

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA KOBE ZUPANC

**RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE ZA  
TERAPEVTSKO SPREMLJANJE KONCENTRACIJ  
PROTIEPILEPTIČNIH UČINKOVIN**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL  
METHOD FOR THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF  
ANTIEPILEPTIC DRUGS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm.

## **ZAHVALA**

*Iskreno se zahvaljujem Danieli Milosheski, mag. farm. in izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. za vsestransko pomoč pri izvajanju praktičnega dela in usmerjanju pri pisanju magistrske naloge. Hvala za potrpežljivost, strokovno pomoč, nasvete in vzpodbudne besede.*

*Hvala tudi mentorju izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju, mag. farm. za pregled magistrske naloge, pomoč in usmeritev.*

*Posebna zahvala gre tudi moji družini in najdražjim, ki me vedno vidijo v najlepši luči in mi s tem tudi pokažejo kaj vse lahko postanem.. »PER ASPERA AD ASTRA !«*

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm.

Maja Kobe Zupanc

Ljubljana, 2015

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Darko Černe mag. farm.

Član magistrske komisije: doc. dr. Žiga Jakopin mag. farm.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VI</b>
<b>POVZETEK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>X</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 EPILEPSIJA.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Patofiziologija epileptičnega napada.....	2
<b>1.2 PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 TERAPEVTSKO SPREMLJANJE KONCENTRACIJ PROTIEPILEPTIČNIH ZDRAVIL.....</b>	<b>8</b>
1.3.1 VZOREC IN ČAS VZORČENJA.....	12
<b>1.4 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI .....</b>	<b>12</b>
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>16</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 MATERIALI .....</b>	<b>17</b>
3.1.1 Biološki material .....	17
3.1.2 Standardi.....	17
3.1.3 Reagenti in topila.....	18
3.1.4 Aparature in laboratorijski pripomočki.....	18
<b>3.2 METODE.....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Razvoj analizne metode s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detekcijo (z uporabo internega standarda).....	19
3.2.2 Razvoj metode za pripravo plazemskih vzorcev .....	22
<b>3.3 VALIDACIJA BIOANALIZNE METODE .....</b>	<b>24</b>
3.3.1 Priprava delovne raztopine, standardnih in kontrolnih raztopin za umeritveno krivuljo.....	24
3.3.2 Selektivnost.....	27
3.3.3 Točnost .....	27
3.3.4 Ponovljivost .....	28
3.3.5 Območje metode .....	28
3.3.6 Linearnost metode.....	28
3.3.7 Spodnja meja določljivosti (LLOQ) .....	29
3.3.8 Izkoristek metode .....	30
3.3.9 Stabilnost .....	30
3.3.10 Vrednotenje rezultatov validacije analizne metode .....	31
3.3.11 Analiza vzorcev bolnikov.....	32
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Razvoj analizne metode s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detekcijo (z uporabo internega standarda) .....</b>	<b>33</b>

---

<b>4.2 Razvoj metode za pripravo plazemskih vzorcev .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3 Rezultati validacije analizne metode .....</b>	<b>39</b>
4.3.1 Selektivnost.....	40
4.3.2 Linearnost (območje metode) in spodnja meja določljivosti (LLOQ).....	41
4.3.3 Točnost in ponovljivost.....	43
4.3.4 Izkoristek ekstrakcije.....	45
4.3.5 Stabilnost .....	46
<b>4.4 Analiza realnih plazemskih vzorcev .....</b>	<b>47</b>
<b>5. SKLEP .....</b>	<b>52</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>53</b>

|

**KAZALO SLIK**

<i>Slika 1: A) Elektroencefalogram (EEG) pacienta v primeru parcialnega epileptičnega napada in B) EEG pacienta v primeru generaliziranega epileptičnega napada .....</i>	3
<i>Slika 2: Prikaz pomembnejših molekulskih tarč in protiepileptičnih zdravil na inhibitorni in ekscitatorni sinapsi .....</i>	5
<i>Slika 3: Biotransformacija okskarbazepina .....</i>	11
<i>Slika 4: Biotransformacija karbamazepina .....</i>	11
<i>Slika 5: Komponente HPLC sistema .....</i>	14
<i>Slika 6: Prekrivajoča razvojna kromatograma preučevanih analitov in prikaz vpliva temperature kromatografske kolone .....</i>	34
<i>Slika 7: Prekrivajoča razvojna kromatograma preučevanih analitov in prikaz vpliva pH vrednosti. ....</i>	35
<i>Slika 8: Prekrivajoči se kromatogrami pri izbranih valovnih dolžinah, pri katerih smo izvedli končno detekcijo .....</i>	37
<i>Slika 9: Kromatogram raztopine standarda KAL 9 za umeritveno krivuljo pri valovni dolžini 210 nm. ....</i>	37
<i>Slika 11: Prekrivajoči se kromatogrami slepih plazemskih vzorcev petih preiskovancev pri valovni dolžini 210 nm.....</i>	40
<i>Slika 12: Prekrivajoči se kromatogrami slepih plazemskih vzorcev petih preiskovancev pri valovni dolžini 235 nm.....</i>	41
<i>Slika 13: Prekrivajoči se kromatogrami slepih plazemskih vzorcev petih preiskovancev pri valovni dolžini 280 nm.....</i>	41
<i>Slika 14: Kromatogram bolnika B80 (pri valovni dolžini 210 nm) na terapiji z lamotriginom in okskarbazepinom. ....</i>	50
<i>Slika 15: Kromatogram bolnika B26 (pri valovni dolžini 210 nm) na terapiji z lamotriginom in karbazepinom.....</i>	50

*Slika 16* : Kromatogram bolnika B37 (pri valovni dolžini 235 nm) na terapiji z lamotriginom in klobazamom ..... 51

**KAZALO PREGLEDNIC**

<b>Preglednica I:</b> Pregled mehanizmov delovanja protiepileptičnih zdravil .....	4
<b>Preglednica II:</b> Pregled farmakokinetičnih lastnosti nekaterih protiepileptičnih učinkovin. .....	6
<b>Preglednica III:</b> Referenčna območja in časi do nastopa stacionarnega stanja za različne protiepileptične učinkovine. ....	10
<b>Preglednica IV:</b> Testirane kombinacije organskih topil in volumskih deležev. ....	23
<b>Preglednica V:</b> Priprava delovne raztopine standardov (DRS).....	25
<b>Preglednica VI:</b> Priprava standardnih in kontrolnih raztopin. ....	25
<b>Preglednica VII:</b> Koncentracija protiepileptičnih učinkovin v standardnih raztopinah za umertitveno krivuljo. ....	26
<b>Preglednica VIII:</b> Koncentracija posameznih protiepileptičnih učinkovin v kontrolnih raztopinah. ....	26
<b>Preglednica IX:</b> Realni vzorci 10 pacientov na terapiji s protiepileptičnimi zdravili, oz. drugimi sočasnimi zdravili, ki smo jih uporabili za analizo.....	32
<b>Preglednica X:</b> Shema gradientne elucije uporabljena pri končni analizi. ....	35
<b>Preglednica XI:</b> Prikaz retencijskih časov in absorpcijskih maksimumov preiskovanih analitov v končni kromatografski metodi. ....	36
<b>Preglednica XII:</b> Posamezni koraki priprave plazemskih vzorcev v končni metodi .....	39
<b>Preglednica XIV:</b> Regresijski parametri umeritvene premice v treh dneh validacije in območje metode za vsak preučevani analit. ....	42
<b>Preglednica XV:</b> Prikaz med-dnevne in znotraj-dnevne ponovljivosti/točnosti za 11 preučevanih analitov.....	44

---

<b>Preglednica XVI:</b> Izkoristki metode na treh koncentracijskih nivojih za posamezen analit. .....	45
<b>Preglednica XVII:</b> Stabilnost (kratkoročna, dolgoročna, v avtomatskem vzorčevalniku, po 3 ciklih zamrznitve/odtalitve) preučevanih analitov pri izbranih pogojih.....	46
<b>Preglednica XVIII:</b> Rezultati TDM za 10 bolnikov z epilepsijo z uporabo razvite HPLC-UV analizne metode. ....	48



## POVZETEK

Epilepsija je ena izmed najpogostnejših nevroloških bolezni. Terapevtsko spremljanje koncentracije zdravila (TDM) predstavlja orodje za optimizacijo terapije s protiepileptičnimi zdravili. Razumna in preudarna uporaba TDM, pravočasni odvzem vzorca, poznavanje kliničnega statusa pacienta, dobro poznavanje zgodovine odmerjanja, pridruženih zdravil in bolezenskih stanj so bistvenega pomena za kvalitetno TDM, zlasti v primeru ozkega terapevtskega območja in velike interindividualne variabilnosti v farmakokinetiki. V okviru magistrske naloge smo s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detekcijo razvili občutljivo analizno metodo, ki omogoča terapevtsko spremljanje celokupnih plazemskih koncentracij protiepileptičnih zdravil: levetiracetama, zonisamida, primidona, lakozamida, lamotrigina, fenitoina, klobazama, okskarbazepina in njegovega metabolita likarbazepina ter karbamazepina in njegovega metabolita karbamazepin epoksida. Ločevanje analitov je potekalo na kromatografski koloni Luna Phenyl-Hexyl, 5  $\mu\text{m}$ , 150 mm x 4,6 mm termostatirani na 40  $^{\circ}\text{C}$ . Z uporabo gradientne elucije in sestave mobilne faze iz 35 – 86 % 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  vrednosti pH 6,9 in acetonitrila smo dosegli elucijo vseh 12 protiepileptičnih učinkovin, vključno z izbranim internim standardom (10,11-dihidrokarbamazepinom) v približno 22 minutah. Odzive preučevanih analitov smo spremljali na detektorju z nizom diod (DAD), ki je omogočal sočasno merjenje absorbance pri valovnih dolžinah 210, 235 in 280 nm. Pri razvoju analizne metode smo večji poudarek namenili predvsem pripravi vzorca, saj so bili ciljana populacija otroci. Končni postopek ekstrakcije analitov iz 100  $\mu\text{L}$  vzorca plazme temelji na obarjanju proteinov plazme z uporabo ohlajenega acetonitrila. Razvita in validirana analizna metoda ustreza validacijskim kriterijem Ameriške agencije za hrano in zdravila za validacijo bioanaliznih metod. Analizna metoda je enostavna, občutljiva, točna, ponovljiva in specifična ter linearna v pripadajočem območju za vsak posamezen analit. Validirano analizno metodo smo uporabili za merjenje plazemskih koncentracij protiepileptičnih zdravil pri bolnikih z epilepsijo. S tem smo potrdili njeno primernost za terapevtsko spremljanje že omenjenih zdravil. Poleg tega je analizna metoda primerna tudi za določanje protiepileptičnih učinkovin v farmakokinetičnih študijah.

**Ključne besede:** *epilepsija, protiepileptična zdravila, plazemski vzorci, TDM, referenčno območje, individualno terapevtsko območje, HPLC-UV, razvoj in validacija bioanalizne metode.*

## ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common neurological diseases. Therapeutic drug monitoring (TDM) is a tool for optimization of antiepileptic drug therapy. Reasonable and rational use of TDM, time of blood sampling, awareness of the patient's clinical status, dosage history of simultaneously administered drugs and patient's medical history are essential for successful TDM, particularly in the case of narrow therapeutic range and high inter-individual variability in pharmacokinetics. In the thesis we have developed a sensitive analytical method using HPLC system with UV detection, which enables TDM of antiepileptic drugs levetiracetam, zonisamide, primidone, lacosamide, lamotrigine, phenytoin, clobazam, oxcarbazepine and its active metabolite licarbazepine, carbamazepine and its metabolite carbamazepine-epoxide in plasma. The separation of analytes was performed on chromatographic column Luna Phenyl-Hexyl, 5  $\mu\text{m}$ , 150 mm x 4,6 mm at temperature 40 °C. Using a gradient elution with 35 – 86 % 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6,9 and acetonitrile we achieved elution of all 12 antiepileptic substances including selected internal standard (10,11-dihydrocarbamazepine) in approximately 22 minutes. Responses of studied analytes were monitored with diode array detector (DAD), which allows simultaneous measurements of absorbance at wavelengths of 210, 235 and 280 nm. During the development of analytical method, we focused on sample preparation, since the targeted population for application of the method were children. Final extraction procedure of the analytes in 100  $\mu\text{L}$  plasma sample is based on deproteinisation from plasma using cold acetonitrile. Developed and validated analytical method meets the criteria of the US Food and Drug Administration for the bioanalytical methods validation. Analytical method is simple, sensitive, precise, specific and linear in the corresponding range for each analyte. We have used the validated analytical method for determination of antiepileptic drug concentration in patients with epilepsy. We confirmed that the method is appropriate for TDM. In addition, the analytical method is suitable for the determination of antiepileptic drugs in pharmacokinetic studies.

**Keywords:** *epilepsy, antiepileptic drugs, plasma sample, TDM, reference range, individual therapeutic concentration, HPLC-UV, development and validation of bioanalytical method.*

**SEZNAM OKRAJŠAV**

CYP	Citokrom P450
CV	koeficient variacije
DBS	posušeni krvni madež (ang. Dried Blood Spot)
EEG	elektroencefalografija (ang. Electroencephalography)
FENI	fenitoin
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration)
GABA	gama aminomaslena kislina (ang. Gamma Amino Butyric Acid)
GIT	gastrointestinalni trakt (ang. Gastro Intestinal Tract)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)
HPLC/MS	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z masno spektrometrijo
IS	Interni Standard
k	naklon umeritvene premice
KAL	kalibrator
KARBA	karbamazepin
KARBA-EPO	karbamazepin epoksid
KLOBA	klobazam
LAMO	lamotrigin
LAKO	lakozamid
LEVE	levetiracetam
LIKAR	likarbazepin
LLOQ	spodnja meja kvantifikacije (ang. Lower Limit of Quantitation)
MHD	mono hidroksi derivat
n	odsek umeritvene premice na ordinati
nm	nanometer
OKS	okskarbazepin
PRIMI	primidon
QC	kontrola kakovosti (ang. Quality Control)
QCl	kontrola kakovosti pri nizki koncentraciji (ang. Quality Control Low)
QCm	kontrola kakovosti pri srednji koncentraciji (ang. Quality Control Medium)
QCh	kontrola kakovosti pri visoki koncentraciji (ang. Quality Control High)
r	Pearsonov koeficient korelacije
r <sup>2</sup>	determinacijski koeficient
RCF	relativna centrifugalna sila (ang. Relative Centrifugal Force)
RSD	relativni standardni odklon (ang. Relative Standard Deviation)
tr	retencijski čas
TDM	terapevtsko spremljanje koncentracije zdravil (ang. Therapeutic Drug Monitoring)
UV	ultravijolčna svetloba
x	neodvisna spremenljivka (koncentracija)
y	odvisna spremenljivka (odziv)
ZONI	zonisamid

# 1. UVOD

## 1.1 EPILEPSIJA

Epilepsija (*sinonimi: padavica, božjast, epilepsia, morbus sacer*) ni specifična bolezen, temveč je definirana kot kronična motnja možganske funkcije, za katero so značilni napadi nezavesti, ki se ponavljajo. Poleg tega so lahko prisotne tudi motnje zavesti in/ali kombinacija motenj senzoričnih, vegetativnih, motoričnih in psihičnih funkcij (1). V razvitem svetu se epilepsija pojavi pri 1 % prebivalstva, pogosto šele po 60. letu starosti. Prevalenca pri moškem in ženskem spolu je enaka, najpogosteje zbole vajo mladi, pri več kot polovici pa se bolezen razvije pred 18. letom starosti (2, 3).

Epilepsije ne uvrščamo med enovito bolezen, ampak je epileptični napad le eden od simptomov epilepsije, ki je praviloma kratek prehodni znak nenormalnega delovanja možganov, ki običajno sponatno preneha. Epileptični napadi se lahko pojavijo zaradi različnih motenj (mehanska poškodba glave, nepravilen razvoj možganov, virusne ali bakterijske okužbe možganov, možganske kapi, možganski tumorji in druge motnje). Epileptični napadi so lahko znak zelo različnih bolezni osrednjega živčevja. Pri marsikaterem bolniku lahko ostane vzrok za bolezen nepojasnen, znanstveniki pa predvidevajo, da je vzrok za nastanek epilepsije tudi genetska predispozicija (4, 5).

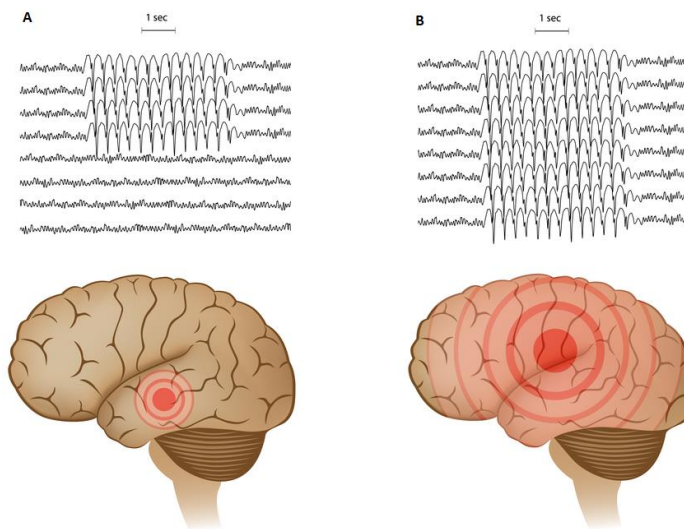
Epileptični napad lahko nastane zaradi nenormalnega izbruha električnih impulzov v možganski skorji. V osnovi so epileptični napadi razdeljeni v tri velike skupine. Epileptični napadi, ki spontano prenehajo po nekaj minutah so predstavniki prve skupine (samo omejujoči). V drugo skupino uvrščamo kontinuirane epileptične napade, ki spontano ne prenehajo brez zdravljenja z zdravili. Tretjo skupino predstavljajo napadi, ki jih sprožijo endo- ali eksogeni dejavniki (stimulatorji: glasba, hranjenje, vroča voda, ipd.). Glede na mesto izbruha ločimo dve osnovni skupini epileptičnih napadov: generalizirane in parcialne (žariščne) napade ter skupino neopredeljenih napadov. Za generalizirane napade (tonično-klonični, tonični, klonični, absence, atonični, bilateralni mioklonus...) je značilno, da nenormalen električni izbruh zajame celotno možgansko skorjo. Bolnik izgubi zavest le za nekaj sekund, lahko se pojavijo mišični krči (v rokah in nogah), motnje mišičnega tonusa, ki vodijo v nenadzorovano trzanje mišic in nenadne padce bolnika (5, 6).

Dihanje bolnika je neenakomerno, bolnik je po napadu zmeden in se ga ne spomni. Druga skupina epileptičnih napadov so parcialni napadi (preprosti, kompleksni, s sekundarno

generalizacijo...), ki so značilni predvsem za otroke. Gre za značilno bolj prikrite napade, ki so omejeni le na določen predel možganske skorje (epileptično žarišče) in pri katerih se pojavijo nenormalni električni izbruhi. Napadi lahko potekajo brez motnje zavesti ali z delno motnjo zavesti, možen je pojav mišičnih krčev in motnje čutil (tip, vonj, sluh) (5, 6).

