

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTIN MIKELJ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTIN MIKELJ

**RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE ZA
DOLOČANJE KONCENTRACIJ OKSKARBAZEPINA,
KARBAMAZEPINA IN NJUNIH METABOLITOV V
POSUŠENIH KRVNIH MADEŽIH**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL
METHOD FOR DETERMINATION OF OXCARBAZEPINE,
CARBAMAZEPINE AND THEIR METHABOLYTES IN
DRIED BLOOD SPOTS**

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljajal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka, mag. farm. Spektroskopske in kromatografske meritve sem izvajal v laboratorijih Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Zahvalil bi se Tomažu za potrpežljivost in usmerjanje ter Veroniki, družini in prijateljem za spodbudo in podporo pri pisanju magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Tomaža Vovka, mag. farm.

Martin Mikelj

Ljubljana, 2015

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Član magistrske komisije: doc. dr. Damjan Janeš, mag. farm.

KAZALO

1	UVOD.....	1
1.1	EPILEPSIJA	1
1.1.1	Razdelitev	1
1.1.2	Vzroki in nastanek epilepsije.....	1
1.2	PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA	2
1.3	FARMAKODINAMIKA OXCBZ in CBZ	4
1.4	FARMAKOKINETIKA OXCBZ in CBZ.....	4
1.4.1	Absorpcija in porazdelitev	4
1.4.2	Metabolizem in izločanje.....	5
1.5	SPREMLJANJE TERAPIJE Z ZDRAVILI	7
1.5.1	Analizne metode	7
1.6	POSUŠENI KRVNI MADEŽI.....	9
1.6.1	Prednosti posušenih krvnih madežev	9
1.6.2	Slabosti posušenih krvnih madežev	10
1.6.3	Uporaba posušenih krvnih madežev ali plazme	10
1.7	PRIPOROČILA EVROPSKEGA BIOANALIZNEGA FORUMA	12
1.7.1	Vpliv hematokrita na posušene krvne madeže	12
1.7.2	Homogenost posušenih krvnih madežev	12
1.7.3	Stabilnost posušenih krvnih madežev.....	13
1.7.4	Postopek redčenja vzorca	13
1.7.5	Dodatek internega standarda k vzorcu.....	13
2	NAČRT ZA DELO.....	15
3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	MATERIALI	16
3.1.1	Vzorci krvi.....	16
3.1.2	Preiskovane spojine	16
3.1.3	Reagenti in topila.....	16
3.1.4	Naprave in pribor.....	17
3.2	POSTOPEK.....	18
3.2.1	Priprava osnovnih raztopin.....	18
3.2.2	Priprava delovnih raztopin za umeritveno krivuljo	18

3.2.3	Priprava raztopin za umeritveno krivuljo	19
3.2.4	Priprava kontrolnih vzorcev	20
3.2.5	Priprava obogatenih krvnih vzorcev	20
3.3	RAZVOJ METODE	20
3.3.1	Krvni vzorci	20
3.3.2	DBS papirčki	21
3.3.3	Interni standard	21
3.3.4	Ekstrakcijsko topilo	21
3.3.5	Dodatni korak	22
3.3.6	Rekonstitucijsko topilo	23
3.3.7	Priprava pufra za analizo	24
3.3.8	Kromatografija	24
3.4	OPTIMALNA METODA	24
4	VALIDACIJA	26
4.1	STABILNOST	29
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	31
5.1	RAZVOJ METODE	31
5.1.1	Obogateni krvni vzorci	31
5.1.2	Izbira DBS papirčka	32
5.1.3	Izbira internega standarda	33
5.1.4	Izbor ekstrakcijskega topila in uvedba dodatnega koraka	33
5.1.5	Izbira rekonstitucijskega topila	36
5.1.6	Izbira kromatografskih razmer	36
5.2	VALIDACIJA	38
5.2.1	Selektivnost	38
5.2.2	Spodnja meja kvantifikacije, umeritvene premice in območje linearnosti ..	39
5.2.3	Točnost	45
5.2.4	Ponovljivost znotraj dneva in med dnevi	50
5.2.5	Izkoristek ekstrakcije	52
5.2.6	Stabilnost	53
6	SKLEP	57
7	VIRI	59

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Glavni mehanizmi delovanja AED prve in druge generacije.....	3
Preglednica II: Odločitvena tabela za izbor matrice.....	11
Preglednica IV: Navodila za pripravo delovnih raztopin.	18
Preglednica V: Navodila za pripravo raztopin za umeritveno krivuljo.	19
Preglednica VI: Sestava preizkušenih ekstrakcijskih topil.....	22
Preglednica VII: Odzivi analitov in nečistot pri uporabi različnih topil.	33
Preglednica VIII: Odzivi analitov in nečistot pri uporabi različnih topil in dodatku FA. ...	34
Preglednica IX: Višina odzivov EpoCBZ in OxCBZ izmerjenih 1. dne validacije.	39
Preglednica X: Izračunane koncentracije OxCBZ in njihove točnosti 1. dne validacije za neuteženo umeritveno premico, umeritveno premico uteženo s koeficientom $1/c$ ter umeritveno premico s koeficientom $1/c^2$	40
Preglednica XI: Izračunane koncentracije LiCBZ iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije.	40
Preglednica XII: Izračunane koncentracije EpoCBZ iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije.	41
Preglednica XIII: Izračunane koncentracije OxCBZ iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije.	42
Preglednica XIV: Izračunane koncentracije CBZ iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije.	42
Preglednica XV: Izračunane koncentracije DihidroCBZ iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije.	43
Preglednica XVI: Točnost preračunanih koncentracij vseh QC vzorcev LiCBZ za vse tri dni validacije.....	45
Preglednica XVII: Točnost preračunanih koncentracij vseh QC vzorcev EpoCBZ za vse tri dni validacije.....	46
Preglednica XVIII: Točnost preračunanih koncentracij vseh QC vzorcev OxCBZ za vse tri dni validacije.....	47
Preglednica XIX: Točnost preračunanih koncentracij vseh QC vzorcev CBZ za vse tri dni validacije.....	48
Preglednica XX: Točnost preračunanih koncentracij vseh QC vzorcev DihidroCBZ za vse tri dni validacije.....	49

Preglednica XXI: Ponovljivost izračunanih koncentracij QC vzorcev LiCBZ znotraj dneva za vse tri dni validacije.	50
Preglednica XXII: Ponovljivost izračunanih koncentracij QC vzorcev EpoCBZ znotraj dneva za vse tri dni validacije.	50
Preglednica XXIII: Ponovljivost izračunanih koncentracij QC vzorcev OxCBZ znotraj dneva za vse tri dni validacije.	51
Preglednica XXIV: Ponovljivost izračunanih koncentracij QC vzorcev CBZ znotraj dneva za vse tri dni validacije.	51
Preglednica XXV: Ponovljivost izračunanih koncentracij QC vzorcev DihidroCBZ znotraj dneva za vse tri dni validacije.	51
Preglednica XXVI: Točnost in ponovljivost med dnevi.	52
Preglednica XXVII: Izkoristek ekstrakcije analitov iz DBS papirčkov.	53
Preglednica XXVIII: Post preparativna stabilnost vzorcev pripravljenih za kromatografsko analizo 12 h in 24 h po ekstrakciji.	53
Preglednica XXIX: Dolgoročna stabilnost LiCBZ.	54
Preglednica XXX: Dolgoročna stabilnost EpoCBZ.	54
Preglednica XXXI: Dolgoročna stabilnost OxCBZ.	55
Preglednica XXXII: Dolgoročna stabilnost CBZ.	55
Preglednica XXXIII: Dolgoročna stabilnost DihidroCBZ.	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Metabolizem CBZ.	5
Slika 2: Metabolizem OxCBZ.	6
Slika 5: Hipotezni graf odziva v odvisnosti od koncentracije.	28
Slika 6: Prikaz ponovljivosti in točnosti na hipoteznem grafu.	29
Slika 7: Odziv OxCBZ in nečistot.	32
Slika 8: Primerjava kromatogramov slepe raztopine in zmesi 6.	37
Slika 9: Kromatogram slepih vzorcev petih različnih oseb.	38
Slika 10: Primerjava kromatogramov slepe raztopine in zmesi 6 iz 3. dneva validacije. ...	38
Slika 11: Umeritvene premice 1. dne validacije.	44
Slika 12: Umeritvene premice 2. dne validacije.	44
Slika 13: Umeritvene premice 3. dne validacije.	45

POVZETEK

V magistrski nalogi smo poskušali razviti novo analizno metodo za ugotavljanje okskarbazepina, karbamazepina, 10,11-dihidro-10-hidroksikarbamazepina, 10,11-epoksikarbamazepina in 10,11-dihidrokarbamazepina v posušeni krvni madeži.

Najprej smo izvedli ekstrakcijo analitov iz posušeni krvni madeži z zmesjo topil acetonitril in voda v razmerju 4:1 (v/v) in z dodatkom 0,5 % mravljinčne kisline. Dodali smo še kloramfenikol kot interni standard. Nato smo s pomočjo mešala na ekscenter ter ultrazvočne kadičke ekstrahirali analit. Po centrifugiranju smo dobljeno raztopino prenesli v drug vsebnik in topilo posušili s pomočjo segrevanja in prepihanja z dušikom. Na koncu smo ostanek rekonstituirali z zmesjo metanola in vode v razmerju 1:1 (v/v).

Za ločitev analitov iz vzorcev smo uporabili kolono Luna 5u, Phenyl-Hexyl, ki smo jo segreti na 55 °C. Mobilna faza je bila sestavljena iz metanola in fosfatnega pufra s pH 3,0 v razmerju 50:50 (v/v). Volumen injiciranja je bil 50 µl, pretok mobilne faze je bil 1,0 ml/min. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 215 nm.

Izvedli smo validacijo po smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila. Selektivnost zaradi prisotnosti motečih koelucij pri retencijskih časih 10,11-epoksikarbamazepina in okskarbazepina ni bila ustrezna. Linearnost je bila ustrezna pri izbranih koncentracijskih območjih vseh spojin. Karbamazepin, 10,11-epoksikarbamazepin in 10,11-dihidro-10-hidroksikarbamazepin so ustrezali zahtevam za točnost metode. Pri okskarbazepinu in 10,11-dihidrokarbamazepinu je bila ena vrednost QC_L vzorcev izven zahtevane meje. Z 20,9-odstotnim odstopanjem zahtevam za ponovljivost med dnevi ni ustrezal en QC_L vzorec okskarbazepina. Drugi vzorci so ustrezali kriterijem za ponovljivost znotraj dneva in med dnevi. Izkoristki ekstrakcij so bili 82,2 % za 10,11-dihidro-10-hidroksikarbamazepin, 81,7 % za 10,11-epoksikarbamazepin, 46,2 % za okskarbazepin, 82,8 % za karbamazepin in 81,8 % za 10,11-dihidrokarbamazepin. Vzorci so pri 5 °C stabilni vsaj 24 ur po ekstrakciji, najboljše razmere za shranjevanje vzorcev so pri 25 °C.

Razvita metoda je primerna za analizo 10,11-dihidro-10-hidroksikarbamazepina v koncentracijskem območju 0,50 do 40,0 µg/ml in za analizo karbamazepina v območju 0,38 do 30,0 µg/ml.

Ključne besede: okskarbazepin, karbamazepin, epilepsija, posušeni krvni madeži, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.

ABSTRACT

In master thesis we tried to develop new analytical method for determination of oxcarbazepine, carbamazepine, 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine, 10,11-epoxycarbamazepine in 10,11-dihydrocarbamazepine in dried blood spots.

Extraction of analytes was performed from dried blood spots with mixture of solvents acetonitrile and water (4:1, v/v) with added 0,5 % of formic acid. Cloramphenicol was added as internal standard. Extract was mixed, sonicated and centrifuged. Supernatant was transferred into a new container and dried at 40 °C with nitrogen stream. Dry residue was reconstituted with a mixture of methanol and water (1:1, v/v). Chromatographic separation of analytes was achieved using column Luna 5u, Phenyl-Hexyl, heated to 55 °C. Mobile phase consisted of methanol and phosphate buffer with pH 3,0 (50:50, v/v). Volume of injection was 50 µl, flow of mobile phase was 1,0 ml/min. Detection was performed at wavelength 215 nm.

Validation was performed according to the Food and drug administration guidelines for Bioanalytical methods. Selectivity was checked first and it didn't meet the requirements for 10,11-epoxycarbamazepine and oxcarbazepine due to interfering coelutions. The developed method was linear over concentration ranges studied for all analytes. Carbamazepine, 10,11-epoxycarbamazepine and 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine met the requirements for method accuracy. Oxcarbazepine and 10,11-dihydrocarbamazepine had one value of QC_L samples outside required limits. QC_L sample of oxcarbazepine with 20,9 % deviation was the only one outside of limits for precision between days. All other samples met the requirements for precision within and between days. Recovery was 82,2 % for 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine, 81,7 % for 10,11-epoxycarbamazepine, 46,2 % for oxcarbazepine, 82,8 % for carbamazepine, and 81,8 % for 10,11-dihydrocarbamazepine. Samples are stable at 5 °C at least 24 hours after extraction, the best storing condition for dried blood spots is room temperature.

Developed method is suitable for analysis of 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine in concentration range 0,50 to 40,0 µg/ml and carbamazepine in range 0,38 to 30,0 µg/ml.

Key words: oxcarbazepine, carbamazepine, epilepsy, dried blood spots, high performance liquid chromatography.

SEZNAM OKRAJŠAV

A _A	površina vrha analita
ACN	acetonitril
AED	protiepileptična zdravila (<i>antiepileptic drugs</i>)
A _{IS}	površina vrha internega standarda
AMPA	podtip glutamatnega receptorja, na katerega se poleg glutaminske kisline kot agonist selektivno veže α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kislina
C	koncentracija
CBZ	karbamazepin
CYP	citokrom P-oksidoreduktaze
CŽS	centralni živčni sistem
DAD	detektor z nizom diod (<i>diode array detector</i>)
DBS	posušeni krvni madeži (<i>dried blood spots</i>)
DihidroCBZ	10,11-dihidrokarbamazepin
DiolCBZ	10,11-dihidro-10,11-hidroksikarbamazepin
EBF	Evropski bioanalizni forum (<i>European Bioanalytical Forum</i>)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EMA	Evropska agencija za zdravila (<i>European Medicines Agency</i>)
EPHX	epoksidhidrolaza
EpoCBZ	10,11-epoksikarbamazepin
FA	mravljinčna kislina (<i>formic acid</i>)
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (<i>Food and Drug Administration</i>)
g	težni pospešek
GABA	γ -aminomaslena kislina (<i>γ-aminobutyric acid</i>)
GC	plinska kromatografija (<i>gas chromatography</i>)
glu	glukuronil-
H _A	višina vrha analita
H _{IS}	višina vrha internega standarda
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>high performance liquid</i>

	<i>chromatography</i>)
HLOQ	zgornja meja kvantifikacije (<i>higher limit of quantification</i>)
IS	interni standard
k_u	naklon utežene premice
LC	tekočinska kromatografija (<i>liquid chromatography</i>)
LiCBZ	10,11-dihidro-10-hidroksikarbamazepin
LLOQ	spodnja meja kvantifikacije (<i>lower limit of quantification</i>)
LOD	meja detekcije (<i>limit of detection</i>)
M	molska masa
MF	mobilna faza
MeOH	metanol
MPO	mieloperoksidaza
MS	masni spektrometer
NMDA	podtip glutamatnega receptorja, na katerega se poleg glutaminske kisline kot agonist selektivno veže <i>N</i> -metil-D-aspartat
NR	nitrat-reduktaza
n_u	odsek na ordinatni osi utežene premice
OxCBZ	okskarbazepin
QC	kontrolni vzorec (<i>quality control</i>)
QC _H	kontrolni vzorec pri visoki koncentraciji
QC _L	kontrolni vzorec pri srednji koncentraciji
QC _M	kontrolni vzorec pri nizki koncentraciji
R ²	determinacijski koeficient
ROS	reaktivni kisikovi radikali
rpm	obrati na minuto (<i>revolutions per minute</i>)
RSD	relativna standardna deviacija
SD	standardna deviacija
sul	sulfonil-
SS	vsota produktov
T	temperatura
TDM	spremljanje koncentracije učinkovine (<i>therapeutic drug monitoring</i>)
t _R	retencijski čas

UGT	glukuroniltransferaza
UPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (<i>ultra high performance liquid chromatography</i>)
UV/VIS detektor	detektor za merjenje ultravijolične in vidne svetlobe
UZ kadička	ultrazvočna kadička
v/v	razmerje volumnov
w	utež
WS	delovna raztopina (<i>working solution</i>)
ZDA	Združene države Amerike

1 UVOD

1.1 EPILEPSIJA

1.1.1 Razdelitev

Epilepsija oziroma epileptični sindrom je ena najpogostejših bolezni centralnega živčnega sistema (CŽS) in se lahko pojavi v kateremkoli starostnem obdobju. Je kronična nevrološka motnja, kjer prihaja do ponavljajočih, pogosto spontanih, epileptičnih napadov. Ti so posledica reverzibilne, občasne in samoomejujoče motnje CŽS zaradi nenehnih usklajenih depolarizacij večjega števila živčnih celic možganske skorje. Delimo jo na žariščno epilepsijo, kjer je motnja omejena na posamezni del možganske skorje in na generalizirano epilepsijo, kjer napad zajame večji del možganske skorje. Primer enostavnega delnega napada so na primer jacksonski napadi, kjer pride do tresenja določenih mišic. Generalizirani napadi se lahko izrazijo kot absence (tipične, atipične), tonično – klonični, tonični, klonični, mioklonični in atonični napadi. Pri absenci se pojavi do 20-sekundna izguba zavedanja okolice. Pri tonično – kloničnih napadih telo najprej otrdi, nato se pojavi nekontrolirano tresenje celega telesa. Pri miokloničnem napadu pride do spazma več skupin mišic, o atoničnem napadu pa govorimo, ko se pojavi izguba nadzora nad mišicami, ki traja dlje kot 1 s. Pri vseh generaliziranih napadih se pojavi tudi izguba zavesti. Pri enostavnih napadih lahko pride tudi do sekundarne generalizacije. Ta se pojavi, če se epileptični napad začne na eni strani možganov in se kasneje razširi še na drugo možgansko polovico (1,2).

