predvsem pri zdravljenju akutnih napadov (8, 9). VPA reagira tudi z metabolizmom γ -hidroksibutirata (GHB), metabolitom GABA. Zmanjšano sproščanje GHB bi lahko bilo pomembno pri zdravljenju absenc. VPA bi naj vplivala tudi na ravnotežje med GABA in glutamatom. Zaradi tega jo uporabljajo tudi pri zdravljenju migren, saj bi naj modulirala biokemični fenomen aure oziroma vplivala na nocicepcijo z modulacijo živčnega prenosa, ki poteka preko GABA-e in/ali glutamata. Pri zdravljenju nevropatske bolečine bi naj VPA blokirala nevrogensko vnetje prek inhibicije GABA_A receptorjev, najverjetneje z moduliranjem trigeminalnih trinociceptivnih nevronov, ki se kopičijo v menignu (8).

Učinki na ekscitatorne neurotransmitorje

Zvišana zunajcelična koncentracija glutamata povzroči neprimerno zvišano znotrajcelično koncentracijo Ca²⁺, kar spodbuja spontano proženje akcijskih potencialov in posledično se poveča tveganje za razvoj epileptičnega napada. VPA z antagonističnim delovanjem na NMDA receptorje zmanjša število sproženih akcijskih potencialov in tako oslabi živčni prenos po ekscitatorni poti v možganih ter tako zmanjša tveganje za razvoj epileptičnega napada (10). Vpliv VPA na NMDA receptorje bi naj bil pomemben tudi pri zdravljenju maničnih epizod, vendar točnih dokazov o tem še ni. Študije nakazujejo, da imajo bolniki z bipolarno motnjo povečano vsebnost glutamata v večih delih možganov (8, 11).

Učinki na monoamine

Bipolarna motnja je motnja, za katero so značilna ponavljajoča se nihanja v razpoloženju. Prihaja do nepredvidljivega nihanja faze manije in depresije (12). Pri zdravljenju z VPA so se nivoji noradrenalina, dopamina in serotonina (ki so glavni mediatorji pri depresiji) znižali v nekaterih regijah možganov, v drugih pa zvišali. Modulacija nivojev monoaminov ima uporabno vrednost pri terapiji depresivne faze bipolarne motnje (8).

Učinki na napetostno odvisne kanalčke

Pri epilepsiji je povečana vzdraženost nevronov. Depolarizacija nevronov v epileptičnem žarišču je, v primerjavi z normalno, neprimerno daljša. Posledično prihaja do spontanega visoko frekvenčnega sprožanja nevronov (10). VPA zavira tovrstno sprožanje in tako pripomore k učinkovitosti pri zdravljenju epilepsije (8).

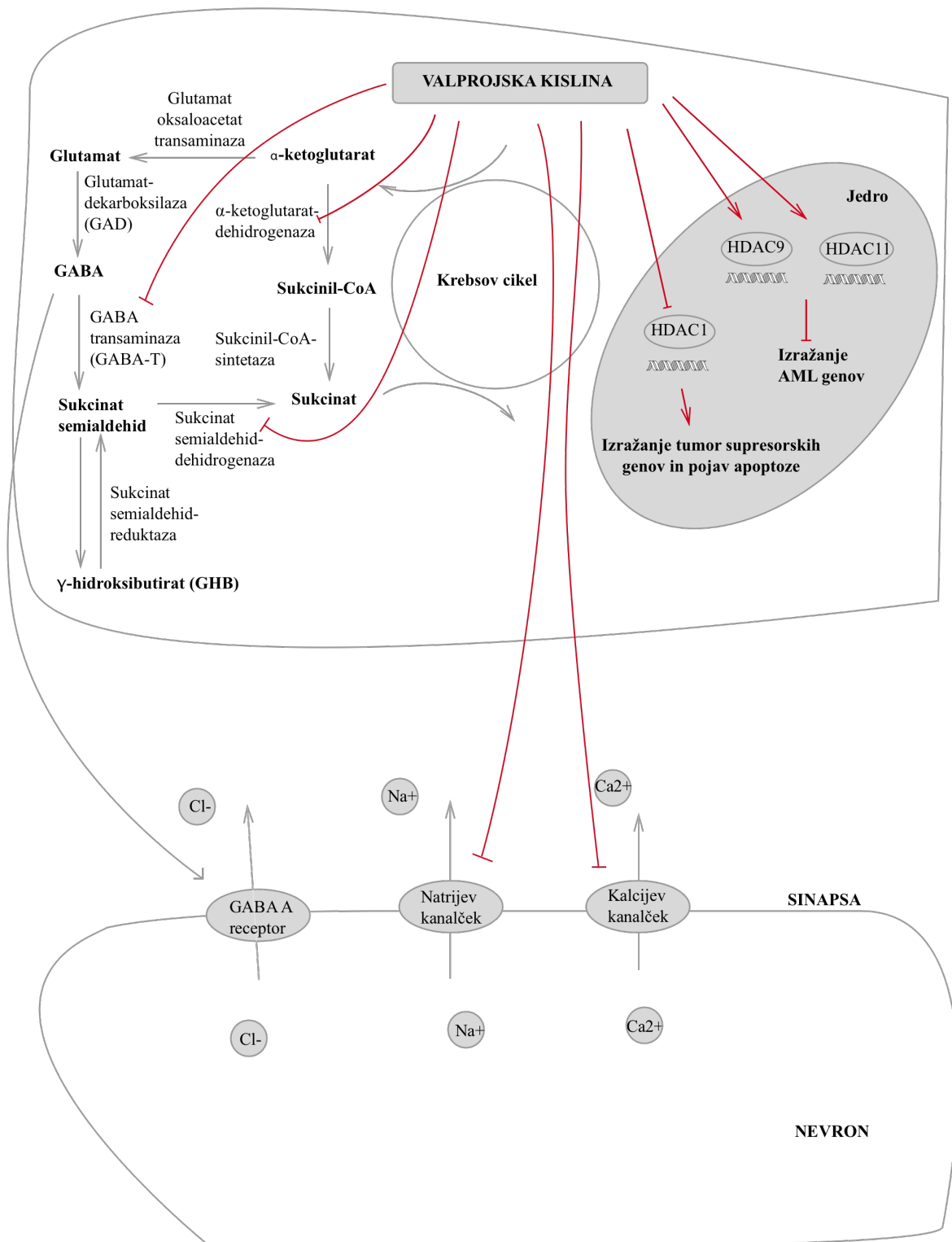
Učinki na presnovo glukoze v možganih

Med epileptičnim napadom se poveča presnova v prizadetem delu možganov. Poraba kisika je do 2,5-krat večja, pretok krvi do 9-krat in poraba ATP do 4-krat, medtem ko je koncentracija glukoze znižana (10). Pri bolnikih z epilepsijo so raziskave pokazale, da VPA zmanjša presnovo glukoze v možganih ter tako prispeva k zdravljenju epilepsije (8).

Učinki na histonske deacetilaze

Valprojska kislina je direktni inhibitor histonskih deacetilaz (HDAC), te pa igrajo pomembno vlogo pri diferenciacijski terapiji raka. Inhibicija HDAC povzroči diferenciacijo rakavih celic (13).

Slika 2 prikazuje mehanizme delovanja valprojske kisline.



Slika 2: Mehanizmi delovanja VPA. Povzeto po Johannessen in Ghodke-Puranik et. al. (9, 14)

1.1.3 Farmakokinetika valprojske kisline

Farmakokinetika valprojske kisline še ni docela razjasnjena in se lahko razlikuje od bolnika do bolnika.

Absorpcija

VPA se po zaužitju hitro absorbira, njena biološka uporabnost je skoraj popolna, in sicer med 96-100% za splošno uporabljane farmacevtske oblike. Hitrost absorpcije in čas za doseg maksimalne koncentracije v krvi (t_{max}) se med različnimi farmacevtskimi oblikami razlikujeta. t_{max} pri sirupih, kapsulah in tabletah je 1-2 h, 3-6 h pri gastrorezistentnih tabletah in 10-12 h pri tabletah s podaljšanim sproščanjem. Absorpcija pri vzdrževanju odmerka je hitrejša kot pri začetnih odmerkih. Lahko se znatno upočasni, če zdravilo vzamemo 2-3 h po obroku. Absorpcija poteka hitreje v jutranjem času (2, 8).

Vezava na plazemske proteine

VPA je več kot 90% vezana na serumske proteine, predvsem albumin, vendar se delež vezave ob povečanju koncentracije zmanjša zaradi nasičenja, kar se kaže v porastu proste oblike VPA. Tako znaša pri plazemski koncentraciji VPA 80 $\mu\text{g/mL}$ delež vezave le 67%. Delež vezave je zmanjšan tudi pri bolnikih z ledvično boleznijo, kronično jetrno boleznijo, pri starostnikih, med nosečnostjo in v prisotnosti drugih zdravil, ki se vežejo na plazemske proteine (npr. fenilbutazon, acetil salicilna kislina). Ne vemo pa, ali je delež vezave odvisen tudi od interakcij z drugimi protiepileptičnimi zdravili. Delež proste oblike VPA je približno enak deležu proste oblike v cerebrospinalni tekočini in solzah, ni pa primerljiv z deležem proste oblike v slini (2, 8, 15).

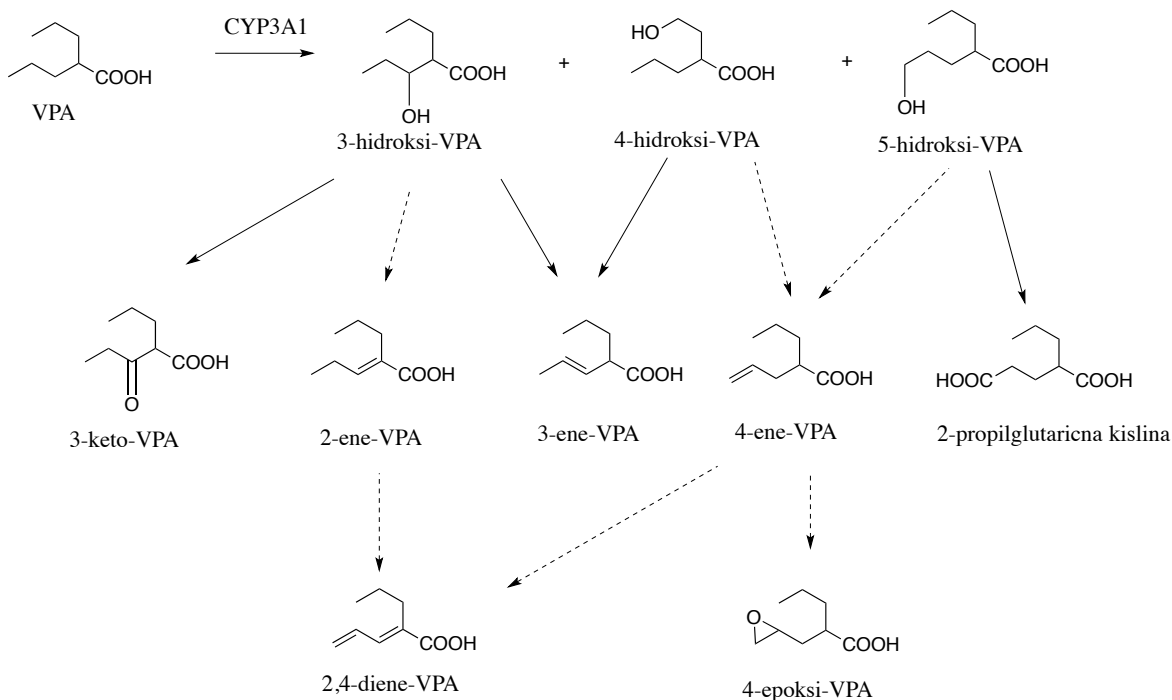
Porazdelitev

V obtoku je VPA v kemijskem ravnotežju, ki se vzpostavi med različnimi oblikami: na proteine vezano obliko, nevezano obliko, ionizirano obliko in neionizirano obliko. Samo prosta oblika VPA prehaja skozi membrane in vstopa v celice. Terapevtske koncentracije v plazmi znašajo od 40 μg -100 $\mu\text{g/mL}$, v možganih 6-27 $\mu\text{g/g}$ (2).

Presnova

Razpolovni čas ($t_{1/2}$) VPA v serumu je 11-20 h. Skoraj v celoti se presnovi. Le majhen del kemijsko nespremenjene VPA najdemo v urinu. VPA se presnavlja po kinetiki prvega reda, neodvisno od plazemskih koncentracij. Zaradi velikih razlik v presnovi med posamezniki obstaja slaba povezava med odmerkom in serumsko koncentracijo VPA. Presnova učinkovine poteka po večih poteh, ki vsebujejo glukuronidacijo, β in Ω – oksidacijo, vendar pa aktivni presnovki predstavljajo le majhen delež celotne koncentracije

VPA v plazmi. Pretvorba VPA v njene aktivne presnovke je predstavljena na sliki 3. Vpliv presnovkov na terapevtske oziroma toksične učinke še ni točno opredeljen (8).



Slika 3: Presnovki VPA. Povzeto po Lu (16).

Izločanje

Manj kot 3% VPA se v nespremenjeni obliki izloči v urin, kar je posledica obširnega metabolizma VPA. Jetrni metabolizem je zato glavna pot izločanja VPA in njenih metabolitov, ki se izločajo predvsem z urinom, manjši delež pa tudi z žolčem, blatom in z izdihanim zrakom (2).

Osnovni farmakokinetični parametri so povzeti v preglednici II.

Preglednica II: Farmakokinetične lastnosti VPA(17-19)

Biolška uporabnost	≥ 90%
t_{\max}	sirup, kapsule in tablete: 1-2 h gastrorezistentne tablete: 3-6 h tablete s podaljšanim sproščanjem: 10-12 h
Razpolovni čas ($t_{1/2}$)	11-20 h

Vezava na proteine	≥ 90% (do nasičenja)
Volumen porazdelitve (V_D)	0,14 L/kg
Presnova	glukuronidacija, β -oksidacija
Izločanje	urin, majhen delež tudi preko žolča, blata in izdihanega zraka

1.1.4 Neželeni učinki valprojske kisline

Večina bolnikov VPA dobro prenaša, kljub temu pa velja za protiepileptično zdravilo, pri katerem so največkrat poročali o toksičnosti (17). Najbolj pogosti neželeni učinki VPA vključujejo: gastrointestinalne težave, tremor ter povečanje telesne teže. Teratogenost in hepatotoksičnost se redko pojavljata in veljata za najbolj resna in neželena stranska učinka. Drugi resni neželeni učinki so: fatalni hemoragični pankreatitis, zaviranje kostnega mozga in hiperamonijeva encefalopatija. Pri nekaterih bolnikih je prišlo tudi do odpovedi jeter. Pri zdravljenju z VPA bi naj prišlo tudi do milejše oblike hepatotoksičnosti, kjer imajo bolniki povišano število jetrnih encimov, ampak brez izraženih kliničnih znakov (2).

Mehanizmi hepatotoksičnosti VPA so še vedno neznani, kljub večim prepostavkam. Opazili so, da je pojavnost hepatotoksičnosti večja pri politerapiji z VPA in induktorji CYP encimov kot v primeru monoterapije. Induktorji CYP encimov povečajo presnovo VPA in s tem količino presnovkov, kar nakazuje, da je hepatotoksičnost VPA posledica toksičnosti njenih presnovkov. Toksičnost pripisujejo predvsem presnovku 4-en VPA (6).

1.2 TERAPEVTSKO SPREMLJANJE ZDRAVLJENJA Z AED

Terapevtsko spremljanje koncentracij (TDM) je multi-disciplinarna dejavnost, ki je namenjena izboljšanju oskrbe bolnikov z individualnim prilagajanjem odmerka zdravil, pri katerih so klinične izkušnje in študije pokazale, da terapevtsko spremljanje koncentracij izboljša rezultate v splošnih in posebnih populacijah. Lahko temelji na predhodno znanih demografskih, kliničnih in farmakogenetskih podatkih in/ali na naknadno izmerjenih koncentracijah učinkovine v krvi (farmakokinetično spremljanje) ali/in na bioloških označevalcih (farmakodinamično spremljanje) (20).

Uporaba TDM pri zdravljenju s protiepileptičnimi zdravili je najbolj smiselna v naslednjih situacijah (18):

- kadar pri bolnikih, ki so dosegli terapevtski učinek, želimo izmeriti individualno terapevtsko koncentracijo;
- kadar želimo diagnosticirati toksičnost zdravila;
- kadar želimo oceniti bolnikovo sodelovalnost;
- kadar želimo nadzirati spremembo odmerka v primerih s povečano variabilnostjo farmakokinetike (npr. pri otrocih, starostnikih, bolnikih s pridruženimi boleznimi, sprememba farmacevtske oblike);
- kadar je pričakovana sprememba v farmakokinetiki (npr. nosečnost, spremenjena terapija – dodano ali ukinjeno zdravilo);
- kadar želimo nadzirati spremembe odmerkov pri protiepileptičnih učinkovinah, katerih farmakokinetika je odvisna od odmerka (npr. fenitoin).