### **1.1.1 Patofiziologija epileptičnega napada**

Možganska električna dejavnost poteka običajno nesinhrono, pri čemer poteka prenos med različnimi regijami možganov posamezne skupine nevronov. V primeru strukturnih ali funkcionalnih težav v možganih se skupina nevronov začne prožiti na nenormalen, sinhroniziran način, kar vodi v epileptični napad. Sinhrona aktivacija nevronov lahko v možganih poteka v žarišču (fokalno) ali po celotnem območju možganov, ki vodi do paroksizmalnega depolarizacijskega premika. Med napadi se zmanjša proženje in odpornost akcijskih potencialov v vzbujajočih nevronih. Cikličnost tega procesa modulirajo zaviralni živčni prenašalec  $\gamma$ -aminomaslena kislina (GABA) in vzbujajoči kemični obveščevalci (glutamat). V depolariziranem vzbujajočem nevronu so prisotni tudi od kalcija odvisni in napetostno odvisni kalijevi kanalčki, ki zavrejo vzdražnost. Ko je zmanjšanje vzdražnosti nepopolno, se epileptični napadi lahko sprožijo zaradi nenadzorovanega vključevanja sosednjih nevronov v proženje. Med vzbujanjem nevronov se v kalijevih kanalčkih iz adenozin trifosfata proizvede adenzin, ki se sprosti iz nevrona in še dodatno zmanjša vzdražnost nevronov tako, da se veže na adenzinske receptorje na bližnjih nevronih. V primeru motnje zaviralnih mehanizmov zaradi poškodb sinaps ali nevronov lahko pride do razvoja žarišča. Tako vključevanje je lahko lokalizirano (posledica je parcialni napad, *Slika 1A*) ali pa se razširi na celotno možgansko skorjo (generalizirani epileptični napad, *Slika 1B*). Med generaliziranim epileptičnim napadom se namesto normalnega ritma alfa v elektroencefalogramu (EEG) pojavijo veliki, počasni, sinhroni valovi električne aktivnosti v obeh možganskih poloblah (7, 8).



*Slika 1: A) Elektroencefalogram (EEG) pacienta v primeru parcialnega epileptičnega napada in B) EEG pacienta v primeru generaliziranega epileptičnega napada (9).*

## 1.2 PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA

Protiepileptična zdravila predstavljajo skupino zdravil s katerimi preprečujemo in nadziramo epileptične napade. Osnovni cilj zdravljenja s protiepileptičnimi zdravili je preprečevanje epileptičnih napadov brez neželenih učinkov ter ohraneno kakovostjo življenja. Ker nastanejo epileptični napadi predvsem zaradi nenormalnega sinhronega delovanja nevronov, ki so posledica porušenega ravnotežja med sinaptičnem zaviranjem (sinaptična inhibicija) in sinaptičnim vzdraženjem (sinaptična ekscitacija), je največji poudarek delovanja protiepileptičnih zdravil pri vzpostavitvi porušenega ravnotežja. Poznamo več mehanizmov delovanja protiepileptičnih zdravil, poznavanje pa nam omogoča racionalno farmakoterapijo, predvsem pa boljše razumevanje neželenih in toksičnih učinkov ter prepoznavanje posledic medsebojnega delovanja zdravil. Učinki posameznih protiepileptičnih zdravil pa so običajno posledica večjih mehanizmov delovanja (10).

Vse do danes nastanek epilepsije kot tudi delovanje nekaterih protiepileptičnih zdravil še nista v celoti pojasnjena. Glede na mehanizem nastanka epileptičnih napadov poznamo več vrst protiepileptičnih zdravil, ki jih uvrščamo v posamezne skupine glede na njihov mehanizem delovanja. Glavni mehanizmi delovanja in pripadajoča protiepileptična

zdravila so navedena v preglednici I. Določena protiepileptična zdravila lahko delujejo na več različnih tarč hkrati, v različnem obsegu in intenziteti. Slikovno ponazoritev molekulskih tarč in pripadajoča zdravila, glede na mehanizem in značilnost delovanja prikazuje *slika 2*. Večinoma gre za skupine zdravil, ki imajo podobno heterociklično strukturo z različnimi substituenti (barbiturati, derivati hidantoina, sukcinamidi, oksazolidindioni) (11, 12).

**Preglednica I:** Pregled najpomembnejših mehanizmov delovanja protiepileptičnih zdravil (prirejeno po 11-15).

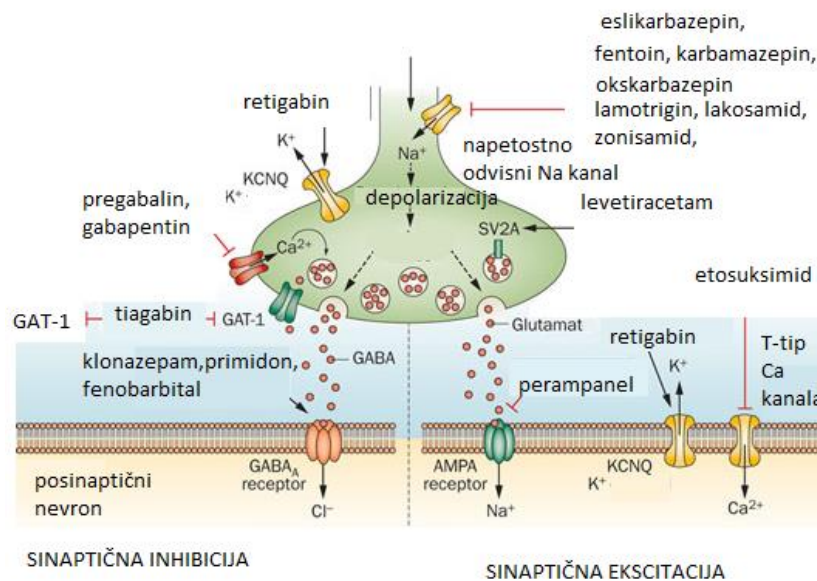
MEHANIZEM DELOVANJA	PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA (UČINKOVINA)
<b>zaviranje nepetostno odvisnih Na<sup>+</sup> kanalov</b>	zonisamid, etosuksimid, klonazepam, valprojska kislina, topiram, gabapentin, fenobarbital, primidon, karbamazepin, okskarbazepin, eslikarbazepin, fenitoin, lakozamid, lamotrigin, rufinamid
<b>Zaviranje Ca<sup>2+</sup> kanalov tipa T</b>	valprojska kislina, etosuksimid, zonisamid, topiram, levetiracetam, karbamazepin
<b>povečano delovanje GABA</b>	lamotrigin, karbamazepin, okskarbazepin, valprojska kislina, topiram, gabapentin, primidon, fenobarbital, vigabatrin, tiagabin, stiripentol, klonazepam, levetiracetam, felbamat
<b>zmanjšanje aktivnosti glutamatnega vzbujajočega sistema</b>	perampanel, felbamat, topiram, valprojska kislina, primidon, fenobarbital, lamotrigin, okskarbazepin, karbamazepin
<b>odpiranje K<sup>+</sup> kanalov</b>	retigabin

Idealne farmakokinetične lastnosti protiepileptičnega zdravila so: popolna absorpcija v GIT, dolg eliminacijski razpolovni čas, linearna kinetika, odsotnost aktivnih metabolitov, velika biološka uporabnost, zanemarljiva vezava na plazemske proteine, izločanje skozi ledvice, kar omogoča lažje titriranje zdravila in čim manj možnih interakcij (13, 14).

Danes poznamo dve osnovni skupini protiepileptičnih zdravil. Starejša protiepileptična zdravila (prva generacija protiepileptičnih zdravil), ki so v uporabi že več desetletij in novejša protiepileptična zdravila (druga in tretja generacija protiepileptičnih zdravil), ki zaradi boljših farmakokinetičnih lastnosti v veliki meri izpodrivajo terapevtsko uporabo protiepileptičnih zdravil starejše generacije. Starejšo generacijo protiepileptičnih zdravil (valprojska kislina, klonazepam, karbamazepin, etosuksimid, fenitoin, primidon, fenobarbital, metilfenobarbital, fosfenitoin...) predstavljajo izredno učinkovita zdravila, ki

imajo iz vidika farmakokinetičnih lastnosti veliko pomanjkljivosti. V veliki meri se vežejo na plazemske proteine in imajo nelinearno farmakokinetiko. Poleg tega vstopajo v interakcije z drugimi učinkovinami, ker se presnavljajo s citokromom P450 (CYP) 2C9 in CYP 2C19 in ga inducirajo ali inhibirajo. Prednost novjših protiepileptičnih zdravil (vigabatrin, rufinamid, okskarbazepin, eslikarbazepin, lakozamid, levetiracetam, topiramat, retigabin, zonisamid, lamotrigin, pregabalin, gabapentin, stiripentol...) je, da vsa izkazujejo linearno farmakokinetiko. Z izjemo nekaterih se v bistveno manjši meri vežejo na plazemske proteine, aktivne metabolite pa tvori samo okskarbazepin. V primerjavi s starejšimi povzročajo manj neželenih učinkov in se v manjši meri presnavljajo, posledično pa je prisotnih tudi manj farmakokinetičnih interakcij z drugimi zdravili (12, 13, 17).

Predstavniki tretje generacije protiepileptičnih zdravil so lakozamid, retigabin, rufinamid in brivaracetam, ki delujejo preko različnih mehanizmov in ponujajo naprednejše in nove pristope pri zdravljenju epilepsije. Glavne karakteristike predstavnikov tretje generacije so linearna farmakokinetika, hitra absorpcija in presnavljanje v jetrih, manj interakcij z ostalimi zdravili in hormoni in šibkejši neželeni učinki (12, 17).



**Slika 2:** Prikaz pomembnejših molekularnih tarč in protiepileptičnih zdravil na inhibitorni (zaviralni) in ekscitatorni (vzbujajoči) sinapsi (prirejeno po 18).

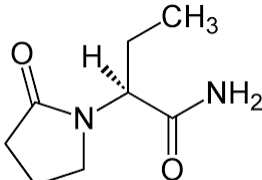
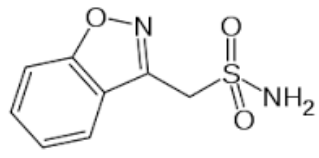
Izbira protiepileptičnega zdravila je odvisna od različnih dejavnikov, ki upoštevajo individualne značilnosti bolnika, kot so spol, starost, telesna teža, rodna doba pri ženskah, oblika epilepsije, ter tudi značilnosti protiepileptičnega zdravila (mehanizem delovanja in možni neželeni učinki). Pri izbiri zdravila je potreben večji poudarek pri populaciji otrok, mladostnikov in starejših. Zdravilo uvajamo postopoma, z nizkim odmerkom in ga nato

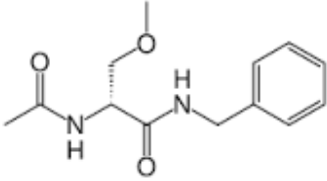
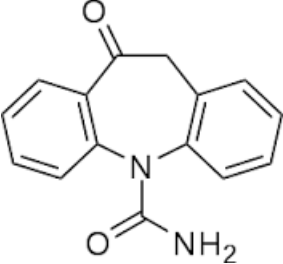
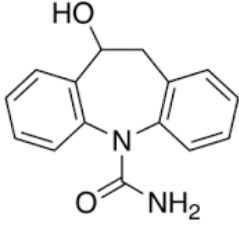
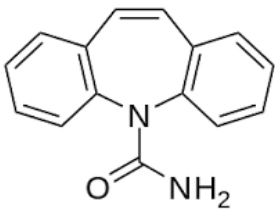
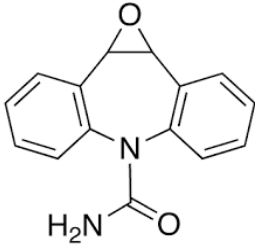
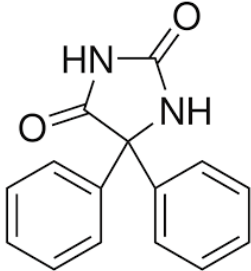


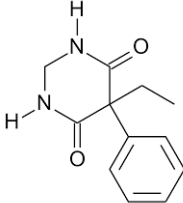
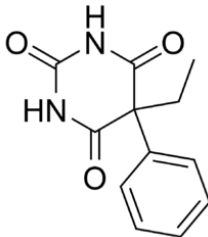
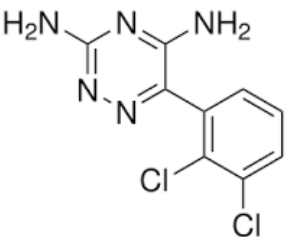
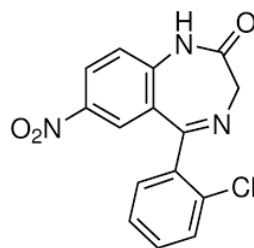
postopoma povečujemo. Pred zdravljenjem s protiepileptičnimi zdravili (z enim - monoterapija ali kombinacijo različnih - politerapija) je potrebno preučiti vse potrebne farmakokinetične in farmakodinamične interakcije med posameznimi zdravili. Izbira zdravila je odvisna od vrste epileptičnega napada in rezultatov preiskav, ki jih opravi nevrolog. Pomembna je tudi opredelitev potencialnih farmakodinamičnih interakcij. Gre za interakcije pri katerih je spremenjen učinek protiepileptičnega zdravila kljub nespremenjeni koncentraciji. Farmakodinamične interakcije težko odkrijemo, lahko so tudi zaželjene. Na drugi strani pa je potrebno preučiti farmakokinetične interakcije učinkovin, ki povzročijo spremembo koncentracije učinkovine in/ali koncentracijo njenega metabolita in se največkrat pokažejo v procesu presnavljanja (13, 14).

Pregled protiepileptičnih učinkovin z glavnimi farmakokinetičnimi lastnostmi, za katere smo v nadaljevanju razvili in validirali analizo metodo je v preglednici II (prirejeno po 12, 17-27).

**Preglednica II:** Pregled farmakokinetičnih lastnosti nekaterih protiepileptičnih učinkovin.

UČINKOVINA/ STRUKTURNA FORMULA	LASTNOSTI / MESTO IN DELEŽ IZLOČANJA	BIOLOŠKA UPORABNOST
		RAZPOLOVNI ČAS
		VEZAVA NA PROTEINE
levetiracetam 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hitra absorpcija iz prebavnega trakta. Glavna presnovna pot je encimska hidroliza acetamidne skupine</li> <li>• Izločanje z urinom (66 % odmerka v nespremenjeni obliki, 27 % v obliki neaktivnih metabolitov)</li> </ul>	≥ 95 %  6 - 8 ur  10 %
zonisamid 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jetra 70 %, acetilacija, redukcija (CYP3A4), glukuronidacija</li> <li>• Izločanje z urinom (30 % v nespremenjeni obliki)</li> </ul>	≤ 65 %  50 - 70 ur  40 - 60 %

lakoamid 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jetra (60 %), demetilacija (CYP2C19) in druge presnovne poti</li> </ul>	100 % 12 - 16 ur ≤ 15 %
okskarbazepin 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jetra 70 %</li> <li>• Hitra in popolna pretvorba</li> <li>• Ketoredukcija do aktivnega monohidroksi derivata, MHD oz. likarbazepin potem glukuronidacija</li> </ul> 	90 % 8 - 15 ur 40 %
karbamazepin 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jetra (se intenzivno presnavlja), glavna presnovna pot vključuje oksidacijo s CYP 3A4 in CYP2C8 do aktivnega metabolita karbamazepin-10,11-epoksida (epoksidacija)</li> </ul> 	75 - 85 % 8 – 20 h 75 %
fenitoin 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jetra, oksidacija s CYP2C9 in CYP2C19</li> <li>• Izločanje: z urinom (2 % v nespremenjeni obliki)</li> </ul>	> 80 % 30 – 100 % 90 %

primidon 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jetra (se intenzivno presnavlja), oksidacija s CYP2C9 in CYP2C19</li> <li>• Izločanje z urinom</li> <li>• Eden izmed glavnih metabolitov je tudi fenobarbital</li> </ul> 	<table border="1"> <tbody> <tr> <td data-bbox="1098 188 1396 280">&gt;90 %</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1098 280 1396 371">7 - 22 ur</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1098 371 1396 763">10 %</td> </tr> </tbody> </table>	>90 %	7 - 22 ur	10 %
>90 %					
7 - 22 ur					
10 %					
lamotrigin 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jetra (se intenzivno presnavlja), glukuronidacija z UGT1A4 in UGT1A9</li> <li>• Izločanje z urinom (10 % nespremenjen)</li> </ul>	<table border="1"> <tbody> <tr> <td data-bbox="1098 801 1396 884">≥ 95 %</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1098 884 1396 974">15 - 35 %</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1098 974 1396 1120">55 %</td> </tr> </tbody> </table>	≥ 95 %	15 - 35 %	55 %
≥ 95 %					
15 - 35 %					
55 %					
klobazam 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jetra (se intenzivno presnavlja), oksidacija s CYP3A4 in CYP2C19</li> </ul>	<table border="1"> <tbody> <tr> <td data-bbox="1098 1158 1396 1254">&gt; 95 %</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1098 1254 1396 1355">10 - 30 %</td> </tr> <tr> <td data-bbox="1098 1355 1396 1464">85 %</td> </tr> </tbody> </table>	> 95 %	10 - 30 %	85 %
> 95 %					
10 - 30 %					
85 %					

### 1.3 TERAPEVTSKO SPREMLJANJE KONCENTRACIJ PROTIEPILEPTIČNIH ZDRAVIL

Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil (ang. Therapeutic Drug Monitoring, TDM) je multi-disciplinarna klinična metoda, ki se uporablja za individualno prilagajanje režimov odmerjanja zdravil z namenom izboljšanja oskrbe bolnikov. Gre za laboratorijsko meritev določenega parametra, ki z ustrezno interpretacijo neposredno vpliva na režim odmerjanja določenega zdravila. TDM omogoča vzdrževanje serumskih, plazemskih ali krvnih

koncentracij določene učinkovine znotraj željenega terapevtskega območja. Terapevtsko spremljanje koncentracij protiepileptičnih zdravil je nujno za doseganje optimalne varnosti in učinkovitosti, saj omogoča maksimalne želene protiepileptične učinke ob minimalnem pojavu neželenih učinkov, ki so sprejemljivi (17, 25).

Pri TDM protiepileptičnih učinkovin je pomembno razlikovati med pojmomoma referenčno območje in individualna terapevtska koncentracija. Referenčno območje predstavlja območje koncentracij zdravilne učinkovine, ki je značilno za vsak laboratorij in znotraj katerega je zdravljenje optimalno pri večini bolnikov v populaciji. Določa spodnjo mejo plazemske koncentracije, pod katero je verjetnost pojava terapevtskega učinka majhna, na drugi strani pa zgornjo mejo plazemske koncentracije, nad katero obstaja večja verjetnost pojava neželenih stranskih učinkov. Individualna terapevtska koncentracija pa predstavlja plazemsko koncentracijo učinkovine, ki pri posamezniku povzroči najboljši klinični odziv (odsotnost epileptičnih napadov in sprejemljiv pojav neželenih učinkov). Individualne terapevtske koncentracije se med posamezniki lahko razlikujejo in niso nujno v območju referenčnih vrednosti (25, 28).

Klinična uporabnost TDM je v veliki meri odvisna od farmakoloških lastnosti zdravila. Pri individualnem bolniku z epilepsijo le na podlagi kliničnih znakov velikokrat težko določimo optimalni odmerek protiepileptičnega zdravila, saj znakov toksičnosti protiepileptičnega zdravila in kliničnih simptomov ni vedno enostavno prepoznati. Zdravljenje s protiepileptičnimi zdravili predstavlja profilaktično zdravljenje, zato je kljub zdravljenju težko napovedati ali bo predpisan odmerek zagotavljal dolgoročno kontrolo nad nenapovedanimi epileptičnimi napadi, ki se pojavljajo v neznanih intervalih. V boju proti epilepsiji še vedno ne obstajajo direktni klinični laboratorijski kazalniki za klinično učinkovitost in toksičnost (25, 29).

Indikacije za uporabo TDM so pri vseh protiepileptičnih zdravilih zelo podobne, vendar pa se uporabnost zaradi velike intra- in interindividualne farmakokinetične variabilnosti teh učinkovin razlikuje. Pomembno je upoštevati celotno klinično sliko in stanje bolnika (29).