1.1.2 Vzroki in nastanek epilepsije

V 60 % primerov je vzrok za nastanek epilepsije neznan. Kjer je vzrok poznan, ločimo prirojeno in pridobljeno epilepsijo. Prirojena epilepsija je posledica mutacij genov ali delovanja toksinov, virusne infekcije v CŽS ploda med nosečnostjo, pridobljena pa se lahko razvije kot posledica možganskih tumorjev, intrakranialne krvavitve, hipoksije ali hipoglikemije možganov, jemanja raznih zdravil itd. Pri tem pride do poškodbe možganskega tkiva, kateri sledi obdobje, med katerim pride do številnih sprememb pri nevronih, celicah glije, piramidnih celicah. Nastajajo nove povezave med nevroni, pojavi se brstenje aksonov itd. Končni učinek tega so nove povezave nevronov, v katerih prihaja

do nenadzorovanega proženja akcijskih potencialov. Pri tem pride najprej do depolarizacije, ki je posledica vstopanja Ca^{2+} skozi napetostno odvisne ionske kanalčke za Ca^{2+} in skozi nespecifične ionske kanalčke glutamatnih receptorjev tipa NMDA (podtip glutamatnega receptorja, na katerega se poleg glutaminske kisline kot agonist selektivno veže *N*-metil-D-aspartat) in AMPA (podtip glutamatnega receptorja, na katerega se poleg glutaminske kisline kot agonist selektivno veže α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kislina). Sledi hiperpolarizacija, ki je posledica odpiranja zlasti napetostno odvisnih kanalčkov za K^+ . Vpliv imajo tudi GABAergični receptorski kanalčki, ki prepuščajo Cl^- in K^+ . V primerjavi z normalno depolarizacijo nevronov je depolarizacija v epileptičnem žarišču, ki jo imenujemo tudi paroksizmalni depolarizirajoči premik, pretirana in razmeroma dolgotrajna. Zato aktivaciji napetostno odvisnih Na^+ kanalčkov v teh nevronih sledi izbruh superponiranih akcijskih potencialov. Temu sledi hiperpolarizacija, ki omejuje njihovo trajanje. Sledi postopno slabljenje hiperpolarizacije nevronov v epileptičnem žarišču in nevronov v okolici. Posledica je daljša depolarizacija nevronov v žarišču in njeno širjenje na sosednje nevrone. S tem se v okolico širijo tudi akcijski potenciali in pojavijo se klinični znaki epileptičnega napada. Zakaj se epileptični napad začne in prekine ob določenem času, še ni znano (1,2).

1.2 PROTIEPILEPTIČNA ZDRAVILA

Epilepsija je kronična bolezen, kjer je zdravljenje simptomatsko in trajno. Cilj farmakoterapije je preprečevanje oziroma omejevanje epileptičnih napadov s čim manj neželenimi učinki. Za izbiro ustreznega protiepileptičnega zdravila je potrebno prepoznati tip epileptičnih napadov, spol in starost bolnika ter morebitno sočasno jemanje zdravil. Na voljo imamo vedno več protiepileptičnih zdravil (*antiepileptic drugs* oziroma AED). Ta zdravila težko razdelimo na več kategorij z različnimi mehanizmi delovanja, saj njihovega delovanja na molekularnem nivoju še ne razumemo v celoti. Poleg tega ima večina AED več kot samo en mehanizem delovanja (preglednica I). AED lahko razdelimo na tri generacije. Zdravljenje epilepsije z zdravili se je pričelo na koncu 19. stoletja z bromidom in malo kasneje s fenobarbitalom. Odkrivanje novih AED se je nadaljevalo do sredine 60. let. V to prvo generacijo sodi tudi karbamazepin (CBZ). V začetku 90. let pa se je z vigabatrinom in okskarbazepinom (OxCBZ) pričela 2. generacija AED. Zadnjih nekaj let s prihodom eslikarbazepin acetata in lakozamida že lahko govorimo o 3. generaciji AED.

Najnovejša AED so večinoma nadgradnja starejših učinkovin z zelo podobnimi strukturami.

Pregled učinkovin po generacijah:

1. generacija AED: CBZ, fenobarbital, fenitoin, valprojska kislina, diazepam, klobazam, klonazepam, etosuksimid,
2. generacija AED: felbamat, gabapentin, lamotrigin, levetiracetam, OxCBZ, pregabalin, rufinamid, stiripentol, tiagabin, topiramat, vigabatrin, zonisamid,
3. generacija AED: eslikarbazepin acetat in lakozamid (3).

Razlika med drugo in prvo generacijo je v manjšem obsegu neželenih učinkov in manjši indukciji oziroma inhibiciji jetrnih encimov, kar koristi pri jemanju več zdravil hkrati. To je posledica drugačnega metabolizma, saj se večina AED 2. generacije presnavlja in izloča preko renalne poti v nasprotju z AED 1. generacije, ki se večinoma presnavljajo s pomočjo citokromov v jetrih. Boljša je tudi njihova biološka uporabnost. Večina AED je teratogenih, lahko jih najdemo tudi v materinem mleku. Pri razvoju 3. generacije se poskuša še povečati biološko uporabnost AED in zmanjšati odstotek vezave na plazemske albumine (4).

Preglednica I: Glavni mehanizmi delovanja AED prve in druge generacije. Povzeto po Perrucci (5).

	Blokada napetostno odvisnih Na ⁺ kanalčkov	Povečanje GABA aktivnosti	Selektivno povečanje odziva preko GABA _A	Neposredno olajšanje pritoka Cl ⁻	Blokada Ca ²⁺ kanalčkov	Drug mehanizem
Prva generacija AED						
Benzodiazepini	-	-	++	-	-	-
CBZ	++	?	-	-	+ (tipa L)	+
Etosuksimid	-	-	-	-	++ (tipa T)	-
Fenobarbital	-	+	+	++	?	+
Fenitoin	++	-	-	-	?	+
Valprojska kislina	?	+	?	-	+ (tipa T)	++
Druga generacija AED						
Felbamat	++	+	+	-	+ (tipa L)	+
Gabapentin	?	?	-	-	++ (tipa N, P/Q)	?

Lamotrigin	++	+	-	-	++ (tipa N, P/Q, R, T)	+
Levetiracetam	-	?	+	-	+(tipa N)	++
OxCBZ	++	?	-	-	+(tipa N, P)	+
Pregabalin	-	-	-	-	++ (tipa N, P/Q)	-
Tiagabin	-	++	-	-	-	-
Topiramata	++	+	+	-	+(tipa L)	+
Vigabatrin	-	++	-	-	-	-
Zonisamid	++	?	-	-	++ (tipa N, P, T)	+
++, primarni mehanizem delovanja; +, sekundarni mehanizem delovanja; -, ni delovanja; ?, dvomljivi dokazi.						

1.3 FARMAKODINAMIKA OXCBZ in CBZ

OxCBZ spada med protiepileptične učinkovine 2. generacije. Strukturno je zelo podoben CBZ, ki ima prav tako protiepileptično delovanje. Uporabljamo ju za zdravljenje delnih napadov in generaliziranih tonično - kloničnih napadov. CBZ in OxCBZ sta lipofilni molekuli, kar jima omogoča prehod preko hematoencefalne bariere. Obe učinkovini delujeta na isto tarčo. Stabilizirata neaktivno stanje napetostno-odvisnih Na^+ kanalčkov na membranah živčnih celicah in s tem preprečita nenadzorovano proženje akcijskih potencialov. Poleg tega inhibirata še Ca^{2+} kanalčke in aktivirata K^+ kanalčke, kar tudi pripomore k preprečevanju epileptičnih napadov. OxCBZ ima v primerjavi s CBZ manj pomembnih interakcij z drugimi zdravili, kar je posledica manjše indukcije in inhibicije jetrnih encimov. Prav tako se pri zdravljenju z OxCBZ pojavlja manj težjih neželenih učinkov kot sta agranulocitoza in hujše dermatološke reakcije (6,7).

1.4 FARMAKOKINETIKA OXCBZ in CBZ

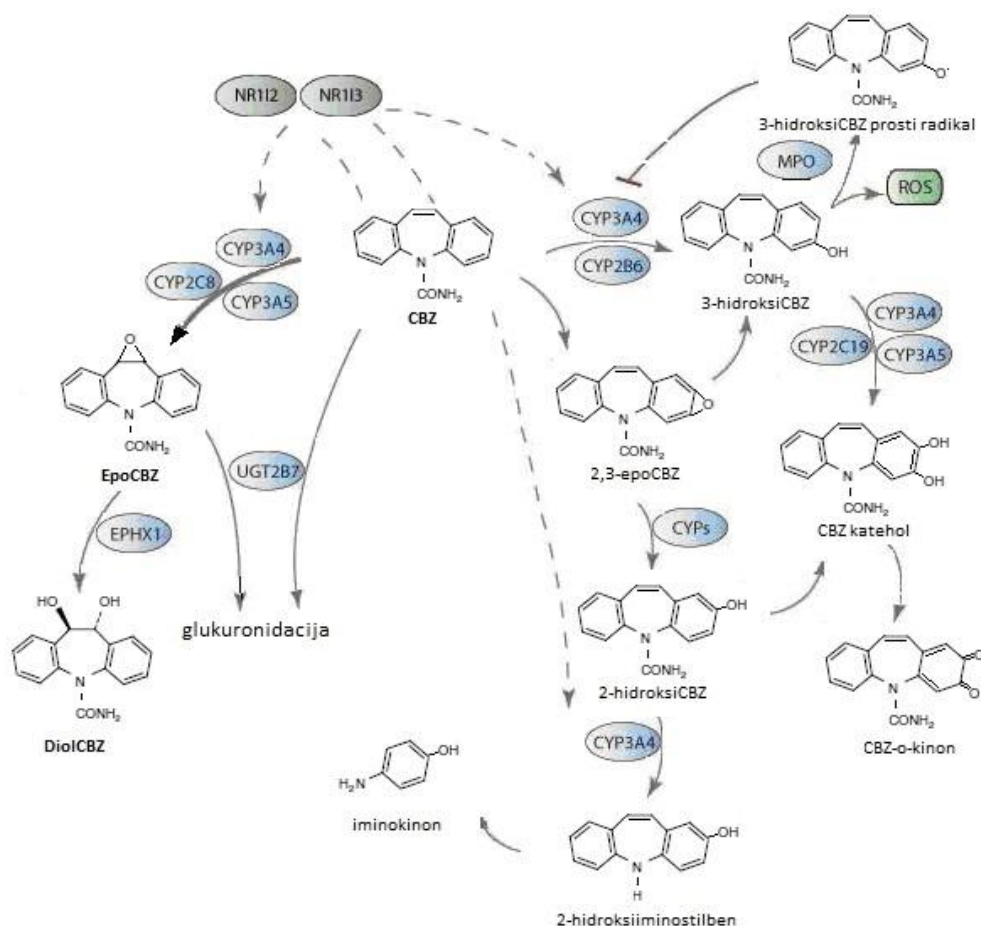
1.4.1 Absorpcija in porazdelitev

Po peroralni aplikaciji OxCBZ se absorbira več kot 95 % učinkovine. Potem pride do hitre redukcije v jetrnih encimih (citosolna arilketonreduktaza) do 10,11-dihidro-10-hidroksikarbamazepina (LiCBZ), ki se v približno 40 % veže na plazemske proteine, v večini na albumine. Približno enakomerno se porazdeljuje med eritrociti in plazmo. Razmerje med eritrociti in plazmo je 1,1 med krvjo in plazmo pa 1,25. Volumen porazdelitve je med 0,3 in 0,8 l/kg. Njegova koncentracija v likvorju je enaka 60%, v

materinem mleku pa 50% plazemske koncentracije. Med nosečnostjo so koncentracije LiCBZ enake v materi in otroku. Razpolovna doba OxCBZ v plazmi je 1,3 do 2,3 h, medtem ko ima LiCBZ razpolovno dobo $9,3 \pm 1,8$ h. Vrednosti pri otrocih in starejših so drugačne, razlika pa je celo med otroki starimi 2 - 5 let in tistimi, ki so stari 6 - 12 let. Zato se zlasti pri otrocih priporoča spremljanje koncentracije učinkovine (*therapeutic drug monitoring* oziroma TDM). Uporaba TDM je koristna tudi pri drugih populacijah (6-9).

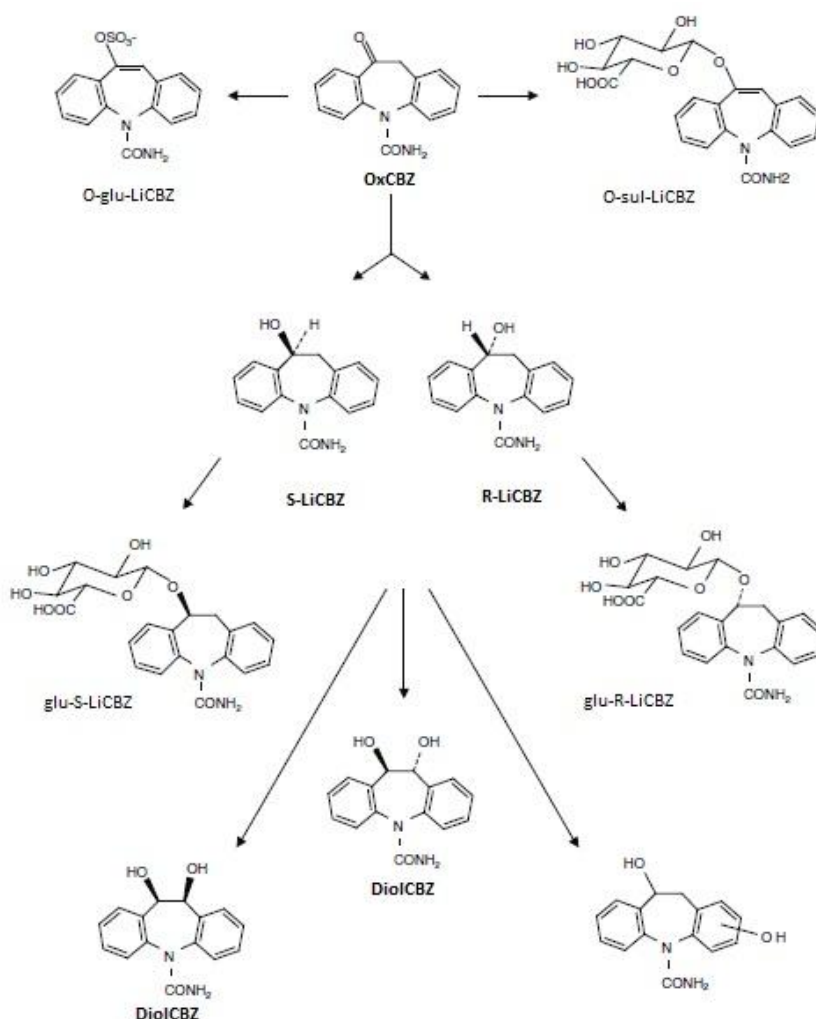
1.4.2 Metabolizem in izločanje

LiCBZ je v približno 70 % odgovoren za farmakološko aktivnost OxCBZ. Natančneje, nastaneta S in R enantiomera, v razmerju 4:1. Obe obliki naj bi imeli enako farmakološko aktivnost.