Z rutinskim spremljanjem koncentracij merimo koncentracijo celokupne učinkovine, vendar pa je pri določenih učinkovinah smiselno meriti tudi prosto obliko učinkovine, in sicer, ko so izpolnjeni naslednji kriteriji:

- vezana oblika učinkovine je neaktivna, aktivna je prosta oblika;
- obstaja ravnotežje med vezano in nevezano obliko in temelji na koncentraciji učinkovine in plazemskih proteinov;
- kot posledica znižanja plazemskih proteinov pride do spremembe v vezavi, kar pomeni drugačen delež proste oblike, kar vodi v drugačne farmakološke odzive pri določeni koncentraciji zdravila.

Merjenje plazemske koncentracije proste oblike je klinično pomembno, kadar:

- je učinkovina vezana na plazemske proteine več kot 85-90% (za te učinkovine je že majhen upad v koncentraciji vezavnih proteinov lahko povzroči pomembno povišanje proste oblike);
- se delež vezave spreminja zaradi spremembe koncentracije proteinov ali učinkovine ali kot posledica spremembe števila razpoložljivih vezavnih mest in spremembe vezavne afinitete.

Tem kriterijem ustrezata VPA in fenitoin (21).

Ravno zaradi narave epileptičnih napadov, ti se pri bolniku pojavljajo sporadično, je TDM pri epilepsiji zelo zapleten, saj je težko oceniti, ali se bolnik odziva na terapijo ali je zgolj brez napadov. Obenem gre za dolgotrajen proces, saj učinek terapije lahko ocenimo le glede na frekvenco pojavljanja epileptičnih napadov. Pogosto je težko ločiti simptome bolezni od toksičnih učinkov ksenobiotikov. Glavna predpostavka pri TDM protiepileptičnih zdravil je, da obstaja boljša povezava med serumskimi koncentracijami in terapevtskim učinkom kot samim odmerkom (18, 21). Kljub temu da se TDM pogosto uporablja v rutinski obravnavi bolnikov z epilepsijo, je slabo podkrepjen z dokazi. Rezultat TDM še ni bil sistematično ovrednoten (17).

Prvi zapisi uporabe metode za spremljanje krvnih koncentracij fenitoina in fenobarbitala izvirajo iz leta 1956 (ZDA). Izpoplnili so ga v začetku 70-ih let, ko je v uporabo prišla plinsko tekočinska kromatografija. Kasneje so TDM poskusili z imunološkimi testi, kjer so kot označevalce uporabili radioaktivne izotope, kar so opustili zaradi kompleksnosti postopka in regulatornih problemov pri rokovanju z radioaktivnimi substancami v bolnišnicah. TDM je postal rutinska analizna metoda, ko so razvili multiencimsko imunološko tehniko (EMIT). Pri tej metodi analit tvori kompleks s specifičnim protitelesom in postane netopen. Motnost, ki je posledica nastanka imunskega kompleksa, ustreza koncentraciji v vzorcu in se nato spektrofotometrično detektira. Pri metodi pa obstaja tveganje, da bi protiteleso reagiralo tudi z metaboliti analita, kar bi lahko imelo za posledico lažno previsoke plazemske koncentracije. V zadnjih letih se je kot najbolj obetavna in praktična metoda za spremljanje terapevtskih koncentracij izkazala tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (22, 23).

1.2.1 Učinkovitost TDM pri valprojski kislini

Rutinsko spremljanje plazemskih koncentracij VPA je v uporabi že več kot 35 let (24). Posebnost valprojske kisline je, da se delež vezane oblike zmanjša, ko koncentracija v plazmi doseže določeno vrednost (75 µg/mL). Ob večanju koncentracij pride do hitrega porasta proste oblike, ki je tudi aktivna oblika VPA (25). Zato je potrebno previdno spremljanje koncentracij VPA v prvih 6-ih mesecih terapije z valprojsko kislino.

VPA se določa v različnih medijih, plazmi, serumu, cerebrospinalni tekočini, solzah ter tudi v slini. Medtem ko je delež proste oblike VPA izmerjen v plazmi, serumu, CSF ali solzah primerljiv, koncentracij izmerjenih v slini ne gre primerjati (15).

V objavljeni literaturi smo zasledili samo dve randomizirani študiji, ki sta raziskovali učinkovitost TDM protiepileptičnih zdravil. V obeh študijah so bolnike razdelili v dve skupini, kjer so eni skupini s pomočjo TDM prirejali terapijo, da so dosegli terapevtske koncentracije, medtem ko so v drugi skupini zdravljenje kontrolirali glede na klinične izkušnje. Rezultati so pokazali, da med skupinama ni bistvenih razlik. Tudi pogostost pojava neželenih učinkov je bila v obeh skupinah enaka (26, 27).

Forooghypour in sodelavci so v svoji študiji obravnavali 18 bolnikov z epilepsijo, katerim so merili plazemske koncentracije VPA. Ugotovili so, da je več kot polovica bolnikov imelo koncentracijo VPA v serumu nižjo od terapevtske, ampak je bilo zdravljenje vseeno uspešno (odsotnost napadov oziroma zmanjšana frekvenca pojavnosti). Rezultati so pokazali, da med serumsko koncentracijo VPA in terapevtskim učinkom ni jasne povezave (28).

Široka variabilnost v farmakokinetiki VPA med posameznimi bolniki in pričakovana dolgotrajna terapija govorita v prid uporabe TDM pri VPA. Po drugi strani pa je med plazemskimi koncentracijami in terapevtskim učinkom nejasna povezava. VPA za razliko od večine ostalih protiepileptičnih zdravil nima tako ozkega terapevtskega okna, ki bi terjalo pozorno spremljanje plazemskih koncentracij učinkovine. Vsekakor pa lahko TDM izboljša nadzor v situacijah, ko gre za nenavaden metabolizem VPA, pri polifarmakoterapiji s pomembnimi interakcijami med zdravilnimi učinkovinami ter kot del celovite ocene sodelovalnosti bolnika (15).

1.3 ALTERNATIVNI NAČINI VZORČENJA BIOLOŠKIH VZORCEV

1.3.1 Posušeni krvni madeži

Pri tehniki posušenih krvnih madežev (DBS) gre za vzorčenje relativno majhnih vzorcev, kjer majhno količino kapilarne krvi odvzamemo iz prsta ali pete in jo kanemo na posebne papirnate kartice (17). V farmacevtski industriji posvečajo metodi v zadnjem času veliko pozornosti (29). Implementacija in učinkovitost tehnologije posušenih madežev bi v praksi pomenila poenostavljeno vzorčenje krvi in nadaljnjo analizo. DBS predstavlja obetavno tehniko, ki bi lahko nadomestila že obstoječe tehnike v farmakokinetičnih in toksikoloških študijah (30).

Prednosti DBS tehnike

Poglavitna prednost tehnike DBS je enostaven in minimalno invaziven odvzem vzorca, ki ga odvajamo iz pete ali prsta. Način vzorčenja prinaša še dodatno prednost, saj pri odvzemu ni potrebna prisotnost zdravstvenega delavca, kot se to zahteva pri ostalih tehnikah (17). Prav tako odvajamo majhen volumen vzorca (10–50 μL), kar omogoča bolj pogosto vzorčenje in vzorčenje pri bolj občutljivih populacijah, kot so novorojenčki, nosečnice in kritično bolni (17). Ker se kri po dodatku na kartico za DBS posuši, dobimo analit v trdnem stanju, kateremu pripisujemo večjo stabilnost kot vzorcu v tekočem stanju. Na voljo so tudi kartice, premazane s snovmi, ki lizirajo celice in denaturirajo proteine, kar je lahko uporabno pri posameznih analitih (17). Poleg naštetih prednosti tehnike je pomembna tudi enostavna priprava vzorca, nižji stroški transporta in enostavno shranjevanje (17).

Slabosti tehnike DBS

Zaradi majhnega volumna vzorca, ki je ena izmed prednosti te tehnike, pa metoda zahteva zelo visoko občutljive analizne metode. Tehnika tudi ni primerna za hlapljive ali vnetljive zdravilne učinkovine. Pri DBS odvajamo kapilarno kri, medtem ko pri drugih metodah uporabljamo vensko kri. Vendar ni dokazov, da so koncentracije izbranih učinkovin v kapilarni in venski krvi primerljive, npr. paracetamol se v kapilarni krvi pojavlja v precej višjih koncentracijah kot v venski (30), kar onemogoča neposredno primerjavo podatkov. Pri metodi gre tudi za kompleksno določanje analitov. Ovire predstavljajo izbira ustrezne kartice za DBS, dodatek internega standarda, hematokrit, volumen nanosa, homogenost med krvnimi madeži, izkoristek ekstrakcije itd. Velik problem pri vključitvi metode v rutinsko spremljanje koncentracij pa predstavlja tudi dejstvo, da na tem področju še ne obstajajo standardizirane smernice, ki bi omogočale celovito validacijo metod. Nenazadnje pa ne poznamo točne povezave med koncentracijo analitov v DBS in plazmi (17).

Tehnika DBS predstavlja alternativo konvencionalnemu TDM AED, ki temelji na plazemskih vzorcih. Kot tehnika, ki je le minimalno invazivna, nam omogoča delo z majhnimi volumni krvi, neodvisno od časa vzorčenja, pospeši obdelavo vzorca in olajša shranjevanje. Tehnika DBS je uporabna predvsem pri novorojenčkih, nosečnicah in kritično bolnih. Seveda pa ima tehnika vseeno nekaj ovir, ki jih bo še potrebno obiti (17).

Volumetrični absorptivni mikrovzorčevalnik (VAMS)

Da bi se izognili slabostim tehnike povezanim s hematokritom in homogenostjo krvnih madežev, se na trgu trenutno uveljavlja nov pripomoček pri vzorčenju krvnih vzorcev – volumetrični absorptivni mikrovzorčevalnik (VAMS). VAMS ima nastavek iz adsorptivnega polimera, ki vpije točno določen volumen kapilarne krvi (ponavadi 10 μL). Nastavek je pritrjen na ročaj s plastično konico (slika 4). Postopek izvajamo tako, da nastavek potopimo v kri, pri tem pa pazimo, da ne potopimo celotnega nastavka, saj bi tako polimer lahko vpil večji volumen krvi od določenega. Postopek je končan, ko je celoten nastavek obarvan rdeče, kar ponavadi traja 2-5 s. Dodatna prednost uporabe VAMS je, da je ročaj primeren tudi kot nastavek za avtomatsko pipeto, kar omogoča takojšnje nadaljnjo obravnavo (31).



Slika 4: VAMS (32)

2 HIPOTEZA IN NAČRT ZA DELO

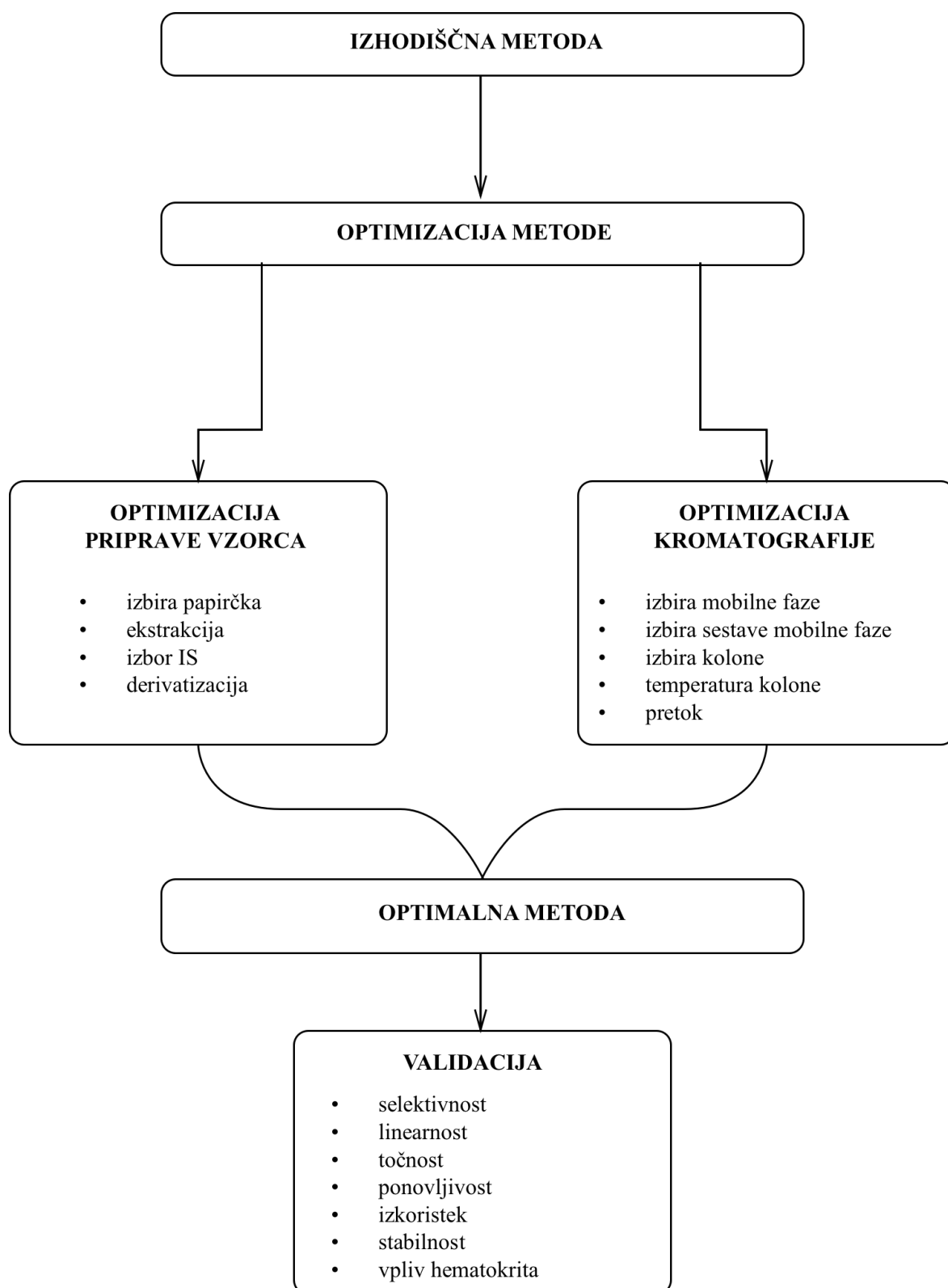
Valprojska kislina (VPA) je protiepileptična učinkovina z močnim učinkom, njene plazemske koncentracije pa se od bolnika do bolnika zelo razlikujejo. Zaradi tega je spremljanje plazemskih koncentracij pri bolnikih izjemnega pomena. Ker se pri zdravljenju s protiepileptičnimi zdravili bojimo neželenih učinkov, pri VPA predvsem hepatotoksičnosti, se bomo v magistrskem delu osredotočili tudi na določanje domnevno toksičnega metabolita valprojske kisline, 4-en VPA v krvi.

Namen magistrskega dela je razviti in validirati metodo, s katero bi lahko sočasno in enostavno določili koncentracijo valprojske kisline in njenega metabolita v krvi bolnikov s pomočjo posušenih krvnih madežev. Metoda bo temeljila na že obstoječi metodi, kjer so določali plazemske koncentracije valprojske kisline in njenega metabolita 4-en VPA s pomočjo derivatizacije analitov in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Pri razvoju metode se bomo najprej osredotočili na izbiro kartice za DBS, na katero bomo nanašali kri. Naslednji izziv v nalogi bo predstavljala ekstrakcija analitov iz kartice. Raziskovali bomo vpliv različnih topil, njihovih volumnov in načina ekstrakcije. Ker valprojske kisline in njenega metabolita ni moč detektirati s fluorescenčno detekcijo brez predhodne derivatizacije, bomo analita najprej derivatizirali, pri čemer bomo preizkusili vpliv različnih koncentracij derivatizacijskih reagentov. Na koncu bomo optimizirali tudi kromatografsko metodo. Testirali bomo različne kolone, ugotavljali kakšen vpliv ima na odzive analitov temperatura kolone, pH mobilne faze, vrsta in sestava mobilne faze.

Razvito metodo bomo validirali po smernicah za bioanalizne metode Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA). V sklopu validacije bomo preverjali selektivnost, določali območje linearnosti, ponovljivost, točnost, stabilnost ter preverili kakšen je izkoristek ekstrakcije. Glavna hipoteza naloge je torej, da bomo razvili in validirali enostavno metodo za določevanje VPA in njenega metabolita 4-en VPA v krvi s pomočjo posušenih krvnih madežev.

Na sliki 5 je predstavljen shematski prikaz načrta dela.

Slika 5: Shematski pregled načrta dela



3 MATERIALI

3.1 BIOLOŠKI MATERIAL

Pri pripravi vzorcev smo uporabljali svežo kri istega darovalca. Kri je bila odvzeta v vakuumsko epruveto z antikoagulatom etilendiamintetraocetno kislino (EDTA), s katerim smo preprečili strjevanje krvi. Po enakem postopku smo odvzeli kri še šestim darovalcem pri ugotavljanju specifičnosti metode.