Indikacije za uporabo TDM:

- uvedba/prilagoditev/sprememba (odmerka) protiepileptičnega zdravila za oceno referenčnega območja,
- ugotavljanje in preverjanje bolnikove vodljivosti (ang. compliance),

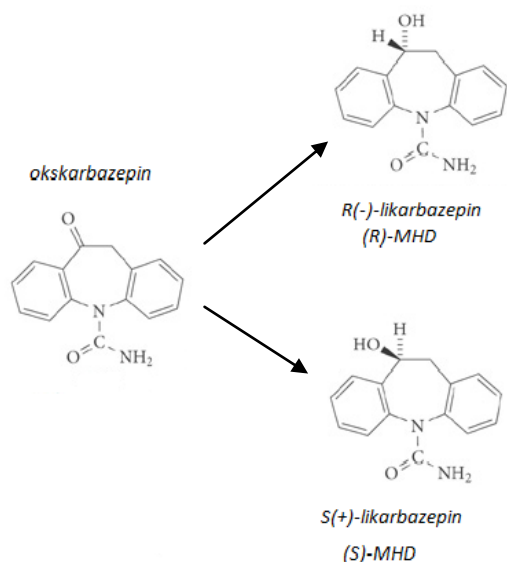
- ugotavljanje individualne terapevtske koncentracije protiepileptičnega zdravila,
- ocena potencialnih vzrokov toksičnih učinkov protiepileptičnih zdravil,
- ocena potencialnih vzrokov za zmanjšanje učinkovitosti protiepileptičnih zdravil
- pri uvedbi sočasnega zdravljenja z drugim zdravilom, prepoznavanje interakcij med zdravili (28, 29).

Glavni cilj pri zdravljenju epilepsije je, da dosežemo ustrezno terapevtsko koncentracijo protiepileptičnega zdravila na mestu njegovega delovanja, torej v centralnem živčnem sistemu. Koncentracija protiepileptične učinkovine v centralnem živčnem sistemu je odvisna od njene koncentracije v krvi. Koncentracijo v krvi lahko merimo in na ta način omogočimo prilagoditev odmerka protiepileptičnega zdravila. Pri prilagajanju odmerjanja so nam v pomoč farmakokinetični modeli. S prileganjem modelov meritvam koncentracije protiepileptične zdravilne učinkovine dobimo individualne ocene farmakokinetičnih parametrov. Z njimi lahko potem napovemo kakšno koncentracijo zdravilne učinkovine bomo dosegli z določenim režimom odmerjanja. Ko najdemo ustrezen terapevtski odmerek pri posamezniku, skušamo doseženo terapevtsko koncentracijo protiepileptičnega zdravila v krvi bolnika ohranjati vse do zaključka zdravljenja. Pregled referenčnih območij in časov do nastopa stacionarnega stanja za protiepileptične učinkovine, ki so predmet razvoja in validacije bioanalizne metode v nadaljevanju magistrske naloge prikazuje preglednica III (17, 25, 28).

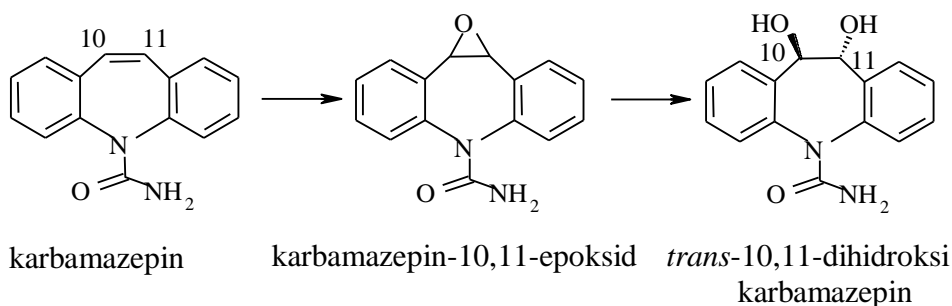
**Preglednica III:** Referenčna območja in časi do nastopa stacionarnega stanja za različne protiepileptične učinkovine (prirejeno po 17, 25, 28).

PROTIEPILEPTIČNA UČINKOVINA	REFERENČNO OBOČJE (mg/L)	STACIONARNO STANJE (dnevi)
<b>Zonisamid</b>	10 - 40	9 - 12
<b>Primidon</b>	5 - 10	2 - 4
<b>okskarbazepin</b> (likarbazepin, oz. monohidroksi derivat, MHD je aktivni metabolit okskarbazepina)	3 - 35	2 - 3
<b>Levetiracetam</b>	12 - 46	1 - 2
<b>Fenitoin</b>	10 - 20	5 - 17
<b>Lamotrigin</b>	2,5 - 15	3 - 6
<b>Klobazam</b>	0,03 - 0,3	7 - 10
<b>Lakozamid</b>	10 - 20	3 - 4
<b>karbamazepin</b> (karbamazepin epoksid je aktivni metabolit karbamazepina)	4 - 12	2 - 4
<b>Fenobarbital</b>	10 - 40	12 - 24

*Slika 3* prikazuje biotransformacijo okskarbazepina preko redukcije 10-keto skupine do farmakološko aktivnega monohidroksi derivata, oziroma likarbazepina, saj TDM samega okskarbazepina ni uporaben. Medtem ko *Slika 4* prikazuje pretvorbo karbamazepina s citokromom P450 3A4 do farmakološko aktivnega metabolita karbamazepin-10,11-epoksida in nato z mikrosomalno epoksidno hidrolazo do farmakološko neaktivnega trans-10,11-dihidroksi karbamazepina (31,32).



**Slika 3:** Biotransformacija okskarbazepina do farmakološko aktivnega metabolita likarbazepina (dveh izomer), oz. MHD-monohidroksi derivata (prirejeno po 31).



**Slika 4:** Biotransformacija karbamazepina (prirejeno po 32).

### 1.3.1 VZOREC IN ČAS VZORČENJA

Za TDM protiepileptičnih učinkovin večinoma uporabljamo krvno plazmo ali serum. Običajno pri TDM merimo celokupno koncentracijo učinkovine v krvni plazmi, torej učinkovino, ki je v plazmi prosta, in učinkovino, ki je vezana na plazemske proteine (večinoma albumin). V nekaterih primerih: hipoalbuminemija, uremija ali ob prisotnosti drugih snovi, ki tekmujejo s protiepileptičnimi učinkovinami za vezavna mesta na proteinih, se obseg vezave na plazemske proteine lahko spremeni in vodi v napačno interpretacijo meritve koncentracije. V takšnih primerih je smiselno določiti koncentracijo proste učinkovine v plazmi (25, 28).

V zadnjih letih zelo aktualen biološki vzorec za TDM predstavljajo posušeni krvni madeži (ang Dried Blood Spot, DBS). Značilnost tega vzorca je bolniku prijaznejši odvzem krvi (volumen nekaj  $\mu\text{L}$ , lahko tudi kapilarna kri, ki si jo bolnik odvzame sam) in enostavnejše rokovanje z vzorci in njihov transport. Potrebna pa je občutljiva analizna metoda, kar je glavna omejitev za rutinski TDM protiepileptičnih učinkovin (17, 29). Možen biološki vzorec za TDM je tudi slina. Plazemska koncentracija večine protiepileptičnih zdravilnih učinkovin, z izjemo nekaterih (npr. valprojska kislina) razmeroma dobro korelira z njihovo koncentracijo v slini (30).

Pri TDM je potrebno načrtovati tudi čas odvzema vzorca. Običajno odvezamo vzorec v stacionarnem stanju, ki nastopi 4 do 5 razpolovnih dob po pričetku terapije ali spremembi odmerjanja. Pri protiepileptičnih zdravilih z dolgo razpolovno dobo (npr. zonisamid, fenobarbital in drugi) in takrat, ko je očistek učinkovine zelo zmanjšan, lahko koncentracijo učinkovine izmerimo še pred nastopom stacionarnega stanja. Vzorec običajno odvezamo tik pred naslednjim odmerkom zdravila, ko je plazemska koncentracija zdravila najmanjša. V primeru suma zastrupitve vzorec odvezamo takoj, ko je mogoče (25).

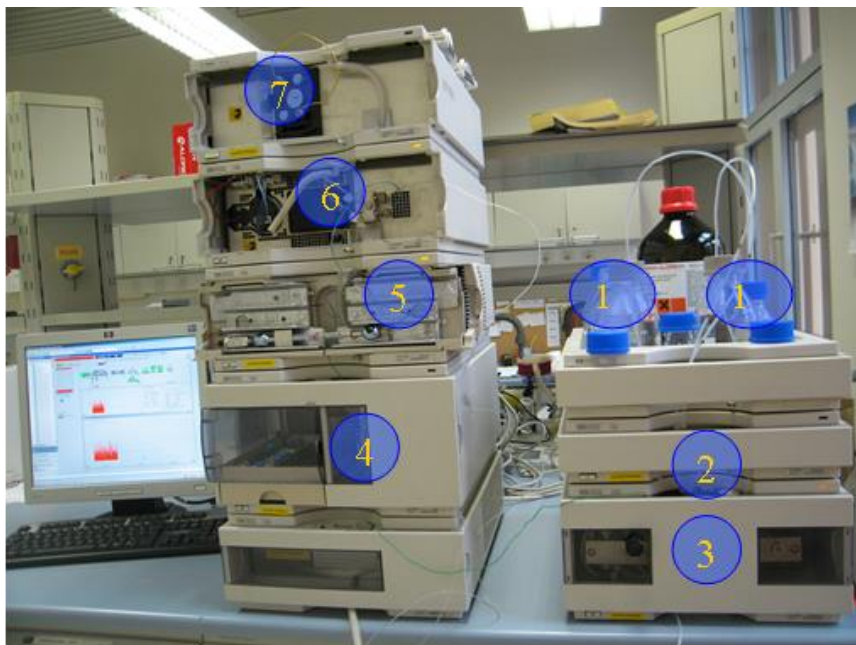
### 1.4 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI

Kromatografija je analizna metoda s katero ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustrežno detekcijo. Kromatografska separacija je posledica različnih fizikalno - kemijskih lastnosti preiskovanega vzorca. Zaradi različnih interakcij med komponentami vzorca, mobilno in stacionarno fazo je zadrževanje (retencija) posameznih

komponent na stacionarni fazi različno. Hitrosti s katerimi posamezne komponente z mobilno fazo potujejo skozi kromatografsko kolono se zato razlikujejo. Sestava mobilne faze je za separacijo bistvenega pomena. Glavne zahteve za izbiro mobilne faze so: ne sme vplivati na lastnost kolone, topiti mora vzorec, kompatibilnost z detektorjem, imeti mora tudi nizko viskoznost. Ločitev poteka tako, da mobilna faza stalno potuje vzdolž kolone in prenese komponente vzorca, ki jih injiciramo na kromatografsko kolono. Kolona je srce HPLC sistema, saj se v njej dogajajo najpomembnejši procesi separacije. Slednja je odvisna od velikosti in oblike polnila (stacionarna faza), ter učinkovitosti kolone (oblika, dimenzije). Polnila so praškasti materiali, velikosti 2 do 5  $\mu\text{m}$ , ki so različno oblikovani. Delci so pravilne sferične oblike, od njihove velikosti pa je odvisen potreben tlak topila, da premagamo upor kolone. Upor je večji pri daljši koloni in manjših delcih stacionarne faze. Pomemben parameter je tudi notranji premer kolone in geometrija kolone. Od geometrije kolone je odvisen mrtvi volumen kolone. Mrtvi volumen predstavlja prostor, kjer prihaja do vrtinčenja, kar povzroči širjenje vrhov, cepljenje ali popolno deformacijo vrhov. Molekule na svoji poti vzdolž kolone stalno prehajajo med mobilno in stacionarno fazo, pri čemer se premikajo le v mobilni fazi, medtem ko v stacionarni fazi mirujejo. Sestava mobilne faze je lahko med celotno analizo stalna (izokratska analiza) ali pa se spreminja (gradientna analiza). S spremembo kemične sestave oziroma polarosti mobilne faze med procesom dosežemo krajše čase zadrževanja močno vezanih komponent na koloni in s tem bistveno skrajšamo čas analize. Z uporabo gradientne analize, dosežemo celotno ločljivost komponent v mešanici, ter izboljšamo obliko vrhov (ustrezen faktor popačenja) in občutljivost. Učinkovitost kromatografije je obratno sorazmerna velikosti uporabljenih delcev, prav majhnost delcev stacionarne faze, pa je razlog za visoke tlake, ki so potrebni, da vzdržujemo ustrezne pretoke mobilne faze skozi kolono. HPLC omogoča veliko višje ločljivosti ob višjih tlakih. Na koncu kolone se ločene komponente eluirajo in jih lahko zaznamo s specifičnim ali nespecifičnim detektorjem. Signali detektorja so podani kot kromatografski vrhovi v kromatogramu. Površina pod kromatografskim vrhom je proporcionalna koncentraciji in podaja kvantitativno oceno merjenega analita. Zaradi svoje prilagodljivosti, ter visoke občutljivosti je HPLC zelo uporabna tehnika v biomedicinskih laboratorijih, predvsem za spremljanje koncentracije zdravilnih učinkovin v bioloških vzorcih in TDM (33, 34).



Osnovne komponente HPLC sistema so shematsko predstavljene na sliki 5: 1 rezervoar za mobilno fazo, 2 razplinjevalec, 3 črpalka, 4 avtomatski vzorčevalnik, 5 kromatografska kolona s predkolono, 6 UV detektor z nizom diod (DAD), 7 fluorescenčni detektor in poleg levo računalnik za kontrolo procesa.



*Slika 5: Komponente HPLC sistema (fotografija posneta na Fakulteti za farmacijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, M. K. Zupanc, maj 2014)*

HPLC metode lahko delimo na metode, pri katerih vzorec injiciramo direktno na kolono in metode, ki zahtevajo predpripravo vzorca. Analiza bioloških vzorcev (npr. serum ali plazma) običajno zahteva predpripravo vzorca z uporabo ekstrakcije (tekoče-tekoče ali tekoče-trdno) ali z obarjanjem proteinov (deproteinizacija). Pri TDM običajno ločujemo polarne zdravilne učinkovine in metabolite z reverzno-fazno HPLC. Pogosto, kot stacionarno fazo uporabljamo modificiran silikagel, ki ima na površino vezane verige ogljikovodikov (C18), ter polarna topila (acetonitril, metanol). Molekule, ki imajo nižjo afiniteto (npr. bolj polarne molekule v primeru reverzno-fazne porazdelitvene HPLC) do stacionarne faze, se eluirajo prve. Večja kot je afiniteta molekul v vzorcu do stacionarne faze, kasneje se eluirajo iz kolone. Manj polarne pa se v primeru reverzno-fazne porazdelitvene HPLC bolj intenzivno porazdelijo v stacionarno fazo, zato je njihov retencijski čas daljši. Pri TDM najpogosteje uporabljamo UV-detekcijo z merjenjem absorbance eluenta pri specifični valovni dolžini. Uporabljajo se tudi fluorescenčni detektorji, ki se uporabljajo predvsem za kvantitativno določanje spojin, ki fluorescirajo in

elektrokemijski detektor za analizo spojin, ki se lahko oksidirajo ali reducirajo. Zdravila, ki nimajo specifičnih funkcionalnih skupin ali značilnih spektrov, lahko pretvorimo v ustrezne spojine (derivate) z značilnim UV maksimumom, najpogosteje s predkolonsko ali postkolonsko derivatizacijo. V zadnjem času se je zelo uveljavila tudi kombinacija HPLC z masno spektrometrijo (HPLC-MS), zaradi velike specifičnosti pri analizi zdravilnih učinkovin. Kljub dobri občutljivosti, široki uporabnosti in hitri prilagoditvi na novo učinkovino, pa ima HPLC tudi slabosti, kot so: draga in zahtevna oprema, potrebno je dodatno usposobljeno operativno osebje, večji volumni vzorca, zahtevna predpriprava vzorca ter dolgotrajne analize (35).

## 2. NAMEN DELA

Zaradi ozkega terapevtskega območja in interindividualne variabilnosti v farmakokinetiki je potrebno terapevtsko spremljanje koncentracij protiepileptičnih zdravilnih učinkovin. V magistrski nalogi bomo s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detekcijo razvili občutljivo analizno metodo, ki bo primerna za terapevtsko spremljanje celokupnih plazemskih koncentracij protiepileptičnih učinkovin. Ker so ciljana populacija otroci, bomo za analizo vzorcev uporabili čim manjši možni volumen plazme. Pri razvoju analizne metode bomo večji poudarek namenili predvsem pripravi vzorca. Razvito analizno metodo bomo nato potrdili z validacijo metode v skladu s smernicami Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA). Ovrednotili bomo naslednje validacijske parametre: točnost, ponovljivost, učinkovitost ekstrakcije, območje linearnosti, spodnjo mejo določljivosti, kratkoročno in dolgoročno stabilnost, stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku in stabilnost po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja. Validirano analizno metodo bomo nato uporabili za analizo realnih vzorcev iz farmakokinetične raziskave pri bolnikih na terapiji s protiepileptičnimi zdravili.

### Cilji magistrske naloge

- Razvita analizna metoda bo enostavna in zadosti občutljiva za terapevtsko spremljanje celokupnih koncentracij levetiracetama, zonisamida, primidona, lakozamida, lamotrigina, fenitoina, klobazama, okskarbazepina in njegovega metabolita likarbazepina (oz. monohidroksi derivata, MHD) ter karbamazepina in njegovega metabolita karbamazepin epoksida).
- Volumen uporabljene plazme bo zaradi ciljane populacije otrok, ki se zdravijo s protiepileptičnimi zdravili 100  $\mu$ L.
- Razvito HPLC-UV analizno metodo bo mogoče validirati po FDA smernicah.
- Validirano HPLC-UV analizno metodo bo mogoče uporabiti za analizo realnih plazemskih vzorcev za namen TDM.
- Razvita analizna metoda bo s stališča izvedbe primerna za rutinsko uporabo za TDM.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEL

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Biološki material

V raziskavo smo vključili 10 plazemskih vzorcev bolnikov z epilepsijo, ki smo jih pridobili na Nevrološki kliniki na Kliničnem oddelku za bolezni živčevja, kjer je potekala klinična raziskava z naslovom »Napovedni dejavniki za variabilnost farmakokinetike lamotrigina pri bolnikih z epilepsijo«. Izvedba raziskave je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (odločba št.: 25p/04/12). Uporabili smo tudi humano plazmo zdravih prostovoljcev, ki niso prejeli nobenega zdravila (Zavod za transfuzijsko medicino v Ljubljani).

Vsi vzorci so bili do našega testiranja shranjeni v zamrzovalniku pri  $-80^{\circ}\text{C}$  ali  $-20^{\circ}\text{C}$  v zaprtih plastičnih epruvetah. Vzorce smo pred uporabo odmrznili pri sobni temperaturi in jih previdno premešali.

##### 3.1.2 Standardi

Pri delu smo uporabili naslednje standarde proizvajalca Sequoia Research Products Ltd. (Pangbourne, Združeno kraljestvo Velike Britanije in Severne Irske):

- levetiracetam, Levetiracetam,  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ ;  $M = 170,21$  g/mol,
- karbamazepin epoksid, Carbamazepine-10,11-epoxide,  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ;  $M = 252,27$  g/mol,
- karbamazepin diol, Carbamazepine-10,11-dihydrodiol,  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ ;  $M = 270,28$  g/mol,
- likarbazepin, Licarbazepine,  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ ;  $M = 254,28$  g/mol,
- karbamazepin, Carbamazepine,  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ ;  $M = 236,27$  g/mol,
- lamotrigin, Lamotrigine,  $\text{C}_9\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_5$ ;  $M = 256,10$  g/mol,
- lakoamid, Lacosamide,  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ ;  $M = 250,29$  g/mol,
- zonisamid, Zonisamide,  $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ ;  $M = 212,23$  g/mol,
- okskarbazepin, Oxcarbazepine,  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ;  $M = 252,27$  g/mol,
- klobazam, Clobazam,  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$ ;  $M = 300,74$  g/mol,

Uporabili smo tudi standarde proizvajalca (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija):

- fenitoin, Phenytoin,  $C_{15}H_{12}N_2O_2$ ;  $M = 252,27$  g/mol
- primidon, Primidone,  $C_{15}H_{14}N_2O_2$ ;  $M = 218,25$  g/mol,
- fenobarbital, Phenobarbital,  $C_{12}H_{12}N_2O_3$ ;  $M = 232,24$  g/mol,
- kloramfenikol, Chloramphenicol,  $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ;  $M = 323,13$  g/mol,
- 10,11-dihidrokarbamazepin, 10,11-Dihydrocarbamazepine,  $C_{15}H_{14}N_2O$ ;  $M = 238,28$  g/mol.