Slika 1: Metabolizem CBZ, prirejeno po Thorn et. al. (8). CYP: citokrom P-oksido-reduktaze, ROS: reaktivni kisikovi radikali, UGT: glukuroniltransferaza, EPHX: epoksidhidrolaza, NR: nitrat-reduktaza, MPO: mieloperoksidaza.

Približno 4 % OxCBZ se presnovi tudi v 10,11-dihidro-10,11-hidroksikarbamazepin (DioICBZ), ki pa je farmakološko neaktiven. Ta metabolit se pojavlja tudi pri metabolizmu CBZ (slika 1). Presnavljanje OxCBZ se pri odmerkih med 300 - 2400 mg odvija po kinetiki 1. reda, torej linearno. Pri CBZ pride po 3 - 5 dneh jemanja do avtoindukcije jetrnih encimov. Njihovo delovanje se ustali po 20 - 35 dneh jemanja CBZ. Večina metabolitov OxCBZ se izloči preko urina, največ v obliki glukuronida (slika 2). Pri otrocih je povečan njihov renalni očistek, zato za doseg terapijske koncentracije učinkovin potrebujejo večji odmerek zdravila glede na površino telesa kot odrasli. Prilagajanje odmerka razen pri težjih poškodbah jeter ni potrebno. Pri metabolizmu CBZ, ki večinoma poteka preko jetrnih encimov, se pojavlja tudi metabolit 10,11-epoksikarbamazepin (EpoCBZ), ki verjetno pripomore zlasti k nekaterim neželenim učinkom. CBZ, OxCBZ in njegov 10-hidroksi derivat prehajajo preko placente in v materino mleko.



Slika 2: Metabolizem OxCBZ, prirejeno po Flesch (6). Sul-: sulfonil-, glu-: glukuronil-.

Testi na živalih so pokazali, da CBZ in OxCBZ ni priporočljivo jemati med nosečnostjo, saj prehajata preko placente in lahko povzročita nepravilno rast in hujše deformacije zarodka. Pri jemanju obeh se poveča presnavljanje oralnih kontracepcijskih sredstev (etinilestradiol in levonorgestrel), kar lahko zmanjša njihovo delovanje (6,7).

1.5 SPREMLJANJE TERAPIJE Z ZDRAVILI

TDM vključuje merjenje kliničnih parametrov pri pacientu in spreminjanje velikosti odmerka zdravila na podlagi pravilne interpretacije dobljenih informacij z namenom zagotavljanja čim boljšega zdravljenja (10). Temelji na predpostavki, da obstaja vzročno posledična povezava med velikostjo odmerka zdravila, koncentracijo učinkovine v plazmi oziroma v krvi in terapevtskim učinkom, pri čemer je korelacija med koncentracijo učinkovine v plazmi oziroma v krvi in terapevtskim učinkom boljša. Uporabljamo ga zlasti pri učinkovinah, ki imajo ozko terapevtsko območje, kjer se pojavljajo velike razlike v koncentraciji učinkovine v krvi med posameznimi bolniki, pri spremembah v farmakokinetiki zaradi interakcij z na novo predpisanimi zdravili in zaradi nelinearnega odnosa med odmerkom in plazemsko koncentracijo. Zavoljo nedvoumnih rezultatih je dobro, če spremljana učinkovina nima aktivnih metabolitov, ima reverzibilni mehanizem delovanja in da se po daljšem času jemanja zdravila ne razvije toleranca nanj. TDM se prične po prvem prejetem odmerku, takoj ko je koncentracija učinkovine v krvi v stacionarnem stanju. Nato je pomembno, da v krvi vzdržujemo dovolj visoko, terapevtsko učinkovito koncentracijo učinkovine. Terapevtsko učinkovitost zagotovimo s koncentracijo učinkovine znotraj terapevtskega območja. S tem poskrbimo, da je zdravljenje za posameznega bolnika najboljše možno. Za TDM je pomembno ugotoviti tudi referenčno območje. To je območje, znotraj katerega je koncentracija učinkovine optimalna za večino bolnikov. Če je koncentracija manjša od spodnje meje, je terapevtski učinek malo verjeten, nad zgornjo mejo pa se pojavljajo neželeni učinki. Zaradi razlik v farmakokinetiki učinkovine med posamezniki je lahko pri nekaterih bolnikih optimalno zdravljenje tudi izven referenčnega območja (9-12).

1.5.1 Analizne metode

Koncentracijo učinkovine izmerimo z analizo bioloških vzorcev. Najpogosteje merimo prisotnost učinkovine v serumu ali plazmi, možna je tudi uporaba polne krvi, sline,

likvorja, urina, materinega mleka, solz ali las. Vzorce jemljemo vedno ob enakem času, najpogosteje tik preden bolnik vzame naslednji odmerek zdravila. Za analizo vzorcev uporabljamo različne analizne metode in aparature, s katerimi poskušamo točno, hitro, čim ceneje in z uporabo najmanjšega možnega volumna, ugotoviti koncentracijo učinkovine v plazmi oziroma krvi. Najpogostejše so imunološke analizne metode kot so radioaktivni imunološki testi, encimski imunološki testi, direktni in indirektni encimski imunoadsorpcijski testi itd. Ti testi temeljijo na uporabi monoklonskih ali poliklonskih protiteles in so specifični ter enostavni za uporabo, saj so avtomatizirani. Kljub temu lahko pride do navzkrižne reaktivnosti z metaboliti učinkovine oziroma molekulami, ki so ji zelo podobne. Poleg imunoloških se veliko uporabljajo tudi kromatografske metode, kjer za ugotavljanje uporabimo tekočinsko kromatografijo (LC), tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (*high performance liquid chromatography* oziroma HPLC) in tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti (UPLC), plinsko kromatografijo (GC) in sisteme sklopljene z masnim spektrometrom (MS) ali s še občutljivejšem tandemskim masnim spektrometrom (MS/MS). Te metode so zelo specifične in primerne za spremljanje koncentracij več učinkovin in njihovih metabolitov hkrati. Specifičnost kromatografske metode je odvisna od načina priprave vzorca, kromatografskih razmer in vrste detektorja. Poznamo še spektroskopske metode, ki se ne uporabljajo več pogosto. Njihova slabost je zlasti nizka občutljivost (9-12).

Pri AED je težko ugotoviti ustreznost zdravljenja, saj je težko oceniti ali je odsotnost epileptičnih napadov posledica ustrezne terapije ali bi imel pacient obdobje brez epileptičnih napadov tudi brez terapije. Kljub temu, da nobena izmed dveh izvedenih randomiziranih kontroliranih kliničnih raziskav ni našla pozitivnih učinkov pri uporabi TDM za AED (13,14), so dolgoletne izkušnje pokazale, da so koristi pri pravilni uporabi. Pri zdravljenju bolnikov z OxCBZ je zanimivo, da ne spremljamo koncentracije OxCBZ, ampak njegovega glavnega metabolita LiCBZ. Terapevtski učinek imata obe spojini, zato bi lahko OxCBZ obravnavali kot zdravilo-bioprekuzor. Vendar OxCBZ obravnavamo kot predzdravilo (*prodrug*), saj je nepresnovljene oblike OxCBZ v plazmi le 2 % začetnega odmerka (6). Za TDM je primeren, ker je dobro znano referenčno območje zdravila v serumu (3-35 mg/l). Pri koncentracijah nad 35 mg/l so že poročali o povečanem pojavu neželenih, celo toksičnih učinkov. TDM se izvaja, ko pričakujemo spremembo koncentracije LiCBZ v krvi. Bolniki z epilepsijo zdravila z OxCBZ pogosto jemljejo dlje

časa, včasih tudi celo življenje. Odmerek je potrebno prilagoditi starosti, pri spremembi (zmanjšanju) delovanja ledvic, v nosečnosti in pri sočasni uporabi zdravil, ki inducirajo ali inhibirajo jetrne encime (10,11). Kromatografske metode za določitev koncentracije LiCBZ v plazmi oziroma serumu že obstajajo: GC (15), GC/MS (16), HPLC (17), LC/MS (18), LC/MS/MS (19), micelarna elektrokinetična kromatografija (20) ter tudi za ugotavljanje v slini (21). V magistrski nalogi smo se odločili za merjenje koncentracije OxCBZ, CBZ in njenih metabolitov v krvi s pomočjo tehnike vzorčenja imenovano posušeni krvni madeži (*dried blood spots* oziroma DBS). Za merjenje smo uporabili HPLC z detektorjem za merjenje ultravijolične in vidne svetlobe (UV/VIS detektor).

1.6 POSUŠENI KRVNI MADEŽI

DBS je tehnika vzorčenja, ki se je pojavila leta 1963. Odkril jo je Škot Robert Guthrie. Prvič so jo uporabili ob koncu 60. let za merjenje koncentracije aminokislin v novorojenčkih s fenilketonurijo. Kasneje uporaba DBS ni bila zelo razširjena, v zadnjih letih pa se po zaslugi bolj občutljivih analiznih naprav vedno bolj uveljavlja kot primerna alternativa konvencionalnim tehnikam vzorčenja. Sam postopek pridobitve vzorca je enostaven in ga lahko izvede tudi bolnik sam. Očistimo mesto odvzema, ki je najpogosteje konica prsta, zmasiramo in ogrejemo prst, nato z lanceto prebodemo kožo, zavržemo prvo kapljico in nato odvezamemo kapljico, ki navadno vsebuje 5-50 μ l krvi. Potem kapnemo kapljice zelene velikosti na posebej za ta namen proizveden DBS papirček. Pri tem dobimo kapilarno kri. Če želimo, lahko v epruveto z dodanim sredstvom proti strjevanju krvi odvezamemo vensko kri, ki jo nato s pipeto naneseemo na DBS papirček. Madeže sušimo vsaj 3 ure, nato pa lahko vzorec takoj analiziramo ali shranimo za kasnejšo analizo. Neuporabljene vzorce damo v plastično vrečko, ki jo nepredušno zapremo in jim dodamo sušilno sredstvo (22).

1.6.1 Prednosti posušenih krvnih madežev

Tehnika vzorčenja DBS je manj invazivna in prijaznejša do bolnika v primerjavi s klasičnim odvzemom venske krvi. Poleg enostavnosti uporabe DBS je velika prednost tudi enostavna obdelava odvzetega vzorca, saj ga ni potrebno zamrzniti, centrifugirati ali separirati. Tudi transport in shranjevanje vzorcev sta enostavna in poceni, saj jih lahko shranimo pri sobni temperaturi. Vseeno moramo paziti, da jih ne izpostavljammo previsokim

temperaturam in preveliki vlagi. Glavna prednost je poraba majhnega volumna krvi. To je pomembno zlasti za bolnike, ki jim je potrebno velikokrat meriti koncentracijo učinkovine v krvi. Tehnika DBS je zaradi tega primerna tudi za novorojenčke, otroke, starejše in ljudi, ki so zelo slabotni. To prednost lahko s pridom izkoristimo tudi pri študijah na živalih, saj poraba majhnega volumna krvi pomeni to, da lahko eno žival uporabimo za večkratno merjenje koncentracije zdravila v njeni krvi. Manjša je tudi verjetnost okužb z morebitnimi patogeni iz vzorca. Poleg tega je cena uporabljenega materiala zelo nizka (22,23).

1.6.2 Slabosti posušenih krvnih madežev

Rokovanje z manjšimi volumni vzorca prinese tudi določene slabosti. Za dobro natančnost in točnost meritev koncentracije učinkovine v krvi potrebujemo bolj občutljive in posledično dražje naprave. Na voljo imamo precej manj kot 1 ml vzorca, tako da je omejeno tudi število testov, ki jih lahko naredimo. Ekstrakcija analita s filtrirnega papirja mora biti čim boljša, medtem ko je zaželeno, da vse nečistote ostanejo na filtrirnem papirju. Poleg tega se lahko pojavijo težave pri ponovljivosti rezultatov zaradi različne koncentracije hemoglobina v krvi, vezave analita na različne celice ali s celulozo. Težave so lahko tudi s homogenostjo DBS in stabilnostjo krvi pred in po nanosu krvnih kapljic na DBS papirček. Pride lahko tudi do kontaminacije vzorca pri odvzemu krvi, bodisi z intersticijsko tekočino, bodisi z umazanijo v bližini odvzema. Slabost je tudi različna priprava DBS pri vzorcih in pri standardih za zagotavljanje kakovosti. Razlika je v tem, da pri vzorcih kapljice krvi nanese neposredno na DBS papirček, pri standardih pa odvzeti krvi dodamo sredstvo proti strjevanju in posledično lahko pride do težav pri primerjanju rezultatov. Uporaba DBS za ugotavljanje koncentracij različnih spojin v krvi oziroma v plazmi je doživela velik razmah šele v zadnjih letih. Zaradi tega še ni točno določeno, če so trenutne klinične smernic za njihovo uporabo in merila za sprejemljivost metod, razvitih s pomočjo DBS zadostne ali bodo za validacijo potrebni dodatni testi in zahteve (23,24).

1.6.3 Uporaba posušenih krvnih madežev ali plazme

Čeprav je farmakološko aktivna le nevezana učinkovina v plazmi, uporabljamo za merjenje učinkovitosti zdravljenja celotno koncentracijo učinkovine v plazmi. To si lahko privoščimo, ker sta ti dve koncentraciji v znanem razmerju. Pri DBS merimo koncentracijo

učinkovine v polni krvi. Zato je potrebno ugotoviti razmerje med koncentracijama v krvi ter plazmi. Dodatna pogoja sta, da morata biti porazdelitev med plazmo in krvnimi celicami ter vrednosti hematokrita konstantni oziroma da variirata v majhnem območju. Referenčna območja za terapevtsko delovanje učinkovin so najpogosteje podana za serum ali plazmo in ne v polni krvi, saj je število opravljenih raziskav s plazmo veliko večje od tistih s polno krvjo. V določenih primerih je merjenje učinkovine v krvi primernejše, ampak je delo z njo bolj zahtevno. Ustreznost uporabe DBS ali plazme podajamo v preglednici II.

Preglednica II: Odločitvena tabela za izbor matrice. Povzeto po Emmons, Rowland (25).

Porazdelitev učinkovine med krvjo in plazmo	Konstantna vrednost hematokrita*	Konstantna vrednost proste učinkovine v plazmi	Konstantna porazdelitev učinkovine med krvjo in plazmo	Plazma in/ali DBS
$0,55 < 2,0$	da	da	da	Vseeno.
$0,55 < 2,0$	da	ne	da	Vseeno, ampak moramo razumeti razloge za variabilnost in narediti popravek pri vezavi na plazemske proteine.
$\geq 2,0$	da	da	da	DBS boljši zaradi možnosti hemolize.
$\geq 2,0$	da	ne	da	DBS boljši zaradi možnosti hemolize.
$\geq 2,0$	da	da	ne	Vseeno, a je pri uporabi DBS potrebno razumeti razloge in narediti popravek zaradi nekonstantne porazdelitve učinkovine.
vse vrednosti	ne	da/ne	da/ne	Odločitev, tako kot zgoraj, odvisna od porazdelitve učinkovine med krvjo in plazmo, pri uporabi DBS in približevanju vrednosti $0,55$ ali $\geq 2,0$ je potreben popravek zaradi hematokrita.
* Vrednost variira v majhnem obsegu, ki ne vpliva bistveno na odnos med koncentracijo proste učinkovine v plazmi in celokupno koncentracijo.				