3.2 STANDARDI

Kemikalija	Formula	M [g/mol]	Proizvajalec
Natrijeva sol valprojske kisline	$C_8H_{15}NaO_2$	166,19	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
2-propilpent-4-enojska kislina	$C_8H_{14}O_2$	142,20	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Nemčija
Oktanojska kislina	$CH_3(CH_2)_6COOH$	144,21	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Pentanojska kislina	$CH_3(CH_2)_3COOH$	102,13	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Heptanojska kislina	$CH_3(CH_2)_5COOH$	130,18	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
5-metil salicilna kislina	$CH_3C_6H_3(OH)CO_2H$	152,15	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Benzojska kislina	C_6H_5COOH	122,12	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
2-bromobenzojska kislina	$BrC_6H_4CO_2H$	201,02	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
Klofibrična kislina	$C_{10}H_{11}ClO_3$	214,65	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
Cikloheksanojska kislina	$C_6H_{11}CO_2H$	128,17	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija

3.3 REAGENTI IN TOPILA

Metanol CH_3OH CHROMASOLV®, for HPLC, $\geq 99,9\%$; M = 32,04 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Acetonitril C_2H_3N Chromasol V® gradient grade, for HPLC, $\geq 99,9\%$; M = 41,05 g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

1 M raztopina natrijevega hidroksida NaOH

1 M raztopina klorovodikove kisline HCl

Standardne pufrske raztopine pH = 3,00 do 9,00; (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija) in (Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija)

Ultra čista voda pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), specifična upornost > 18,2 mΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) < 6 ppb (pri T = 25 °C), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
Kalijev dihidrogen fosfat for analysis KH₂PO₄; M = 136,08 g/mol, (Merck, Darmstadt, Nemčija)

98-100% mravljinčna kislina HCOOH, M = 46,03 g/mol, (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Amonijev acetat CH₃COONH₄, M = 77,08 g/mol, (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Etilacetat CH₃COOC₂H₅, ≥ 99,5%, M = 88,10 g/mol, (Panreac, Barcelona, Španija)

Stisnjen dušik N₂ za preprihanje (Messer, Ruše, Slovenija)

Ocetna kislina CH₃COOH, 100%, M = 60,05 g/mol, (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Dimetil formamid HCON(CH₃)₂, ≥ 99,5%, M = 73,09 g/mol, (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

EDC hidroklorid C₈H₁₇N₃ · HCl, 191,70 g/mol (Apollo Scientific, Stockport, Anglija)

HOBt hidrat C₆H₅N₃O · H₂O, 135,12 g/mol, (Acros, Geel, Belgija)

3-metoksifenol C₇H₈O₂ 124,14 g/mol, (Acros, Geel, Belgija)

Etil 4-kloroacetoacetat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Žveplova kislina H₂SO₄, 98,08 g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Natrijev azid NaN₃, 65,01 g/mol, (Janssen, Hamburg, Nemčija)

Tetrahidrofuran C₄H₈O, 72,11 g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Diklorometan CH₂Cl₂, 84,93 g/mol (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

3.4 NAPRAVE IN PRIBOR

Hladilnik 3 °C z zamrzovalnikom -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Zamrzovalnik SANYO (T = -80 °C) (SANYO electric Co., Ltd., Osaka, Japonska)

Zamrzovalnik Gorenje (T = -20 °C) (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Termostat kolone Varian Pro star 510 (VARIAN medical systems, Palo Alto, Kalifornija, Združene države Amerike)

Tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

Tehtnica XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

pH meter MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)
Centrifuga Eppendorf, tip: 5415R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
Centrifuga Centric 322A (Tehtnica®, Železniki, Slovenija)
Stresalnik VORTEMP 56EVC (Tehtnica®, Železniki, Slovenija)
Turbovap®LV (Caliper, Hopkinton-MA, ZDA)
Magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Koper, Slovenija)
Mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica®, Železniki, Slovenija)
Ultrazvočna kadička SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)
Ultrazvočna kadička BANDELIN SONOREX (Bandelin electronic, Berlin, Nemčija)
Polavtomatske pipete 2 - 20 µl, 20 - 200 µl, 200 - 1000 µl, 500 - 5000 µl in 1 - 10 ml
(Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
Polavtomatska pipeta 2 - 20 µl (Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finska)
Plastične epruvete 1,5 in 2 ml (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija) in 1,5 ml
(Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
Celulozno acetatni filter 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Nemčija)
Program za izračunavanje logP ChemDraw Professional 15.0
HPLC kolona; Phenomenex, Luna Phenyl-Hexyl, 150 × 4,6 mm × 5 µm
(Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
HPLC kolona; Phenomenex Luna C8 100A 150 × 4,6 mm 5 µm, (Phenomenex, Torrance,
Kalifornija, Združene države Amerike)
HPLC kolona; Phenomenex Luna C18 (2) 100A 150 × 4,6 mm 3 µm, (Phenomenex,
Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
Predkolona za HPLC; Phenomenex 4 × 3 mm C18 (Phenomenex, Torrance, Kalifornija,
Združene države Amerike)
HPLC sistem Agilent 1100 series z UV in FLD detektorjem (Agilent technologies, Santa
Clara, Kalifornija, ZDA)

Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, tehtiči, vialo, inserti za vijale, presesalna buča in
lij za presesalno bučo.

Ostali inventar: spatule, nastavki za pipete, magneti, magnetna palica za odstranjevanje
magnetov, pokrovčki za vialo, plastične kapalke, epruvete namenjene za vakuumski
odvzem venske krvi (EDTA), lateks rokavice in Parafilm®M.

4 METODE

Razvoj metode je temeljil na že obstoječi metodi, kjer so določali koncentracijo valprojske kisline in njenega metabolita 4-en VPA v plazemskih vzorcih (33). Pri prenosu metode iz plazemskih na krvne vzorce smo optimizirali številne pogoje. Testirali smo različne vrste kartic za nanos krvnih kapljic, spreminjali volumen ekstrakcijskega topila in pogoje ekstrakcije, preizkušali smo različne interne standarde ter poizkusili optimizirati kromatografske pogoje tako, da smo dobili maksimalne in čiste kromatografske odzive analitov.

4.1 IZHODIŠČNA PLAZEMSKA METODA

4.1.1 Priprava osnovnih raztopin (OR) valprojske kisline in 4-en VPA

Za pripravo osnovne raztopine VPA zatehtamo natrijev valproat in pripravimo vodno raztopino s koncentracijo 4,6 mg/mL, kar ustreza koncentraciji 4,0 mg/mL valprojske kisline. Pri pripravi osnovne raztopine 4-en VPA kot topilo uporabimo metanol. Pripravo osnovnih raztopin prikazujeta preglednici III in IV.

Preglednica III: Postopek priprave osnovne raztopine VPA (OR1)

Spojina	$c_{\text{končna}}$ [mg/mL]	m_{spojine} [mg]	V_{topila} [mL]
Na-VPA	4,60	4,60	1,000

Preglednica IV: Postopek priprave osnovne (OR2) in delovne raztopine 4-en VPA

	Osnovna raztopina 4-en VPA (OR2)		Delovna raztopina 4-en VPA
$m_{4\text{-en VPA}}$ [mg]	100	V_{OR2} [μL]	22,0
V_{topila} [mL]	1,000	V_{topila} [μL]	1978
$c_{\text{končna}}$ [mg/mL]	100	$c_{\text{končna}}$ [$\mu\text{g/mL}$]	1000

4.1.2 Priprava internega standarda

Za interni standard (IS) uporabimo pentojsko kislino. Pripravimo vodno raztopino pentojske kisline s koncentracijo 2,3 mmol/L.

4.1.3 Priprava delovnih raztopin

Delovne raztopine pripravimo iz osnovnih raztopin. Postopek priprave je prikazan v preglednicah V in VI.

Preglednica V: Postopek priprave delovnih raztopin VPA

Delovna raztopina	C _{VPA} v vzorcu [μg/mL]	C _{VPA} v del. razt. [μg/mL]	V _{OR} [μL]	V _{H₂O} [μL]	V _{končni} [μL]
ST1	200	4000	1000	0	1000
ST2	150	3000	375	125	500
ST3	100	2000	250	250	500
ST4	75	1500	225	375	600
ST5	50	1000	125	375	500
ST6	25	500	75	525	600
ST7	16	320	40	460	500
ST8	10	200	25	475	500
ST9	5	100	25	975	1000
ST10	2,5	50	25	1975	2000

Preglednica VI: Postopek priprave delovnih raztopin 4-en VPA

Delovna raztopina	C _{4-en VPA} v vzorcu [μg/mL]	C _{4-en VPA} v del. razt. [μg/mL]	V _{OR} [μL]	V _{H₂O} [μL]	V _{končni} [μL]
ST1	50	1000	1000	0	1000
ST2	30	600	300	200	500
ST3	20	400	200	300	500
ST4	10	200	100	400	500
ST5	6	120	60	440	500
ST6	4	80	40	460	500
ST7	2	40	20	480	500
ST8	1	20	20	980	1000
ST9	0,5	10	20	1980	2000
ST10	0,25	5	500	500	1000

4.1.4 Priprava plazemskih vzorcev

Za pripravo vzorcev najprej v 1,5 mL epico odpipetiramo 170 μL plazme, dodamo 10 μL delovne raztopine ST1-ST10 VPA, 10 μL delovne raztopine ST1-ST10 4-en VPA in 10 μL IS.

4.1.5 Ekstrakcija

Od predhodno pripravljenega vzorca odvezamo 50 μL , dodamo 200 μL EtAc in 100 μL 10 mM HCl. Zmes mešamo na vibracijskem mešalu 10 sekund in prestavimo na stresalnik za 5 min pri temperaturi 25 $^{\circ}\text{C}$ in 70 obratih na minuto. Po stresanju vzorce centrifugiramo 5 min pri 16 000 obratih na minuto pri sobni temperaturi.

4.1.6 Derivatizacija

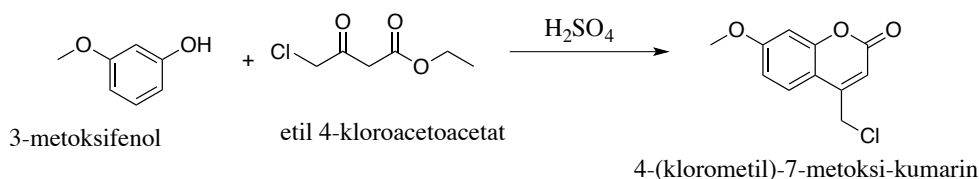
Odvzamemo 100 μL organske faze in ji dodamo 25 μL kumarina, 25 μL HOBt-a, 100 μL EDC-ja in 40 μL 0,5 M fosfatnega pufru (pH = 7,0). Priprava reagentov je prikazana v preglednici VII. Sinteza kumarina je prikazana na sliki 6 (izhajamo iz sinteze objavljene v literaturi (34)). Zmes vorteksiramo 10 sekund in prestavimo v stresalnik za 5 min pri temperaturi 25 $^{\circ}\text{C}$ in 70 obratih na minuto. Po stresanju vzorce centrifugiramo za 5 min 16 000 obratih na minuto pri sobni temperaturi.

Preglednica VII: Postopek priprave derivatizacijskih reagentov

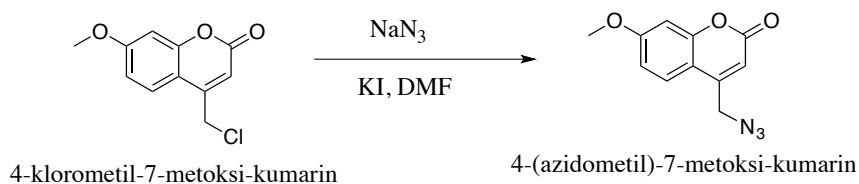
Reagent	M [g/mol]	c [mg/mL]	m [mg]	V [mL]
Kumarin	205	12,3	22,0	1790*
HOBt	135,1	99,8	186	1860*
EDC	155,2	765,9	3240	4230*

*Kumarin in HOBt raztopimo v DMF-ju, EDC pa v vodi.

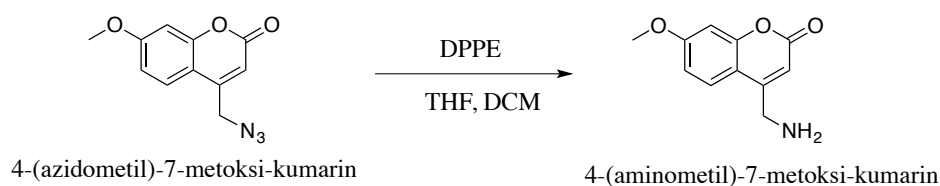
1. stopnja: Pechmann-ova kondenzacija



2. stopnja: substitucija halogena z azidom



3. stopnja: Staudingerjeva reakcija



Slika 6: Sinteza kumarina. 1. stopnja: na ledeni kopeli dodajamo H_2SO_4 in mešamo pod atmosfero argona čez noč. Naslednji dan zmes ohladimo na ledu, oborino odnučamo in posušimo na zraku. 2. stopnja: klorid suspendiramo v DMF, ohladimo na ledeni kopeli in nato postopoma dodamo NaN_3 in KI. Reakcijsko zmes mešamo pri sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan izvedemo ekstrakcijo, kjer organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in topilo uparimo na rotavaporju. 3. stopnja: Azid raztopimo v THF in DCM, dodamo DPPE in mešamo pri sobni temperaturi čez noč. Zmes čistimo s kolonsko kromatografijo.

4.1.7 Sušenje

Odvzamemo 25 μ L organske faze in jo posušimo ($T_{vode} = 40$ °C, prepihanje pri tlaku 2 bar). Posušene vzorce rehidriramo v 150 μ L 60% acetonitrila in jih prenesemo v inserte.

4.1.8 Kromatografska analizna metoda

Kromatografski pogoji izhodiščne metode so podani v preglednici VIII.

Analizni čas	16 min
Mobilna faza	1,5% AcOH v vodi
Kolona	Luna® 3 µm C18(2) 100 Å, 250 × 4.6 mm
Temperatura kolone	50 °C
Sestava mobilne faze	54:46
Pretok	0,7 mL/min
Detekcija	Eks.: 330 nm Em.: 400 nm

4.2 OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCA

Kri poleg plazme vsebuje še rdeče krvne celice in druge komponente, zato plazemskih in krvnih vzorcev ne gre enostavno enačiti. Pri optimizaciji metode smo posebno pozornost namenili pripravi vzorca, izbiri kartice za DBS, derivatizacijskim pogojem ter ekstrakciji iz kartice. Tekom razvoja metode smo ugotovili, da bomo metodo lahko razvili samo za valprojsko kislino, zato smo nekatere parametre optimizirali za oba analita, nekatere pa le za valprojsko kislino.

4.2.1 Priprava posušenih krvnih madežev

Pripravili smo dve osnovni in delovne raztopine, kot je opisano v točkah 4.1.1 in 4.1.3. Pri pripravi vzorca je bila potrebna optimizacija, saj se pri vzorcih DBS interni standard ne dodaja k vzorcu, temveč v ekstrakcijski medij. Zato smo za pripravo vzorca najprej odpipetirali 180 µL krvi in nato dodali 10 µL delovne raztopine VPA in 10 µL delovne raztopine 4-en VPA. Vzorec smo narahlo pretresli in 10 µL obogatene krvi nanесли na kartico za DBS. Krvne madeže smo sušili 24 h pri sobni temperaturi in jih nato pospravili v plastično vrečko opremljeno s sušilnim sredstvom ter jih shranili pri sobni temperaturi.

4.2.2 Izbira kartice za DBS

Na tržišču so na voljo različne kartice za pripravo posušenih krvnih madežev. Pri razvoju metode smo se odločili, da bomo primerjali kromatografske odzive valprojske kisline na naslednjih karticah: Whatman 903, FTA DMPK-A, FTA DMPK-B, FTA DMPK-C. Na kartice smo nanесли kapljice sveže krvi obogatene z raztopino valprojske kisline, s koncentracijo 16 µg/mL in 4-en VPA s koncentracijo 2 µg/mL in jih sušili 24 h pri sobni

temperaturi. Obogatene vzorce krvi smo pripravili po postopku opisanem v prejšni točki in jih nato obdelali kot plazemske vzorce opisane v točkah od 4.1.5 do 4.1.8.

4.2.3 Ekstrakcijski pogoji

Pri metodah s posušenimi krvnimi madeži predstavlja največjo oviro predvsem ekstrakcija analita iz kartice za DBS. Da bi dosegli čim večjo ekstrakcijo, smo k postopku ekstrakcije izhodiščne metode dodali še inkubacijo vzorca v ultrazvočni kadički in preizkušali vpliv volumna ekstrakcijskega topila na izkoristek ekstrakcije.

Ultrazvočna kadička

Izhodiščno metodo smo optimizirali tako, da smo po dodatku HCl, vzorec vorteksirali 30 s in nato postavili za 3 min v ultrazvočno kadičko. Nato smo dodali etilacetat, vzorec ponovno vorteksirali 30 s in postavili v ultrazvočno kadičko za 10 min.

Volumen ekstrakcijskega topila

V izhodiščni metodi je za ekstrakcijo analita Bau (33) uporabil 100 μL 10 mM HCl. Ta volumen smo želeli zmanjšati, saj volumen vzorca ni bil 50 μL , temveč le 10 μL krvi, ki smo jo nakapljali na kartico in posušili. Naredili smo poskus, v katerem smo pripravili krvne madeže s koncentracijo valprojske kisline 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pri ekstrakciji smo nato vsakemu madežu dodali različen volumen HCl, predstavljen v preglednici IX. Vzorce smo potem pripravili, kot je opisano v točkah 4.1.6 in 4.1.7.