### 3.1.3 Reagenti in topila

Pri delu smo uporabili naslednje reagente in topila:

- Kalijev dihidrogenfosfat, pro analysi,  $KH_2PO_4$ , Merck KgaA (Darmstadt, Nemčija),
- Metanol,  $CH_3OH$ , Chromasol V, čistote za kromatografijo, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija),
- Acetonitril,  $CH_3CN$ , Chromasol V, čistote za kromatografijo, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija),
- Natrijev hidroksid, NaOH, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija),
- Klorovodikova kislina, HCl (Castellar del Valles- Barcelona Španija),
- Puferske raztopine pH =3, pH =6, pH =7, (Kefolab, Ljubljana, Slovenija),
- Čista voda pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA).

### 3.1.4 Aparature in laboratorijski pripomočki

Pri delu smo uporabili naslednje aparature in laboratorijske pripomočke:

- Tehnica AG 245, Mettler Toledo (Schwarzenbach, Švica),
- Tehnica XP 2105, Mettler Toledo (Schwarzenbach, Švica),
- Ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra (Kranj, Slovenija),
- Magnetno mešalo HI 190M, Hanna instruments (Póvoa de Varzim, Portugalska),
- pH meter MA5750, Iskra (Kranj, Slovenija),
- Hladilnik ( $T = 3$  °C) z zamrzovalnikom ( $T = - 20$  °C), Gorenje (Velenje, Slovenija),
- Zamrzovalnik MDF-U50V ( $T = - 80$  °C), Sanyo Electric Biomedical (Japonska),
- Centrifuga Eppendor, tip: 5415 R, Eppendorf research (Hamburg, Nemčija),

- Koncentrator in evaporator Turbovap ® LV, Caliper Life Sciences (Hopkinton-M, ZDA),
- Polavtomatske pipete 2 - 20 ul, 20 - 200 ul, 100 - 1000 ul, Eppendorf (Hamburg, Nemčija),
- Mešalnik Vibromix 10, Tehnica (Železniki, Slovenija),
- Mikrocentrifugirke velikosti 0,5 mL; 1,5 mL in 2,0 mL, Eppendorf (Hamburg, Nemčija),
- stekleni inventar: merilne bučke, čaše, valji, tehtiči, HPLC vial in inserti za vial, presesalna nuča in lij; različnih velikosti in različnih proizvajalcev,
- ostali inventar: stojala za vial in epruvete, pokrovčki za vial, spatule, žličke, nastavki za pipete, parafinski film Parafilm®M, magneti za magnetno mešalo, lateks rokavice, štoparica.
- digestorij,
- HPLC sistem Agilent technologies 1100 series z UV detektorjem, kvarterna črpalka, razplinjevalec, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, programska oprema (ChemStation), Agilent technologies (Santa Clara, Kalifornija, ZDA),
- HPLC kolona: Luna Phenyl-Hexyl, 5µm, 150 mm x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance (Kalifornija, ZDA),
- Predkolona za HPLC: Gemini C6-Pheny, 4 mm x 3,0 mm, Phenomenex, Torrance (Kalifornija, ZDA).

Po uporabi smo vse uporabljene reagente in pripomočke varno in ustrezno zavrgli. Med samo izvedbo testa smo upoštevali vse varnostne predpise in navodila za delo v laboratoriju in se ustrezno zaščitili z zaščitnimi in dezinfekcijskimi sredstvi.

## **3.2 METODE**

### **3.2.1 Razvoj analizne metode s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detekcijo**

#### **3.2.1.1 Izbira in priprava internega standarda ter osnovnih standardnih raztopin**

Med že poznanimi metodami določanja protiepileptičnih učinkovin s HPLC-UV metodo v objavljenih člankih (19-24) smo ugotovili, da je večina raziskovalcev uporabila različne interne standarde kot so: citalopram, melatonin, 10,11-dihidrokarbamazepin, kloramfenikol in oksazepam.

V naši raziskavi smo preizkusili dva interna standarda (IS): kloramfenikol in 10,11-dihidrokarbamazepin. Ustreznost internega standarda smo ovrednotili z vidika retencijskih časov, cenovne dostopnosti, predvsem pa ločitve kromatografskih vrhov v primerjavi s preučevanimi analiti.

Osnovno raztopino internega standarda (IS) s koncentracijo 1,25 mg/mL smo pripravili tako, da smo 1,25 mg internega standarda kvantitativno prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko in ga raztopili v 1 mL metanola.

Osnovne standardne raztopine (OSR) s približno koncentracijo 3 mg/mL smo pripravili tako, da smo v 2 mL mikrocentrifugirko zatehtali posamezno učinkovino in jo raztopili v 1 mL metanola. Vse učinkovine, vključno z internimima standardoma, so bile dobro topne v metanolu.

Osnovne raztopine standardov in osnovni raztopini internega standarda smo hranili v hladilniku pri 4 °C približno 1 mesec do zaključka validacije bioanalizne metode, nato smo vse raztopine varno in ustrezno zavrgli.

### **3.2.1.2 Določitev kromatografskih pogojev**

Med razvojem HPLC metode (izbira kromatografske kolone in njene temperature, mobilne faze, pretoka mobilne faze in pogojev detekcije) smo iskali optimalne pogoje za analizo preiskovanih analitov. Največji poudarek smo namenili času (dolžini) analize, ter predvsem kromatografski ločbi vrhov preiskovanih analitov, internega standarda ter komponent iz plazme.

#### **Izbira kromatografske kolone**

Uporabili smo fenil-heksilno kromatografsko kolono Luna Phenyl-Hexyl dimenzije 150 x 4,6 mm z velikostjo delcev 5 µm in predkolono Gemini C6-Phenyl, 4 mm x 3,0 mm, da smo kolono zavarovali pred morebitnimi nečistotami. Izhodišče za izbiro kromatografske kolone je bila magistrska naloga Janje Ramšak z naslovom »Razvoj in validacija analizne metode za določanje plazemskih koncentracij karbamazepina, okskarbazepina in njunih presnovkov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (36)«.

### **Izbira in priprava mobilne faze**

Za vodno komponento mobilne faze smo uporabili fosfatni pufer z ionsko močjo 25 mM. Preizkusili smo različne pH vrednosti pufra: 3,0, 6,5, 6,8, 6,9, 6,95 in 7,0. Kot organsko komponento mobilne faze smo uporabili metanol. Mobilno fazo smo pripravljali vsak dan svežo z ločeno vodno in organsko komponento.

Razvoj metode smo začeli z izokratsko metodo. Za mobilno fazo smo uporabili 25 mM fosfatni pufer : metanol = 50:50 (v/v). Nadaljevali smo z gradientno metodo in preizkušali različne kombinacije deleža organske faze in sicer od 20 - 90 % v kombinaciji s spremenjenimi preostalimi dejavniki vpliva na kromatografijo preiskovanih analitov (T, različne pH vrednosti pufrov).

*Priprava pufrov (25 mM  $KH_2PO_4$ ) za mobilno fazo:* 3,403 g  $KH_2PO_4$  smo raztopili v 1000 mL prečiščene vode za kromatografijo. Za pripravo pufra pH vrednosti 3,0 smo pH meter umerili na 3 s standardno pufersko raztopino, ter nato pufersko raztopino nakisali do željenega pH s pomočjo klorovodikove kisline. Za pripravo pufrov s pH vrednostmi: 6,5, 6,8, 6,9, 6,95 in 7,0 smo pH meter umerili med 6 in 7 ter nato pufersko raztopino  $KH_2PO_4$  titrirali z raztopino natrijevega hidroksida do željene pH vrednosti. Pred uporabo puferske raztopine smo raztopino filtrirali preko 0,45  $\mu$ m celulozno acetatnega filtra, da smo odstranili morebitno prisotne delce in jo nato približno 20 minut razplinjevali v ultrazvočni kadički.

### **Izbira temperature kromatografske kolone**

Preizkusili smo različne temperature kolone: 40, 42, 45, 48 in 50 °C.

### **Izbira pretoka**

Preizkusili smo različne pretoke mobilne faze v območju od 0,5 – 1,5 mL/min.

### **Izbira valovne dolžine detekcije**

Odzive preučevanih analitov smo spremljali na detektorju z nizom diod (DAD), ki omogoča sočasno merjenje absorbance pri vseh valovnih dolžinah. Analite smo merili pri valovnih dolžinah 210, 215, 221, 230, 235, 260 in 280 nm. Za vsak preučevani analit smo določili tudi absorpcijski maksimum.



### **Izbira volumna injiciranja**

Razvoj metode smo začeli s 5  $\mu\text{L}$  volumni injiciranja in nato nadaljevali z 10 in 20  $\mu\text{L}$ .

### **Temperatura avtomatskega vzorčevalnika**

Temperaturo v avtomatskem vzorčevalniku smo nastavili na 4  $^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.2 Razvoj metode za pripravo plazemskih vzorcev**

Za pripravo plazemskih vzorcev smo uporabili osnovne metanolne raztopine analitov, iz katerih smo pripravili delovno raztopino analitov (preglednica V). Delovno raztopino analitov smo pripravili na osnovi referenčnega območja (preglednica III) za vsak preučevani analit.

Po pregledu objavljenih člankov (19-24) o določanju protiepileptičnih učinkovin v krvni plazmi s pomočjo HPLC-UV metode smo ugotovili, da so raziskovalci največkrat plazemske vzorce pripravljali s pomočjo ekstrakcije tekoče-tekoče ali tekoče – trdno. V naši raziskavi smo proteine plazme odstranili z uporabo različnih obarjalnih reagentov (preglednica IV) na osnovi enostavne precipitacije.

Razvoj metode za pripravo plazemskih vzorcev je potekal po spodaj navedenih točkah.

- **Določitev volumna plazme**

Ker so bili ciljana populacija otroci smo se odločili, da bo uporabljen volumen plazme čim manjši in sicer 100  $\mu\text{L}$ . Volumnu plazme smo prilagodili tudi kasnejši izbor obarjalnega reagenta in njegovega volumna.

*Plazemski vzorec:* v 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100  $\mu\text{L}$  plazme zdravega preiskovanca in dodali 25  $\mu\text{L}$  delovne raztopine analitov (priprava opisana v točki 3.3.1 magistrske naloge) ter raztopino intenzivno premešali na vrtinčnem mešalu približno 30 sekund.

- **Določitev obarjalnega reagenta**

Pri izbiri obarjalnega reagenta smo testirali različne kombinacije organskih topil v različnih volumskih deležih (preglednica IV). Vsa dodana organska topila so bila ohlajena na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Preglednica IV:** Testirane kombinacije organskih topil in volumskih deležev.

ZAP. ŠT.	OBARJALNI REAGENT	VOLUMEN OBARJALNEGA REAGENTA (mL)	VOLUMEN SUPERNATANTA (mL)
1.	acetonitril	300	250
2.	acetonitril	500	450
3.	acetonitril	800	700
			750
			800
4.	metanol	500	450
5.	metanol: acetonitril = 1 : 1	500	450

- Določitev pogojev centrifugiranja

Izhajali smo iz magistrske naloge Janje Ramšak z naslovom »Razvoj in validacija analizne metode za določanje plazemskih koncentracij karbamazepina, okskarbazepina in njihovih presnovkov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (36), kjer so vzorce centrifugirali 10 minut pri 4 °C pri 2,5 RCF.

- Volumen supernatanta

V kombinaciji različnih volumnov in tipov obarjalnega reagenta smo preizkusili različne volumne odvzetih supernatantov. Preizkušene kombinacije odvzetih volumnov supernatantov prikazuje preglednica IV.

- Sušenje organske faze

Organsko fazo smo posušili v dušikovi atmosferi pri povišanem tlaku. Čas sušenja je bil odvisen od števila vzorcev in intezitete dovoda dušika.

- Rekonstitucija in čas vrtnčnega mešanja po rekonstituciji

Pri tem parametru smo izhajali iz magistrske naloge Janje Ramšak (36), kjer so za raztapljanje suhega vzorca uporabili raztopino metanola in pufru v različnih volumskih razmerjih.

Pri rekonstituciji smo pufer nadomestili z vodo v razmerju 1 : 1 (v/v), ki je predstavljal topilo. Vzorce smo po rekonstituciji mešali na vrtničnem mešalniku 1 minuto.

*Priprava topila za redčenje in rekonstitucijo:* v merilnem valju smo zmešali 150 mL metanola in 150 mL prečiščene vode (v/v).

### 3.3 VALIDACIJA BIOANALIZNE METODE

Validacija analizne metode je sistematično dokumentiran postopek s katerim dokažemo, da analizna metoda z veliko gotovostjo zagotavlja ponovljive in točne rezultate kvantitativnih meritev preiskovanih analitov v biološkem matriksu (serum, kri, plazma, urin). Validacijo analizne metode smo izvedli v skladu s priporočili Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA) o validaciji bionaliznih metod. Ovrednotili smo naslednje validacijske parametre: selektivnost, točnost, ponovljivost, linearnost, uspešnost ekstrakcije, mejo določljivosti in stabilnost. Validacijo smo izvajali tri dni (37).

Pri vrednotenju zgoraj naštetih parametrov validacije smo pri odzivih vseh preučevanih analitov upoštevali razmerje odziva preučevanega analita in odziva internega standarda (IS). Vsak vzorec smo injicirali dvakrat ter določili povprečje odzivov. Odzivi analitov in internega standarda so predstavljale površine pod kromatografskimi vrhovi (*enačba 1*).

$$\text{Odziv} = \frac{\text{odziv analita}}{\text{odziv IS}} \quad (\text{enačba 1})$$

#### 3.3.1 Priprava delovne raztopine, standardnih in kontrolnih raztopin

Iz osnovnih raztopin preučevanih analitov (OSR) smo pripravili delovno raztopino standardov (DRS) (preglednica V). Delovno raztopino standardov smo pripravili v 2 mL mikrocentrifugirki z namenom kasnejše priprave umeritvene krivulje (preglednica VII) in kontrolnih raztopin (preglednica VIII). Kontrolne raztopine so predstavljali trije koncentracijski nivoji: nizki (QCl), srednji (QCm) in visoki (QCh). Pripravo delovne raztopine smo prilagodili glede na referenčno območje posameznih preiskovanih analitov tako, da je bila končna koncentracija analita 312,5 µg/mL, 187,5 µg/mL ali 62,5 µg/mL. Priprava delovne raztopine prikazuje preglednica V.

**Preglednica V:** Priprava delovne raztopine standardov (DRS).

ANALIT	VOLUMEN OSR/VODE/METANOLA ( $\mu\text{L}$ )	KONCENTRACIJA UČINKOVINE V DRS ( $\mu\text{g/mL}$ )
levetiracetam	100	312,5 $\mu\text{g/mL}$
zonisamid	100	
likarbazepin	100	
okskarbazepin	100	
lakoamid	60	187,5 $\mu\text{g/mL}$
karbamazepin	60	
fenitoin	60	
primidon	60	
lamotrigin	60	
karbamazepin-epoksid	10	62,5 $\mu\text{g/mL}$
klobazam	10	
prečiščena voda	10	/
metanol	230	/

Delovno raztopino internega standarda (D-IS) s koncentracijo 250  $\mu\text{g/mL}$  smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 250  $\mu\text{L}$  osnovne metanolne raztopine 10,11-dihidrokarbamazepina in dodali 750  $\mu\text{L}$  topila.

**Preglednica VI:** Priprava standardnih in kontrolnih raztopin.

OZNAKA RAZTOPINE	$V_{\text{DRS}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{TOPILA}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{D-IS}}$ ( $\mu\text{L}$ )
KAL 9	80	/	20
QCh	360	40	100
KAL 8	70	30	25
KAL 7	40	60	25
KAL 6	20	80	25
QCm	72	328	100
KAL 5	20	180	50
KAL 4	20	380	100
KAL 3	*50 (RS)	50	25
QCl	*180 (RS)	220	100
KAL 2	*50 (RS)	150	50
KAL 1	*25 (RS)	175	50

\*Priprava RS: 20  $\mu\text{L}$  DRS smo dodali 480  $\mu\text{L}$  metanola in dobro premešali.

Za postopek validacije smo nato iz standardnih in kontrolnih raztopin pripravili plazemske vzorce tako, da smo 100  $\mu\text{L}$  plazme dodali 25  $\mu\text{L}$  kalibracijske raztopine standardov (od

KAL 1 do KAL 9), oziroma QCl, QCm in QCh. Raztopine smo nato obdelovali po končnem postopku priprave plazemskih vzorcev, ki je opisan v poglavju 4.2. Končne koncentracije v posameznih kalibracijskih raztopinah za umeritveno krivuljo in kontrolnih vzorci prikazujeta preglednica VII in preglednica VIII.

**Preglednica VII:** Koncentracija protiepileptičnih učinkovin v standardnih raztopinah za umeritveno krivuljo.

ANALIT	KONCENTRACIJA ANALITOV V STANDARDNIH RAZTOPINAH ( $\mu\text{g/mL}$ )								
	KAL9	KAL8	KAL7	KAL6	KAL5	KAL4	KAL3	KAL2	KAL1
LEVE ZONI LIKAR OKS	50	35	20	10	5	2,5	1	0,5	0,25
LAKO KARBA FENI PRIMI LAMO	30	21	12	6	3	1,5	0,6	0,3	0,15
KARBA- EPO KLOBA	5	3,5	2	1	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025

**Preglednica VIII:** Koncentracija posameznih protiepileptičnih učinkovin v kontrolnih raztopinah.

ANALIT	KONCENTRACIJA UČINKOVIN V KONTROLNIH RAZTOPINAH ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	QCl	QCm	QCh
LEVE ZONI LIKAR OKS	0,9	9	45
LAKO KARBA FENI PRIMI LAMO	0,54	5,4	27
KARBA-EPO KLOBA	0,09	0,9	4,5

### 3.3.2 Selektivnost

Selektivnost je sposobnost analizne metode, da loči preučevani analit od ostalih komponent, ki so morebiti prisotne v vzorcu (urin, plazma, metaboliti, razgradni produkti, zdravila, ki jih bolnik sočasno uživa in druge snovi v vzorcu) in na ta način omogoča njegovo določanje v preučevanem biološkem vzorcu (37). Selektivnost naše analizne metode smo preverili z analizo 5 slepih plazemskih vzorcev, ki so bili odvzeti petim različnim zdravim preiskovancem in z analizo topila. Dobljene kromatograme slepih plazemskih vzorcev smo nato ovrednotili pri meji določljivosti in preučili ali se ob retencijskih časih analitov pojavijo moteči kromatografski vrhovi (endogene substance in razpadni produkti).

Priprava slepega vzorca plazme: v 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100  $\mu$ L plazme zdravega preiskovanca in dodali 25  $\mu$ L topila ter raztopino intenzivno premešali na vrtinčnem mešalu približno 30 sekund. Raztopino smo nato obdelovali po končnem postopku priprave plazemskih vzorcev, ki je opisan v poglavju 4.2.

### 3.3.3 Točnost

Točnost analizne metode izraža ujemanje med izmerjeno koncentracijo analita, ki smo jo določili z analizno metodo in referenčno (dejansko) koncentracijo analita. FDA priporoča določitev točnosti na vsaj treh koncentracijskih nivojih, ki so enakomerno porazdeljeni čez celotno območje in se analizirajo v vsaj petih ponovitvah (37).

Točnost smo določili z analizo QCl, QCm, QCh znanih koncentracij analitov. Točnost analizne metode smo izračunali z enačbo 2, kjer je  $c_{povprečna}$  (izmerjena) aritmetična sredina petih izmerjenih vrednosti za vsak QC.

$$Točnost [\%] = \frac{c_{povprečna} (izmerjena)}{c (referenčna)} \times 100 \quad (enačba 2)$$

#### **Kriterij**

Povprečje izmerjenih vrednosti ne sme odstopati od referenčne vrednosti za več kot 15 %. Izjema je spodnja meja določljivosti, kjer je dovoljeno odstopanje znotraj 20 % referenčne vrednosti (37).