1.7 PRIPOROČILA EVROPSKEGA BIOANALIZNEGA FORUMA

Prvo validacijo metode DBS za terapevtsko spremljanje zdravil sta leta 2008 potrdili Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) in Evropska agencija za zdravila (EMA). K temu pa nista podali dodatnih priporočil za uporabo DBS tehnike (26). Strokovnjaki bioanalitike so se zato poglobili v do tedaj znana priporočila za preizkušanje metode DBS, in leta 2011 izdali smernice glede uporabe in validacije pod okriljem Evropskega bioanaliznega foruma (EBF). Osredotočili so se na vpliv hematokrita na DBS, na homogenost DBS, na stabilnost DBS, na postopek redčenja vzorca ter na čas dodajanja internega standarda (IS) k vzorcu (24).

1.7.1 Vpliv hematokrita na posušene krvne madeže

Hematokrit je volumski delež eritrocitov v krvi in predstavlja posredno merilo za viskoznost krvi. Normalne vrednosti hematokrita so pri moških med 41 % in 51 %, pri ženskah pa med 37 % in 47 %. Vendar pa se lahko vrednosti pri različnih ljudeh raztezajo v območju od 20 % do 70 %. Takšne razlike so zaznali zlasti pri novorojenčkih. Strokovnjaki bioanalitike so potrdili domneve, da je delež hematokrit zelo pomemben pri uporabi tehnike DBS in da vpliva na velikost in obliko DBS ter na količino nanosa krvi. Odvisno od spojine lahko vpliva tudi na velikost ekstrakcije in homogenost DBS. Poleg tega se velikost ekstrakcije ponavadi zmanjšuje s starostjo vzorca in tudi tu lahko različni deleži hematokrita privedejo do različnih rezultatov. Vsi ti dejavniki značilno vplivajo na natančnost in točnost preračunavanja farmakološko aktivne koncentracije učinkovine. Vpliv hematokrita lahko zmanjšamo tako, da preizkusimo različne filtrirne papirčke, primerjamo rezultate in izberemo najboljše. Poleg tega lahko uporabimo celotni DBS vzorec, pri čemer morajo biti vsi enake velikosti. Končno priporočilo EBF je, da se pri validaciji metode izvede dodatni test točnosti in ponovljivosti pri različnih vrednostih hematokrita znotraj območja, za katerega je razvita metoda (27).

1.7.2 Homogenost posušениh krvnih madežev

Strokovnjaki EBF so potrdili, da koncentracija analita ni homogena po celotni površini DBS. Navadno je koncentracija spojine največja na sredini ter dokaj homogena do robov, kjer strmo pade. Pri nekaterih spojinah lahko pride pri uporabi DMPK-A in DMPK-C

papirčkov do tako imenovanega vulkanskega učinka, kjer je koncentracija spojine na robovih večja kot na sredini DBS. Na homogenost najbolj vplivajo delež hematokrita, vrsta filtrirnega papirja in analizirana spojina. Težavam s homogenostjo se lahko izognemo tako, da za analizo uporabimo celotni DBS vzorec, pri tem pa moramo zagotoviti, da so vsi enake velikosti (28).

1.7.3 Stabilnost posušeni krvnih madežev

Ker je uporaba tehnike vzorčenja DBS za analizo različnih spojin dokaj nova, so trenutne izkušnje s stabilnostjo DBS po daljšem časovnem obdobju, torej več kot pol leta, omejene. Kljub pomanjkanju podatkov lahko prepoznamo glavne vplive na stabilnost DBS. To so temperatura, vlaga in vrsta filtrirnega papirja. Za čim boljšo dolgoročno stabilnost se priporoča nizka temperatura, nizka vlaga in papirji, ki so kemijsko obdelani in imajo zaščito proti mikroorganizmom, denaturirajo proteine, razkrojijo celice in stabilizirajo analite (24,26).

1.7.4 Postopek redčenja vzorca

Pri DBS so posebne omejitve tehnike, saj DBS vzorca ni mogoče redčiti tako kot pri tekočih vzorcih. Vzorec lahko redčimo šele po izvedeni ekstrakciji iz DBS z ekstraktom slepega DBS vzorca. (29).

1.7.5 Dodatek internega standarda k vzorcu

Pri tradicionalnih metodah dodamo IS k plazmi ali krvi pred ekstrakcijo. Pri DBS to ni praktično in pogosto nemogoče, saj pri odvzemu nimamo dovolj natančnih laboratorijskih pripomočkov. Prav tako to ni mogoče, če bolnik sam prenese krvne kapljice na DBS papirček, saj pri sebi nima IS. Zato se je uveljavila praksa, da vzorcu dodamo IS v ekstrakcijsko topilo. Obstajajo tudi druge metode, ki so jih strokovnjaki pod okriljem EBF vključili v poskus. Poleg zgoraj omenjenih metod, so poskusili še z dodatkom IS na DBS papirček pred in po nanosu krvnih kapljic. Preizkusili so tudi metodo z dvema različnima DBS, pri čemer so na eno nanесли kri z analitom, na drugo pa kri z IS. Vse metode so preizkusili s svežimi DBS in DBS starimi tri mesece. Za najbolj praktično metodo z zadovoljivimi rezultati se je izkazala metoda, kjer dodamo IS v ekstrakcijsko topilo.

Vendar pa ima ta postopek veliko omejitev pri spojinah, pri katerih se s časom precej zmanjša delež ekstrakcije s filtrirnega papirja, saj ne zajame teh izgub. Končno priporočilo EBF je, da ni en pristop najboljši za vse spojine, zato je potrebno pri razvoju bioanalitske metode z uporabo DBS temu nameniti posebno pozornost (30).

2 NAČRT ZA DELO

Farmakološka aktivnost OxCBZ poteka zlasti preko njegovega aktivnega metabolita LiCBZ. Uporablja se za zdravljenje epilepsije, natančneje za zdravljenje generaliziranih tonično - kloničnih napadov ter lokaliziranih napadov pri odraslih in otrocih. Pri presnovi se v manjših količinah pojavijo še nekateri drugi derivati, ki nimajo farmakološkega delovanja. Med njimi najdemo tudi EpoCBZ in DiolCBZ. V bioanalizo bomo vključili tudi CBZ, antiepileptik, ki je strukturno podoben OxCBZ.

Namen magistrske naloge je razvoj in validacija analizne metode, s katero bi ugotovili koncentracijo LiCBZ, EpoCBZ, OxCBZ, CBZ in DiolCBZ. Metodo bomo izvedli na vzorcih iz posušenih krvnih madežev, kvantitativno analizo pa bomo izvedli s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z UV/VIS detekcijo. Glavni izzivi bodo ustrezna priprava vzorcev, čim večja ekstrakcija vseh spojin iz posušenih krvnih madežev in odstranitev motečih komponent matrice. Skozi raziskovalno delo bomo to poskušali doseči z uporabo različnih ekstrakcijskih in rekonstitucijskih topil, ekstrakcijo tekoče – tekoče in s spreminjanjem kromatografskih razmer. Poleg tega bomo preizkusili različne volumne krvnih kapljic in različne DBS papirčke, na katere nakapamo kri.

Razvito metodo bomo validirali po smernicah FDA. Preverili bomo, če bo zagotovila ustrezno točnost, ponovljivost in selektivnost. Ugotovili bomo izkoristek ekstraktij, mejo kvantifikacije, območje linearnosti, in stabilnost vzorcev. Rezultate bomo ustrezno interpretirali.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci krvi

Za pripravo vzorcev posušenih krvnih madežev smo uporabljali svežo kri vedno istega darovalca. Kri smo odvzemali v plastično epruveto, v kateri je bila že prej dodana etilendiamintetraocetna kislina (EDTA), kar je preprečevalo strjevanje krvi. Uporabili smo jo za pripravo obogatenih krvnih vzorcev. Naredili smo tudi primerjavo venske krvi med petimi različnimi darovalci.

3.1.2 Preiskovane spojine

10,11-dihidrokarbamazepin $C_{15}H_{14}N_2O$, $M = 238,3$ g/mol, (Sequoia Research Products, Pangbourne, Združeno kraljestvo Velika Britanija)

Epokarbamazepin $C_{15}H_{12}N_2O_2$, $M = 252,3$ g/mol, (Sequoia Research Products, Pangbourne, Združeno kraljestvo Velika Britanija)

Karbamazepin $C_{15}H_{12}N_2O$, $M = 236,3$ g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Kloramfenikol $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$, $M = 323,1$ g/mol, (Sequoia Research Products, Pangbourne, Združeno kraljestvo Velika Britanija)

10,11-dihidro-10-hidroksikarbamazepin $C_{15}H_{14}N_2O_2$, $M = 254,3$ g/mol, (Sequoia Research Products, Pangbourne, Združeno kraljestvo Velika Britanija)

Okskarbazepin $C_{15}H_{12}N_2O_2$, $M = 252,3$ g/mol, (Sequoia Research Products, Pangbourne, Združeno kraljestvo Velika Britanija)

3.1.3 Reagenti in topila

85 % ortofosforjeva kislina H_3PO_4 , for analysis, $M = 98,00$ g/mol, (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

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

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

Amonijev acetat $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $M = 77,08 \text{ g/mol}$, (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
Bidestilirana voda – milli-Q voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10
Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), specifična upornost $< 18,2 \text{ m}\Omega\text{cm}$, celokupni organski ogljik (TOC) $< 6 \text{ ppb}$ (pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
Dietileter, $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$, for analysis, $M = 74,12 \text{ g/mol}$, (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
Etilacetat $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, $\geq 99,5 \%$, $M = 88,10 \text{ g/mol}$, (Panreac, Barcelona, Španija)
Kalijev dihidrogenfosfat KH_2PO_4 , for analysis, $M = 136,08 \text{ g/mol}$, (Merck, Darmstadt, Nemčija)
Metanol CH_3OH CHROMASOLV®, for HPLC, $\geq 99,9 \%$; $M = 32,04 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
Stisnjen dušik N_2 , za prepričavanje (Messer, Ruše, Slovenija)
Trietilamin $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$, for synthesis, $\geq 99 \%$, $M = 101,19 \text{ g/mol}$, (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Nemčija)

3.1.4 Naprave in pribor

Celulozno acetatni filter $0,45 \mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Nemčija)
HPLC kolona: Phenomenex, Luna 5u, Phenyl-Hexyl, $150 \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
Centrifuga Eppendorf, tip: 5415R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
Hladilnik $3 \text{ }^\circ\text{C}$ z zamrzovalnikom $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Gorenje, Velenje, Slovenija)
HPLC sistem Agilent 1100 series z UV/VIS detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
Magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Koper, Slovenija)
Mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica®, Železniki, Slovenija)
pH meter MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)
Plastične epruvete z zamaškom $1,5$ in 2 ml (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
Polavtomatske pipete $10 - 100 \mu\text{l}$, $100 - 1000 \mu\text{l}$ (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
Predkolona za HPLC: Phenomenex, Luna 5u, $4 \times 3 \text{ mm}$ (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
Tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
Tehtnica XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)

Termostat kolone Varian Pro star 510 (VARIAN medical systems, Paolo Alto, Kalifornija)
 Turbovap®LV (Caliper, Hopkinton-MA, ZDA)

Ultrazvočna kadička BANDELIN SONOREX (Bandelin electronic, Berlin, Nemčija)

Ultrazvočna kadička SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)

Združene države Amerike)

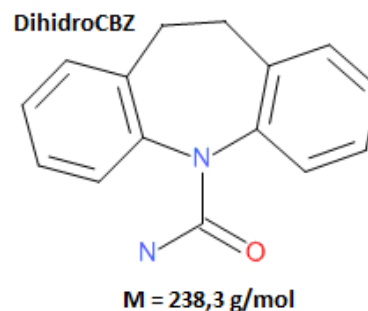
Zamrzovalnik Gorenje (T = -20 °C) (Gorenje, Velenje, Slovenija)

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

3.2 POSTOPEK

3.2.1 Priprava osnovnih raztopin

Pri razvoju metode, smo se oprli na že razviti analizni postopek istih spojin v plazmi, ki je delo diplomantke Janje Ramšak (31). Na tehtnici smo zatehtali ustrezne količine spojin in jih raztopili v metanolu (MeOH), tako da smo dobili osnovne raztopine OxCBZ, LiCBZ, EpoCBZ, 10,11 – dhidrokarbamazepin (DihidroCBZ) in CBZ s koncentracijo 5,00 mg/ml in raztopino kloramfenikola, ki smo ga uporabili kot IS, s koncentracijo 1,00 mg/ml.



Slika 3: Molekula DihidroCBZ.

3.2.2 Priprava delovnih raztopin za umeritveno krivuljo

Pripravljene osnovne raztopine smo razredčili z zmesjo MeOH in H₂O v razmerju 1:1 (v/v) (preglednica III). Potem smo vse delovne raztopine dobro premešali z mešalom na ekscenter. Mešali smo dokler v raztopini ni bilo več videti trdnih delcev. Najdlje sta se raztapljala OxCBZ in DihidroCBZ, tudi do 20 min.

Preglednica III: Navodila za pripravo delovnih raztopin.

UČINKOVINA	VOLUMEN OSNOVNE RAZTOPINE (5,00 mg/ml)	VOLUMEN MeOH:H ₂ O = 1:1
OxCBZ – WS1	200 µl	0,00 µl
LiCBZ – WS2	200 µl	0,00 µl

CBZ – WS3	150 µl	50,0 µl
DihidroCBZ – WS4	100 µl	100 µl
EpoCBZ – WS5	100 µl	100 µl

3.2.3 Priprava raztopin za umeritveno krivuljo

Nato smo v 1,5 ml plastično epruveto združili po 70,0 µl vsake izmed delovnih raztopin, dobljeno raztopino premešali in jo redčili, kot je prikazano v spodnji preglednici.

Preglednica IV: Navodila za pripravo raztopin za umeritveno krivuljo.

	Volumen analitov	Volumen MeOH:H ₂ O = 1:1 (µl)	Koncentracije analitov v krvnih vzorcih (20 µl zmesi + 480 µl krvi) (µg/ml)	
ZMES 8	70,0 µl WS1 70,0 µl WS2 70,0 µl WS3 70,0 µl WS4 70,0 µl WS5	0,00	OxCBZ	40,0
			LiCBZ	40,0
			CBZ	30,0
			DihidroCBZ	20,0
			EpoCBZ	20,0
ZMES 7	75,0 µl ZMES 8	25,0	OxCBZ	30,0
			LiCBZ	30,0
			CBZ	22,5
			DihidroCBZ	15,0
			EpoCBZ	15,0
ZMES 6	50,0 µl ZMES 8	50,0	OxCBZ	20,0
			LiCBZ	20,0
			CBZ	15,0
			DihidroCBZ	10,0
			EpoCBZ	10,0
ZMES 5	25,0 µl ZMES 8	75,0	OxCBZ	10,0
			LiCBZ	10,0
			CBZ	7,50
			DihidroCBZ	5,00
			EpoCBZ	5,00
ZMES 4	25,0 µl ZMES 8	175	OxCBZ	5,00
			LiCBZ	5,00
			CBZ	3,75
			DihidroCBZ	2,50
			EpoCBZ	2,50
ZMES 3	25,0 µl ZMES 8	375	OxCBZ	2,50
			LiCBZ	2,50
			CBZ	1,88
			DihidroCBZ	1,25
			EpoCBZ	1,25
ZMES 2	40,0 µl ZMES 3	60,0	OxCBZ	1,00
			LiCBZ	1,00
			CBZ	0,75
			DihidroCBZ	0,50

			EpoCBZ	0,50
ZMES 1	25,0 µl ZMES 3	100	OxCBZ	0,50
			LiCBZ	0,50
			CBZ	0,38
			DihidroCBZ	0,25
			EpoCBZ	0,25

3.2.4 Priprava kontrolnih vzorcev

Raztopine kontrolnih vzorcev (QC) smo pripravili tako, da smo združili delovne raztopine in s tem dobili zmes 8 (preglednica IV). Nato smo jo redčili z MeOH in H₂O v razmerju 1:1 (v/v) tako, da smo dobili tri različne zmesi, kontrolne vzorce pri visoki (QC_H), srednji (QC_M) in nizki koncentraciji (QC_L). Koncentracija OxCBZ po dodatku krvi (v krvnem vzorcu) je bila v QC_H 35,0 µg/ml, v QC_M 7,50 µg/ml in v QC_L 1,50 µg/ml. QC_H smo dobili z dodajanjem 1 dela topila 7 delom zmesi 8, QC_M z dodajanjem 13 delov topila 3 delom zmesi 8 in QC_L z dodajanjem 77 delov topila 3 delom zmesi 8.