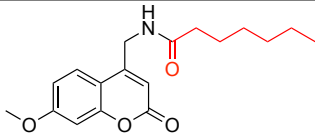
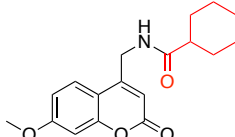
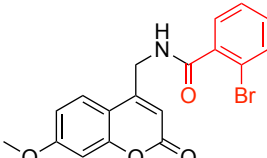
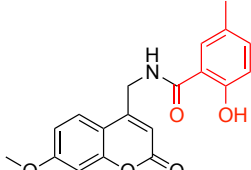
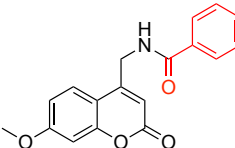
Preglednica IX: Različni volumni ekstrakcijskega topila

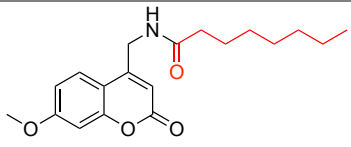
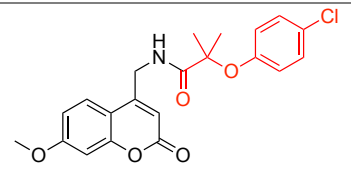
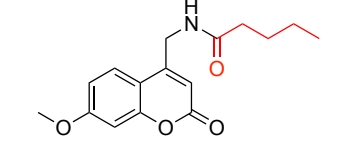
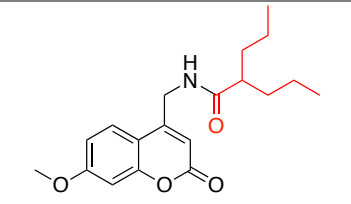
V_{HCl} [μL]
10
20
30
50
70

4.2.4 Izbor internega standarda

V izhodiščni metodi so kot interni standard uporabili pentanojsko kislino. Zaradi nečistoč, ki se se pri analizi sočasno eluirale, ni idealen interni standard. Pri izbiri internega standarda naj bi se držali pravila, da je interni standard čimbolj strukturno podoben analitom, saj se potem tudi podobno obnaša med pripravo vzorca in nadaljnji analizi (35). Izbrali smo si osem substanc (preglednica X), ki so bile dostopne na fakulteti in so bile potencialno primerne za interni standard (imajo COOH skupino, ki s kumarinom tvori amid). S programom ChemDraw Professional 15.0 smo narisali s kumarinom označene spojine in pregledali njihove logaritme porazdelitvenih koeficientov (logP). Glede na vrednosti logP smo predvideli, kakšne retencijske čase bodo imele, saj se iz podanih logP lahko izračuna t_R (36). Strukturne formule s kumarinom označenih spojin in njihovi logP so prikazani v preglednici X.

Preglednica X: Strukturne formule in logP testiranih IS in valprojske kisline

Spojina	Spojina + kumarin	log P
Heptanojska kislina		2,69
Cikloheksanojska kislina		2,34
2-bromobenzojska kislina		3,09
5-metil salicilna kislina		2,36
Benzojska kislina		2,26

Oktanojska kislina		3,10
Klofibrična kislina		3,29
Pentanojska kislina		1,85
Valprojska kislina		3,25

Pripravili smo raztopine vseh spojin s koncentracijo 2,30 mmol/L. Heptanojsko kislino smo raztopili v dimetilformamidu, pentanojsko v vodi, ostale pa v metanolu. 2,5 μL posameznega IS smo dodali k vzorcem s koncentracijo VPA 100 $\mu\text{g/mL}$, ki smo jih nato pripravili po postopku opisanem pod točko 4.1. Po enakem postopku smo pripravili tudi slepi krvni vzorec, s katerim smo preverili, ali so na t_R preiskovanih spojin kakšne koelucije, ki bi lahko motile analizo.

Pri dodatku internega standarda smo opazili, da kromatografski odzivi precej nihajo, kar pripisujemo napakam pri pipetiranju zaradi majhnega volumna pipetiranja (2,5 μL). Odločili smo se, da v prihodnje izbrani IS pripravimo v HCl in ga skupaj dodamo k posušenemu krvnemu madežu. Tako smo vsakič pripravili večje količine zmesi IS in HCl (v enakem razmerju kot v izhodiščni metodi) in nato 50 μL odpipetirali v posamezen vzorec.

4.2.5 Optimizacija derivatizacije

Pri derivatizaciji smo izhajali iz metode Sasomota in sodelavcev (37). V fazi derivatizacije smo spojine označili s fluorescentnim označevalcem kumarinskega tipa, pri čemer smo uporabili različne sklopitvene reagente. Da bi dosegli čim višjo označenost valprojske kisline, smo spreminjali masne koncentracije posameznega reagenta in preverjali, kako to vpliva na kromatografske odzive. Pri tem smo v vsakem pogoju spremenili koncentracijo

le enega sklopitvenega reagenta, da smo lahko določili, kateri od reagentov vpliva. Kombinacije, ki smo jih preizkušali, so podane v preglednici XI.

Preglednica XI: Različne kombinacije derivatizacijskih reagentov

Kombinacija	γ_{kumarina} [mg/mL]	γ_{HOBt} [mg/mL]	γ_{EDC} [mg/mL]
Kombinacija 1	6,00	99,8	765
Kombinacija 2	12,3	99,8	765
Kombinacija 3	18,0	99,8	765
Kombinacija 4	12,3	50,0	765
Kombinacija 5	12,3	150	765
Kombinacija 6	12,3	99,8	380
Kombinacija 7	12,3	99,8	1150

4.2.6 Izbor topila za rekonstitucijo suhega ostanka

Pri optimizaciji metode nas je zanimal tudi vpliv rekonstitucijskega topila na kromatografske odzive valprojske kisline. Preverili smo, kako se odzivi spreminjajo glede na delež vodne faze. Za rekonstitucijsko topilo smo izbrali acetonitril. Deleži vodne faze so podani v preglednici XII. V vseh primerih smo pripravili vzorec s koncentracijo 5 $\mu\text{g/mL}$ in slepi krvni vzorec. Pripravili smo ju po postopku opisanem v točkah 4.1.5-4.1.7.

Preglednica XII: Sestava topila za rekonstitucijo suhega ostanka

AcN:H ₂ O (v/v)
40:60
50:50
60:40
70:30

4.2.7 Vpliv časa priprave obogatene krvi na kromatografski odziv valprojske kisline

Iz sveže krvi smo po postopku, opisanem v točki 4.1.4, pripravili vzorce krvi za umeritveno krivuljo VPA in 4-en VPA. Nekaj madežev smo nanесли takoj po pripravi obogatene krvi, druge pa smo nanесли kasneje (pred nanosom smo vzorce narahlo

premešali). S tem smo želeli preveriti, ali se z analitom v krvi med nanosom na kartice kaj dogaja, če je pomemben čas nanosa krvnih kapljic.

4.2.8 Vpliv temperature sušenja na kromatografski odziv valprojske kisline

Pripravili smo dve paralelki vzorcev s koncentracijo 100 µg/mL in 5 µg/mL. Eno paralelko papirčkov smo sušili pri 70 °C, drugo pa pri sobni temperaturi. Preverili smo, ali temperatura sušenja vpliva na odzive na kromatogramu.

4.3 OPTIMIZACIJA KROMATOGRFSKE ANALIZNE METODE

Do razlik med plazemskimi in krvnimi vzorci prihaja tudi pri kromatografskih odzivih, zato smo v zadnji fazi optimizacije metode poskušali optimizirati tudi kromatografske parametre. Ker so se pod vrhovi analitov pojavljale nečistoče ter koelucije, smo s spreminjanjem sestave mobilne faze in njenega pH, s testiranjem različnih stacionarnih faz in spreminjanjem temperature kolone želeli doseči čimboljšo separacijo in maksimalne površine vrhov analitov.

4.3.1 Mobilna faza

Izbira mobilne faze z optimalnim pH

Testirali smo osem različnih mobilnih faz, ki so podane v preglednici XIII. Izbrali smo mobilne faze različnih pH. S tem smo želeli vplivati na ionizacijo koelucij v slepem vzorcu in posledično njihovo separacijo. Poleg pH pa na separacijo analitov vpliva tudi ionska moč oziroma pufrna kapaciteta. Ta se z večanjem koncentracije kisline povečuje, zato smo testirali tudi različne koncentracije očetne kisline.

Preglednica XIII: Preiskovane mobilne faze

Mobilna faza	pH
10 mM mravljinčna kislina	2,31
20 mM amonijev acetat	3, 5, 7, 9
1% očetna kislina v vodi	2,87
1,5% očetna kislina v vodi	2,77
2% očetna kislina v vodi	2,71

Pri testiranju vsake mobilne faze smo pripravili slepi vzorec in vzorec s koncentracijo VPA 25 µg/mL (pri 2% očetni kislini vzorec s koncentracijo 5 µg/mL) po postopku opisanem pod točko 4.4.1.

Izbira optimalne sestave MF

V točki 4.3.2 smo kot ustrezno kolono izbrali kolono Luna C18. Pri testiranju kolone smo že preizkušali različno sestavo mobilne faze in ugotovili, da z naraščanjem deleža acetonitrila dobimo lepše kromatograme, zato smo se odločili, da kromatografske odzive izmerimo še pri naslednjih deležih AcN v 1,5% vodni raztopini očetne kisline: 48%, 50%, 52%, 54%, 56% in 58%. Pripravili smo slepi vzorec in vzorca s koncentracijo VPA 50 µg/mL in 75 µg/mL.

4.3.2 Stacionarna faza

Vrsta kolone

Pripravili smo slepi vzorec DBS in vzorec s koncentracijo 75 µg/mL VPA. Testirali smo tri različne kolone, da smo ugotovili, katera kolona da maksimalne kromatografske odzive analitov. Kromatografijo smo izvajali pri temperaturi 50 °C in treh različnih deležih AcN (42%, 46%, 48%). Testirane kolone so predstavljene v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Lastnosti testiranih kolon

Ime kolone	Luna C8	Luna C18 (2)	Luna Phenyl hexyl
Proizvajalec	Phenomex	Phenomex	Phenomex
Stacionarna faza	C8 zaestrene s TMS	C18 zaestrene s TMS	Fenilheksil zaestrene s TMS
Velikost delcev	5 µm	3 µm	5 µm
Velikost por	100 Å	100 Å	100 Å
Velikost kolone	4,6 × 250 mm	4,6 × 250 mm	4,6 × 250 mm

Temperatura kolone

Najprej smo testirali pri deležih acetonitrila 48%, 50%, 52%, ki so se pri testiranju sestave zdeli najbolj optimalni. Preverili smo, kakšni so kromatogrami pri teh deležih, pri temperaturah 45 °C, 50 °C, 55 °C. Pripravili smo slepi vzorec in vzorec s koncentracijo 50

µg/mL. Izmed teh pogojev smo potem ugotovili, da je pogoj 50% AcN najbolj optimalen in ker je za kolono dobro, da jo čimmanj segrevamo, smo poizkusili še pri temperaturah 20 °C, 30 °C in 35 °C.

4.3.3 Sprememba pretoka

Optimizirali smo tudi pretok. Kot je napisano v točki 4.4, smo pripravili vzorce za umeritveno krivuljo in jih testirali z metodo, ki se je izkazala za najbolj optimalno. Najprej smo vzorce analizirali s pretokom 0,7 mL/min nato pa še s pretokom 1 mL/min.

4.3.4 Sprememba valovne dolžine

Zadnji parameter, ki smo ga poskušali optimizirati, je bila valovna dolžina, pri kateri smo detektirali analite. Pripravili smo slepi vzorec in vzorec s koncentracijo VPA 75 µg/mL. Nato smo FLD detektor nastavili tako, da je posnel kromatograme pri različnih ekscitacijskih in emisijskih valovnih dolžinah. Najprej smo spreminjali ekscitacijsko dolžino in pri tem imeli konstantno emisijsko, nato pa ravno obratno. Kombinacije valovnih dolžin, ki smo jih preverjali, so podane v preglednici XV.

Preglednica XV: Valovne dolžine

FLD	Ekscitacijska λ [nm]	Emisijska λ [nm]
FLD1	300	400
FLD2	320	400
FLD3	330	400
FLD4	340	400
FLD5	330	390
FLD6	330	380
FLD7	330	410

4.4 OPTIMALNA METODA

Tekom optimizacije metode smo ugotovili, da nam ne bo uspelo sočasno detektirati VPA in njenega metabolita 4-en VPA, zato smo validirali samo metodo določanja koncentracij VPA v posušeni krvni madežih.

4.4.1 Priprava vzorca

V 180 μL krvi smo odpipetirali 20 μL delovnih raztopin VPA (preglednica XVI) in nežno pomešali. 10 μL krvi smo nato nanесли na Whatman 903TM kartico in pustili, da so se madeži 24 h sušili na sobni temperaturi. Posušen krvni madež smo natančno obrezali in mu dodali 50 μL 10 mM HCl z dodanim internim standardom (oktanojska kislina). Vzorec smo nato mešali z vibracijskim mešalom (vortex) 30 sekund ter za 3 minute postavili v ultrazvočno kadičko. V epico smo nato dodali 200 μL etilacetata in ponovno 30 sekund mešali z vibracijskim mešalom in za 10 minut postavili v ultrazvočno kadičko. Vzorec smo nato 5 minut stresali s stresalnikom in nato še 5 minut centrifugirali pri 16 000 obr/min pri sobni temperaturi. Nato smo 100 μL organske faze prenesli v novo 1,5 mL epico ter po vrsti dodali 25 μL kumarina, 25 μL HOBt-a, 100 μL EDC-ja in 40 μL 20 mM fosfatnega pufra (pH 7). Vzorec smo nato 5 min stresali s stresalnikom in 5 min centrifugirali pri 16000 obr/min. Iz dobljene raztopine smo nato odvzeli 25 μL organske faze in jo na aparaturi TurboVap sušili 5 min pri temperaturi vode 40 °C in tlaku dušika 2 barov. Suhi ostanek v epici smo rekonstituirali s 150 μL 60% AcN in vorteksirali 30 sekund. Celotno vsebino smo potem prenesli v inserte. Viale smo opremili z vzmetmi in vanje vstavili inserte.

Preglednica XVI: Priprava delovnih raztopin VPA - optimalna metoda

Delovna raztopina	C _{VPA} v vzorcu [$\mu\text{g/mL}$]	C _{VPA} v del. razt. [$\mu\text{g/mL}$]	V _{OR} [μL]	V _{H₂O} [μL]	V _{končni} [μL]
ST1	200	4000	50	50	100
ST2	150	3000	45	75	125
ST3	100	2000	25	75	100
ST4	75	1500	60	260	320
ST5	50	1000	50	350	400
ST6	25	500	50	750	800
ST7	16	320	40	960	1000
ST8	10	200	50	1950	2000
ST9	5	100	50	3950	4000
ST10	2,5	50	50	7950	8000

4.4.2 Kromatografska analizna metoda

V preglednici XVII so predstavljeni končni kromatografski pogoji.

Preglednica XVII: Optimalni kromatografski pogoji

Analizni čas	16 min
Mobilna faza	1,5% AcOH v vodi
Kolona	Luna® 3 µm C18(2) 100 Å, 250 × 4.6 mm
Temperatura kolone	30 °C
Sestava mobilne faze	50% AcN in 50% AcOH v vodi
Pretok	1 mL/min
Volumen injiciranja	5 µL
Detekcija	Eks.: 300 nm Em.: 400 nm

4.5 VALIDACIJA

Validacijo smo izvajali v skladu s smernicami FDA. Parametri, ki smo jih testirali, so bili točnost, ponovljivost, območje linearnosti, selektivnost, delež ekstrakcije valprojske kisline iz kartice in stabilnost. Vsak dan validacije smo pripravili vzorce za umeritveno krivuljo, kontrolne vzorce (QC) in slepi vzorec.

Pri preverjanju posameznega parametra validacije smo vzorce vedno pripravili in detektirali, kot je navedeno pod točko 4.4. V sklopu validacije smo preverili tudi stabilnost vzorcev.

4.5.1 Priprava standardov za kontrolo kakovosti

Za preverjanje kakovosti smo pripravili kontrolne vzorce nizke (QC_L), srednje (QC_M) in visoke (QC_H) koncentracije. Z njimi smo pokrili celotno koncentracijsko območje, ki smo ga želeli validirati. Postopek priprave raztopin, s katerimi smo nato obogatili kri, prikazuje preglednica XVIII. Na kartice za DBS smo nato nanesti 10 µL krvi. Vsak dan smo pripravili pet paralelnih kontrolnih vzorcev vsake koncentracije.

QC	c_{VPA} [$\mu\text{g/mL}$]	$V_{OR\ VPA}$ [μL]	V_{H_2O} [μL]
QC _L	7	35	45
QC _M	60	75	425
QC _H	175	35	1965

4.5.2 Selektivnost

Selektivnost je definirana kot zmožnost metode, da nedvoumno prepozna in določi testiran analit glede na druge substance prisotne v vzorcu (38-40). FDA smernice narekujejo, da se za dokazovanje selektivnosti uporabi biološki matriks vsaj šestih različnih ljudi. V skladu s smernicami smo zato testirali kri šestih oseb. Iz vsakega vzorca krvi smo pripravili slep vzorec (180 μL krvi smo dodali 20 μL vode) in ga analizirali pod kromatografskimi pogoji podanimi pod točko 4.4 (brez dodatka IS).