### 3.3.4 Ponovljivost

Ponovljivost analizne metode je definirana kot ujemanje večkratnih meritev posameznih koncentracij analita, pripravljenih in izmerjenih pri istem homogenem vzorcu v predpisanih pogojih. Je merilo za natančnost uporabljenega postopka. Smernice FDA priporočajo določitev ponovljivosti na vsaj treh koncentracijskih nivojih, ki so enakomerno porazdeljeni čez celotno območje in se analizirajo v vsaj petih ponovitvah (37). Tudi mi smo ponovljivost metode določali z analizo QCl, QCm in QCh vzorcev v petih ponovitvah tekom treh dni validacije. Nato smo jo ovrednotili s koeficientom variacije (CV). Pri vrednotenju analizne metode smo določili med-dnevno in znotraj-dnevno ponovljivost za vse tri dni validacije.

#### *Kriterij*

Koeficient variacije ne sme biti večji od 15 % pri petih ponovitvah na vsaj treh različnih koncentracijskih nivojih. Izjema je vzorec na spodnji meji določljivosti, kjer koeficient variacije ne sme biti večji od 20 % (37).

### 3.3.5 Območje metode

Območje metode predstavlja interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, v katerem analizna metoda še ustreza zahtevanim kriterijem točnosti, ponovljivosti in linearnosti. Običajno območje metode določamo v območju linearnosti analizne metode (37).

### 3.3.6 Linearnost metode

Linearnost je lastnost metode, s katero lahko znotraj določenega območja (intervala) določimo meritve vzorcev, ki so lahko neposredno ali po pretvorbi z uporabo matematičnih postopkov premosorazmerne s koncentracijami preučevanih analitov v vzorcu. V območju linearnosti metode je odziv inštrumenta oziroma detektorja neposredno sorazmeren koncentraciji analita v vzorcu. Linearnost razmerja med spremenljivko koncentracija analita v vzorcu in odzivom preverimo s pomočjo regresijske premice z *enačbo 3* (38).

$$y = kx + n \quad (\text{enačba 3})$$

kjer je:

y - odziv (npr. površina pod kromatografskim vrhom analita oziroma razmerje površin pod kromatografskima vrhoma analita in IS,

n - odsek na ordinatni osi,

x - koncentracija analita v vzorcu in

k - naklon regresijske premice.

Statistični model je premica, ki opisuje odnos med koncentracijo analita in izmerjenim odzivom (signalom). Korelacijo med odzivom in koncentracijo podamo s Pearsonovim korelacijskim ( $r$ ), oziroma determinacijskim koeficientom ( $r^2$ ). Zaželjeno je, da so njegove vrednosti čim višje, oziroma blizu vrednosti 1. Linearnost odnosa potrdimo vizualno ter z vrednostima korelacijskega koeficienta in odseka z ordinatno osjo. Njuna meja je postavljena glede na namen analizne metode (38). Linearnost metode smo določili s pomočjo kalibracijskih standardnih raztopin (KAL 1–KAL 9), priprava katerih je navedena v točki 3.3.1 (preglednica VI). Na podlagi meritev smo določili odzive v odvisnosti od koncentracije, ter določili enačbe umeritvenih premic in determinacijske koeficiente.

### ***Kriterij***

Priporočilo FDA je, da se za določanje linearnosti uporabi najmanj šest standardnih kalibracijskih raztopin. Najmanj 75 % standardnih vzorcev mora pri izračunu koncentracij analitov iz umeritvene premice odstopati za manj kot 15 % od njihove referenčne (nominalne) vrednosti koncentracije, oz. za 20 % v primeru vzorca na spodnji meji določljivosti (37).

### **3.3.7 Spodnja meja določljivosti (LLOQ)**

Spodnja meja določljivosti (LLOQ) predstavlja standard z najnižjo koncentracijo v umeritveni krivulji, ki jo z izbrano analizno metodo lahko kvantitativno ovrednotimo z želeno točnostjo in natančnostjo. Po FDA smernicah je to najnižja točka v umeritveni premici, ki mora ustrezati spodaj opisanim kriterijem (37).

### ***Kriterij***

Smernice FDA priporočajo, da je koncentracija LLOQ tista vrednost, pri kateri je odziv analita vsaj 5 krat višji od odziva pri analizi slepega vzorca. Koeficient variacije mora imeti ponovljivost znotraj 20% in točnost med 80 in 120 % (37).



### 3.3.8 Izkoristek metode

Uspešnost izkoristka metode (ang. recovery) za vseh 11 preučevanih analitov smo vrednotili tako, da smo primerjali povprečne odzive analitov plazemskih vzorcev (ekstrahirani plazemski vzorec) s standardnimi vodnimi vzorci (ekstrahirani slepi vzorec, matriks je voda) na treh koncentracijskih nivojih (QCl, QCm in QCh). Ker nas je poleg učinkovitosti izkoristka zanimala tudi ponovljivost izkoristka metode, smo izvedli po 5 meritev za vsako od koncentracij. Vodni vzorci so predstavljali 100 % uspešnost ekstrakcije.

*Priprava vodnega vzorca:* v 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100 µL prečiščene vode in dodali 25 µL DRS na posameznem koncentracijskem nivoju ter raztopino intenzivno premešali na vrtničnem mešalu približno 30 sekund. Raztopino smo nato obdelovali po končnem postopku priprave plazemskih vzorcev, ki je opisan v poglavju 4.2.

### 3.3.9 Stabilnost

Analizo stabilnosti plazemskih vzorcev smo izvedli v skladu s priporočili smernic FDA, kjer smo v sklopu validacije ocenili naslednje vrste stabilnosti: kratkoročno in dolgoročno stabilnost analitov v plazemskih vzorcih, post-preparativno stabilnost plazemskih vzorcev analitov in stabilnost plazemskih vzorcev po zamrzovanju in odtajanju. Stabilnost smo izračunali kot relativno razliko med merjenjem po določenem času ( $t_x$ ) in začetnim merjenjem ( $t_0$ ) (enačba 4) (37).

$$\text{Relativna razlika (\%)} = \frac{\text{odziv pri } t(x) - \text{odziv pri } t(0)}{\text{odziv pri } t(0)} \times 100 \quad (\text{enačba 4})$$

#### 3.3.9.1 Kratkoročna in dolgoročna stabilnost

Kratkoročno stabilnost analitov v plazemskih vzorcih smo v skladu s smernicami FDA izvedli s pomočjo kontrolnih vzorcev na treh koncentracijskih nivojih, ki so enakomerno porazdeljeni čez celotno območje metode (QCl, QCm, QCh). Dolgoročno stabilnost smo izvedli s pomočjo kontrolnih vzorcev na dveh koncentracijskih nivojih (QCm in QCh) (37). Plazemske vzorce za kratkoročno in dolgoročno stabilnost smo pripravili v treh paralelkah tako, da smo na vsakem koncentracijskem nivoju 100 µL plazme dodali 25 µL

kontrolnega vzorca za posamezen koncentracijski nivo. Za oceno kratkoročne stabilnosti analitov smo nato tako pripravljeno raztopino do nadaljnje obdelave vzorcev in analize shranili 1 dan v laboratoriju na delovni površini pri sobni temperaturi. Za oceno dolgoročne stabilnosti pa smo tako pripravljene vzorce do nadaljnje obdelave in analize zamrznili na  $- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  za obdobje približno 1 mesec. Po preteku časa hrambe vzorcev kratkoročne in dolgoročne stabilnosti smo nato izvedli ekstrakcijo in analizo vzorcev, ter dobljene odzive primerjali z izmerjenimi odzivi vzorcev, ki smo jih takoj ekstrahirali in analizirali ( $t_0 = \text{čas } 0$ ).

### **3.3.9.2 Post-preparativna stabilnost**

Post-preparativna stabilnost odraža stabilnost že pripravljenih plazemskih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku HPLC pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in sicer za čas, ki se predvideva, da bo v rutinski uporabi potreben za analizo vzorca (37). Izvedli smo 24 – urno post preparativno stabilnost v treh paralelkah s pomočjo kontrolnih vzorcev (QCl, QCm, QCh), ki so enakomerno porazdeljeni čez celotno območje metode. Vzorce smo pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 4.2 in jih nato analizirali prvi dan validacije, takoj po njihovi pripravi ter po 24 – urnem hranjenju v avtomatskem vzorčevalniku HPLC pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nato smo primerjali odzive raztopin analitov po 24 urah glede na odzive neposredno po pripravi.

### **3.3.9.3 Stabilnost plazemskih vzorcev po zamrzovanju in odtajanju**

Stabilnost plazemskih vzorcev po zamrzovanju in odtajanju smo opredlili skladno s smernicami FDA, ki navajajo, da je potrebno stabilnost analita določiti po treh izvedenih ciklih zamrzovanja in odtajanja vzorca (37). Stabilnost smo ocenili s pomočjo kontrolnih vzorcev (QCl, QCm, QCh), ki so enakomerno porazdeljeni čez celotno območje metode, ki smo jih pripravili po postopku opisanem v poglavju 4.2. Na vsakem koncentracijskem nivoju, smo pripravili 3 paralelke vzorcev. V vsakem ciklu zamrzovanja in odtajanja smo vzorce zamrznili za najmanj 12 ur na  $- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nato pa jih odtalili pri sobni temperaturi. Vzorec smo analizirali po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja in primerjali odzive z odzivi neposredno po pripravi vzorcev.

### **3.3.10 Vrednotenje rezultatov validacije analizne metode**

Za lažje razumevanje in predstavitev dobljenih rezultatov smo za vrednotenje podatkov uporabili program Excel (Microsoft Office 2010). Na osnovi določenih naklonov

umeritvenih premic in odsekov na ordinatni osi standardnih plazemskih vzorcev smo nato vsem 11 preučevanim analitom na podlagi teh rezultatov določili posamezne koncentracije v realnih vzorcih bolnikov z epilepsijo z upoštevanjem internega standarda.

### 3.3.11 Analiza vzorcev bolnikov

Validirano analizno metodo smo v nadaljevanju uporabili za določanje celokupnih plazemskih koncentracij analitov pri 10 pacientih na terapiji s protiepileptičnimi zdravili in morebitnimi drugimi sočasnimi zdravili (preglednica IX). Plazemske vzorce smo do pričetka analize hranili v polipropilenskih epruvetah na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na dan analize smo plazmo odtalili pri sobni temperaturi. Koncentracije analitov v vzorcih bolnikov smo ovrednotili na osnovi sočasno analiziranih standardnih plazemskih vzorcev. Za analizo plazemskih vzorcev smo uporabili  $100\text{ }\mu\text{L}$  vsakega plazemskega vzorca.

*Priprava realnih plazemskih vzorcev bolnikov:* v  $2\text{ mL}$  mikrocentrifugirko smo odpipetirali  $100\text{ }\mu\text{L}$  predhodno pri sobni temperaturi odtaljenega in dobro premešanega plazemskega vzorca posameznega bolnika in dodali  $25\text{ }\mu\text{L}$  internega standarda s koncentracijo  $0,2\text{ }\mu\text{g/mL}$  in  $400\text{ mL}$  topila. Rastopino smo nato intenzivno premešali na vrtničnem mešalu približno 30 sekund in jo nato obdelovali po končnem postopku priprave plazemskih vzorcev, ki je opisan v poglavju 4.2.

**Preglednica IX:** Realni vzorci 10 pacientov na terapiji s protiepileptičnimi zdravili, oz. drugimi sočasnimi zdravili, ki smo jih uporabili za analizo.

PACIENT ŠT.	PROTIEPILEPTIČNO ZDRAVILO/ DNEVNI ODMEREK	PROTIEPILEPTIČNO ZDRAVILO/ DNEVNI ODMEREK	PROTIEPILEPTIČNO ZDRAVILO/ DRUGA SOČASNA ZDRAVILA
<b>B10</b>	LAMOTRIGIN (400mg)	LAKOZAMID (200mg)	/
<b>B26</b>	LAMOTRIGIN (300mg)	KARBAMAZEPIN (800mg)	escitalopram
<b>B27</b>	LAMOTRIGIN (600mg)	OKSKARBAZEPIN (2400mg)	/
<b>B37</b>	LAMOTRIGIN (400mg)	KLOBAZAM (15mg)	levotiroksin
<b>B40</b>	LAMOTRIGIN (150mg)	ZONISAMID (300mg)	valprojska kislina, diosmin, acetilsalicilna kislina, hesperidin, folna kislina
<b>B67</b>	LAMOTRIGIN (250mg)	KARBAMAZEPIN (800mg)	/

<b>B80</b>	LAMOTRIGIN (400mg)	OKSKARBAZEPIN (1200mg)	fenobarbital
<b>B86</b>	LAMOTRIGIN (400mg)	FENTOIN (100mg)	ecitalopram, duloksetin
<b>B95</b>	LAMOTRIGIN (300mg)	LEVETIRACETAM (1500mg)	/
<b>B98</b>	LAMOTRIGIN (300mg)	OKSKARBAZEPIN (1200mg)	acetilsalicilna kislina, simvastatin, losartan flutikazon

Po uporabi smo vse uporabljene vzorce in uporabljene pripomočke varno in ustrezno zavrgli. Med samo izvedbo testa smo upoštevali vse varnostne predpise in navodila za delo v laboratoriju in se ustrezno zaščitili z zaščitnimi in dezinfekcijskimi sredstvi.

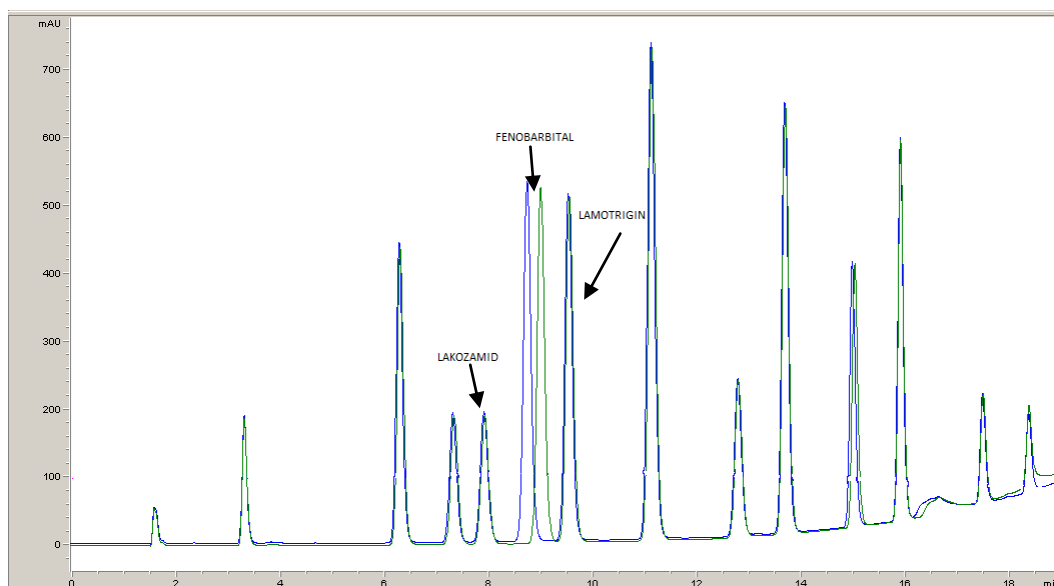
## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Razvoj analizne metode s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z UV detekcijo

Na osnovi pregleda objavljenih člankov je bila najpogosteje uporabljena tehnika za določanje protiepileptičnih učinkovin tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) z različnimi vrstami detekcije (19-24). Kromatografsko kolono smo izbrali na osnovi predhodnih raziskav (36). Uporabili smo fenil heksilno kromatografsko kolono Luna Phenyl-Hexyl dimenzije 150 mm x 4,6 mm in velikostjo delcev 5  $\mu\text{m}$ . Uporabili smo tudi predkolono Gemini C6-Phenyl, 4 mm x 3,0 mm. Preučevali smo vpliv izbrane kolone na trajanje analize ter obliko in ločbo kromatografskih vrhov od ostalih sestavin plazme. Izbrana kolona s fenilno-heksilnimi skupinami se je izkazala za zelo primerno, saj imajo vsi preučevani analiti aromatske obročje, ki omogočajo  $\Pi$ - $\Pi$  interakcije s stacionarno fazo.

Pri izbiri vodne komponente mobilne faze smo izhajali iz iste raziskave v kateri so testirali različne fosfatne pufre z različnimi ionskimi močmi (36). Izbrali smo 25 mM fosfatni puffer, ki ima manjšo kapaciteto. Tekom preizkušanja različnih pH vrednosti vodne faze smo ugotovili, da pH vrednost 25 mM fosfatnega pufru 6,9 omogoča zadostno ločljivost in hitro elucijo vseh preučevanih vrhov (analitov), vključno z internim standardom. Pri nižjih vrednostih (pH = 3,0) nismo dosegli ustrezne ločbe preučevanih vrhov, predvsem smo imeli neustrezno ločbo vrha fenobarbitala, ki je zelo močno odvisen od vrednosti pH. Nižje vrednosti pH so povzročile elucijo fenobarbitala pri višjih retencijskih časih in obratno, kar je močno vplivalo na ločbo kasnejših vrhov. Izrazit vpliv na elucijo vrha fenobarbitala pa

je imela tudi temperatura kromatografske kolone. Nižja temperatura kolone je povzročila elucijo vrha fenobarbitala pri daljših retencijskih časih in obratno. Vrh fenobarbitala se je eluiral skupaj z vrhovoma lakozamida in lamotrigina. Kljub gradientni eluciji in optimizaciji pH vrednosti pufru ter temperature kolone se je eluiral med obema omenjenima vrhovoma, posledica slednjega pa je bila neustrezna kromatografska ločba (*slika 6* in *slika 7*). Končno shemo gradientne elucije prikazuje preglednica X. Kljub nadaljnji optimizaciji metode in iskanju ustreznih rešitev se prekrivanju vrhov nismo mogli izogniti, zato smo se odločili, da fenobarbital izključimo iz naše raziskave. Kot organsko fazo smo uporabili metanol, tudi iz stališča uporabe fenil-heksilne kromatografske kolone, kjer metanol omogoča  $\Pi - \Pi$  interakcije med aromatskimi obroči analitov in stacionarno fazo.



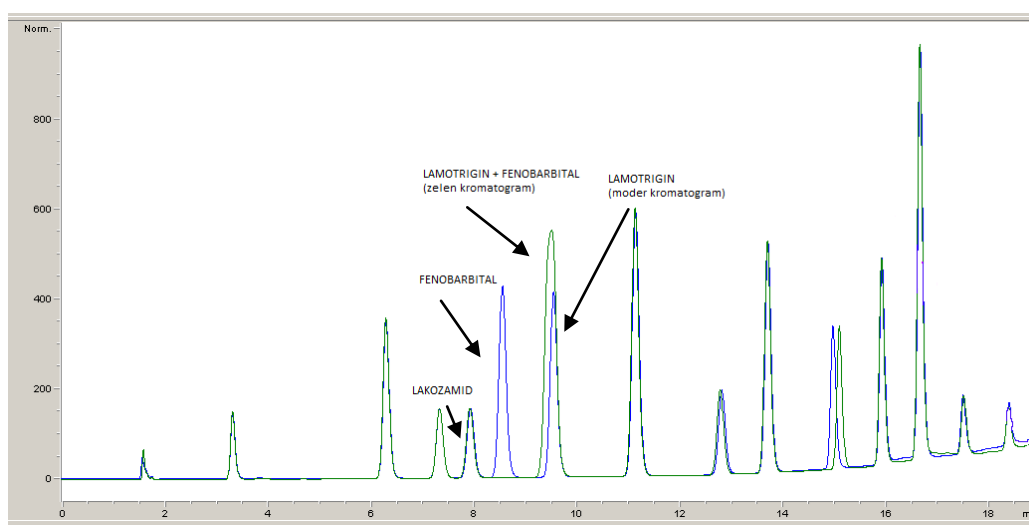
**Slika 6:** Prekrivajoča razvojna kromatograma preučevanih analitov in prikaz vpliva temperature kromatografske kolone: 40 °C (zelena barva) in 50 °C (modra barva) na elucijo vrha fenobarbitala med vrhovoma lakozamida in lamotrigina, pri valovni dolžini 210 nm.