3.2.5 Priprava obogatenih krvnih vzorcev

Obogatene krvne vzorce smo pripravili tako, da smo 480 µl sveže odvzeti krvi dodali 20 µl zmesi (1-8). Poleg osmih zmesi krvi in razredčenih osnovnih raztopin učinkovin, smo pripravili tudi slepo raztopino, kjer smo 480 µl krvi dodali 20 µl zmesi MeOH in H₂O v razmerju 1:1 (v/v). Za tako majhen volumen raztopin (< 2,5 %), ki smo jih dodali krvi, smo se odločili zato, da ne bi prišlo do obarjanja proteinov. Vse zmesi smo nato na mešalu na ekscenter mešali po 30 s. Potem smo s polavtomatsko pipeto iz vsake zmesi odpipetirali po 20 µl vzorca in ga kapnili na DBS papirček (Whatman 903TM). Postopek smo ponavljali, dokler nismo porabili vseh zmesi krvi in zmesi. Vzorce smo na sobni temperaturi sušili preko noči. DBS papirčke, smo nato dali v vrečko z nizko prepustnostjo plinov, jim dodali sušilno sredstvo in jih spravili v omaro. Na dan analize vzorcev smo iz papirčkov natančno izrezali celotne DBS ter jih prenesli v 2 ml plastične epruvete.

3.3 RAZVOJ METODE

3.3.1 Krvni vzorci

Imeli smo štiri plastične epruvete, v katere smo dali 480 µl krvi. Dvema smo dodali slepo raztopino, dvema pa zmes 6 in jih občasno mešali. Potem smo izvedli ekstrakcijo spojin

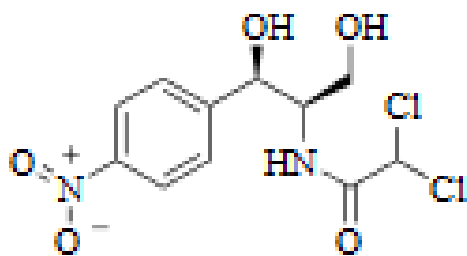
neposredno iz 20 μl krvi z dvema različnima topiloma ob različnih časih. Prvi vzorec smo vzeli takoj po dodatku topil, nato po 5 min, 15 min, 30 min, 1 h in 2 h. Kot ekstrakcijski topili smo uporabljali MeOH in acetonitril (ACN). S tem smo preverili, koliko časa potrebujejo analiti za vzpostavitev ravnotežja v krvi.

3.3.2 DBS papirčki

Poleg DBS papirčkov Whatman 903TM smo preizkusili tudi papirčke DMPK-A in DMPK-C. Preizkus smo izvedli tako, da smo najprej pripravili vodne raztopine analitov z enako koncentracijo kot v krvnih vzorcih. Pripravili smo samo dva vzorca, kjer je bila koncentracija enaka kot pri zmesih 4 in 6, poleg njiju pa še slepo raztopino. Na vsak DBS papirček smo kapnili nekaj kapljic različnih koncentracij analitov. Nadaljevali smo po postopku, ki je opisan poglavju 3.4.

3.3.3 Interni standard

Uporabljali smo kloramfenikol. Preverili smo tudi retencijske čase in kromatografske odzive guanabenz acetata, nitrazepam, ketoprofena, 2-amino-5-nitrobenzofenona in 2-amino-5,5-kloronitrobenzofenona. Ustrezno koncentracijo kloramfenikola smo dosegli tako, da smo 63,5 μl osnovne raztopine ($c = 1,00 \text{ mg/ml}$) dodali 938 μl MeOH in H_2O v razmerju 1:1 (v/v).



Slika 4: Strukturna formula kloramfenikola (32).

3.3.4 Ekstrakcijsko topilo

Pri optimizaciji metode smo največ parametrov spreminjali ravno pri tem delu. Preizkusili smo različna topila kot so MeOH, H_2O , ACN. Spreminjali smo razmerje med posameznimi topili (preglednica V). Poleg tega smo spreminjali tudi celokupen volumen topil.

Preglednica V: Sestava preizkušenih ekstrakcijskih topil.

Metanol (%)	Acetonitril (%)	Voda (%)
100	0	0
50	50	0
25	75	0
80	0	20
60	0	40
40	40	20

Poskusili smo tudi z dodatkom mravljinčne kisline (FA). Preizkusili smo različne koncentracije: 0,1 %, 0,5 %, 1,0 %, 2,5 % in 10 %. Kasneje smo kot ekstrakcijsko topilo preizkusili še nekatera druga organska topila. Uporabili smo dietileter in etilacetat.

Vzorcem smo dodajali po 680 μ l ekstrakcijskega topila in 20 μ l internega standarda. Plastične epruvete smo dobro zaprli in vsebino 30 s mešali na mešalu na ekscenter. Potem smo jih dali za 15 min v ultrazvočno kadičko (UZ kadičko), v kateri je bila voda s sobno temperaturo. Sledilo je pet minutno centrifugiranje pri 8200 obratih na minuto (rpm) (10000 g) in 4 °C. Nato smo s polavtomatsko pipeto iz vsake 2 ml plastične epruvete prenesli po 680 μ l vzorca v 1,5 ml plastične epruvete. Postavili smo jih v napravo za sušenje vzorcev Turbovap, ki smo ga prej segreli na 40 °C. V tej napravi smo vzorce prepihovali z dušikom, dokler ni topilo povsem izhlapelo. Prepihovanje smo začeli pri tlaku 7 kPa (1 psi), saj so bile plastične epruvete precej napolnjene in smo se s tem izognili izgubi vzorca. Topilo je izhlapevalo, mi pa smo postopoma povečevali tlak do 34 kPa (5 psi) in s tem skrajšali čas prepihovanja.

3.3.5 Dodatni korak

Najprej smo poskusili z dodatkom različnih volumnov dietiletra k suhem vzorcu, po prepihovanju z dušikom. Sledilo je 40 s stresanje na mešalu na ekscenter in 15 minutna inkubacija v UZ kadički. Nato smo vzorce ponovno postavili v Turbovap (40 °C, 10 kPa oziroma 1,5 psi), dokler ni topilo do konca izparelo in so ostali samo suhi vzorci. Poskusili smo tudi z uvedbo dodatnega koraka na začetku, takoj po vstavljanju DBS v 2 ml plastične epruvete. Dodali smo jim po 100 μ l topila. Uporabili smo:

0,5 % FA v H₂O,

MeOH/H₂O 1:1 (v/v),
MeOH/H₂O 4:1 (v/v),
0,5 % trietilamin v MeOH/H₂O 1:1 (v/v),
2,5 % FA v MeOH/H₂O 4:1 (v/v),
1,5 % trietilamin v H₂O,
1,5 % trietilamin v MeOH/H₂O 4:1 (v/v),
250 mM amonijev acetat v H₂O,
250 mM NaCl v H₂O/MeOH 4:1 (v/v),
250 mM NaCl v H₂O.

Po 30 s stresanju na mešalu na ekscenter in 15 min inkubaciji v UZ kadički, v kateri je bila voda segreta na 50 °C, smo vsakemu vzorcu dodali še 700 µl dietiletra, poskusili smo tudi z dvojno količino etra. Nato smo vzorce 30 s stresali na mešalu na ekscenter in 15 min mešali v UZ kadički. S tem smo pospešili ekstrakcijo tekoče – tekoče. Vzorce smo nato postavili v zamrzovalnik (-80 °C). Počakali smo, da je voda zamrznila (~30 min). Nato smo v 1,5 ml plastične epruvete čim hitreje prenesli vso organsko fazo (~600 µl). Sledilo je preprihanje s stisnjanim dušikom pri temperaturi 40 °C in tlaku 10 kPa (1,5 psi).

3.3.6 Rekonstitucijsko topilo

Ko so nam ostali povsem suhi vzorci smo jim dodali 100 µl topila. Kot topilo smo uporabili MeOH in H₂O v razmerju 1:1 (v/v) ali 4:1 (v/v). Poskusili smo tudi z rekonstitucijo v mobilni fazi (MeOH in 25 mM KH₂PO₄ s pH 3,0 v razmerju 1:1 (v/v)). Plastične epruvete smo 40 s stresali na mešalu na ekscenter in če smo v raztopini opazili trdne delce, smo jih za 5 min postavili v centrifugo (13200 rpm (16100 g) in 4 °C). Nato smo čim večjo količino supernatanta (~80 µl) prenesli v stekleni insert z volumnom 150 µl, ki smo ga vstavili v vialo in analizirali vsebino s pomočjo kromatografije z visoko ločljivostjo z UV/VIS detekcijo.

Preverili smo tudi razliko med rezultati pri pripravi krvnih vzorcev s svežo krvjo in zamrznjeno krvjo. Poleg tega smo preverjali smotrnost uporabe UZ kadičke.

3.3.7 Priprava pufra za analizo

Kot vodni del mobilne faze (MF) smo uporabljali 25 mM KH_2PO_4 . Pripravili smo ga tako, da smo najprej na tehtič natehtali 3,402 g KH_2PO_4 . Nato smo ga stresli v merilno bučko z volumnom 1 l. Do oznake smo jo napolnili z MiliQ vodo. Bučko smo zaprli z zamaškom in jo dobro pretresli, da se je KH_2PO_4 popolnoma raztopil. Raztopino smo prelili v litrsko čašo, ji dodali magnet in vse skupaj postavili na magnetno mešalo. S pH metrom, ki smo ga pred tem umerili s standardnimi puferskimi raztopinami, smo izmerili pH raztopine in ji s pomočjo 85 % ortofosforjeve kisline ali 1 M NaOH pH uravnali na želeno vrednost. Nato smo puffer s pomočjo vodne črpalke prefiltrirali skozi celulozno-acetatni filter papir z 0,45 μm velikimi porami. Nazadnje smo ga prelili v litrsko steklenico, jo odprto postavili v UZ kadičko ter jo tam pustili 15 min.

3.3.8 Kromatografija

Kolona, ki smo jo pretežno uporabljali, je bila Luna 5u, Phenyl-Hexyl. Poskusili smo tudi z Luno 3u. MF je bila sestavljena iz MeOH in 25 mM KH_2PO_4 , najpogosteje s pH 3,0. Preizkusili smo tudi pH vrednosti 2,0 in 5,0. Poskusili smo z različnimi razmerji topil v MF. Razmerje med MeOH in vodno fazo je bilo največkrat 50:50 (v/v), smo pa preizkusili tudi razmerja od 52:48 (v/v) do 40:60 (v/v) in s tem spreminjali retencijske čase (t_R) analitov. Elucija je bila izokratska. Spreminjali smo tudi temperaturo kolone. Segreli smo jo na 50 °C, 55 °C in 60 °C. Pretok je bil 1,0 ml/min, poskusili smo tudi z 0,8 ml/min, 1,3 ml/min in 1,5 ml/min. Temperatura v avtomatskem vzorčevalniku je bila 5 °C. Volumen injiciranja je bil 50 μl in po vsakem nanosu vzorca je aparat obod igle spral z zmesjo H_2O in MeOH 1:1 (v/v). Odzive smo merili z UV/VIS detektorjem pri valovnih dolžinah 215 nm, 205 nm, 210 nm, 220 nm in 235 nm.

3.4 OPTIMALNA METODA

Za pripravo 20 μl DBS smo uporabili DBS papirčke Whatman 903TM. Za ekstrakcijsko topilo smo izbrali 680 μl 0,5 % FA v ACN/ H_2O v razmerju 4/1 (v/v). Vzorcem smo dodali še 20 μl raztopine kloramfenikola kot IS. Plastične epruvete smo dobro zaprli in vsebino 30 s mešali na mešalu na ekscenter. Potem smo jih dali za 15 min v UZ kadičko, v kateri je bila voda s sobno temperaturo. Sledilo je pet minutno centrifugiranje pri 8200 rpm (11000

g) in 4 °C. Nato smo s polavtomatsko pipeto iz vsake 2 ml plastične epruvete prenesli po 680 µl vzorca v 1,5 ml plastične epruvete. Postavili smo jih v napravo za sušenje vzorcev Turbovap, ki smo ga prej segreli na 40 °C. V tej napravi smo vzorce prepihovali z dušikom, dokler ni topilo povsem izhlapelo. Prepihovanje smo začeli pri tlaku 7 kPa (1 psi) in ga postopoma povečevali do 34 kPa (5 psi). Dodatni korak smo opustili. Kot rekonstitucijsko topilo smo uporabili 100 µl MeOH/H₂O v razmerju 1/1 (v/v). Plastične epruvete smo 40 s stresali na mešalu na ekscenter in če smo v raztopini opazili trdne delce, smo jih za 5 min postavili v centrifugo (13200 rpm (16100 g) in 4 °C). Nato smo čim večjo količino supernatanta (~80 µl) prenesli v stekleni insert z volumnom 150 µl, ki smo ga vstavili v vialo.

Kromatografska metoda, kjer so bili odzivi naših analitov na kromatogramu najboljši, je bila sestavljena iz kolone Luna 5u, Phenyl-Hexyl, segrete na 55 °C. MF je bila sestavljena iz MeOH in 25 mM KH₂PO₄ s pH 3,0 v razmerju 50:50 (v/v). Volumen injiciranja je bil 50 µl, pretok pa nastavljen na 1,0 ml/min. Analiza je trajala 12 min. Detekcija z DAD detektorjem tipa UV/VIS je potekala pri 215 nm.

4 VALIDACIJA

Validacijo smo izvedli po smernicah FDA. Meritve smo izvedli trikrat v razponu petih dni. Vsak dan posebej smo pripravili kontrolne vzorce s tremi različnimi koncentracijami: visoko (QC_H), srednjo (QC_M) in nizko (QC_L). Izbrali smo take koncentracije, da smo pokrili celotno zastavljeno območje merjenja koncentracij izbranih spojin. Za vsako koncentracijo smo imeli po pet paralelk. Poleg tega smo vsak dan pripravili novo umeritveno premico za vsako izmed spojin. Pripravili smo tudi dve slepi raztopini. Eno brez in drugo z IS. Koncentracijo analitov v krvnih vzorcih smo kvantificirali z razmerjem med višino vrha analita in višino vrha internega standarda. (H_A/H_{IS}). Ko smo imeli vse rezultate, smo preverili osnovne parametre kot so selektivnost, točnost, ponovljivost, spodnjo mejo določljivosti (LLOQ), območje linearnosti in izkoristek ekstrakcije. Sledilo je še tritedensko preverjanje stabilnosti vzorcev pri treh različnih temperaturah.

Da bi bila metoda uporabna, je morala ustrezati določenim merilom:

Selektivnost: na kromatogramih morajo biti retencijski časi (t_R) analiziranih spojin toliko različni, da se njihovi vrhovi med seboj ne prekrivajo. Na kromatogramu slepe raztopine ne sme biti vidnih endogenih vrhov, pri katerih bi lahko prišlo do interference z vrhovi naših analitov. Preverili smo njihovo pojavnost z analizo polne krvi šestih oseb po postopku, ki je opisan v poglavju 3.4, s tem, da jim nismo dodali IS.

LLOQ: Višina vrhov vsakega izmed analiziranih spojin pri najmanjši koncentraciji mora biti vsaj petkrat večja od odziva slepe raztopine pri enakem t_R . Prav tako koeficient variacije ne sme biti večji od 20 % in točnost mora biti med 80 in 120 %.