4.5.3 Linearnost, meja kvantifikacije (LLOQ) in umeritvene krivulje

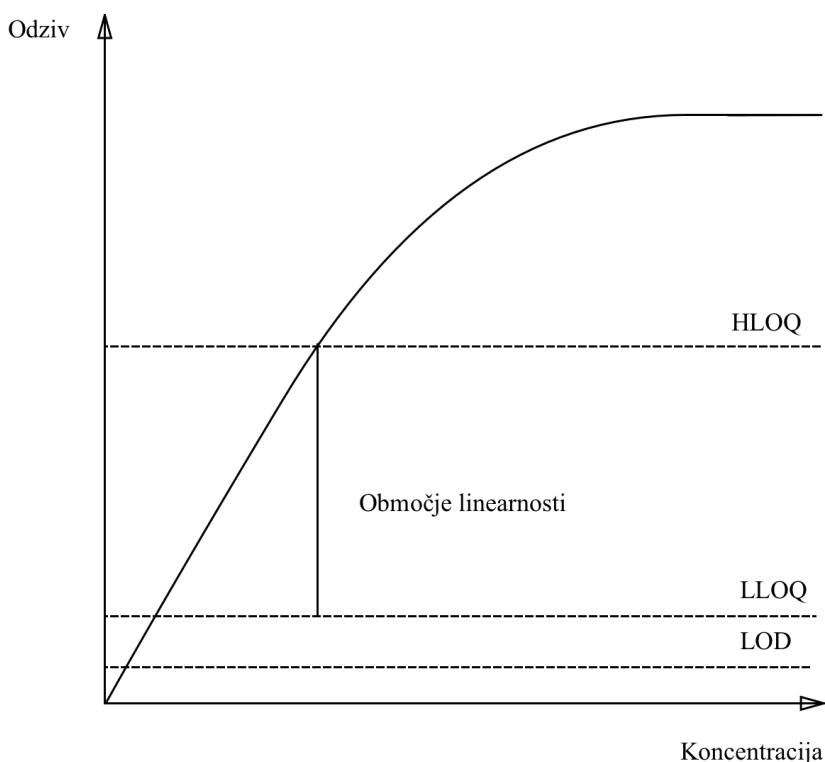
Linearnost metode je definirana kot njena sposobnost, da znotraj nekega območja daje odzive, ki so premosorazmerni koncentraciji analita v preiskovanem vzorcu (38-40). V sklopu ugotavljanja linearnosti smo naredili umeritveno krivuljo, ki pokriva koncentracijsko območje, ki ga za VPA napoveduje literatura. Po smernicah mora umeritvena krivulja vsebovati slep vzorec, ničli vzorec (slep brez IS) ter šest do osem standardov znanih koncentracij (vključno z LLOQ). Za zagotavljanje linearnosti morajo vsaj 4 standardi od 6, vključno s standardom pri spodnji meji kvantifikacije (LLOQ) in pri najvišji koncentraciji, odstopati za manj kot 15% od pričakovanega odziva in manj kot 20% pri LLOQ.

Umeritvene krivulje smo dobili tako, da smo z linearno regresijo obdelali podatke, pri čemer smo dobili enačbo premice $odziv = kc + n$. Odziv (vrednost na abcisi) je predstavljal razmerje površin vrhov VPA in internega standarda, na ordinato pa smo nanesli teoretične koncentracije VPA v vzorcu. Korelacijo med koncentracijo in odzivom smo podali s Pearsonovim koeficientom (r) oz. determinacijskim koeficientom (R^2).

Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ) predstavlja najnižjo koncentracijo analita v vzorcu s sprejemljivo točnostjo in natančnostjo. LLOQ je hkrati tudi najnižji standard umeritvene krivulje, če sta izpolnjena naslednja pogoja:

- odziv analita pri LLOQ mora biti vsaj 5-krat višji od odziva slepega vzorca,
- odziv analita je določljiv in ponovljiv z relativno standardno deviacijo 20% in točnostjo 80-120% (39).

Območje linearnosti in LLOQ prikazuje slika 7:



Slika 7: Območje linearnosti in LLOQ (38)

4.5.4 Točnost

Točnost metode nam pove, za koliko se dobljeni rezultati razlikujejo od dejanskih vrednosti. Preverili smo jo tako, da smo vsak dan validacije analizirali 6 paralelnih vzorcev z enako koncentracijo analita pri treh različnih koncentracijah (QC_L , QC_M , QC_H), ki so pokrile celotno koncentracijsko območje. Priprava vzorcev je opisana pod točko 4.5.1. Z linearno regresijo smo iz umeritvene premice dobili koeficienta n in k ter nato iz razmerja odzivov valprojske kisline in internega standarda po enačbi 1 izračunali koncentracije. Točnost smo izračunali po enačbi 2.

$$c_{izrač.} = \frac{\left(\frac{A_{VPA}}{A_{IS}} - n\right)}{k}$$

Enačba 1

$$Točnost [\%] = \frac{c_{izrač.}}{c_{teoretična}} \cdot 100$$

Enačba 2

Da lahko za metodo trdimo, da je točna, lahko povprečna vrednost rezultatov odstopa za največ 15% od teoretične vrednosti, razen v primeru spodnje meje kvantifikacije (LLOQ), kjer ne sme odstopati za več kot 20% (39).

4.5.5 Ponovljivost

Pri preverjanju ali je metoda ponovljiva, smo pripravili 6 paralelk kontrolnih vzorcev treh različnih koncentracij (QC_L , QC_M , QC_H). Ponovljivost metode ponavadi podamo z relativno standardno deviacijo (RSD), ki smo jo izračunali po enačbi 3. Znotraj ponovljivosti smo izračunali dnevno in meddnevno ponovljivost.

$$RSD = \frac{SD}{\bar{c}} \cdot 100$$

Enačba 3

Da lahko za analitsko metodo trdimo, da je ponovljiva, RSD posameznega QC ne sme biti večji od 15%, izjema je spodnja meja kvantifikacije, kjer lahko znaša maksimalno 20%.

4.5.6 Delež ekstrakcije valprojske kisline iz kartice

V sklopu validacije metode smo preverjali tudi kolikšen je izkoristek ekstrakcije VPA iz kartice za DBS. Smernice ne zahtevajo, da je izkoristek zelo visok, mora pa biti konstanten in ponovljiv. Pripravili smo tri paralelke koncentracij QC_L , QC_M in QC_H vzorcev DBS in tri paralelke koncentracij QC_L , QC_M , QC_H vodnih vzorcev. Postopek priprave je prikazan v preglednici XIX. Derivatizirali in detektirali smo jih, kot je navedeno pod točko 4.4.

Preglednica XIX: Postopek priprave vzorcev za določanje izkoristka ekstrakcije

Vzorci DBS	Vodni vzorci
10 μ L posušen krvni madež	10 μ L vodne raztopine
+ 50 μ L HCl + 2,5 μ L IS	+ 40 μ L HCl + 2,5 μ L IS
+ 200 μ L EtAc	+ 200 μ L EtAc

Dobljene rezultate smo podali kot razmerja med odzivom VPA in IS. Razmerje VPA/IS pri vodnih vzorcih je predstavljalo 100%.

4.5.7 Stabilnost

Postpreparativna stabilnost

Ker med testiranjem vzorci več ur stojijo v avtomatskem vzorčevalniku, smo želeli preveriti njihovo stabilnost med samo analizo. Pripravili smo tri paralelke kontrolnih vzorcev QC_L, QC_M, QC_H in jih takoj analizirali, nato pa pustili stati v avtomatskem vzorčevalniku pri temperaturi 5 °C in jih ponovno analizirali po 24 urah.

Dolgoročna stabilnost VPA v posušeni krvni madeži

Dolgoročno stabilnost smo preverjali tako, da smo pripravili posušene krvne madeže kontrolnih vzorcev (QC_L, QC_M, QC_H). Krvne madeže smo nato shranili pri treh različnih pogojih: -20 °C, sobni temperaturi in 45 °C. Vsebnost VPA smo preverili v roku štirih tednov (teden 0, teden 1, teden 2, teden 3). Vsak teden smo pripravili tri paralelke vsakega kontrolnega vzorca iz vsakega pogoja. Vzorce smo pripravili in analizirali po postopku podanem pod točko 4.4.

4.6 VPLIV HEMATOKRITA

Pri določanju porazdelitve valprojske kisline med plazmo in krvnimi celicami smo svežo kri najprej 10 minut centrifugirali pri sobni temperaturi in pri 2400 obratih na minuto. S tem smo dosegli, da so se krvne celice ločile od plazme. Nato smo pripravili kri z različnimi vrednostmi hematokrita (0,3; 0,4; 0,6). Pripravo krvi z različnimi vrednostmi hematokrita prikazuje preglednica XX.

Preglednica XX: Priprava krvi z različnimi vrednostmi hematokrita

Ht	V _{krvnih celic} [μL]	V _{plazme} [μL]	V _{polne krvi} [μL]
0,3	576	1344	1920
0,4	768	1152	1920
0,6	1152	768	1920

Predhodno smo pripravili osnovne raztopine treh koncentracij (QC_L , QC_M , QC_H), s katerimi smo nato obogatili kri. 380 μ l polne krvi smo dodali 20 μ L osnovnih raztopin. Dobljene vzorce obogatene krvi smo nato nežno premešali in inkubirali 30 min pri 37 °C. Po inkubaciji smo iz vsakega vzorca na kartice za DBS nakapljali 7 krvnih kapljic z volumnom 10 μ L. Preostanek obogatene krvi smo 10 min centrifugirali pri sobni temperaturi in 2400 obratih na minuto ter nato ločeno zamrznili dele plazme in krvi na -80 °C.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VZORCA

5.1.1 Izbira kartice

Testirali smo štiri različne kartice za nanašanje krvi, in sicer Whatman 903TM, FTA DMPK-A, FTA DMPK-B in FTA DMPK-C. Vse so narejene iz celuloznega matriksa (filter papirja) s specifično velikostjo por in debelino papirčka. DMPK-A in DMPK-B kartici sta premazani s snovmi, ki ob stiku lizirajo celice in denaturirajo proteine, medtem ko Whatman 903TM in DMPK-C nista obdelani s snovmi in se razlikujeta glede na kakovost. Whatman 903TM kartica je manj nadzorovana v smislu specifikacij kakovosti (41).

Kot kriterij pri izboru kartice so služile površine VPA, 4-en VPA in internega standarda, slednje so podane v preglednici XXI. Kartici FTA DMPK-A in FTA DMPK-B smo takoj izločili, saj so bile površine vrhov analitov precej nižje. Sklepamo, da je prišlo do vezave analitov na kartico in je bila posledično ekstrakcija nižja. Kromatogrami se, razen po površini vrhov analitov, med seboj niso znatno razlikovali. Primerjali smo še razmerja odzivov analitov in IS in se na koncu odločili za kartico Whatman 903TM.

Preglednica XXI: Površine analitov na posameznih karticah za DBS

Kartica	A _{VPA}	A _{4-en VPA}	A _{IS} *
Whatman 903 TM	248	32,6	1245
FTA DMPK-A	194	4,30	1147
FTA DMPK-B	34,0	3,60	461
FTA DMPK-C	265	22,8	1331

*IS=oktanojska kislina

5.1.2 Vpliv časa nanosa krvnih madežev

Pri pripravi velikega števila vzorcev lahko nanos madežev traja tudi več ur. Želeli smo preveriti, ali je analit v krvi stabilen tekom nanosa krvi. Naredili smo umeritveno krivuljo

iz posušenih krvnih madežev, ki smo jih nanegli takoj, in iz krvnih madežev, ki smo jih nanegli 1 h po pripravi obogatene krvi.

Površine vrhov določenih analitov pri takojšnjem nanosu madežev in pri nanosu po 1h shranjevanja so primerljive, ravno tako točnost rezultatov. Tudi na kromatogramih ni bilo opaziti nobenih zaznavnih razlik v obliki vrhov. S tem smo preverili, kakšen vpliv ima čas nanosa krvnih madežev po pripravi obogatene krvi, in ugotovili, da je analit stabilen vsaj 1 h po dodatku v kri.

5.1.3 Vpliv temperature sušenja krvnih madežev

V primeru nestabilnosti analita tekom sušenja, bi slednjega lahko stabilizirali tako, da bi ga sušili pri višjih temperaturah, kar bi posledično pomenilo krajši čas sušenja. V preglednici XXII so prikazane površine vrhov analitov, glede na temperaturo sušenja krvnih madežev. Površine se le malo razlikujejo, zato smo se odločili, da krvnih madežev ne bomo sušili pri temperaturi 70 °C. S tem bi metodo samo otežili ter jo naredili manj primerno za TDM, saj bi pacienti morali imeti posebne sušilnike, v katerih bi pri odvzemu krvi in nanosu sušili kartice.

Preglednica XXII: Vpliv temperature sušenja krvnih madežev

Analit	c [µg/mL]	A	
		T _{sušenja} : RT	T _{sušenja} : 70 °C
VPA	5,00	71,8	74,9
	100	1582	1529
4-en VPA	5,00	7,50	6,70
	100	296	283

5.1.4 Volumen ekstrakcijskega topila

Pri ekstrakciji analita iz krvnih madežev smo želeli zmanjšati volumen vodne faze, zato smo opazovali, kaj se dogaja s površinami vrhov analitov, če zmanjšamo volumen HCl.

V preglednici XXIII je prikazano, kako se spreminja površina vrhov analitov, glede na volumen topila, ki smo ga uporabili pri ekstrakciji. Kromatogrami se, razen po površini vrhov, niso razlikovali.

Preglednica XXIII: Vpliv volumna ekstrakcijskega topila

V_{HCl} [μ L]	VPA		4-en VPA		A_{IS}^*
	A_{VPA}	A_{VPA}/A_{IS}	$A_{4-en VPA}$	$A_{4-en VPA}/A_{IS}$	
10	2687,4	10,7	615,6	2,4	251,7
20	3126,9	6,2	689,6	1,4	507,2
30	3180,8	4,3	679,8	0,9	736,4
50	2972,2	2,4	696,1	0,6	1222,6
70	3137,1	1,8	709,4	0,4	1770,0

*IS = oktanojska kislina

Pri izbiri optimalnega volumna ekstrakcijskega topila smo najprej kot kriterij upoštevali absolutne kromatografske odzive analitov in se odločili za zadnja dva pogoja. Nato smo izračunali razmerja A_A/A_{IS} in ugotovili, da dobimo najboljše odzive, če uporabimo 50 μ L ekstrakcijskega topila, kar smo tudi uporabili kot optimalen volumen.

5.1.5 Izbor internega standarda

Pri izboru internega standarda nam je bil pomemben t_R , saj smo želeli, da je metoda hitra in uporabna v rutinskih spremljanjih koncentracij VPA. Želeli smo, da bi interni standard imel t_R med t_R VPA in 4-en VPA. Vendar med analiziranimi spojinami žal nismo našli primerne. Analizirali smo tudi slepi vzorec in ugotovili, da se pod vsemi spojinami pojavljajo nečistoče. Najmanjša nečistoča glede na površino analiziranega IS je bila pod klofibrično kislino, vendar pa je imela klofibrična kislina najdaljši t_R izmed preiskovanih spojin. Na koncu smo izbrali oktanojsko kislino in se odločili, da bomo z optimizacijo kromatografije poskušali zmanjšati oziroma odstraniti nečistoče v slepem vzorcu.

5.1.6 Optimizacija derivatizacije

Uspešnost derivatizacije smo preverjali s sedmimi različnimi kombinacijami derivatizacijskih reagentov. Za najbolj optimalno se je izkazala kombinacija, ki so jo uporabljali tudi v izhodiščni metodi. Pri povečevanju koncentracije kumarina smo videli, da se povečajo tudi koelucije v slepem vzorcu, če pa koncentracijo zmanjšamo, se zmanjša tudi odziv pri višjih koncentracijah, medtem ko pri nižji koncentraciji ostane enak. Videli smo, da je nižja koncentracija EDC-ja premajhna, da bi v celoti prišlo do derivatizacije pri

višjih koncentracijah VPA, če pa koncentracijo EDC povečujemo nad določeno mejo, se površine vrhov ne povečujejo. Koncentracija HOBt v preizkušanih območjih ni imela vpliva na površino vrhov.

Odločili smo se, da uporabimo derivatizacijske reagente v takih koncentracijah, kot so navedene v izhodiščni metodi.

5.1.7 Izbor topila za rekonstitucijo suhega ostanka

Preizkušali smo acetonitril z različnimi deleži vodne faze. V preglednici XXIV so podana razmerja površin analitov in površin koelucij, ki smo jih detektirali pri odgovarjajočem t_R v slepem vzorcu. Za optimalno topilo se je izkazal 60% AcN. Pri uporabi tega topila so bila razmerja površin vrhov analitov in koelucij najbolj ugodna.