Kljub temu, da smo želeli za delo enostavno in ponovljivo metodo, se je tekom razvoja izkazalo, da izokratski tip metode daje predolge čase kromatografiranja, slabo ločbo in nesimetrične vrhove analitov. Zato smo se odločili za gradientno elucijo, ki je povzročila zožanje kromatografskih vrhov in krajši čas elucije v primerjavi z izokratsko elucijo za vseh 12 vrhov analitov. Vrhovi preučevanih analitov so bili ustrezne oblike, dosegli smo tudi boljšo kromatografsko ločbo med preučevanimi vrhovi, vendar je končni čas analize

sorazmeroma dolg. Celotna analiza je s končno razvito metodo trajala 22 minut, čas reekvilibracije pa je bil 4 minute.

**Preglednica X:** Shema gradientne elucije uporabljena pri končni analizi.

ČAS (min)	% organske faze (metanol)
0	35
5	40
10	50
15	70
19	86



**Slika 7:** Prekrivajoča razvojna kromatograma preučevanih analitov in prikaz vpliva pH vrednosti 3,0 (zeleno barvo) in 6,8 (modro barvo) 25 mM fosfatnega pufrana na elucijo vrha fenobarbitala med vrhovoma lakozamida in lamotrigina, pri valovni dolžini 210 nm.

Končna temperatura kromatografske kolone je bila 40 °C, ki je v kombinaciji z gradientno elucijo močno pripomogla h krajšemu času elucije vrhov in njeni obliki. Z višanjem temperature smo vplivali na selektivnost in velikost vrhov. Temperatura avtomatskega vzorčevalnika je bila zaradi preučevanega biološkega materiala 4 °C, končni pretok mobilne faze pa 1 mL/min. Višji pretok je povzročil visok tlak na koloni, ki je v primeru končne analize znašal približno 100 barov. Pri končni izbiri volumna injiciranja, ki je odvisen od koncentracije in ponovljivosti odziva analita smo se odločili za volumen 20 µL. Po vsakem vmesnem injiciranju se nam je igla za injiciranje spirala v mešanici vode in metanola (50 : 50, v/v). S tem smo preprečili ostajanje analitov na igli za injiciranje in s

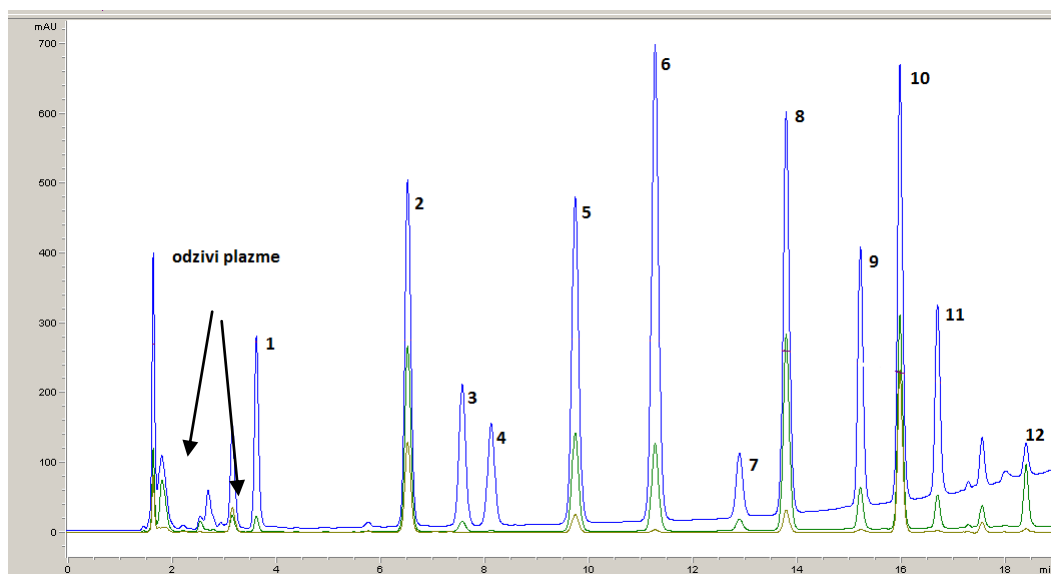
tem prenos na naslednje injiciranje, kar bi se pri določanju tako nizkih koncentracij odražalo v lažno višjih vrednostih.

Pri izbiri internega standarda smo se odločali med kloramfenikolom in 10,11-dihidrokarbamazepinom. Ustreznost internega standarda smo ovrednotili z vidika retencijskih časov in ločitve kromatografskih vrhov v primerjavi s preučevanimi analiti in ostalimi sestavinami plazme. Slednje smo potrdili s končno izbiro internega standarda 10,11-dihidrokarbamazepina, ki se je eluiral pri retencijskem času približno 16,6 minut.

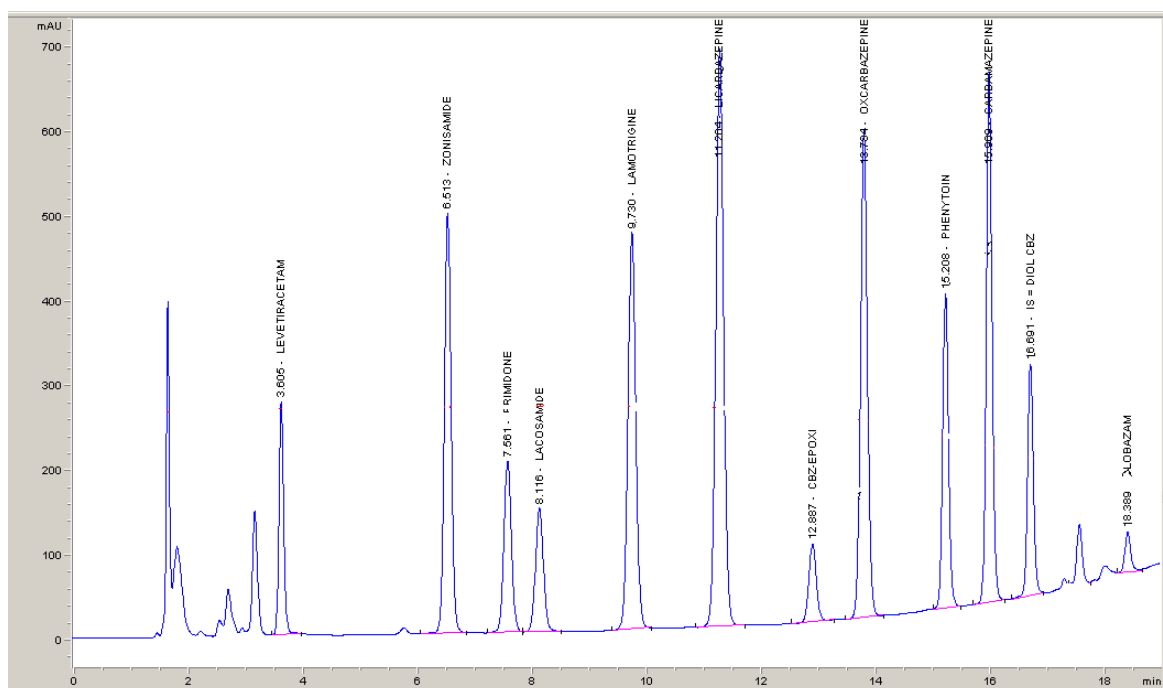
Pri izbiri valovne dolžine za detekcijo analitov smo vsakemu preučevanemu analitu določili absorpcijski maksimum (preglednica XI). Analite smo na podlagi absorpcijskih maksimumov učinkovin razdelili v tri skupine in jih detektirali pri za njih najbolj optimalni valovni dolžini (210 nm, 235 nm in 280 nm). Uporabili smo DAD detektor, ki je omogočil sočasno detekcijo pri različnih valovnih dolžinah. Razvrstitev posameznih analitov glede na odzive vrhov analitov pri določenih valovnih dolžinah v končni kromatografski metodi so prikazane v preglednici XI. Pri valovni dolžini 210 nm so izrazito vidni vrhovi plazme, ki so zadostno ločeni od preučevanih analitov, ki se eluirajo ob kasnejših retencijskih časih.

**Preglednica XI:** Prikaz retencijskih časov in absorpcijskih maksimumov preiskovanih analitov v končni kromatografski metodi.

VALOVNA DOLŽINA (nm)	PREUČEVANI ANALIT	RETENCIJSKI ČAS (min)	ABSORPCIJSKI MAKSIMUM (nm)
210	levetiracetam	3,6	220
	zonisamid	6,6	200, 240, 285
	primidon	7,6	220
	lakoamid	8,2	210
	lamotrigin	9,8	310
	likarbazepin	11,3	240
	karbamazepin-epoksid	12,9	220
235	okskarbazepin	13,8	210, 260, 310
	fenitoin	15,2	220
280	klobazam	18,3	230
	karbamazepin	16,8	280



**Slika 8:** Prekrivajoči se kromatogrami pri izbranih valovnih dolžinah, pri katerih smo izvedli končno detekcijo (kromatogrami: moder - 210 nm, tm. zelen - 235 nm, sv. zelen - 280 nm). Zaporedne številke na kromatogramu predstavljajo naslednje učinkovine: 1 - levetiracetam, 2 - zonisamid, 3 - primidon, 4 - lakozamid, 5 - lamotrigin, 6 - likarbazepin, 7 - karbamazepin-epoksid, 8 - okskarbazepin, 9 - fenitoin, 10 - IS, 11 - karbamazepin, 12 - klobazam.



**Slika 9:** Kromatogram raztopine standarda KAL 9 za umeritveno krivuljo pri valovni dolžini 210 nm.

Primernost končno razvite HPLC metode z UV detekcijo smo v nadaljevanju ovrednotili z validacijo.

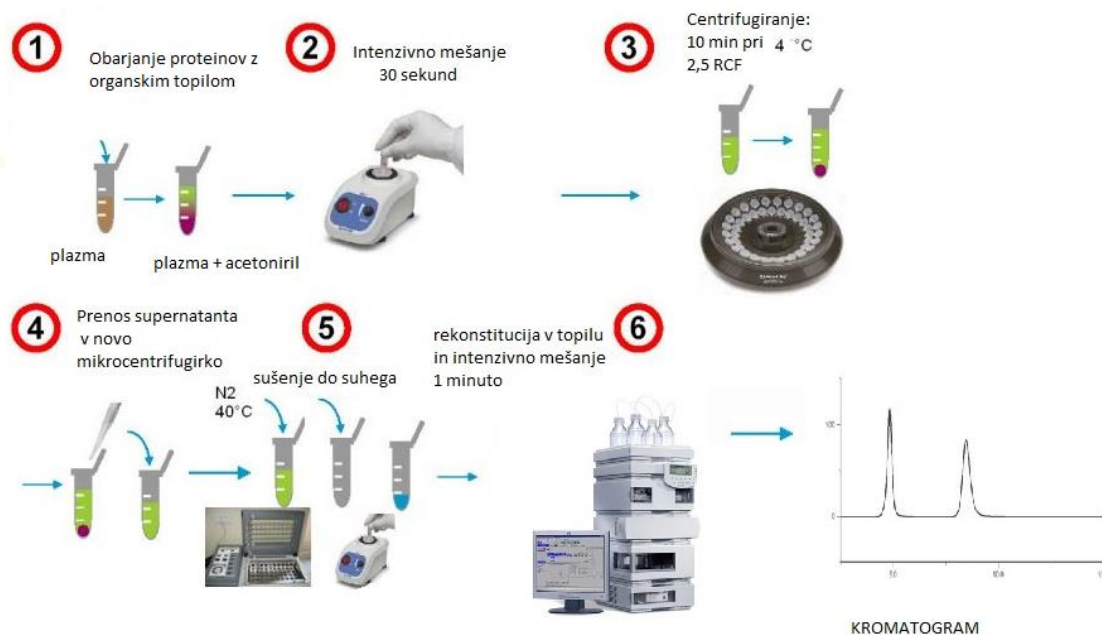


## 4.2 Razvoj metode za pripravo plazemskih vzorcev

V prvi stopnji smo na osnovi referenčnega območja (preglednica III) za vsak preučevani analit določili posamezne koncentracije analitov. Za pripravo osnovnih raztopin smo zaradi dobre topnosti uporabili metanol. Kot medij za vmesno redčenje raztopin smo uporabili mešanico metanola in prečiščene vode za kromatografijo. Ker so bili ciljna populacija otroci, smo za razvoj analizne metode že na začetku eksperimentalnega dela določili čim manjši volumen odvzete plazme in sicer 100  $\mu\text{L}$ . Ker smo želeli enostaven postopek priprave plazemskih vzorcev smo izbrali metodo z obarjanjem proteinov. Vzorcem plazme smo dodali preučevane analite in intenzivno premešali. Obarjanje proteinov iz plazme smo pospešili z dodajanjem ohlajenega obarjalnega reagenta. Pri preizkušanju različnih kombinacij; tipov in volumnov obarjalnih reagentov je bila najboljša izbira na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ohlajen acetonitril. V primerjavi s preostalima dvema; metanolom in mešanico metanola in acetonitrila, so bili vzorci po mešanju na vrtinčnem mešalu in centrifugiranju bolj čisti. Zaradi boljše ponovljivosti smo za končni volumen dodanega obarjalnega reagenta izbrali največji volumen 800  $\mu\text{L}$ . Po 10 minutah centrifugiranja pri temperaturi  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in s hitrostjo 2,5 RCF smo se odločili, da bomo kot končni volumen odvzetega supernatanta izbrali volumen 800  $\mu\text{L}$ . Največji volumen 900  $\mu\text{L}$  ni bil primeren, saj smo pri pipetiraju posrkali oborjene ostanke plazme. Ekstrahirane vzorce smo nato glede na število vzorcev različno dolgo sušili do suhega ostanka v dušikovi atmosferi pri povečanem tlaku. Posušene vzorce smo nato rekonstituirali v 100  $\mu\text{L}$  topila in nato raztopino intenzivno mešali 1 minuto na vrtinčnem mešalu. Končno raztopino smo nato prenesli v HPLC vialo z insertom. Končno pripravo plazemskih vzorcev po korakih prikazuje preglednica XII in shematsko slika 10. Čas mešanja (1 minuto), smo izbrali na podlagi predhodne raziskave v kateri so testirali različne čase vrtinčnega mešanja po rekonstituciji. Metoda je bila najbolj ponovljiva, ko je bil čas mešanja 1 minuto (36). Izbiro in uspešnost obarjanja z izbranim organskim topilom smo ugotavljali po postopku, ki je opisan v podpoglavju 4.3.4 Izkoristek metode.

**Preglednica XII:** Posamezni koraki priprave plazemskih vzorcev v končni metodi .

FAZA	POSTOPEK PRIPRAVE	
<b>MEŠANJE</b>	100 $\mu$ L plazemskega vzorca + 25 $\mu$ L DRS	mešanje na vrtničnem mešalu 30 sekund
<b>OBARJANJE</b>	dodamo 800 $\mu$ L acetonitrila (ohlajenega na - 20 °C)	mešanje na vrtničnem mešalu 30 sekund
<b>CENTRIFUGIRANJE</b>	centrifugiramo 10 minut pri 4 °C in 2,5 RCF	
<b>ODVZEM SUPERNATANTA</b>	odvzamemo 800 $\mu$ L supernatanta	
<b>SUŠENJE ORGANSKE FAZE</b>	sušimo do suhega ostanka v dušikovi atmosferi pri povečanem tlaku	
<b>REKONSTITUCIJA</b>	dodamo 100 $\mu$ L topila	mešanje na vrtničnem mešalu 1 minuto
<b>PRENOS V HPLC VIALO Z INSERTOM IN ANALIZA</b>		

*Slika 10: Shematski prikaz končne priprave plazemskih vzorcev.*

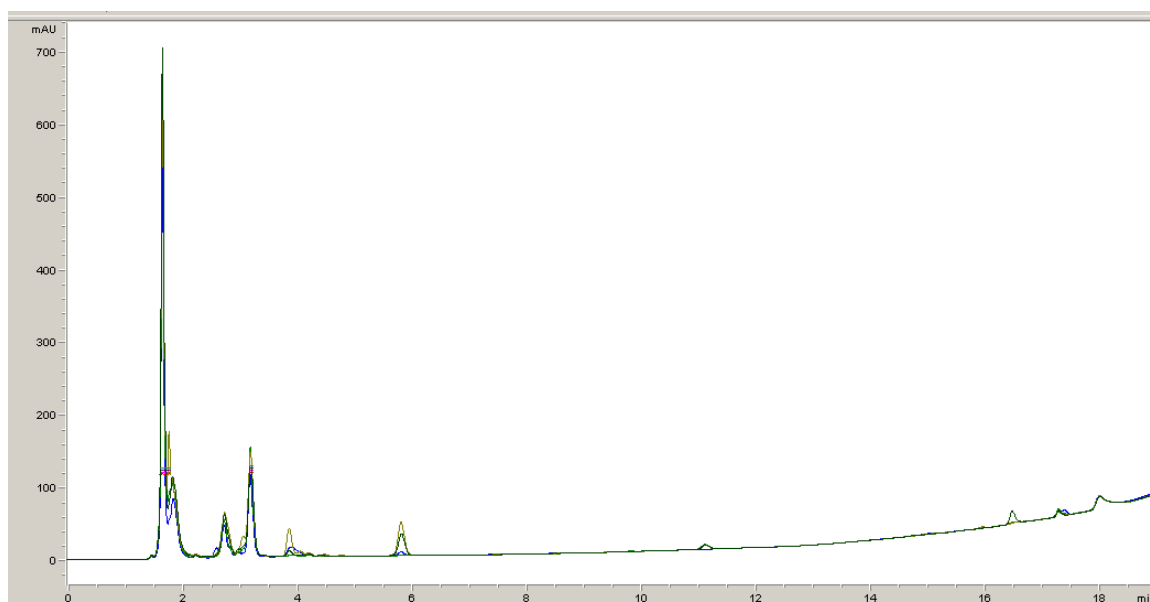
### 4.3 Rezultati validacije analizne metode

Z validacijo analizne metode, smo želeli potrditi ustreznost, primernost in zanesljivost analizne metode za določanje celokupnih plazemskih koncentracij protiepileptičnih zdravil: levetiracetama, zonisamida, primidona, lakoamida, lamotrigina, fenitoina, klobazama, okskarbazepina in njegovega metabolita likarbazepina ter karbamazepina in njegovega metabolita karbamazepin epoksida. V skladu s smernicami FDA smo jo izvajali

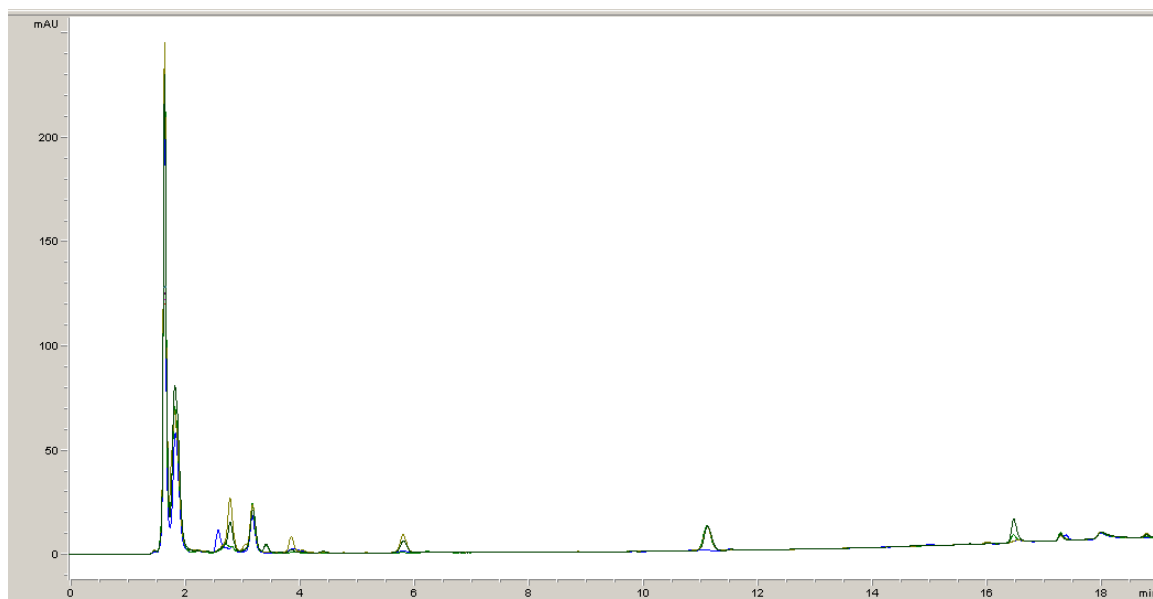
tri dni. Pri podajanju in vrednotenju rezultatov smo upoštevali interni standard (10,11-dihidrokarbamazapin) tako, kot narekujejo smernice FDA.