Umeritvena premica: podatke smo vsak dan analizirali s pomočjo linearne regresije in po metodi najmanjših kvadratov ugotovili enačbo umeritvene premice. Za to metodo je značilno, da imajo odstopanja pri večjih koncentracijah, večji vpliv na enačbo kot odstopanja pri majhnih koncentracijah. Ker smo imeli dokaj velik razpon med najmanjšo in največjo koncentracijo pri vseh spojinah (80x), smo se temu izognili z uporabo utežene linearne regresije. Kot potencialni uteži smo preizkusili vrednosti $1/C$ in $1/C^2$. S pomočjo funkcije reševalec v programu Microsoft Excel smo optimizirali naklon (k_u) in odsek na

ordinatni osi (n_u) umeritvene premice tako, da je bila vsota produktov (SS) izbrane uteži (w) pri določeni koncentraciji (C) in kvadrata razlike med izmerjeno vrednostjo (H_1) ter izračunano vrednostjo (H_2), najmanjša.

$$H_1 = H_A/H_{IS} \quad (\text{enačba 1})$$

$$H_2 = k_u * C + n_u \quad (\text{enačba 2})$$

$$SS = \sum (w * (H_1 - H_2)^2 * 1/C^2) \quad (\text{enačba 3})$$

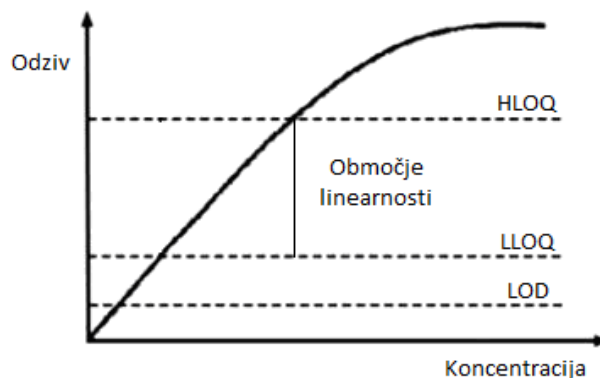
Kot primernejšo utež smo izbrali tisto, kjer so bila odstopanja vseh izmerjenih odzivov analitov od umeritvene premice najmanjša. V našem primeru je bila to utež $1/C^2$. Točnost umeritvene premice smo nato izračunali tako, da smo najprej s pomočjo utežene linearne regresije dobljena koeficienta k_u in n_u uporabili za izračun koncentracije pri izmerjenem odzivu. Potem smo ga delili s C ter vse skupaj pomnožili s 100 in s tem dobili odstotke.

$$C_{\text{izračun}} = (H_A/H_{IS} - n_u)/k_u \quad (\text{enačba 4})$$

$$\text{Točnost [\%]} = C_{\text{izračun}} * 100/C \quad (\text{enačba 5})$$

Vsaj 75 % vrednosti na umeritveni premici mora ustrezati kriteriju odstopanja za največ 15 %. To v našem primeru pomeni, da mora biti vsaj šest od osmih vzorcev znotraj zahtevanega območja.

Območje linearnosti: odziv na kromatogramu mora biti premosorazmeren s koncentracijo spojine v krvi za celo koncentracijsko območje vsake od izbranih spojin, ki jih želimo ugotoviti z našo metodo. To pomeni, da vrednosti na umeritveni premici ne smejo odstopati več kot 15% od točne vrednosti, razen pri najmanjši vrednosti je dovoljeno 20-odstotno odstopanje (33).



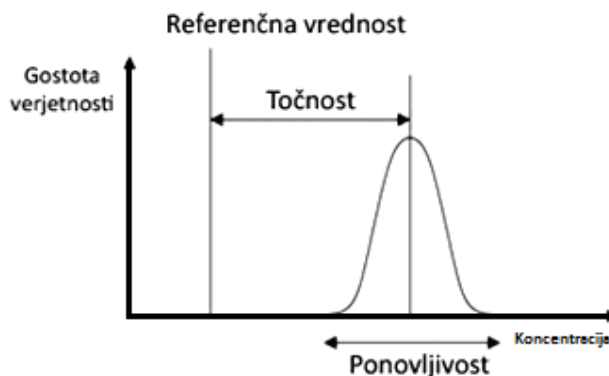
Slika 5: Hipotezni graf odziva v odvisnosti od koncentracije. Naklon premice predstavlja občutljivost. Definiramo jo kot sposobnost detektorja oziroma metode, da razlikuje med majhnimi razlikami v koncentraciji analita. HLOQ: zgornja meja kvantifikacije, LOD: meja zaznavnosti. Prirejeno po Ederveen (34).

Točnost: izračunali smo jo tako, da smo s pomočjo enačb 4 in 5 izračunali točnost vseh izmerjenih vrednosti kontrolnih vzorcev (QC_H , QC_M in QC_L). Analizna metoda je točna, če nobena izmed povprečnih vrednosti QC pri vsaki spojini ne odstopa za več kot 15 % od vrednosti na umeritveni premici.

Ponovljivost: vseh šest paralelk za vsako koncentracijo kontrolnih vzorcev je bilo pripravljeno in izmerjeno na enak način. Po analizi kromatogramov smo primerjali dobljene vrednosti koncentracij in izračunali ponovljivost znotraj dneva in med tremi različnimi dnevi. Najprej smo izračunali vse koncentracije QC vzorcev po enačbi 4 in njihovo povprečje ter standardno deviacijo (SD) znotraj vsakega dne in med dnevi validacije. Nato smo s pomočjo relativne standardne deviacije (RSD) izračunali ponovljivost v odstotkih za vsako spojino pri visokih, srednjih in nizkih koncentracijah znotraj dneva in med dnevi po enačbi 6.

$$RSD = SD / \bar{c}_{\text{izračun}} * 100. \quad (\text{enačba } 6)$$

Tudi tu ne sme priti do odstopanja večjega od 15 % (33).



Slika 6: Prikaz ponovljivosti in točnosti na hipotезnem grafu. Prirejeno po Ederveen (34).

Izkoristek ekstrakcije: ni nujno, da je zelo visok, mora pa biti ponovljiv pri vsaki analizi in pri različnih koncentracijah. Izračunali smo ga tako, da smo iz osnovnih raztopin topljencev pripravili raztopine, ki so imele enako koncentracijo kot bi jo imeli vzorci pri 100-odstotni ekstrakciji. Ker smo to naredili za vse koncentracije naših analitov, smo lahko s pomočjo utežene linearne regresije izračunali vse koeficiente uteženih umeritvenih premic. Vrednosti na tej premici so bile 100-odstotni izkoristki. Potem smo primerjali izračunane koncentracije QCjev z vrednostmi na uteženih umeritvenih premicah. Primerjali smo vseh šest paralelek za vsako koncentracijo kontrolnih vzorcev in tako dobili izkoristek ekstrakcije.

4.1 STABILNOST

Izvedli smo tudi študijo stabilnosti. Pri post-preparativni stabilnosti smo preverili stabilnost vzorcev po pripravi in hranjenju v kromatografu. To smo storili tako, da smo analizirali QC vzorce 12 h in 24 h po ekstrakciji. V tem čas so bili v avtomatskem vzorčevalniku, ki je del HPLC. Preverili smo tudi dolgoročno stabilnost krvnih vzorcev pri treh različnih temperaturah. Papirčke s krvnimi madeži smo shranili v vrečke z nizko prepustnostjo plinov, jim dodali sredstvo za zaščito pred vlago in jih nepredušno zaprli. Štiri tedne smo jih hranili pri sobni temperaturi, pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pri $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analizirali smo jih po enem, dveh in po treh tednih. Vsakič smo analizirali en krvni vzorec s slepo raztopino ter tri paralele QC_L in QC_H vzorcev. Tem smo vedno dodali tudi IS. Potem smo iz teh vrednosti s pomočjo enačbe 1 preračunali koncentracije analitov. Vrednosti za parametra k in n smo vzeli iz umeritvenih premic 2. dne validacije. Potem smo izračunali povprečne vrednosti QC vzorcev za vsako koncentracijo. Nato smo izračunali njihovo točnost po enačbah 4 in 5

ter ponovljivost po enačbi 6. Spojine so stabilne, če izračunana koncentracija ne odstopa več kot 15 % od točne vrednosti in če je RSD manjši od 15 % (33).

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

Namen magistrske naloge je razvoj in validacija analizne metode, s katero bi ugotovili koncentracijo OxCBZ, LiCBZ, CBZ, EpoCBZ in DiolCBZ v krvi bolnikov. Metoda temelji na tehniki vzorčenja DBS in uporabi HPLC z UV/VIS detekcijo. Šele po analizi na MS smo ugotovili, da imamo namesto DiolCBZ v ovojnini DihidroCBZ. Na ovojnini je bil deklariran DiolCBZ, vendar smo ugotovili, da se CAS številka na ovojnini ne ujema s CAS številko DiolCBZ. Odločili smo se, da vse rezultate obdržimo in ne ponavljamo poskusov.

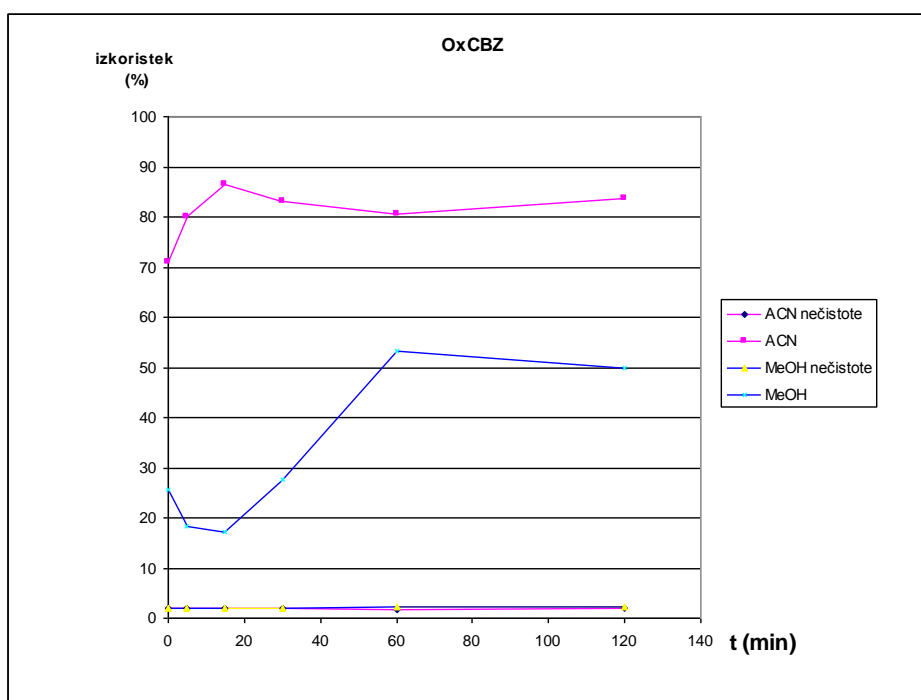
5.1 RAZVOJ METODE

Najprej smo pripravili raztopine OxCBZ, LiCBZ, CBZ, EpoCBZ in DihidroCBZ, jih ustrezno razredčili ter vsako posebej analizirali na HPLC. S tem smo dobili retencijske čase in odzive vseh spojin. Za ločevanje smo uporabili kolono Luna 5u, Phenyl-Hexyl. Ta stacionarna faza dobro loči spojine z aromatskimi obroči. Zanje smo se odločili, ker so si vse analizirane spojine strukturno podobne in imajo aromatske obroče. MF, ki smo jo uporabili za ta poskus, je bila sestavljena iz MeOH in 25 mM KH_2PO_4 s pH 3,0 v razmerju 50:50 (v/v). Volumen injiciranja je bil 5 μl . Elucija je bila izokraska, pretok MF 1,0 ml/min in temperatura kolone 50 °C. Detekcija je potekala pri 215 nm. Opisana metoda ni optimalna metoda. Kljub temu so bili vsi vrhovi lepo vidni, dobili pa smo naslednji vrstni red: LiCBZ (t_R 4,74 min), EpoCBZ (t_R 5,66 min), OxCBZ (t_R 6,47 min), CBZ (t_R 9,61 min) in DihidroCBZ (t_R 11,4 min). Retencijski časi v oklepajih so podani za optimalno metodo (poglavje 3.4).

5.1.1 Obogateni krvni vzorci

Pri pripravi obogatenih krvnih vzorcev smo vedno uporabili svežo odvzeto kri in se s tem izognili morebitnim dodatnim vplivom na slabšo točnost in ponovljivost pri uporabi zamrznjene krvi. Pazili smo tudi, da dodatek raztopine ne bi presežal 10 % celokupnega volumna vzorca. To nam je z dodatkom 20 μl raztopine v 480 μl krvi tudi uspelo. Najprej smo naredili ekstrakcijo neposredno iz obogatenih krvnih vzorcev ob različnih časovnih točkah: 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min in 120 min po dodatku raztopin v kri. S tem smo preverili koliko časa je potrebno, da postane koncentracija analitov v krvnem vzorcu

homogena in konstantna. Uporabili smo slep vzorec in zmes 6. To kombinacijo smo tekom razvoja metode uporabljali skoraj vedno. V zmesi 6 so bile koncentracije LiCBZ 20,0 $\mu\text{g/ml}$, EpoCBZ 10,0 $\mu\text{g/ml}$, OxCBZ 20,0 $\mu\text{g/ml}$, CBZ 15,0 $\mu\text{g/ml}$ in DihidroCBZ 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrakcijski topili sta bili MeOH in ACN. Pri vseh analitih so bili najboljši rezultati ob točki 15 min po dodatku v kri. Pri uporabi obeh topil smo dobili podobne rezultate. Večja razlika je bila le pri OxCBZ, kjer smo z ACN dosegli precej večji izkoristek ekstrakcije. Pri retencijskih časih, ki sta bila enaka retencijskima časoma OxCBZ in EpoCBZ, smo opazili nečistote pri uporabi obeh topil.



Slika 7: Odziv OxCBZ in nečistot po dodatku zmesi 6 v kri ob ekstrakciji z ACN in MeOH v različnih časovnih točkah. Rezultati so normirani na teoretično koncentracijo analita v vzorcu ob predpostavki 100-odstotnega izkoristka.

5.1.2 Izbira DBS papirčka

Naslednji korak je bila izbira vrste DBS papirčka in volumna krvi za pripravo DBS. Preizkusili smo papirčke Whatman 903TM, DMPK-A in DMPK-C. Na njih smo najprej nanesli raztopine analitov, ki pa so bili namesto v krvi razredčeni v vodi. Najboljše rezultate smo dobili pri papirčkih Whatman 903TM. Pri papirčkih DMPK-A in DMPK-C so se po ekstrakciji pojavile oborine ter dodatni široki vrhovi na kromatogramu, ki so

prekrivali vrhova CBZ in DihidroCBZ. Te dve vrsti papirčkov sta prevlečeni z dodatnimi zaščitnimi plastmi in pri ekstrakciji je verjetno zaradi dodatka FA prišlo do delnega raztapljanja teh plasti. Prvotni načrt za razvoj metode je bil, da bi imeli DBS, ki bi bili narejeni iz 10 μ l kapljic, ampak je bilo kmalu po izdelavi in analizi prvih vzorcev jasno, da bo to zelo težko. Razlog za to je bil nizek izkoristek ekstrakcije OxCBZ. Odsotnost vrha za OxCBZ smo zaznali že pri zmesi 5 (10,0 μ g/ml), poleg tega pri najmanjših koncentracijah nismo zaznali niti LiCBZ, niti DihidroCBZ. Zato smo se odločili za nanos 20 μ l kapljic krvi.

5.1.3 Izbira internega standarda

Kot IS smo uporabljali kloramfenikol, saj nobena izmed drugih preizkušenih spojin ni bila na ustreznem mestu v kromatogramu ali pa je sploh nismo zaznali. Kloramfenikol kljub temu ni najboljša izbira, saj pride pri večjih koncentracijah analitov na kromatogramih do majhnega prekrivanja njegovega vrha z vrhom EpoCBZ (sliki 8 in 10).

5.1.4 Izbor ekstrakcijskega topila in uvedba dodatnega koraka

Pri vseh ekstrakcijah smo uporabili enako metodo (poglavje 3.4). EpoCBZ v času izvajanja teh poskusov nismo imeli, zato podatek za njegov odziv manjka pri vseh topilih. Iz preglednice VI je razvidno, da so bili odzivi pri LiCBZ, CBZ in DihidroCBZ veliki (najboljši izkoristki večji od 80 %). Prav tako pri njihovih t_R v slepem vzorcu večinoma ni zaznati drugih snovi. Na drugi strani so odzivi OxCBZ nizki pri vseh uporabljenih ekstrakcijskih topilih. Poleg tega imamo ob istem t_R še neželene koelucije.

Preglednica VI: Odzivi analitov in nečistot pri uporabi različnih topil. Vsa razmerja med topili so (v/v).

Topilo	Odzivi analitov in nečistot									
	Li CBZ	n*	Epo CBZ	n*	Ox CBZ	n*	CBZ	n*	Dihidro CBZ	n*
MeOH	560	8,90	/		74,4	58,5	667	22,4	306	2,00
MeOH/ACN 1:1	609		/		60,6	8,70	681		342	
MeOH/ACN 3:1	662		/		58,9	5,40	735		368	
MeOH/H ₂ O 4:1	909		/		177	10,4	927		455	

MeOH/H ₂ O 3:2	688		/		144	9,20	723	12,7	390	
MeOH/ACN/ H ₂ O 2:2:1	759		/		96,7	9,20	772		398	
* Odziv morebitnih nečistot ob istem t _R kot merjen analit.										