Preglednica XXIV: Vpliv koncentriranosti AcN na kromatografske odzive analitov

AcN:H ₂ O (v/v)	$A_{VPA} / A_{slep\ vzorec}$	$A_{4-en\ VPA} / A_{slep\ vzorec}$	$A_{IS} / A_{slep\ vzorec}$
40:60	4,13	32,0	86,6
50:50	4,25	30,4	151
60:40	4,43	34,0	170
70:30	5,70	40,0	99,0

5.2 OPTIMIZACIJA KROMATOGRAFSKE ANALIZNE METODE

5.2.1 Mobilna faza

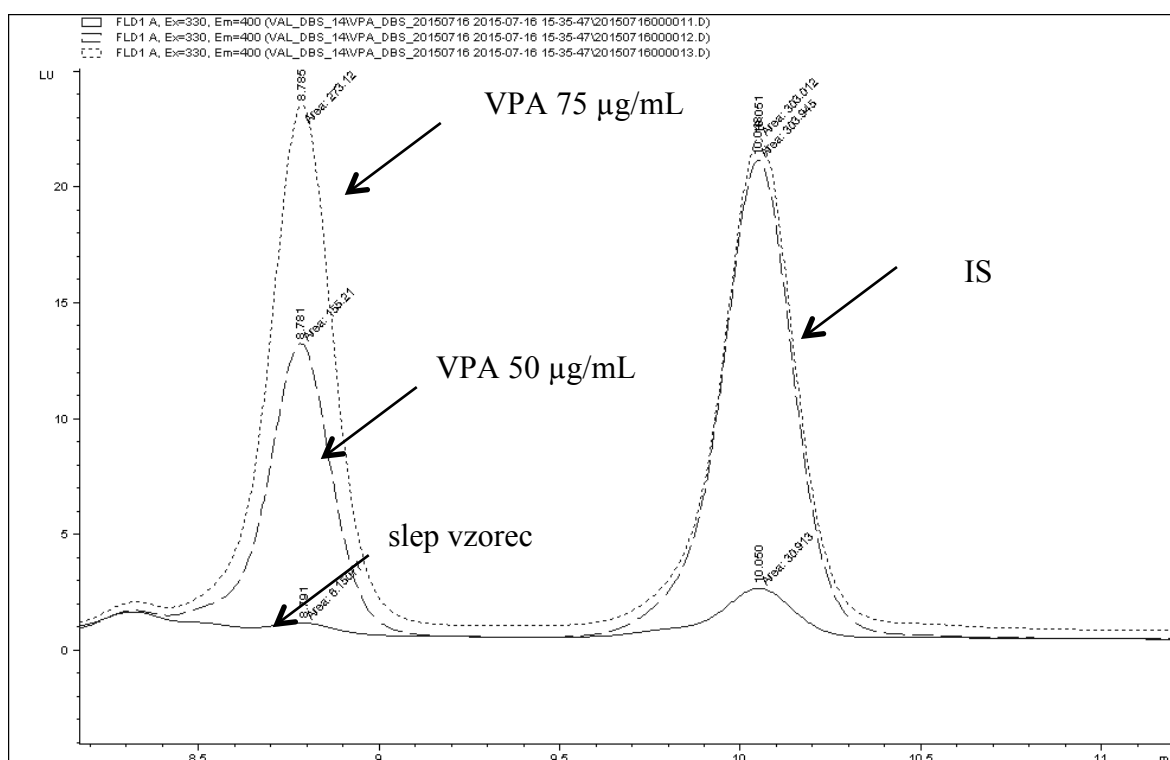
Izbira mobilne faze z optimalnim pH

Testirali smo 8 različnih mobilnih faz. Vse meritve smo izvedli na koloni Phenyl-hexyl, pri temperaturi 50 °C in 44% deležu AcN (MF_B) v mobilni fazi. Na koloni Phenyl hexyl, ki smo jo uporabljali tekom razvoja, so bili vrhovi lepše ločeni pri uporabi amonijevega acetata (nečistoče na retencijskih časih analitov so se manjšale s povečevanjem pH). Na koncu smo izbrali kolono C18, ker je bila za določevanje same VPA bolj primerna. Zato smo kot MF_A izbrali 1,5% očetno kislino.

Izbira optimalne sestave MF

Pod točko 5.2.2 je opisano, zakaj smo izbrali kolono C18. Ker smo pri pregledu rezultatov opazili, da se je z večanjem deleža acetonitrila v mobilni fazi manjšal delež nečistoč pod VPA ter IS, smo pri temperaturi 50 °C preverili, kakšne kromatograme dobimo, če poizkusimo še z višjim deležem acetonitrila. Poskusili smo z 48%, 50%, 52%, 54%, 56% in 58%.

Z večanjem deleža AcN v mobilni fazi so se krajšali t_R , kar je ugodno z vidika uporabe metode za rutinsko spremljanje koncentracij, ki zahteva čim krajši t_R , ampak so se vrhovi med seboj najlepše ločili pri 50% AcN. Tudi delež koelucij v slepem vzorcu v primerjavi z odzivom analita je bil pri tem odstotku najmanjši (slika 8).



Slika 8: Kromatogram pri sestavi mobilne faze 50:50 (AcN:H₂O)

5.2.2 Stacionarna faza

Vrsta kolone

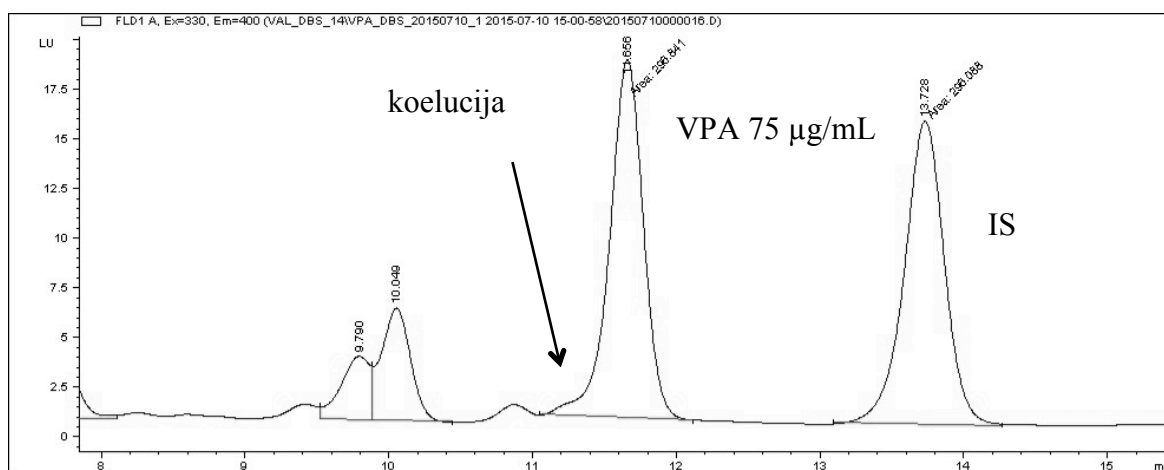
Pri izbiri vrste kolone smo bili predvsem pozorni na obliko vrhov testiranih analitov in velikost površine vrhov koelucij, ki se pojavljajo v slepem vzorcu. Izračunali smo razmerje med površinami vrhov VPA in IS ter odzivom, ki se pri istem t_R kaže v slepem vzorcu.

Razmerja so podana v preglednici XXV. Ker želimo, da bi bila metoda uporabna za rutinsko vzorčenje, je pomemben tudi t_R . Želimo, da bi bil le-ta čim manjši. Zato smo pri izbiri kolone spremljali tudi t_R , ki se razlikuje med kolonami.

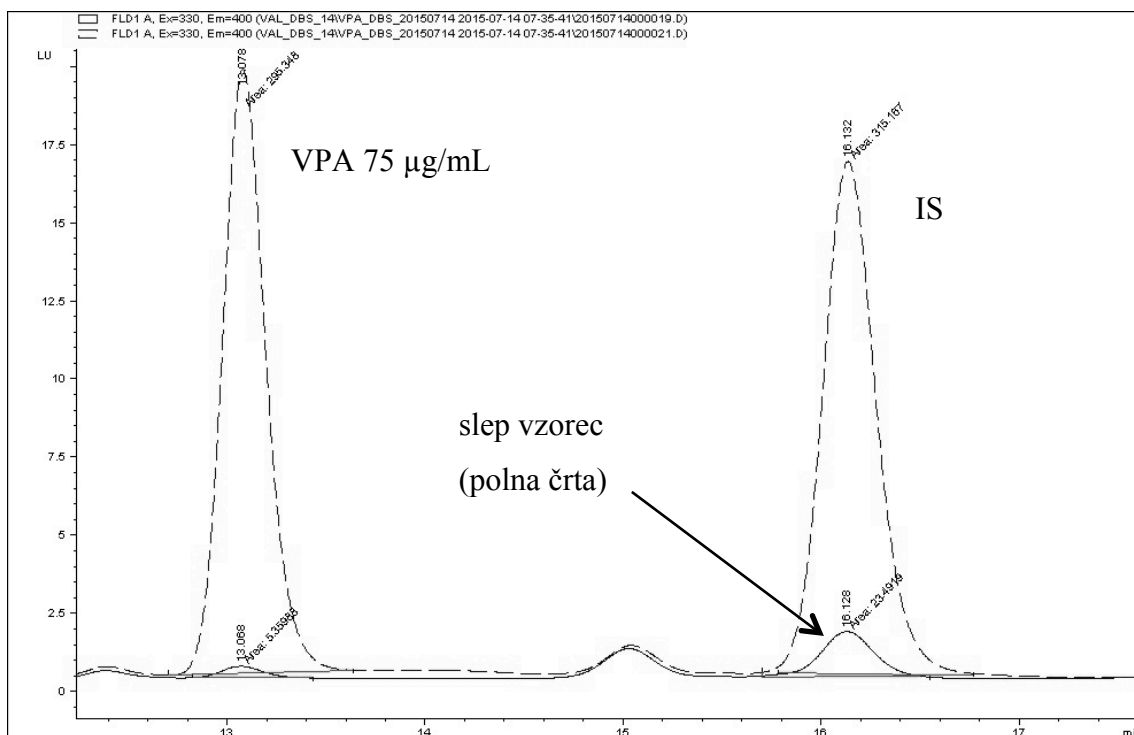
Preglednica XXV: Odstotek nečistoče v slepem vzorcu glede na VPA in IS

Delež AcN	Analit	Vrsta kolone					
		Phenyl-hexyl		C8		C18	
		t_R	[%]	t_R	[%]	t_R	[%]
42%	VPA 75 μ g/mL	20,4	2,86	17,3	0,965	22,0	0,965
	IS	26,3	6,18	20,5	9,29	28,7	9,29
46%	VPA 75 μ g/mL	12,7	2,50	9,94	8,32	15,4	8,32
	IS	15,9	5,76	11,9	8,43	19,3	8,43
48%	VPA 75 μ g/mL	11,7	0,505	8,86	1,87	13,1	1,87
	IS	13,8	8,21	10,4	10,0	16,1	10,0

Pri pregledu rezultatov smo kljub ugodnim t_R najprej izločili kolono C8, saj smo imeli pod testiranimi analiti največji delež nečistoč. Nato smo primerjali še kolono Phenyl-hexyl in kolono C18 in pri pregledu kromatogramov ugotovili, da pri C18 dobimo lepše kromatograme (slika 9 in slika 10).



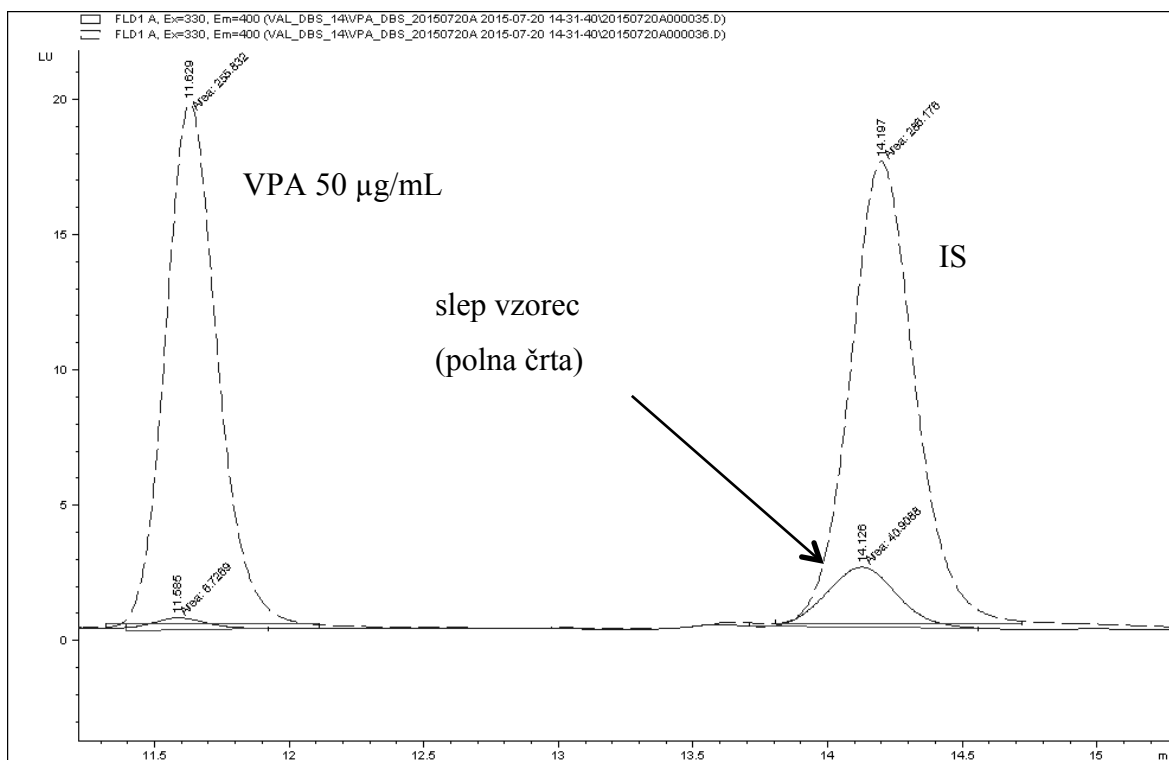
Slika 9: Kromatogram vzorca s koncentracijo VPA 75 μ g/mL – kolona phenyl-hexyl



Slika 10: Slep vzorec in vzorec VPA s koncentracijo 75 µg/mL – kolona C18

Temperatura kolone

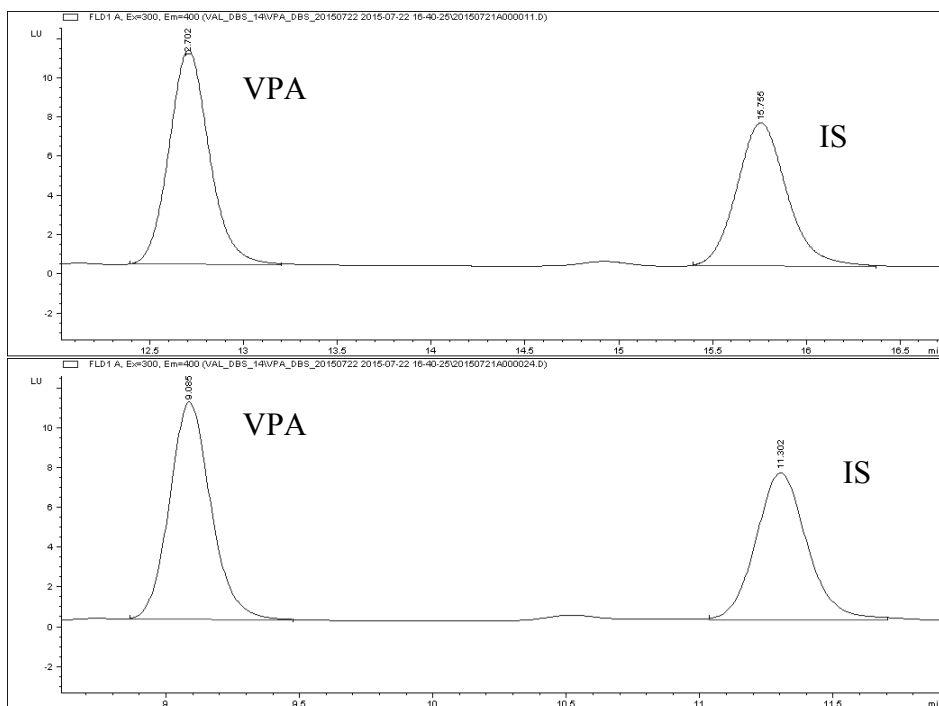
Najprej smo testirali kolono pri različnih sestavah MF pri temperaturah 45 °C, 50 °C in 55 °C. Glede na velikost koelucij smo ugotovili, da je najbolj ugodna sestava mobilne faze pri 50% AcN. Nato smo pri tej sestavi MF testirali še tri različne temperature kolone (20 °C, 30 °C in 35 °C). Za najbolj optimalno se je izkazala temperatura 30 °C (slika 11).



Slika 11: Kromatogram slepega vzorca in vzorca s koncentracijo 50 µg/mL VPA, $T_{kolone} = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$

5.2.3 Sprememba pretoka

S povečanjem pretoka smo sicer skorajda razpolovili površine vrhov analitov, ampak smo znatno skrajšali t_R . Ker so površine še vedno dovolj velike za detekcijo vseh koncentracij v izbranem območju, smo se odločili za pretok 1 mL/min, ker je za rutinsko spremljanje koncentracij v krvi zaželen čim krajši t_R (slika 12).