### 4.3.1 Selektivnost

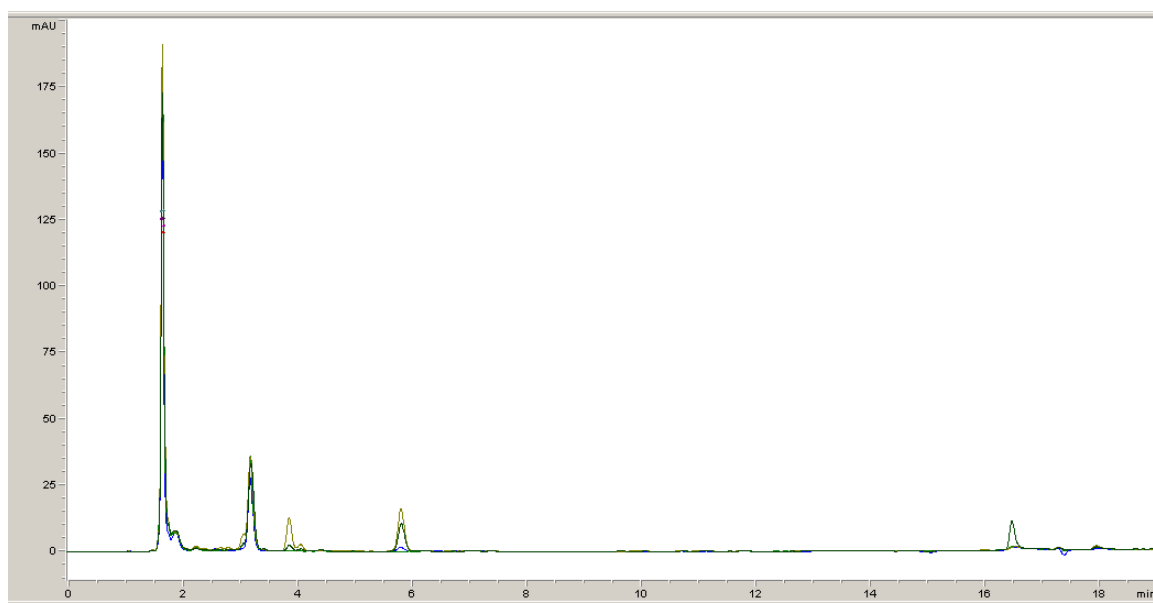
Selektivnost analizne metode smo dokazali z analizo 5 slepih plazemskih vzorcev, različnih zdravih preiskovancev. Posneli smo pet kromatogramov pri izbranih valovnih dolžinah (*slika 11 - 13*) kjer smo preverili ali so pri času elucije preiskovanih analitov in internega standarda prisotni vrhovi spojin iz matriksa vzorca in ali morebiti prihaja do interferenc. V področju retencijskih časov analitov nismo opazili motečih vrhov endogenih substanc, oziroma so bili petkrat manjši od vrha najnižjega standarda zato smo potrdili selektivnost naše analizne metode.



**Slika 11:** Prekrivajoči se kromatogrami slepih plazemskih vzorcev petih preiskovancev pri valovni dolžini 210 nm.



*Slika 12: Prekrivajoči se kromatogrami slepih plazemskih vzorcev petih preiskovancev pri valovni dolžini 235 nm.*



*Slika 13: Prekrivajoči se kromatogrami slepih plazemskih vzorcev petih preiskovancev pri valovni dolžini 280 nm.*

#### **4.3.2 Linearnost (območje metode) in spodnja meja določljivosti (LLOQ)**

Linearnost metode smo določali tri dni validacije s pomočjo kalibracijskih standardov, ki so predstavljali umeritveno premico. Za vsak analit smo na osnovi referenčnega območja določili pričakovane vrednosti koncentracij kalibracijskih standardov na vsakem koncentracijskem nivoju. Odziv kalibracijskih standardov je bil sorazmeren njihovi

koncentraciji v koncentracijskem območju. Za vsak preučevani analit smo določili območje analizne metode, ki je predstavljalo interval med najnižjo (LLOQ) in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu. Iz odzivov v standardnih (kalibracijskih) plazemskih vzorcih smo določili enačbe umeritvenih krivulj in determinacijski koeficient za posamezen preučevani analit.

Območje metode predstavlja interval v katerem smo v skladu s smernicami FDA potrdili kriterij za točnost ( $\pm 15\%$ ), ponovljivost in linearnost umeritvene premice. Analizna metoda je v vseh treh dneh validacije ustrezala FDA kriterijem za vseh 11 preučevanih analitov. Determinacijski koeficienti ( $r^2$ ) so pri vseh preučevanih analitih v vseh treh dneh validacije bili večji od 0,9910.

Na osnovi kriterija; najmanjša koncentracija kalibratorja v umeritveni krivulji z ustrežno točnostjo ( $\pm 20\%$ ), ter z vsaj petkrat večjim odzivom, kot je bil odziv slepe plazme, smo določili spodnjo mejo določljivosti (LLOQ) za posamezen analit. Regresijske parametre umeritvene premice v treh dneh validacije in območje metode posameznega analita prikazuje preglednica XIV.

**Preglednica XIV:** Regresijski parametri umeritvene premice v treh dneh validacije in območje metode za vsak preučevani analit.

ANALIT	DAN VALIDACIJE (enačba umeritvene premice/determinacijski koeficient)			OBMOČJE METODE ( $\mu\text{g/mL}$ )
	1.dan	2. dan	3. dan	
<i>LEVE</i>	$y=0,0146x-0,0019$	$y=0,0146x+0,0019$	$y=0,0146x+0,0019$	0,5 - 50
$r^2$	0,9993	0,9997	0,9995	
<i>ZONI</i>	$y=0,0395x+0,0006$	$y=0,0386x+0,0017$	$y=0,0374x+0,00007$	0,5 - 50
$r^2$	0,9967	0,9996	0,9996	
<i>PRIMI</i>	$y=0,0330x-0,0025$	$y=0,0297x+0,0014$	$y=0,3058x-0,0022$	0,6 - 30
$r^2$	0,9993	0,9994	0,9998	
<i>LAKO</i>	$y=0,0256x-0,0023$	$y=0,02266x+0,0013$	$y=0,0235x-0,0026$	0,6 - 30
$r^2$	0,9996	0,9991	0,9995	
<i>LAMO</i>	$y=0,08015x-0,0135$	$y=0,0781x-0,0061$	$y=0,0774x-0,0104$	0,6 - 30
$r^2$	0,9993	0,9971	0,9971	

<b>LIKAR</b>	$y=0,0692x-0,0214$	$y=0,0692x-0,0214$	$y=0,0680x-0,0109$	0,5 - 50
$r^2$	0,9946	0,9914	0,9910	
<b>KARBA-EPOXI</b>	$y=0,0829x+0,0034$	$y=0,0889x-0,0008$	$y=0,0907+0,0028$	0,05 - 5
$r^2$	0,9991	0,9940	0,9931	
<b>OKS</b>	$y=0,0303x-0,0155$	$y=0,0297x-0,0189$	$y=0,0285x-0,0167$	0,5 - 50
$r^2$	0,9906	0,9902	0,9938	
<b>FENI</b>	$y=0,0083x+0,0007$	$y=0,0072x+0,0014$	$y=0,0088x+0,0006$	0,6 - 30
$r^2$	0,99836	0,99421	0,9996	
<b>KLOBA</b>	$y=0,0662x-0,0022$	$y=0,0584x-0,0016$	$y=0,0678x-0,0041$	0,05 - 5
$r^2$	0,9992	0,9984	0,9922	
<b>KARBA</b>	$y=0,0306x-0,0142$	$y=0,0310x-0,0146$	$y=0,029x-0,0121$	0,6 - 30
$r^2$	0,9976	0,9930	0,9948	

#### 4.3.3 Točnost in ponovljivost

Točnost in ponovljivost metode smo skladno s postopkom opisanim v poglavju 3.3.3 določali v treh dneh s pomočjo kontrolnih vzorcev na treh koncentracijskih nivojih. QCl predstavlja najnižjo, QCm srednjo in QCh najvišjo koncentracijo za izbrani analit, ki smo jo določili na osnovi referenčnega območja posameznega analita. Na vsakem koncentracijskem nivoju smo izvedli 5 ponovitev vsake meritve. Pri vrednotenju rezultatov se je izkazalo, da je uporaba IS pripomogla k večji točnosti in ponovljivosti rezultatov. Točnost in natančnost metode za vseh 11 preučevanih analitov ustreza smernicam FDA, saj so rezultati med-dnevne in znotraj-dnevne točnosti znotraj predpisanih kriterijev. Vse tri dni validacije je bilo pri vseh uporabljenih QC na vseh treh koncentracijskih nivojih odstopanje od dejanske (referenčne) vrednosti manjše od 15 %. Tako smo z validacijo potrdili, da je naša metoda primerna za kvantitativno določanje vseh 11 preučevanih protiepileptičnih učinkovin v plazemskih vzorcih. Rezultati med-dnevne in znotraj-dnevne točnosti so prikazani v preglednici XV.

**Preglednica XV:** Prikaz med-dnevne in znotraj-dnevne ponovljivosti/točnosti za 11 preučevanih analitov.

ANALIT		MED-DNEVNA PONOVLJIVOST/TOČNOST (n = 15)			ZNOTRAJ-DNEVNA PONOVLJIVOST/TOČNOST (n = 5)		
		$C_{\text{izračunana}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	točnost (%)	$C_{\text{izračunana}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	točnost (%)
vzorec	$C_{\text{nominalna}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )						
<b>Levetiracetam</b>							
QCh	45	47,9	11,0	102,1	45,6	3,2	101,3
QCm	9	9,20	3,7	111,6	9,0	3,1	99,6
QCl	0,9	0,826	5,3	109,6	0,9	4,4	102,9
<b>Zonisamid</b>							
QCh	45	47,6	4,7	103,5	47,6	1,0	105,8
QCm	9	9,44	3,4	106,4	9,8	0,9	108,5
QCl	0,9	0,800	5,7	92,6	0,82	2,0	91,5
<b>Primidon</b>							
QCh	27	28,3	3,6	95,3	27,3	1,6	101,1
QCm	5,4	5,73	4,2	99,6	5,5	2,2	101,0
QCl	0,54	0,54	5,7	106,6	0,6	3,8	104,8
<b>Lakozamid</b>							
QCh	27	28,6	5,2	93,5	27,3	1,5	101,0
QCm	5,4	5,91	1,8	99,0	5,8	12,8	107,7
QCl	0,54	0,56	6,6	111,9	0,6	3,2	106,0
<b>Lamotrigin</b>							
QCh	27	28,4	7,8	94,9	28,3	1,1	105,0
QCm	5,4	5,71	6,4	99,3	5,6	2,1	104,0
QCl	0,54	0,53	8,6	103,0	0,6	1,1	104,1
<b>Likarbazepin</b>							
QCh	45	46,9	3,5	95,0	45,4	12,7	100,9
QCm	9	9,15	2,5	94,7	9,0	1,9	99,5
QCl	0,9	1,00	8,8	105,9	0,9	3,5	100,5
<b>CBZ-epoksid</b>							
QCh	4,5	4,58	4,6	103,8	4,8	1,9	107,1
QCm	0,9	0,98	3,2	114,8	0,9	5,4	105,5
QCl	0,09	0,08	11,5	97,9	0,08	2,1	99,7
<b>Okskarbazepin</b>							
QCh	45	43,1	4,1	85,8	44,7	4,6	99,4
QCm	9	8,12	4,8	87,5	8,4	8,1	93,4
QCl	0,9	1,04	3,0	99,1	1,0	6,5	113,7
<b>Fenitoin</b>							
QCh	27	29,0	2,6	94,4	27,2	3,6	100,8
QCm	5,4	5,34	11,3	93,7	5,7	2,9	104,8
QCl	0,54	0,45	14,5	91,2	0,49	10,0	91,0

<b>Klobazam</b>							
QCh	4,5	4,81	5,7	98,6	4,7	4,2	104,9
QCm	0,9	0,92	8,3	99,7	0,8	3,7	94,2
QCl	0,09	0,10	12,8	115,0	0,1	8,7	113,8
<b>Karbamazepin</b>							
QCh	27	28,9	8,9	91,7	29,8	4,8	110,3
QCm	5,4	5,32	4,6	101,4	5,0	2,0	93,3
QCl	0,54	0,589	2,3	108,4	0,6	8,7	111,2

\*(CV - koeficient variacije odzivov, v %)

#### 4.3.4 Izkoristek ekstrakcije

Izkoristek metode smo določili skladno s postopkom opisanim v poglavju 4.3.4 na treh koncentracijskih nivojih (QCL, QCm, QCh) tako, da smo primerjali povprečne odzive analitov treh ponovitev v kontrolnih vzorcih (brez plazme - vodni vzorci) in petih ponovitev plazemskih kontrolnih vzorcev. Vodni vzorci so predstavljali 100 % uspešnost ekstrakcije. Za vsak preučevan analit smo izkoristek ekstrakcije izračunali tako, da smo odziv analita, ki smo ga izmerili v ekstrahiranem vzorcu delili z odzivom analita v neekstrahiranem vzorcu ter množili s 100. Najmanjši izkoristek postopka smo dobili pri karbamazepinu (pri QCl) in sicer 89,6 %, največji pa pri klobazamu (pri QCm) in zonisamidu (pri QCh) in sicer 106,8.

Rezultati odražajo dober izkoristek postopka, zato je obarjanje z acetonitrilom odlična izbira, oziroma so rezultati posledica same točnosti in ponovljivosti metode. Izkoristki metode so zbrani v preglednici XVI.

**Preglednica XVI:** Izkoristki metode na treh koncentracijskih nivojih za posamezen analit.

IZKORISTEK (%)											
ANALIT	LEVE	ZONI	PRIMI	LAKO	LAMO	LIKAR	CBZ-EPOXI	OXS	FENI	KLOBA	KARBA
QCh	98,5	104,1	99,1	98,6	99,6	99,0	96,4	102,2	94,0	106,8	102,5
QCm	90,0	106,8	99,0	106,3	97,4	97,4	102,8	99,1	97,9	106,6	94,2
QCl	103,1	103,8	100,3	101,5	90,1	92,6	103,2	102,8	100,1	98,4	89,6



### 4.3.5 Stabilnost

Stabilnost (z izjemo dolgoročne stabilnosti) smo določili na treh koncentracijskih nivojih (QCL, QCm, QCh) skladno s postopkom, opisanim v poglavju 3.3.9. Določili smo kratkoročno stabilnost (hranjenje vzorcev 1 dan pri sobni temperaturi) za vseh 11 preučevanih analitov na treh koncentracijskih nivojih in dolgoročno stabilnost za vse preučevane analite na dveh koncentracijskih nivojih (QCm, QCh). Pri dolgoročni stabilnosti smo z izjemo lakosamida, kjer smo na QCm določili 23,6 % razpad učinkovine določili manj kot 15 % razpada posamezne učinkovine na obeh koncentracijskih nivojih. Rezultati dolgoročne stabilnosti so odraz majhnega razpada določenih preučevanih analitov. To je dokaz, da so plazemski vzorci stabilni na sobni temperaturi najmanj 1 dan in najmanj 61 dni pri hranjenju na -80 °C, saj ne pride do večjih izgub pri vseh preučevanih analitih. Pri ugotavljanju post-preparativne stabilnosti smo plazemske vzorce pustili 24 h stati v avtomatskem vzorčevalniku HPLC analizatorja pri temperaturi 4 °C. Najnižja določena vrednost pri kratkoročni stabilnosti je bila 97,0 %, ter najvišja 102,8 %. . Tudi rezultati stabilnosti analitov v plazemskih vzorcih na vseh treh koncentracijskih nivojih, izpostavljenim stresnim razmeram po 3 ciklih zamrzovanja in odtajanja so bili od 90,9 % do 108,6 %. S stabilnostjo plazemskih vzorcev po večkratnem zamrzovanju in odtajanju smo dokazali, da lahko isti plazemski vzorec večkrat odmrzujemo in zamrzujemo. Rezultate 4 tipov stabilnosti pri danih pogojih za preučevane analite prikazuje preglednica XVII.

**Preglednica XVII:** Stabilnost (kratkoročna, dolgoročna, v avtomatskem vzorčevalniku, po 3 ciklih zamrznitve/odtalitve) preučevanih analitov pri izbranih pogojih.

ANALIT		STABILNOST (%)		
KONCENTRACIJA	SOBNA TEMP. 1 dan	4 °C, 24 h	-80 °C 61dni	3 cikli zam./odtal.
<b>LEVETIRACETAM</b>				
<i>QCh</i>	107,5	98,0	110,7	106,7
<i>QCm</i>	101,8	96,6	107,4	100,3
<i>QCL</i>	107,4	99,9	/	102,3
<b>ZONISAMID</b>				
<i>QCh</i>	98,2	97,8	99,4	101,2
<i>QCm</i>	97,8	99,2	95,6	101,6
<i>QCL</i>	101,3	99,4	/	100,2
<b>PRIMIDON</b>				
<i>QCh</i>	98,9	100,1	97,6	102,2

<i>QCm</i>	97,4	97,2	95,3	102,2
<i>QCL</i>	99,4	99,4	/	90,9
<b>LAKOZAMID</b>				
<i>QCh</i>	94,0	97,0	98,7	102,2
<i>QCm</i>	106,1	98,3	76,4	102,2
<i>QCL</i>	109,6	99,4	/	90,9
<b>LAMOTRIGIN</b>				
<i>QCh</i>	103,5	95,9	96,4	101,2
<i>QCm</i>	95,6	98,4	88,5	107,5
<i>QCL</i>	100,9	98,9	/	96,2
<b>LIKARBAZEBIN</b>				
<i>QCh</i>	90,8	101,1	97,8	95,9
<i>QCm</i>	93,3	96,7	97,1	92,6
<i>QCL</i>	103,1	99,8	/	95,9
<b>KARBAMAZEPIN-EPOKSID</b>				
<i>QCh</i>	107,7	99,1	99,4	106,5
<i>QCm</i>	103,3	99,1	112,1	94,5
<i>QCL</i>	103,4	96,4	/	106,3
<b>OKSKARBAZEPIN</b>				
<i>QCh</i>	98,9	97,0	102,9	106,4
<i>QCm</i>	94,8	95,6	88,0	95,3
<i>QCL</i>	92,9	95,1	/	106,8
<b>FENTOIN</b>				
<i>QCh</i>	104,4	101,2	87,1	98,6
<i>QCm</i>	103,0	99,9	91,0	102,2
<i>QCL</i>	107,8	102,8	/	108,6
<b>KLOBAZAM</b>				
<i>QCh</i>	103,2	99,0	108,7	105,7
<i>QCm</i>	92,3	96,2	107,2	102,0
<i>QCL</i>	105,0	100,6	/	104,6
<b>KARBAMAZEPIN</b>				
<i>QCh</i>	106,9	97,4	99,2	104,9
<i>QCm</i>	97,8	97,5	97,8	106,7
<i>QCL</i>	104,3	101,7	/	107,7

#### 4.4 Analiza realnih plazemskih vzorcev

Realne plazemske vzorce 10 bolnikov, ki prejemajo protiepileptično terapijo v različnih odmerkih, smo pripravili po postopku opisanem v poglavlju 3.3.10. Bolniki (vzorec številka 27, 37, 40, 80, 86 in 98) so poleg protiepileptične terapije učinkovin, ki so bile

vključene v razvoj in validacijo analizne metode sočasno prejeli še druga zdravila. Rezultate analize posameznih koncentracij 10 bolnikov smo zbrali v preglednici XVIII.