Po primerjavi rezultatov smo za izvajanje nadaljnjih poskusov izbrali ekstrakcijsko topilo MeOH/H₂O 4:1 (v/v), saj smo s to kombinacijo dobili najboljši izkoristek ekstrakcije in s tem največje odzive analitov. Da bi izboljšali izkoristek ekstrakcije pri OxCBZ, smo nato poskusili s povečanjem volumna ekstrakcijskega topila iz 700 µl na 1400 µl, vendar se odziv ni izboljšal. Potem smo preverili smiselnost uporabe UZ kadičke in ugotovili najboljši čas uporabe UZ kadičke ter najbolj primerno temperaturo vode v njej. Ugotovili smo, da so odzivi brez uporabe UZ kadičke približno 10 % slabši. Optimalni čas uporabe je bil 15 min pri temperaturi vode 25 °C. Pri višjih temperaturah nismo opazili večjih odzivov, je pa prišlo do razpada EpoCBZ pri temperaturah nad 60 °C. Potem smo primerjali odzive OxCBZ pri ekstrakciji neposredno iz krvi in pri ekstrakciji iz DBS. Ker so že tu opazne precejšne razlike (izkoristek iz 100 % na 60 %), smo sklepali, da se OxCBZ verjetno veže na DBS papirčke. Sklepali smo, da verjetno pride do tvorbe vodikovih vezi med OxCBZ in celulozo. Zato smo ekstrakcijskem topilu dodali različne koncentracije FA, ki je šibka kislina in s tem poskusili prekiniti te vezi. Iz preglednice VII je razvidno, da smo z dodatkom FA izboljšali ekstrakcijo OxCBZ iz DBS papirčka, hkrati pa smo povečali tudi ekstrakcijo neželenih koelucij pri retencijskih časih OxCBZ in EpoCBZ. Z večanjem koncentracije FA v ekstrakcijskem topilu se je ta vrednost večala, medtem ko pri odzivu analitov ni bilo večjih razlik. Kot najboljša kombinacija se je izkazalo ekstrakcijsko topilo MeOH/H₂O 4:1 (v/v) z dodatkom 0,5 % FA.

Preglednica VII: Odzivi analitov in nečistot pri uporabi različnih topil in dodatku FA. Vsa razmerja med topili so (v/v).

Topilo	Odzivi analitov in nečistot									
	Li CBZ	n*	Epo CBZ	n*	Ox CBZ	n*	CBZ	n*	Dihidro CBZ	n*
0,1 % FA v MeOH/H ₂ O 4:1	712		507	5,70	262	29,1	886		396	
0,5 % FA v MeOH/H ₂ O 4:1	775		493		307	6,30	970		441	
1,0 % FA v	724		365	18,0	284	13,0	891		403	

MeOH/H ₂ O 4:1									
2,5 % FA v MeOH/H ₂ O 4:1	810		288	15,7	274	75,7	1,08*10 ³		397
0,5 % FA v dietiletru	487		330		70,0		771		335
0,5 % FA v etilacetatu	183		146		27,2	5,80	342		142
* Odziv morebitnih nečistot ob enakem t _R kot merjen analit.									

Ker smo si želeli zmanjšati količino koelucij in popolnoma odpraviti koeluciji pri t_R OxCBZ in EpoCBZ, smo poskusili z uvedbo dodatne ekstrakcije tekoče - tekoče. Kot vidimo iz preglednice VII, so koelucije prisotne pri vseh uporabljenih topilih, razen pri dodatku 0,5 % FA v dietiletru. Pri uporabi tega topila opazimo tudi nekoliko manjši izkoristek ekstrakcije iz filtrirnega papirčka, zlasti pri OxCBZ. Temu smo se izognili tako, da smo ekstrakcijo iz filtrirnega papirčka izvedli z enim topilom, nato smo DBS papirček odstranili, ekstrakcijskemu topilu smo dodali dietileter in izvedli ekstrakcijo tekoče – tekoče. Dodatni korak nam je omogočil povečavo deleža vode v ekstrakcijskem topilu in s tem posledično boljšo ekstrakcijo analitov in nečistot. Vendar po drugi strani pride do dodatnih izgub, saj del vsake izmed spojin ostane v ekstrakcijskem topilu. Zato smo mu dodali različne količine soli (NaCl in amonijev acetat) in s tem povečali prehod analitov v dietileter. Poskusili smo tudi z dodatkom baze trietilamin. Izkoristek ekstrakcije tekoče – tekoče smo povečali tudi tako, da smo pri ekstrakciji iz filtrirnega papirčka uporabili 100 µl topila in mu nato dodali 700 µl dietiletra. Poleg tega smo vzorce za eno uro postavili v zamrzovalnik na -80 °C in s tem zamrznili vodno fazo. Ker je proces prenosa organske faze v drugo plastično epruveto trajal približno 15 min, se je v tem času pri nekaterih vzorcih stalil del vodne faze, v kateri je bila sol. Pri prenosu smo tako zajeli tudi to vodno fazo skupaj s soljo. Soli se potem v naslednjih korakih nikakor nismo uspeli znebiti in zato analiza nekaterih vzorcev s HPLC sploh ni bila mogoča. Imeli smo tudi velike težave s prenosom organske faze v drugo plastično epruveto, saj ima dietileter zelo majhno površinsko napetost in posledično hitro zdrsi iz nastavka pipete. Temu smo se izognili tako, da smo pred prenosom vzorca pipeto postavili nad dietileter. V pipeto so se pri tem ujeli njegovi hlapi, ki so nato preprečili uhajanje vzorca. Kljub temu nam ni uspelo prenesti vedno enake količine organske faze, saj dietileter pri sobni temperaturi hlapi in smo zato pogosto zajeli tudi nekaj MeOH in z njim dodatne nečistote. Uvedba dodatnega koraka je tudi podaljšala čas obdelave vzorcev za dve uri. Kljub vsem tem poskusom, nam še vedno ni uspelo dvigniti izkoristka ekstrakcije OxCBZ iz DBS papirčka (najboljši izkoristek je bil

17,1 %), zato smo se odločili, da dodatni korak opustimo. Ker so naši analiti precej lipofilni, bi lahko poskusili izboljšati ekstrakcijo s topili, ki so še bolj lipofilna kot etilacetat (npr. diklorometan). Za to se nismo odločili, ker je diklorometan toksičen in se zaradi tega ne uporablja v rutinskih preiskavah.

Najboljše ekstrakcijsko topilo je bilo tako ACN/H₂O 4:1 (v/v) z dodatkom 0,5 % FA, saj smo z njim dosegli najboljše rezultate pri ekstrakciji OxCBZ. Tudi izkoristki ekstrakcij drugih analitov so bili precej visoki. Vendar so se še vedno pojavljale neželene koelucije pri t_R OxCBZ in EpoCBZ.

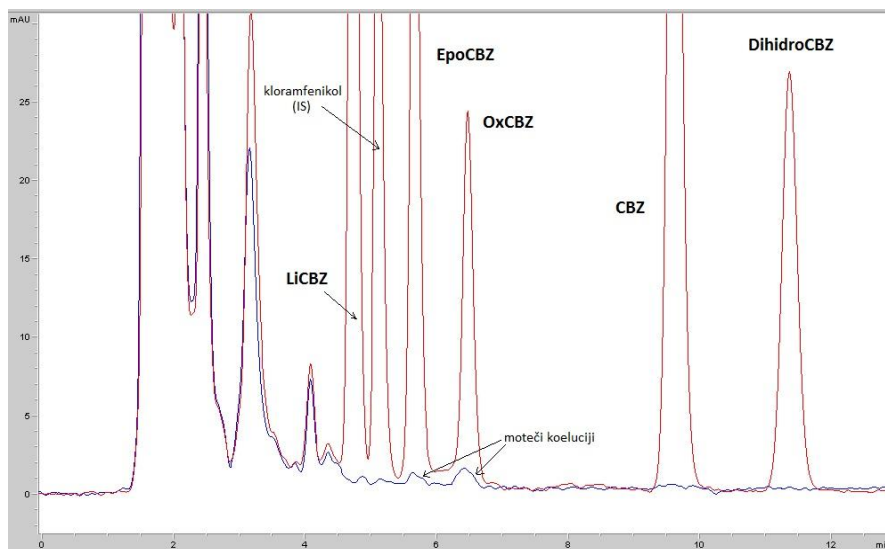
5.1.5 Izbira rekonstitucijskega topila

Med seboj smo najprej primerjali topili MeOH/H₂O v razmerju 4:1 (v/v) in v razmerju 1:1 (v/v). Izmerili smo kromatografske odzive vseh analitov pri vseh koncentracijah. Za odtenek boljše rezultate smo dobili pri razmerju 1:1 (v/v). Nato smo preverili, če bi lahko s kislo rekonstitucijo povečali odzive na kromatogramu. Za ta poskus smo primerjali topili MeOH/H₂O 1:1 (v/v) in MF/H₂O 1:1 (v/v). Nekoliko večji so bili rezultati pri uporabi topila MeOH/H₂O 1:1 (v/v) in zato smo za validacijo metode uporabili to kombinacijo.

5.1.6 Izbira kromatografskih razmer

Pri razvoju kromatografske metode za analizo vzorcev smo se oprli na metodo, ki smo jo uporabili za ugotavljanje t_R analitov. Tam smo uporabili kolono Luna 5u, Phenyl-Hexyl, segreto na 50 °C. MF je bila sestavljena iz MeOH in 25 mM KH₂PO₄ s pH 3 v razmerju 50:50 (v/v). Volumen injiciranja je bil 5 µl. Elucija je bila izokratska, pretok pa nastavljen na 1,0 ml/min. Detekcija z DAD detektorjem tipa UV/VIS je potekala pri 215 nm. Na sliki 8 so lepo vidni največji problemi, s katerimi smo se spopadali pri razvoju metode. To so moteče koelucije, slab izkoristek ekstrakcije OxCBZ in nezadostna razdalja med vrhovoma LiCBZ in IS. Da bi se izognili prekrivanjem med OxCBZ, EpoCBZ in neželenimi koelucijami ter med LiCBZ in IS, smo spreminjali kromatografske parametre in opazovali, če bo prišlo do različnih premikov t_R. Spreminjali smo razmerje med MeOH in vodno fazo v MF, pH vodne faze, temperaturo kolone in pretok. Poleg tega smo merili odzive pri različnih valovnih dolžinah. Takoj na začetku smo pri analizi DBS vzorcev povečali volumen injiciranja na 50 µl. S tem smo povečali odzive vseh analitov. Nato smo

spreminjali sestavo MF. Spreminjali smo razmerje med MeOH in 25 mM KH_2PO_4 s pH 3. Preizkusili smo vsa razmerja med 52:48 (v/v) in 40:60 (v/v). Izven tega območja nismo šli, ker bi imeli pri uporabi MF, kjer je vsebnost MeOH večja od 52 %, preslabo ločljivost med analiti. Na drugem koncu intervala, pri vsebnosti MeOH pod 40 %, so se t_R analitov precej povečali, kar je podaljšalo čas analize enega vzorca na 25 min in več, česar si nismo želeli.



Slika 8: Primerjava kromatogramov slepe raztopine in zmesi 6 pri razmerju med MeOH in vodno fazo 50:50 (v/v), temperaturi kolone 50 °C in pri pretoku 1,0 ml/min.

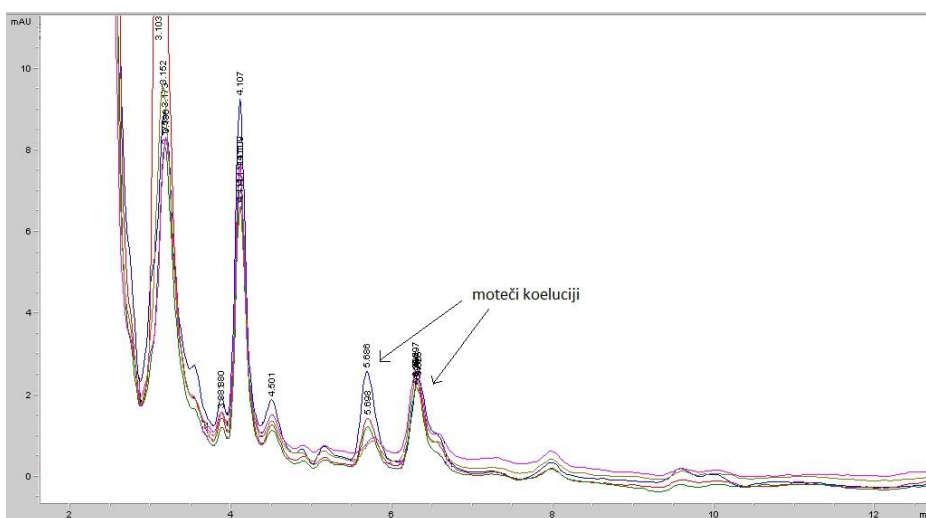
S povečanjem temperature kolone omilimo opisane težave, saj z višjo temperaturo zmanjšamo viskoznost MF in s tem tlak na koloni, kar omogoča uporabo večjih pretokov MF in s tem skrajšanje časa analize. Pri tem nismo opazili, da bi zaradi večje temperature prišlo do razpada analitov. Podobno je tudi pri spreminjanju pretoka MF preko kolone. Manjši kot je bil, daljša je bila analiza. S spreminjanjem vseh teh parametrov so se vrhovi analitov premikali naprej in nazaj, vendar so se z njimi premikale tudi neželene koelucije. Uspelo nam je ločiti različne koelucije pod vrhovi analitov, vendar nam ni uspelo zadovoljivo ločiti vrhov teh koelucij in vrhov OxCBZ ter EpoCBZ. Smo pa s povečanjem temperature kolone na 55 °C povečali ločitev med vrhovoma LiCBZ in IS. Ločbo vrhov smo poskusili izboljšati še s spreminjanjem pH 25 mM KH_2PO_4 . Pri manjšem pH ni bilo opaznih sprememb. Pri večjem so se koelucije premaknile malo bolj levo glede na vrhove analitov, ampak razlika je bila še vedno manjša od 0,2 min. Ker smo kromatografske odzive merili pri različnih valovnih dolžinah, smo primerjali tudi vidne spektre analitov in koelucij, a večjih razlik nismo opazili. Iz vsega tega izhaja, da imajo te koelucije zelo

podobne strukturne in fizikalne lastnosti kot OxCBZ in EpoCBZ. Na koncu smo preizkusili tudi drugo kolono, Luno 3u, vendar je bila ločitev vrhov analitov in koelucij slabša.

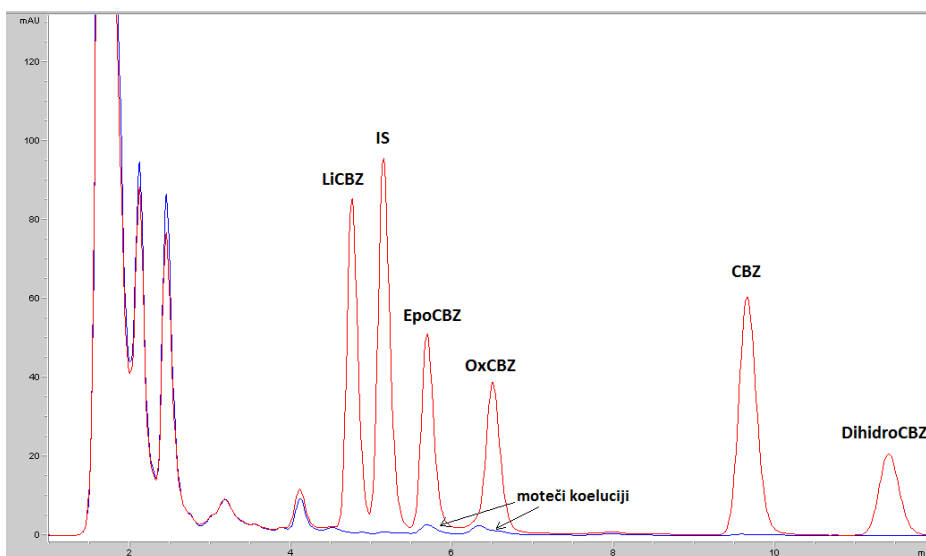
5.2 VALIDACIJA

5.2.1 Selektivnost

Najprej smo preverili selektivnost metode. Pri tem sta nam bili v pomoč spodnji sliki.



Slika 9: Kromatogram slepih vzorcev petih različnih oseb.



Slika 10: Primerjava kromatogramov slepe raztopine in zmesi 6 iz 3. dneva validacije.