Slika 12: Sprememba pretoka: pretok 0,7 mL/min (zgoraj), pretok 1 mL/min (spodaj)

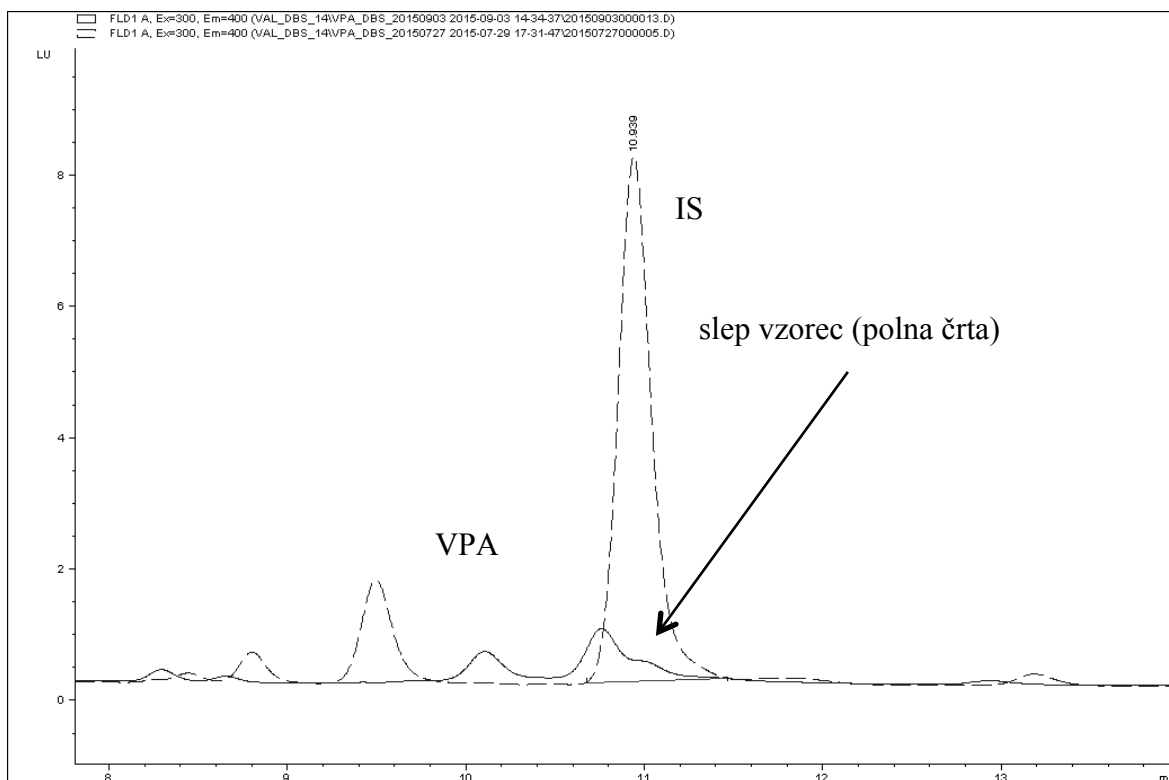
5.2.4 Sprememba valovne dolžine

Pri pregledu vseh pogojev in površin vrhov analitov smo ugotovili, da dobimo maksimalne kromatografske odzive analitov pri ekscitacijski valovni dolžini 300 nm in emisijski valovni dolžini 400 nm.

5.3 VALIDACIJA

5.3.1 Selektivnost

Pri preverjanju selektivnosti metode smo ugotavljali, ali se v slepem vzorcu pri retencijskih časih VPA in IS pojavljajo koelucije. Tako pri retencijskem času VPA kot pri retencijskem času IS so v slepem vzorcu koelucije, ampak so vse pod mejo določljivosti ter se pojavljajo pri vseh šestih preiskovancih. Sklepamo, da nastanejo ob derivatizaciji in so konstantne, zato trdimo, da je metoda vseeno selektivna (slika 13).

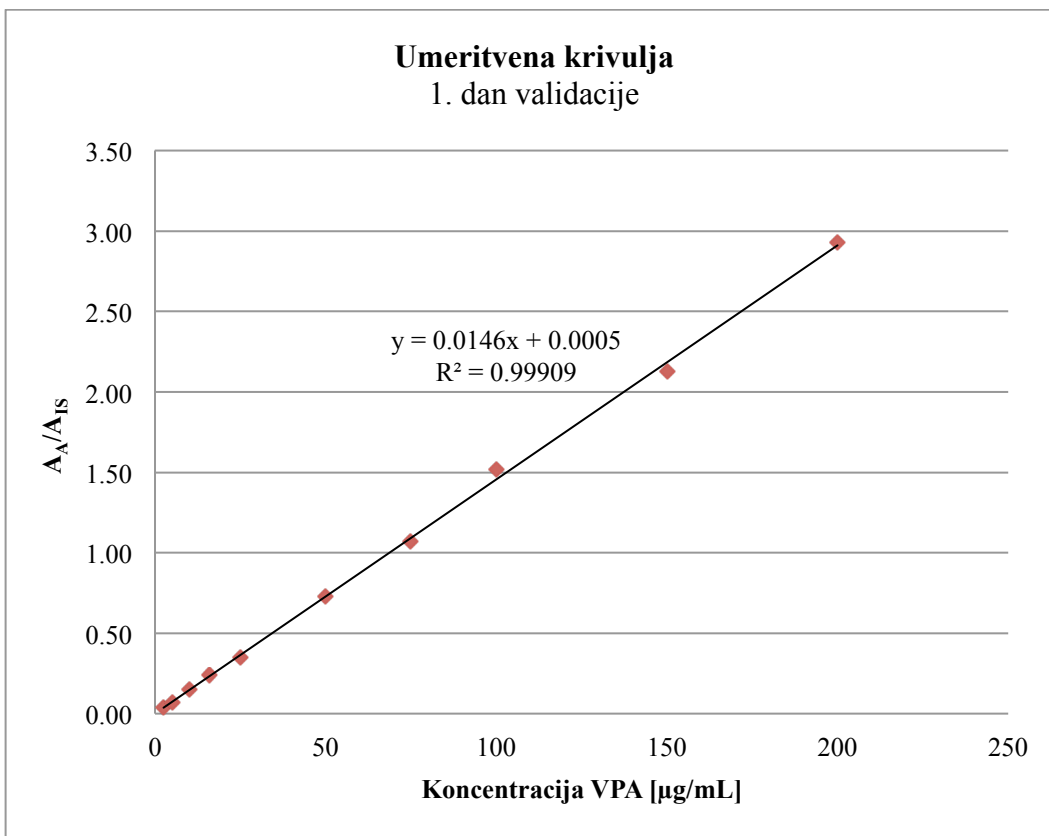


Slika 13: Kromatogram slepega vzorca in vzorca s koncentracijo VPA 2,5 µg/mL

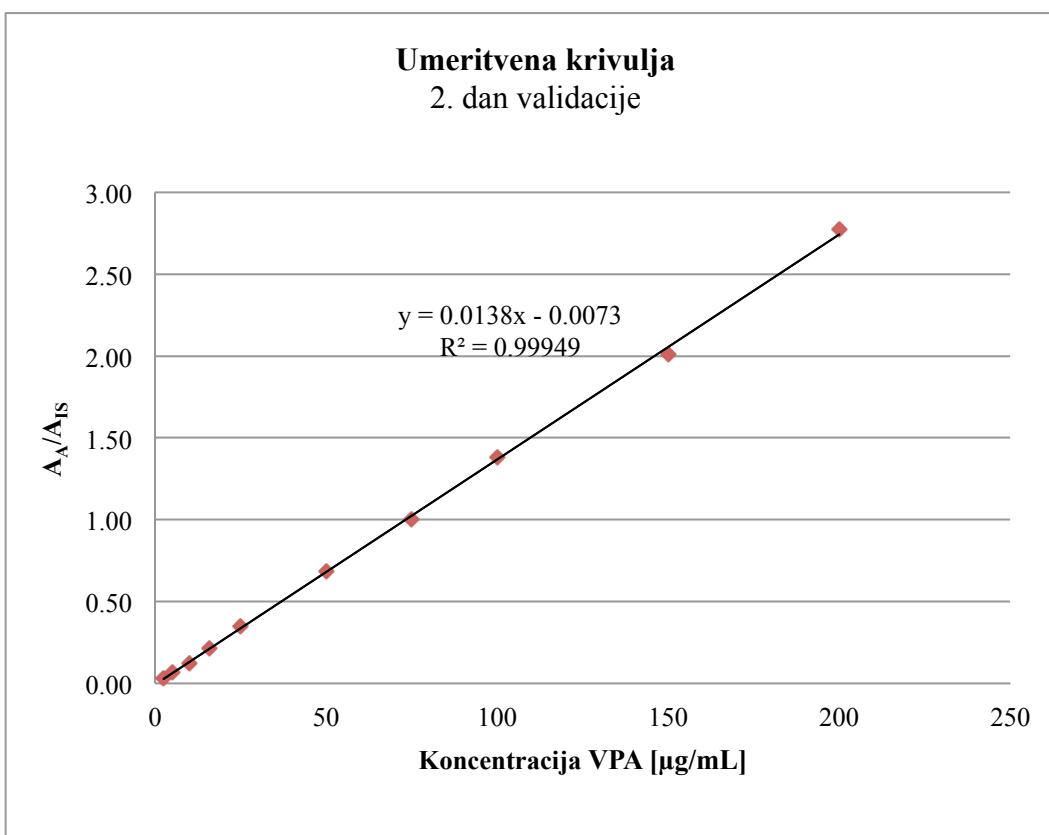
5.3.2 Spodnja meja določljivosti, umeritvene krivulje in območje linearnosti

Dokazali smo, da je LLOQ metode 2,5 µg/mL, saj je višina analita vsaj petkrat večja od odziva slepega vzorca in njena vrednost ne odstopa več kot 20 % od točne vrednosti (slika 13).

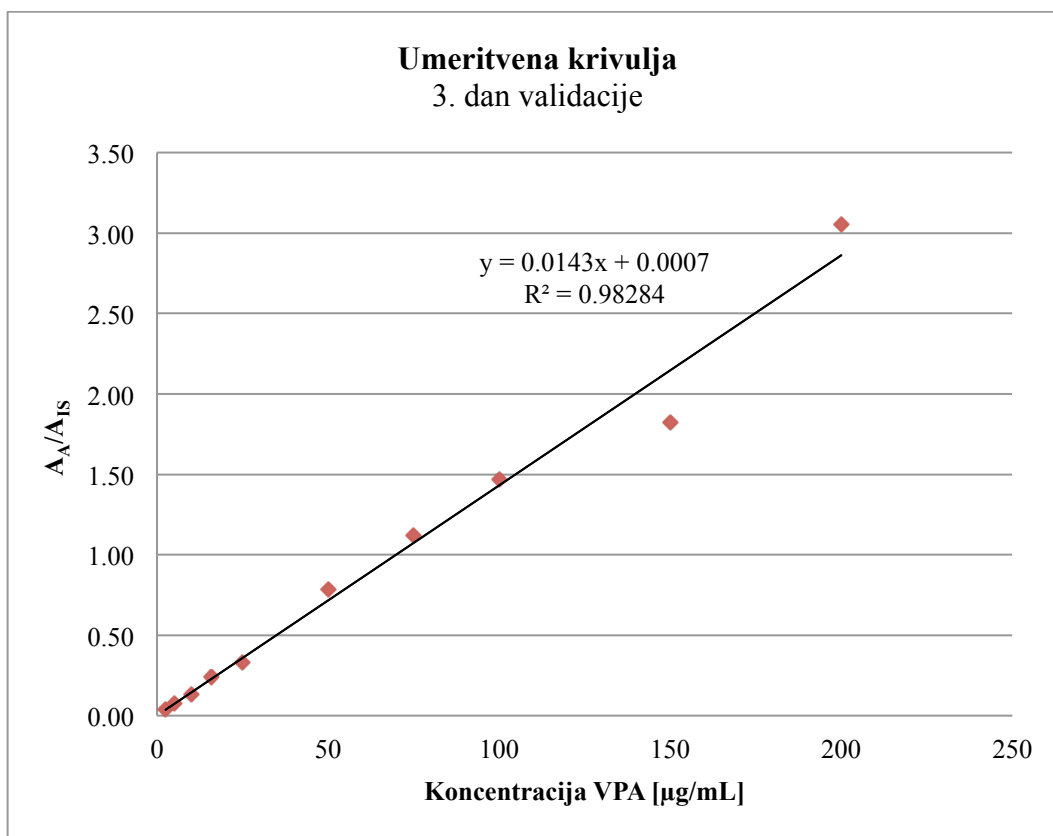
Za vsak dan validacije smo narisali umeritveno krivuljo in z nje razbrali determinacijski koeficient (R^2). Umeritvene krivulje so prikazane na slikah 14-16.



Slika 14: Umeritvena krivulja 1. dneva validacije



Slika 15: Umeritvena krivulja 2. dneva validacije



Slika 16: Umeritvena krivulja 3. dneva validacije

Vse tri dni validacije dobimo linearne premice. Malo slabšo linearnost dobimo zadnji dan in kot je razvidno z grafa odstopa odziv pri koncentraciji VPA 150 µg/mL. Vseeno so vsi odzivi znotraj dovoljenega območja točnosti ($\pm 15\%$) in tudi, če pri zadnjem dnevu ne upoštevamo vzorca s koncentracijo 150 µg/mL, imamo še vedno 90% standardov, ki ustrezajo. S tem smo potrdili, da je metoda linearna v območju od 2,5 µg/mL do 250 µg/mL.

5.3.3 Točnost

Preglednica XXVI prikazuje izračunano točnost rezultatov.

Preglednica XXVI: Točnost metode za vsak dan validacije

	Izračunana koncentracija VPA [µg/ml]								
	QC _L [7 µg/m]			QC _M [60 µg/ml]			QC _H [175 µg/ml]		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
1.	7,43	6,28	7,63	53,9	61,1	55,8	171	173	177
2.	7,15	6,37	7,16	54,4	64,6	60,6	170	177	188

3.	7,59	6,08	6,39	53,3	52,8	61,0	180	166	175
4.	7,04	6,21	6,90	54,2	54,0	60,5	176	182	180
5.	7,16	6,62	7,88	53,1	58,8	65,0	182	175	179
6.	6,74	6,46	7,88	61,7	63,6	64,1	178	184	/
c [$\mu\text{g/mL}$]	7,19	6,34	7,31	55,1	59,1	61,2	176	176	180
točnost [%]	103	90,6	104	91,8	98,6	102	101	101	103

Pri zadnjem dnevu validacije je pri eni paralelki prišlo do napake v derivatizaciji, zato odziv na kromatogramu ni bil viden in smo paralelko izpustili, vendar pa točnost metode vseeno ustreza, saj je po kriterijih FDA potrebnih 5 paralelk. Kot je razvidno iz preglednice XXVI, so vsi rezultati točnosti znotraj meja $\pm 15\%$, kar dokazuje, da je metoda točna.

5.3.4 Ponovljivost

Preglednici XXII in XXIII prikazujeta, da je validirana metoda ponovljiva tako znotraj dneva, kot med posameznimi dnevi (vse RSD vrednosti so manjše od 15%).

Preglednica XXVII: Dnevna ponovljivost

QC	c [$\mu\text{g/mL}$]	1. dan validacije			2. dan validacije			3. dan validacije		
		c _{izračunana} [$\mu\text{g/mL}$]	SD	RSD %	c _{izračunana} [$\mu\text{g/mL}$]	SD	RSD %	c _{izračunana} [$\mu\text{g/mL}$]	SD	RSD %
QC _L	7,00	7,18	0,298	4,15	6,34	0,190	3,00	7,31	0,589	8,18
QC _M	60,0	55,1	3,27	5,94	59,1	4,90	8,28	61,2	3,25	5,31
QC _H	175	176	5,02	2,85	176	6,48	3,68	180	4,94	2,75

Preglednica XXVIII: Meddnevna ponovljivost

QC	c [$\mu\text{g/mL}$]	c _{izračunana} [$\mu\text{g/mL}$]	SD	RSD [%]
QC _L	7,00	6,94	0,527	7,60
QC _M	60,0	58,5	3,10	5,30
QC _H	175	177	2,12	1,20

5.3.5 Delež ekstrakcije valprojske kisline iz kartice

Preglednica XXIX prikazuje izkoristek ekstrakcije valprojske kisline, ki znaša med 74,0% in 98,7%.

Preglednica XXIX: Izkoristek ekstrakcije

QC	A_A / A_{IS} (DBS)	$\overline{A_A / A_{IS}}$ (H ₂ O)	Izkoristek [%]	RSD [%]
QC _L	0,0966	0,105	91,9	4,07
	0,0968		92,2	
	0,104		98,7	
QC _M	0,762	0,910	83,7	3,61
	0,748		82,2	
	0,802		88,1	
QC _H	1,93	2,61	74,0	5,10
	2,13		81,6	
	1,98		76,0	

Pri pregledu rezultatov smo opazili, da izkoristek z večanjem koncentracij pada, medtem ko je med paralelkami dobro ponovljiv ($RSD \leq 5,10\%$). Rezultati so nas opozorili na pomanjkljivo izveden poskus, saj postopka priprave DBS in vodnih vzorcev nista direktno primerljiva in posledično tudi ne dobljeni kromatografski odzivi. Sklepamo, da se del analita veže na kartico. Ker smo vseeno dobili premico, se stopnja vezave na kartico najverjetneje z večanjem koncentracij konstantno povečuje.