**Preglednica XVIII:** Rezultati TDM 10 bolnikov z epilepsijo z uporabo razvite HPLC-UV analizne metode.

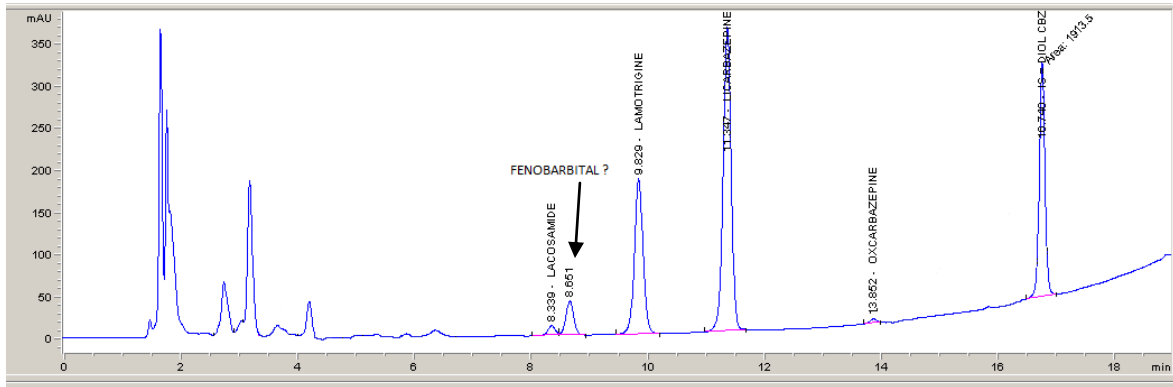
PACIENT	PROTIEPILEPTIČNO ZDRAVILO	DNEVNI ODMEREK (mg)	C <sub>PROTIEP. ZDRAVILA</sub> (µg/mL)	TDM OBMOČJE (µg/mL)	OBMOČJE HPLC METODE* (µg/mL)	DRUGA SOČASNA ZDRAVILA
B10	LAMOTRIGIN	400	10,3	2,5 - 15	0,6 - 30	/
	LAKOZAMID	200	5,0	10 - 20	0,6 - 30	
B26	LAMOTRIGIN	300	11,1	2,5 - 15	0,6 - 30	escitalopram
	KARBAMAZEPIN	800	5,0	4 - 12	0,6 - 30	
	KARBAMAZEPIN-EPOKSID	/	0,37	2 - 5	0,05 - 5	
B27	LAMOTRIGIN	600	23,6	2,5 - 15	0,6 - 30	/
	OKSKARBAZEPIN	2400	2,7	3 - 35	0,05 - 50	
	LIKARBAZEPIN	/	37,3	3 - 35	0,5 - 50	
B37	LAMOTRIGIN	400	13,0	2,5 - 15	0,6 - 30	levotiroksin
	KLOBAZAM	15	0,25	0,03 - 0,3	0,05 - 5	
B40	LAMOTRIGIN	150	5,8	2,5 - 15	0,6 - 30	valproj. kis., diosmin, aspirin, folna kislina, hesperidin
	ZONISAMID	300	23,8	10 - 40	0,5 - 50	
B67	LAMOTRIGIN	250	11,2	2,5 - 15	0,6 - 30	/
	KARBAMAZEPIN	800	4,9	4 - 12	0,6 - 30	
	KARBAMAZEPIN-EPOKSID	/	1,0	2 - 5	0,05 - 5	
P80	LAMOTRIGIN	400	14,3	2,5 - 15	0,6 - 30	fenobarbital
	OKSKARBAZEPIN	1200	1,7	3 - 35	0,5 - 50	
	LIKARBAZEPIN	/	25,7	3 - 35	0,5 - 50	
B86	LAMOTRIGIN	400	12,4	2,5 - 15	0,6 - 30	escitalopram duloksetin
	FENTOIN	100	2,9	10 - 20	0,6 - 30	
B95	LAMOTRIGIN	300	8,3	2,5 - 15	0,6 - 30	/
	LEVETIRACETAM	1500	9,6	12 - 46	0,5 - 50	

B98	<b>LAMOTRIGIN</b>	300	11,2	2,5 - 15	0,6 - 30	aspirin, simvastatin, losartan, flutikason
	<b>OKSKARBAZEPIN</b>	1200	1,7	3 - 35	0,5 - 50	
	<b>LIKARBAZEPIN</b>	/	18,4	3 - 35	0,5 - 50	

\* Območje naše HPLC metode, ki smo jo uspešno validirali v skladu s smernicami FDA.

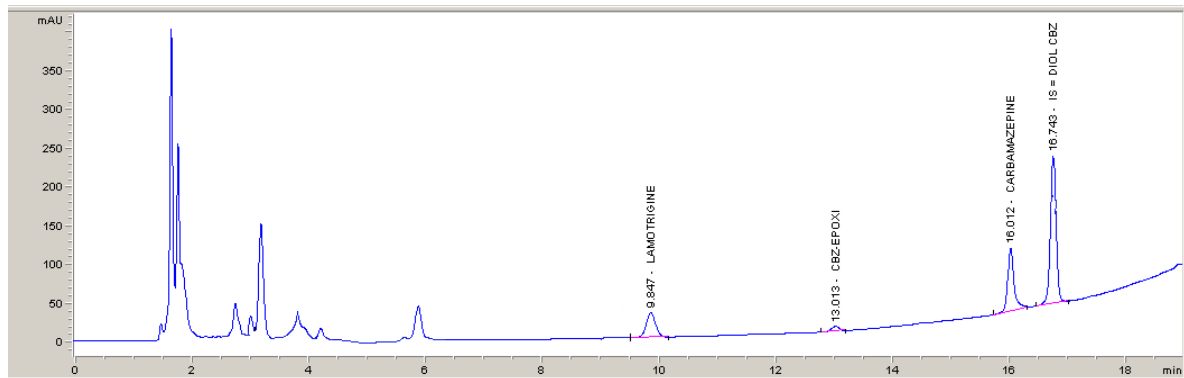
Poleg so navedeni tudi podatki dnevnega odmerka posameznega zdravila, referenčno območje in območje naše HPLC metode za vsako posamezno učinkovino. Ker smo si na začetku naše raziskave zadali cilj, da bomo razvili in validirali občutljivo HPLC-UV analizo metodo za določanje 11 protiepileptičnih učinkovin, lahko slednjemu z zagotovostjo pritrdimo. Z aplikacijo naše analize metode smo s pomočjo realnih vzorcev kvantitativno ovrednotili protiepileptične učinkovine. Glede na referenčno območje posameznih učinkovin je območje metode, ki smo jo določili za vsako učinkovino, sorazmeroma široko in omogoča detekcijo učinkovin v zelo širokem koncentracijskem intervalu. Koncentracije analitov v vzorcih bolnikov smo izračunali na osnovi sočasno analiziranih vzorcev umeritvene krivulje. Pri vzorcih bolnikov, ki so prejeli različne dnevne odmerke lamotrigina (od 150 mg do 600 mg) opazimo veliko variabilnost, ki je lahko posledica vplivov različnih dejavnikov na farmakokinetiko lamotrigina. Ker se lamotrigin intenzivno presnavlja z glukuronidacijo, indukcijske učinke pa lahko pripišemo preostalim protiepileptičnim zdravilom; karbamazepinu, okskarbazepinu, fenitoinu, fenobarbitalu in primidonu, lahko posledično v veliki meri vpliva na določene rezultate lamotrigina v naših analiziranih vzorcih.

V plazemskih vzorcih bolnikov B27, B80, B98, ki so prejeli protiepileptično terapijo z lamotriginom in okskarbazepinom v različnih odmerkih, smo kvantitativno ovrednotili tudi farmakološko aktivni presnovek okskarbazepina in sicer likarbazepin (oz. monohidroksi derivat, MHD). Primer kromatograma bolnika B80 je prikazan na *Sliki 14*. Pred vrhom lamotrigina se pri retencijskem času 8,6 min eluira neznan vrh. Ker je bolnik B80 poleg odmerkov lamotrigina in okskarbazepina prejel tudi fenobarbital sumimo, da neznan vrh pripada le-temu.

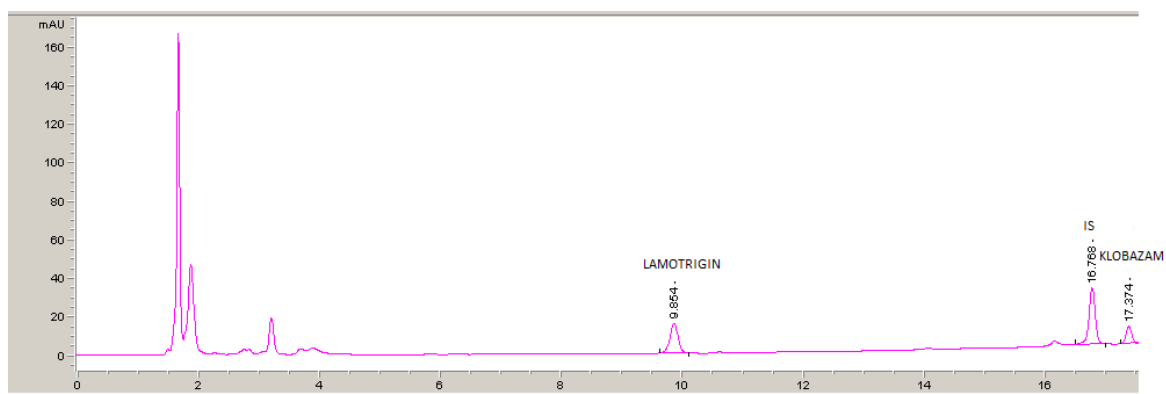


**Slika 14 :** Kromatogram bolnika B80 (pri valovni dolžini 210 nm) na terapiji z lamotriginom in okskarbazepinom.

V plazemskih vzorcih bolnikov B26 (kromatogram bolnika prikazuje *Slika 15*) in B67, ki so prejeli protiepileptično terapijo z lamotriginom in karbamazepinom v različnih odmerkih, smo kvantitativno ovrednotili tudi farmakološko aktivni presnovek karbamazepina in sicer karbamazepin-epoksid. Kromatogram bolnika B37 na terapiji z lamotriginom in klobazamom je prikazan na *Sliki 16*.



**Slika 15 :** Kromatogram bolnika B26 (pri valovni dolžini 210 nm) na terapiji z lamotriginom in karbazepinom



*Slika 16 : Kromatogram bolnika B37 (pri valovni dolžini 235 nm) na terapiji z lamotriginom in klobazamom*

Z uporabo analizne metode na realnih plazemskih vzorcih bolnikov z epilepsijo smo potrdili, da smo uspešno razvili občutljivo analizno metodo, v širokem koncentracijskem območju za detekcijo vseh 11 protiepileptičnih učinkovin.

## 5. SKLEP

V magistrski nalogi smo dosegli predhodno zastavljene cilje. Razvili smo občutljivo gradientno analizno metodo, ki temelji na tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti z UV detekcijo, za terapevtsko spremljanje celokupnih koncentracij protiepileptičnih učinkovin: levetiracetama, zonisamida, primidona, lakozamida, lamotrigina, fenitoina, klobazama, okskarbazepina in njegovega metabolita likarbazepina ter karbamazepina in njegovega metabolita karbamazepin epoksida. Metoda vključuje tudi enostavno pripravo plazemskih vzorcev, ki temelji na obarjanju proteinov z uporabo acetonitrila, oziroma enostavni deproteinizaciji in uporabi volumna plazme 100  $\mu$ L. Metodo smo po razvoju in optimizaciji priprave vzorcev uspešno validirali v skladu s smernicami FDA. Metoda je ustrezala vsem parametrom, ki smo jih vključili v validacijo in so ustrezali priporočilom FDA. Metoda je enostavna, točna, občutljiva, zanesljiva, selektivna in ponovljiva. Potrdili smo različne tipe stabilnosti (kratkoročna, dolgoročna, v avtomatskem vzorčevalniku, po ciklih zamrznitve in odtalitve) vseh preučevanih analitov. Validirano metodo smo uporabili za merjenje plazemskih koncentracij levetiracetama, zonisamida, primidona, lakozamida, lamotrigina, fenitoina, klobazama, okskarbazepina (in njegovega aktivnega metabolita likarbazepina) in karbamazepina (in njegovega aktivnega metabolita karbamazepin-epoksida) pri bolnikih z epilepsijo, s čimer smo potrdili njeno primernost za rutinsko terapevtsko spremljanje koncentracij, saj območje metode za vseh 11 učinkovin obsega referenčna območja vseh analitov. Metoda je uporabna za določanje že omenjenih učinkovin v farmakokinetičnih študijah in za zanesljivo določanje koncentracij v plazemskih bolnikih z epilepsijo. Pomankljivost naše analizne metode je sorazmeroma dolg kromatografski čas, saj pri analiziranju porabimo več časa in pa tudi mobilne faze, kar zelo vpliva na končno ceno analize. V obzir pa je potrebno vzeti tudi dejstvo, da je bil naš cilj metode razviti občutljivo metodo za določanje 12 protiepileptičnih zdravil, vključno z internim standardom 10,11-dihidrokarbamazepinom. Analizna metoda predstavlja odlično izhodišče za nadaljevanje in optimizacijo predvsem kromatografskih pogojev, ki bo omogočala sočasno določanje večjega števila protiepileptičnih učinkovin.

## 6. LITERATURA

1. Sket D: Slovenski medicinski slovar, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2012.
2. Kudin AP, Zsurka G, Elger CE, Kunz WS: Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy. *Experimental Neurology*, 2009, 218: 326-332.
3. Tan TY, Lu CH, Chuang HY, Lin TK, Liou CW, Chang WN, Chuang YC; Long-term antiepileptic drug therapy contributes to the acceleration of atherosclerosis. *Epilepsia*, 2009, 50: 1579-86.
4. Ribarič S: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 9 izdaja, Ljubljana, 2001.
5. Bassin S, Smith TI, Bleck TP: Clinical review: Status epilepticus. *Crit care*, 2002, 6 (2): 137-142.
6. Engel J. Jr. ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Research*, 2006, 70: 5-10.
7. Griffin EA, Lowenstein DH. Pharmacology of abnormal electrical neurotransmission in the central nervous system. V: LeDuc B. *Antiseizure Drugs. Foye's Principles of Medical Chemistry*. 6 izdaja. Williams, D. A.; Lemke, T. L. 2008, 521-541.
8. Fisher RS, Boas WE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel JJ: Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005, 46(4): 470-472.
9. Can you Neurofeedback Help With Epilepsy? (<http://www.braintrainuk.com/other-conditions-that-neurofeedback-supports/neurofeedback-for-epilepsy/>). Dostopno 30.06.2015.
10. Le Duc B. *Antiseizure Drugs. Foye's Principles of Medical Chemistry*. 6 izdaja. Williams, D.A.; Lemke, T. L. 2008, 52: 521-541.
11. Brodie MJ: Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure* 2010, 19: 650-655.
12. Perucca E: The new generation of antiepileptic drugs: advantages and disadvantages. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1996, 42: 531-543.
13. Zgonc V, Čebular B: Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. *Zdravstveni Vestnik* 2006, 75: 379-88.



14. Zgonc V, Čebular B: Posebnosti zdravljenja epilepsije pri starejših. Farmaceutski vestnik, 2007; 76: 473-479.
15. Antiepileptic drugs (AEDs) and sodium channels([http://www.nature.com/nrn/journal/v5/n7/fig\\_tab/nrn1430\\_F2.html](http://www.nature.com/nrn/journal/v5/n7/fig_tab/nrn1430_F2.html)). Dostopno 30.06.2015.
16. Kelemen A, Halász: Lacosamide for the prevention of partial onset seizures in epileptic adults. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2010; 6:465-471.
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. Singh SK, Brashier DBS: Perampanel: New drug for treatment of refractory partial onset seizures. *Muller Journal of Medical Science and Research*, 2014; 5: 195-199.
19. Contin M, Mohamed S, Albani F, Riva R, Baruzzi A. Simple and validated HPLC-UV analysis of levetiracetam in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *Journal of Chromatography B*, 2008, 873: 129-132.
20. Vermeij TAV, Edelbroek PM: Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, oxcarbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 2007, 857: 40-46.
21. Serralheiro A, Alves G, Fortuna A, Rocha M, Falcao A: First HPLC-UV method for rapid and simultaneous quantification of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, 10,11-trans-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine and licarbazepine in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 2013, 925: 1-9.
22. Contin M, Balboni M, Callegati E, Candela C, Albani F, Riva R, Baruzzi A: Simultaneous liquid chromatographic determination of lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in plasma of patients with epilepsy. *Journal of Chromatography B*, 2005, 828: 113-117.
23. Contin M, Mohamed S, Candela C, Albani F, Riva R, Baruzzi A: Simultaneous HPLC-UV analysis of rufinamide, zonisamide, lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in deproteinized plasma of patients with epilepsy. *Journal of Chromatography B*, 2010, 878: 461-465.

24. Pienimaki P, Fuchs S, Isojarvi J, Vahakangas: Improved detection and determination of carbamazepine and oxcarbazepine and their metabolites by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 1995, 673: 97-105.
25. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BF, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, Leppik IE, Tomson T, Perucca E: Antiepileptic drugs – best practise 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.
26. Krasowski MD, McMillin GA: Advances in anti-epileptic drug testing. *Clin. Chim. Acta*, 2014, 436: 224-236.
27. Patsalos PN, Berry DJ: Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs by use of saliva. *Ther. Drug Monit.*, 2013, 35: 4-29.
28. Petre M, Strah A: Spremljanje plazemskih koncentracij antiepileptikov. *Farmacevtski vestnik*, 2015; 66: 35-41.
29. Shah Mohamed N, Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, McElnay: A simple bioanalytical method for the quantification of antiepileptic drugs in dried blood spots. *Journal of Chromatography B*, 2013; 923-924: 65-73.
30. Patsalos PN, Berry DJ. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs by use of saliva. *Ther Drug Monit* 2013; 35(1): 4-29.
31. Metabolic pathway of the licarbazepine prodrugs eslicarbazepine acetate (ESL) and oxcarbazepine (OXC)  
([http://www.nature.com/nrd/journal/v9/n1/fig\\_tab/nrd2997\\_F2.html](http://www.nature.com/nrd/journal/v9/n1/fig_tab/nrd2997_F2.html)).  
Dostopno 30.06.2015.
32. Modifications of Antiepileptic Drugs for Improved Tolerability and Efficacy  
([http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2746576\\_pmc-2008-021f4&req=4](http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=2746576_pmc-2008-021f4&req=4)). Dostopno 30.06.2015.
33. Douglas A. Skoog; *Principles of Instrumental Analysis* (5. Izdaja); Saunders College Publishing 1997.
34. Yuri Kazakevich, Rosario LoBrutto; *HPLC for pharmaceutical scientists*; Wiley Interscience; 2007
35. Marshall WJ, Bangert SK. *Clinical Chemistry*, 6th Edition. Edinburgh, London: Mosby Elsevier. 2008.

36. Ramšak J: Razvoj in validacija analizne metode za določanje plazemskih koncentracij karbamazepina, okskarbazepina in njunih presnovkov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, magistrska naloga v izdelavi.
37. Guidance for industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM9 Rockville, MD, maj 2001.  
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>).  
Dostopno 10.02.2015
38. Skoog D.A: Principles of Instrumental Analysis. 5<sup>th</sup> ed. Saunders College Publishing, USA 1998: 725-769.