Poskus bi pravilno izvedli tako, da bi v epico z vodnim vzorcem dodali prazno DBS liso. Ker pa smernice ne zahtevajo visokega izkoristka, temveč da je ponovljiv, upamo vseeno trditi, da z ekstrakcijo dosežemo zadovoljiv izkoristek.

5.3.6 Stabilnost

Post preparativna stabilnost

Preverili smo post preparativno stabilnost, in sicer smo vzorce testirali po 24 h v avtomatskem vzorčevalniku na 5 °C. Kot je razvidno iz preglednice XXX, točnost ustreza

kriterijem podanih v smernicah (maksimalno odstopanje za 15%), torej so vzorci stabilni 24 h.

Preglednica XXX: Post preparativna stabilnost kontrolnih vzorcev po 24h

QC	c [$\mu\text{g/mL}$]	$\left(\frac{\text{VPA}}{\text{IS}}\right)_{t=0} \pm \text{SD}$	$\left(\frac{\text{VPA}}{\text{IS}}\right)_{t=24\text{h}} \pm \text{SD}$	točnost [%]
QC _L	7,00	0,0990 \pm 0,000403	0,101 \pm 0,000178	102
QC _M	60,0	0,771 \pm 0,0278	0,763 \pm 0,0345	99,1
QC _H	175	2,01 \pm 0,103	1,97 \pm 0,0868	97,7

Dolgoročna stabilnost

Preglednica XXXI prikazuje rezultate dolgoročne stabilnosti analita na kartici za DBS do vključno 3. tedna, iz katerih je razvidno, da je VPA na kartici stabilna le 1 teden. Tako med paralelkami posameznih koncentracij kot med vzorci, ki smo jih hranili na različnih temperaturah, ni posebnih razlik v stabilnosti.

Preglednica XXXI: Dolgoročna stabilnost analita na kartici za DBS

T	QC	c [$\mu\text{g/mL}$]	1. teden		2. teden		3. teden	
			točnost [%]	RSD [%]	točnost [%]	RSD [%]	točnost [%]	RSD [%]
- 20°C	QC _L	7,00	88,9	3,43	115	0,839	97,4	4,46
	QC _M	60,0	104	5,95	129	3,59	116	2,96
	QC _H	175	108	4,27	133	7,54	133	2,30
RT	QC _L	7,00	89,1	9,32	108	6,02	106	24,2
	QC _M	60,0	96,3	14,7	125	4,26	123	1,49
	QC _H	175	109	5,20	135	2,31	128	9,22
45°C	QC _L	7,00	86,3	1,86	104	3,96	97,9	9,14
	QC _M	60,0	94,9	1,39	127	1,33	112	0,43
	QC _H	175	108	4,62	138	4,06	132	2,36

Po podatkih o stabilnosti krvnih madežev iz objavljene literature (42, 43) so posušeni krvni madeži stabilni vsaj 3 tedne pri vseh treh pogojih. Tudi sami smo med razvojem metode včasih uporabljali krvne madeže, stare dva tedna ali več in nismo ugotovili, da bi bili

madeži nestabilni. Sklepamo, da so rezultati neustrezne stabilnosti posledica neustrezno postavljene metode določevanja stabilnosti ne pa nestabilnosti analita, saj so kromatografski odzivi analitov od tedna do tedna precej nihali. Boljše bi bilo, da bi vsak dan pripravili tudi vzorce za umeritveno krivuljo in iz njih izračunali koncentracije in nato s pomočjo koncentracij ugotavljali stabilnost analitov. Zaradi zgoraj naštetih razlogov in rezultatov stabilnosti iz do sedaj objavljene literature sklepamo, da so rezultati neustrezne stabilnosti posledica neustrezno postavljene metode določevanja stabilnosti ne pa nestabilnosti analita.

5.4.VPLIV HEMATOKRITA

Normalna vrednost hematokrita se lahko v času različnih boleznih zviša ali zniža. Preverili smo ali delež hematokrita v krvi vpliva na kromatografski odziv valprojske kisline v vzorcih DBS. Odzive valprojske kisline smo preverili pri deležih hematokrita 0,3 0,4 in 0,6. Ker se normalna vrednost hematokrita giblje okrog 0,4, smo podatke pri 0,4 podali kot 100%. Ujemanje razmerja smo izračunali po enačbi 4.

$$ujemanje [\%] = \frac{\overline{A_{VPA}/A_{IS}}}{A_{VPA\ 0,4}/A_{IS\ 0,4}} \cdot 100$$

Enačba 4

Preglednica XXXII: Vpliv hematokrita

Ht	QC	A _{VPA}	A _{IS}	A _{VPA} /A _{IS}	$\overline{A_{VPA}/A_{IS}}$	SD	RSD	ujemanje
0,30	QC _L	10,9	106	0,102	0,103	0,00667	6,47	108
		11,2	102	0,110				
		9,50	98,1	0,0968				
	QC _M	78,3	105	0,744	0,751	0,00628	0,836	90,5
		69,2	92,1	0,751				
		66,6	88,0	0,757				
	QC _H	246	113	2,18	1,96	0,192	9,83	88,7
		203	110	1,85				
		203	110	1,85				
0,40	QC _L	9,20	97,4	0,0945	0,0956	0,000980	1,03	100
		9,80	102	0,0962				

		9,70	101	0,0961				
	QC _M	86,0	103	0,833	0,829	0,0111	1,34	100
		87,8	105	0,839				
		82,6	101	0,817				
	QC _H	204	103	1,98	2,21	0,204	9,25	100
		247	104	2,37				
		201	88,7	2,27				
0,60	QC _L	10,2	97,3	0,105	0,104	0,000810	0,778	109
		11,2	108	0,104				
		10,6	103	0,103				
	QC _M	91,0	111	0,824	0,833	0,0473	5,67	100
		87,2	98,6	0,884				
		83,8	106	0,791				
	QC _H	232	104	2,22	2,15	0,0753	3,50	97,6
		232	107	2,16				
		235	113	2,07				

Kot je razvidno iz preglednice XXXII, je odziv valprojske kisline neodvisen od vrednosti hematokrita ($0,3 \leq Ht \leq 0,6$) v krvi. Vse izračunane vrednosti so znotraj meja dopustnosti ($\pm 15\%$).

5.5 PREDLOGI IZBOLJŠAV

Med samim raziskovalnim delom kot tudi pri interpretaciji rezultatov smo opazili določene pomanjkljivosti, za katere predlagamo sledeče izboljšave:

- pri določanju izkoristka ekstrakcije bi bilo potrebno k vodnim vzorcem dodati tudi prazni krvni madež, tako bi se izognili vplivu vezave analitov na kartico za DBS;
- pri določevanju dolgoročne stabilnosti bi bilo smiselno, da bi vsak dan analize poleg kontrolnih vzorcev pripravili še umeritveno krivuljo, iz nje bi izračunali koncentracije in nato s pomočjo koncentracij ugotavljali stabilnost analitov, saj se odzivi analitov lahko od dneva do dneva signifikantno razlikujejo;
- v sklopu validacije bi bilo smiselno testirati še homogenost lise in vpliv volumna kapljice krvi;
- za boljšo uporabnost metode bi bila potrebna aplikacija metode na realne vzorce.

6 SKLEP

V magistrski nalogi smo uspešno razvili metodo za določanje valprojske kisline v krvi, pri čemer nismo v celoti potrdili hipoteze, saj nam metode ni uspelo razviti za določanje metabolita valprojske kisline 4-en VPA.

Kromatografsko metodo smo razvili na koloni Luna 3 μm , C18 (2), ki smo jo segreli na 30 °C. Mobilna faza je bila sestavljena iz AcN in 1,5% vodne raztopine očetne kisline v razmerju 50:50 (v/v). Analit smo detektirali s FLD pri ekscitacijski valovni dolžini 330 nm in emisijski valovni dolžini 400 nm.

Največjo oviro pri razvijanju metode so predstavljale koelucije na retencijskih časih analitov. Ker so se z višanjem koncentracije kumarina povečevale, sklepamo, da so posledica derivatizacije s kumarinom. Ob nadaljnji optimizaciji metode bi bilo smiselno razmisliti o pripravi čistejšega derivatizacijskega reagenta.

Metodo smo uspešno validirali po smernicah FDA za bioanalizne metode. Preverjali smo selektivnost, točnost, ponovljivost, mejo kvantifikacije, linearnost, izkoristek ekstrakcije in stabilnost. Metoda je selektivna in linearna v koncentracijskem območju VPA od 2,5 $\mu\text{g/mL}$ do 250 $\mu\text{g/mL}$, kjer koncentracija 2,5 $\mu\text{g/mL}$ predstavlja LLOQ. Točnost metode se giblje med 90,6-103%, dnevna ponovljivost znaša 2,75-8,28% in meddnevna ponovljivost 1,2-7,5%, torej ustrezajo kriterijem. Izkoristek ekstrakcije je ponovljiv in znaša minimalno 74%. Validacija metode je bila ustrezna. Vsekakor pa moramo upoštevati dejstvo, da smo metodo prvotno razvijali za določanje valprojske kisline in njenega metabolita, pri čemer smo testirali izbrane pogoje, ki so bili najbolj optimalni za oba analita. Po odločitvi, da nadaljujemo razvoj metode samo za valprojsko kislino, bi bilo smiselno ponovno testirati posamezne parametre in izbrati najbolj optimalne pogoje za valprojsko kislino. Tako bi lahko izbrali interni standard s krajšim retencijskim časom in s tem občutno skrajšali čas analize, s tem pa bi postala tudi bolj primerna za rutinsko analizo vzorcev.

Pri preverjanju stabilnosti vzorcev smo ugotovili, da so pripravljene vzorci v avtomatskem vzorčevalniku, ki je ohlajen na 5 °C, stabilni vsaj 24 ur, medtem ko je analit po nanosu na kartico za DBS stabilen le 1 teden. Preverili smo tudi vpliv hematokrita na odzive analita in ugotovili, da hematokrit ne igra posebne vloge.

Zaključimo lahko, da je bila metoda uspešno validirana in predstavlja dobro osnovo za nadaljnji razvoj rutinskega spremljanja koncentracij valprojske kisline v krvi. Za sočasno detekcijo 4-en VPA menimo, da bi bilo metodo smiselno prenesti na masni detektor.

7 LITERATURA

- 1 Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, et al. Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 2010.
- 2 Silva MFB, Aires CCP, Luis PBM, et al. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *Journal of inherited metabolic disease* 2008; 31 (2): 205-216.
- 3 Löscher W. The discovery of valproate. In: Löscher W, ed. *Valproate*: Birkhäuser Basel, 1999:1-3.
- 4 Henry TR. The history of valproate in clinical neuroscience. *Psychopharmacology bulletin* 2002; 37: 5-16.
- 5 Henry TR. The history of valproate in clinical neuroscience. *Psychopharmacol Bull* 2003; 37 Suppl 2: 5-16.
- 6 Baillie TA. Metabolic activation of valproic acid and drug-mediated hepatotoxicity. Role of the terminal olefin, 2-n-propyl-4-pentenoic acid. *Chemical research in toxicology* 1988; 1 (4): 195-199.
- 7 Löscher W. Valproate enhances GABA turnover in the substantia nigra. *Brain research* 1989; 501 (1): 198-203.
- 8 Johannessen CU, Johannessen SI. Valproate: Past, Present, and Future. *CNS Drug Reviews* 2003; 9 (2): 199-216.
- 9 Johannessen CU. Mechanisms of action of valproate: a commentary. *Neurochemistry International* 2000; 37 (2-3): 103-110.
- 10 Ribarič S. *Temelji patološke fiziologije*, 2. izdaja. UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2011: 163-182.
- 11 Sanacora G, Zarate CA, Krystal J, et al. Targeting the Glutamatergic System to Develop Novel, Improved Therapeutics for Mood Disorders. *Nature reviews Drug discovery* 2008; 7 (5): 426-437.
- 12 Rapoport SI, Basselin M, Kim H-W, et al. Bipolar disorder and mechanisms of action of mood stabilizers. *Brain Research Reviews* 2009; 61 (2): 185-209.
- 13 Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO journal* 2001; 20 (24): 6969-6978.

- 14 Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, et al. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and genomics* 2013; 23 (4): 236.
- 15 Haymond J, Ensom MHH. Does valproic acid warrant therapeutic drug monitoring in bipolar affective disorder? *Therapeutic drug monitoring* 2010; 32 (1): 19-29.
- 16 Lu D. Antiepileptic Drugs Metabolism.
[http://www.uic.edu/classes/phar/phar402/Antiepileptic Drug Metabolism7.htm](http://www.uic.edu/classes/phar/phar402/Antiepileptic%20Drug%20Metabolism7.htm).
Dostopano: 14. 11. 2015
- 17 Milosheska D, Grabnar I, Vovk T. Dried blood spots for monitoring and individualization of antiepileptic drug treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 75: 25-39.
- 18 Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, et al. Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2008; 49 (7): 1239-1276.
- 19 Lagace DC, O'Brien WT, Gurvich N, et al. Valproic acid: how it works. Or not. *Clinical Neuroscience Research* 2004; 4 (3): 215-225.
- 20 International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology.
<http://www.iatdmct.org/about-us/about-association/about-definitions-tdm-ct.html>.
Dostopano: 07.11.2015-
- 21 Warner A, Privitera M, Bates D. Standards of laboratory practice: antiepileptic drug monitoring. *National Academy of Clinical Biochemistry. Clinical chemistry* 1998; 44 (5): 1085-1095.
- 22 Glauser TA, Pippenger CE. Controversies in Blood - level Monitoring: Reexamining Its Role in the Treatment of Epilepsy. *Epilepsia* 2000; 41 (s8): S6-S15.
- 23 Kong ST, Lim S-H, Lee WB, et al. Clinical validation and implications of dried blood spot sampling of carbamazepine, valproic acid and phenytoin in patients with epilepsy. 2014.
- 24 Rathmalgoda C, Potter JM, Lueck CJ. Serum sodium valproate testing: is it appropriate? *Medical Journal of Australia* 2007; 187 (10): 582.

- 25 Kalu A. Measuring plasma valproate: A guide to patient management. *Biomedical Scientist* 2010; 54 (4): 253.
- 26 Jannuzzi G, Cian P, Fattore C, et al. A multicenter randomized controlled trial on the clinical impact of therapeutic drug monitoring in patients with newly diagnosed epilepsy. *Epilepsia* 2000; 41 (2): 222-230.
- 27 Fröscher W, Eichelbaum M, Gugler R, et al. A prospective randomised trial on the effect of monitoring plasma anticonvulsant levels in epilepsy. *J Neurol* 1981; 224 (3): 193-201.
- 28 Foroughipour M, Mohammadpour AH, Vahdati MN, et al. Therapeutic drug monitoring of valproic acid in patients with monotherapy at steady state. 2009.
- 29 Timmerman P, White S, Cobb Z, et al. Update of the EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis* 2013; 5 (17): 2129-2136.
- 30 Sharma A, Jaiswal S, Shukla M, et al. Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug Testing and Analysis* 2014; 6 (5): 399-414.
- 31 Spooner N, Denniff P, Michielsen L, et al. A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: overcoming the issues associated blood hematocrit. *Bioanalysis* 2015; 7 (6): 653-659.
- 32 Phenomenex. <https://i.ytimg.com/vi/eTyBVvOKGNU/hqdefault.jpg>. Dostopano: 15. 11. 2015-
- 33 Bau T. Razvoj in validacija analizne metode za določanje koncentracij valprojske kisline s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti in fluorescenčno detekcijo. Magistrsko delo v pripravi.
- 34 Tosić O, Mattay J. New Photochromic Dithienylethenes through a Click Chemistry Approach. *European Journal of Organic Chemistry* 2011; 2011 (2): 371-376.
- 35 Lowes S, Jersey J, Shoup R, et al. Recommendations on: internal standard criteria, stability, incurred sample reanalysis and recent 483s by the Global CRO Council for Bioanalysis. *Bioanalysis* 2011; 3 (12): 1323-1332.
- 36 Hanai T. HPLC: a practical guide. Royal Society of Chemistry, 1999.
- 37 Sasamoto K, Ushijima T, Saito M, et al. Precolumn Fluorescence Derivatization of Carboxylic Acids Using 4-Aminomethyl-6, 7-dimethoxycoumarin in a Two-Phase Medium. *Analytical Sciences* 1996; 12 (2): 189-193.

- 38 Ederveen J. A practical approach to biological assay validation. Dutch Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment (VROM), Hoofddorp 2010.
- 39 Administration F, Drug. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2001.
- 40 Riley CM, Rosanske TW. Development and validation of analytical methods. Elsevier, 1996.
- 41 Bonate PL, Howard DR. The Use of Dried Blood Spots for Concentration Assessment in Pharmacokinetic Evaluations. *Pharmacokinetics in Drug Development: Advances and Applications*: Springer Science & Business Media, 2011:91-114.
- 42 Rhoden L, Antunes MV, Hidalgo P, et al. Simple procedure for determination of valproic acid in dried blood spots by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2014; 96: 207-212.
- 43 Ikeda K, Ikawa K, Yokoshige S, et al. Gas chromatography–electron ionization–mass spectrometry quantitation of valproic acid and gabapentin, using dried plasma spots, for therapeutic drug monitoring in in - home medical care. *Biomedical Chromatography* 2014; 28 (12): 1756-1762.