Pri pregledu kromatograma slepih vzorcev petih različnih osebah vidimo, da imamo do t_R 4,5 min kar nekaj motečih snovi biološke matrice. Vendar te snovi ne motijo analize, saj imajo vsi analiti daljše t_R od tega. Precej bolj moteča sta naslednja dva vrhova pri t_R 5,7 min in 6,4 min, saj imata skoraj enak t_R kot vrhova EpoCBZ in OxCBZ. Pri t_R vrhov LiCBZ, CBZ in DihidroCBZ ni motečih snovi. Poleg tega vrhova LiCBZ in IS nista zadostno ločena. Njunjo ločitev bi lahko izboljšali z uporabo manjše koncentracije IS, saj bi se s tem kromatografski vrh zožil. Da bi bila metoda selektivna, ne bi smelo biti nobenih endogenih snovi v neposredni bližini t_R analitov. Metoda je ustrezno selektivna le za LiCBZ, CBZ in DihidroCBZ, medtem ko EpoCBZ in OxCBZ ne ustrezata kriterijem.

5.2.2 Spodnja meja kvantifikacije, umeritvene premice in območje linearnosti

LLOQ smo postavili pri koncentraciji 0,25 $\mu\text{g/ml}$ za EpoCBZ ter DihidroCBZ, 0,38 $\mu\text{g/ml}$ za CBZ ter 0,50 $\mu\text{g/ml}$ za LiCBZ ter OxCBZ. Vrednost LLOQ je ustrezna, če je višina odziva analita vsaj petkrat večja od odziva slepega vzorca in njena vrednost ne odstopa več kot 20 % od točne vrednosti. Pri LiCBZ, CBZ in DihidroCBZ s tem nimamo težav, drugače pa je pri EpoCBZ in OxCBZ. Kot vidimo iz slike 9, dosegajo odzivi slepih vzorcev višino 2,5. Da bi bila torej odziva pri LLOQ ustrezna, morata preseči višino 12,5. Kot vidimo iz preglednice VIII, to vrednost EpoCBZ preseže pri koncentraciji 2,50 $\mu\text{g/ml}$, OxCBZ pa šele pri koncentraciji 10,0 $\mu\text{g/ml}$. Višino odzivov teh dveh spojin pri koncentracijah, ki so manjše od teh dveh, smo še vseeno lahko izmerili, saj so bili vrhovi nečistot in analitov delno ločeni. Iz preglednic X – XIV vidimo, da so pri vseh analitih vrednosti LLOQ znotraj zahtevane točnosti, torej med 80 % in 120 %.

Preglednica VIII: Višina odzivov EpoCBZ in OxCBZ izmerjenih 1. dne validacije.

EpoCBZ	C ($\mu\text{g/ml}$)	0,25	0,50	1,25	2,50	5,00	10,0	15,0	20,0
	H_A	2,40	4,00	8,10	14,7	25,3	48,3	56,2	86,2
OxCBZ	C ($\mu\text{g/ml}$)	0,50	1,00	2,50	5,0	10,0	20,0	30,0	40,0
	H_A	1,20	2,40	6,00	11,5	21,1	40,9	59,5	89,1

Da bi lahko ugotovili druge parametre vrednosti validacije smo izmerjene vrednosti iz kromatogramov statistično obdelali. Ker smo imeli dokaj velik razpon med najmanjšimi in največjimi koncentracijami, smo uporabili uteženo linearno regresijo.

Preglednica IX: Izračunane koncentracije OxCBZ in njihove točnosti 1. dne validacije za neuteženo umeritveno premico, umeritveno premico uteženo s koeficientom $1/c$ ter umeritveno premico s koeficientom $1/c^2$.

OxCBZ C ($\mu\text{g/ml}$)	neutežena		utežena 1 ($1/c$)		utežena 2 ($1/c^2$)	
	\bar{C} izračun ($\mu\text{g/ml}$)	točnost (%)	\bar{C} izračun ($\mu\text{g/ml}$)	točnost (%)	\bar{C} izračun ($\mu\text{g/ml}$)	točnost (%)
0,50	0,36	72,3	0,40	80,8	0,47	94,7
1,00	0,98	97,7	1,02	101,7	1,06	106,1
2,50	2,74	109,4	2,77	110,8	2,74	109,7
5,00	5,48	109,5	5,50	110,1	5,36	107,3
10,0	10,1	100,5	10,1	100,6	9,73	97,3
20,0	19,8	98,7	19,7	98,6	19,0	95,0
30,0	28,5	94,8	28,4	94,7	27,3	91,1
40,0	41,2	103,0	41,1	102,8	39,5	98,8

V preglednici IX smo na primeru OxCBZ iz 1. dne validacije, prikazali, kakšna bi bila točnost metode, če ne bi uporabili utežene linearne regresije. Za utež smo uporabili vrednosti $1/c$ in $1/c^2$, pri čemer se je druga utež izkazala za boljšo in smo jo zato uporabili za izračun vseh validacijskih parametrov. Pri neuteženi premici so točnosti analiz med 72,3 % in 110,8 %, pri premici uteženi z utežjo $1/C$ so med 80,8 % 110,8 % in pri premici z utežjo $1/C^2$ so vrednosti med 94,7 % in 109,7 %. Z uporabe utežene linearne regresije smo tako zmanjšali razpon med največjima odstopanjema od točne vrednosti iz 38,5 % na 15,0 %. Izračunane koncentracije drugih umeritvenih premic in njihovo točnost vidimo v preglednicah X do XIV.

Preglednica X: Izračunane koncentracije LiCBZ iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije.

LiCBZ C ($\mu\text{g/ml}$)	1. dan		2. dan		3. dan	
	\bar{C} izračun ($\mu\text{g/ml}$)	točnost (%)	\bar{C} izračun ($\mu\text{g/ml}$)	točnost (%)	\bar{C} izračun ($\mu\text{g/ml}$)	točnost (%)
0,50	0,50	100,2	0,47	93,6	0,49	97,4
1,00	0,97	96,6	1,10	110,2	1,02	102,2

2,50	2,60	104,0	2,68	107,2	2,72	108,7
5,00	5,45	109,0	5,16	103,2	5,03	100,5
10,0	9,90	99,0	9,46	94,6	9,54	95,4
20,0	19,6	97,9	19,4	96,8	19,3	96,6
30,0	28,2	94,1	27,9	93,1	29,2	97,2
40,0	39,7	99,1	40,5	101,2	40,7	101,9

Pri LiCBZ so vse izmerjene vrednosti znotraj dovoljenega 15% odstopanja, zato je metoda linearna v koncentracijskem območju 0,50 µg/ml do 40,0 µg/ml.

Preglednica XI: Izračunane koncentracije EpoCBZ iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije.

EpoCBZ	1. dan		2. dan		3. dan	
	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)
0,25	0,22	87,8	0,23	93,1	0,24	95,8
0,50	0,58	115,9	0,56	112,8	0,54	107,3
1,25	1,45	115,9	1,30	103,7	1,32	105,2
2,50	2,89	115,5	2,55	101,9	2,44	97,6
5,00	5,09	101,7	4,80	96,0	4,83	96,7
10,0	10,0	100,1	9,47	94,7	9,56	95,6
15,0	11,5	76,9	14,3	95,3	14,8	98,6
20,0	17,2	86,1	20,5	102,5	20,6	103,2

Pri EpoCBZ opazimo, da je kar polovica izmerjenih vrednosti 1. dne izven zahtevanih meja točnosti. Do tega je verjetno prišlo zaradi delnega prekrivanja z vrhovi koelucij na kromatogramu. Vendar tri od omenjenih vrednosti odstopajo za manj kot 1 % in naslednja dva dneva ni opaziti podobnih težav. Zato sklepamo, da je metoda linearna v koncentracijskem območju 0,25 µg/ml do 20,0 µg/ml.

Preglednica XII: Izračunane koncentracije OxCBZ iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije.

OxCBZ	1. dan		2. dan		3. dan	
	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)
0,50	0,47	94,7	0,49	97,1	0,50	100,7
1,00	1,06	106,1	1,06	106,0	0,95	94,6
2,50	2,74	109,7	2,52	100,8	2,81	112,3
5,00	5,36	107,3	5,04	100,9	4,99	99,8
10,0	9,73	97,3	9,41	94,1	9,24	92,4
20,0	19,0	95,0	19,4	97,0	19,5	97,4
30,0	27,3	91,1	28,5	95,0	29,3	97,6
40,0	39,5	98,8	43,7	109,1	42,1	105,3

Kljub delnemu prekrivanju vrha OxCBZ in koelucij na kromatogramu, so bile vse izmerjene vrednosti znotraj dovoljenega 15-odstotnega odstopanja, zato je metoda linearna v koncentracijskem območju od 0,50 µg/ml do 40,0 µg/ml.

Preglednica XIII: Izračunane koncentracije CBZ iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije.

CBZ	1. dan		2. dan		3. dan	
	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)
0,38	0,36	96,4	0,36	97,2	0,37	98,7
0,75	0,78	103,4	0,78	103,9	0,74	99,0
1,88	2,03	108,4	1,96	104,4	2,06	110,1
3,75	3,97	105,8	3,85	102,8	3,79	101,0
7,50	7,31	97,5	7,18	95,8	7,18	95,7
15,0	14,5	96,6	14,8	98,4	14,6	97,0
22,5	20,9	92,7	21,3	94,5	21,7	96,5
30,0	29,8	99,2	30,9	103,0	30,6	102,0

Pri CBZ so vse izmerjene vrednosti znotraj dovoljenega 15 % odstopanja, zato je metoda linearna v koncentracijskem območju 0,38 µg/ml do 30,0 µg/ml.

Preglednica XIV: Izračunane koncentracije DihidroCBZ iz odzivov posameznega dne in njihova točnost za vse tri dni validacije.

DihidroCBZ	1. dan		2. dan		3. dan	
	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)
0,25	0,29	114,5	0,25	99,8	0,24	96,7
0,50	0,34	68,8	0,50	99,2	0,52	103,1
1,25	1,26	101,2	1,28	102,1	1,37	110,0
2,50	2,67	106,9	2,58	103,3	2,52	100,9
5,00	5,06	101,3	4,87	97,3	4,80	96,1
10,0	10,2	102,4	9,90	99,0	9,62	96,2
15,0	14,8	98,9	14,3	95,5	14,4	95,8
20,0	21,2	106,1	20,7	103,7	20,3	101,3

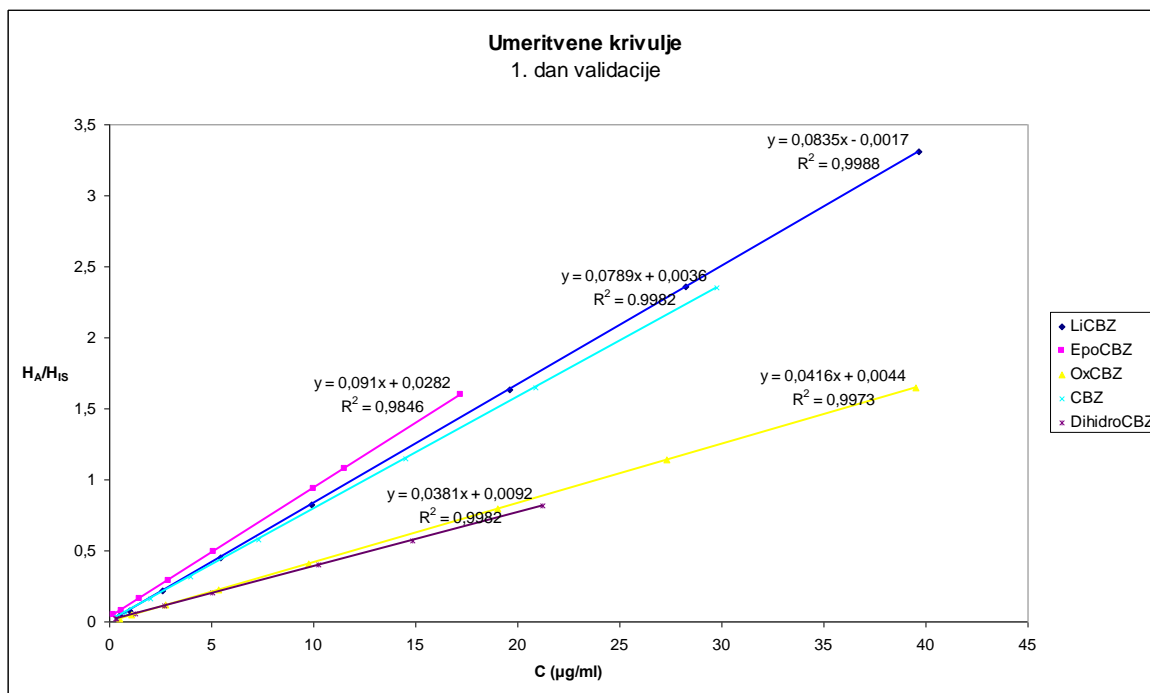
V zgornji preglednici vidimo, da en rezultat iz umeritvene krivulje CBZ ni znotraj zahtevanega območja. Ker je odstopanje precej veliko in se ne ponovi v naslednjih dveh dneh, smo sklepali, da je verjetno prišlo do napake pri pripravi vzorca. Kljub temu je 75 % vzorcev znotraj zahtevanega območja in je zato metoda linearna v koncentracijskem območju 0,25 µg/ml do 20,0 µg/ml.

Dobljene vrednosti odzivov analitov za vse tri dni lahko vidimo tudi v grafičnem prikazu na slikah 10, 11 in 12. Determinacijski koeficient (R^2) smo izračunali za neutežene umeritvene premice. Pri večini je bil $\geq 0,997$, le pri umeritvenih premicah EpoCBZ 1.dne in OxCBZ 2.dne so bili rezultati slabši. Poleg tega lahko poleg vsake premice vidimo tudi njeno enačbo.

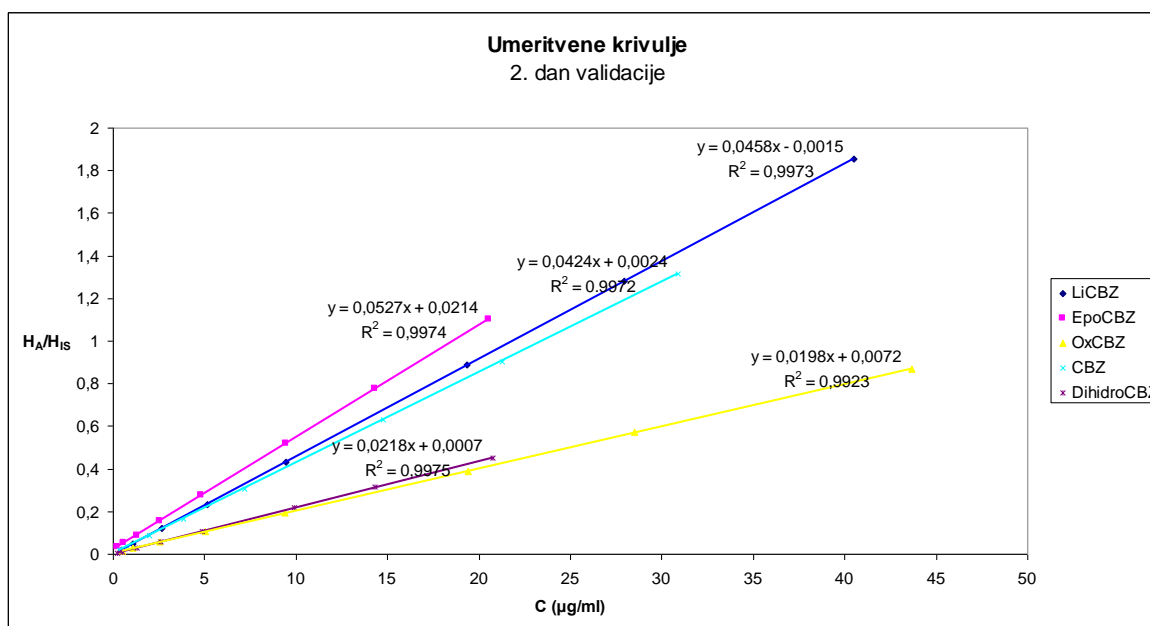
$$y = k_u * x + n_u \quad (\text{enačba 7})$$

Kot lahko vidimo iz ordinatne osi je vrednost y enaka vrednosti H_A/H_{IS} , iz abcisne osi pa vidimo, da vrednost x predstavlja koncentracijo vzorca. Koeficienta k_u in n_u iz enačbe 7

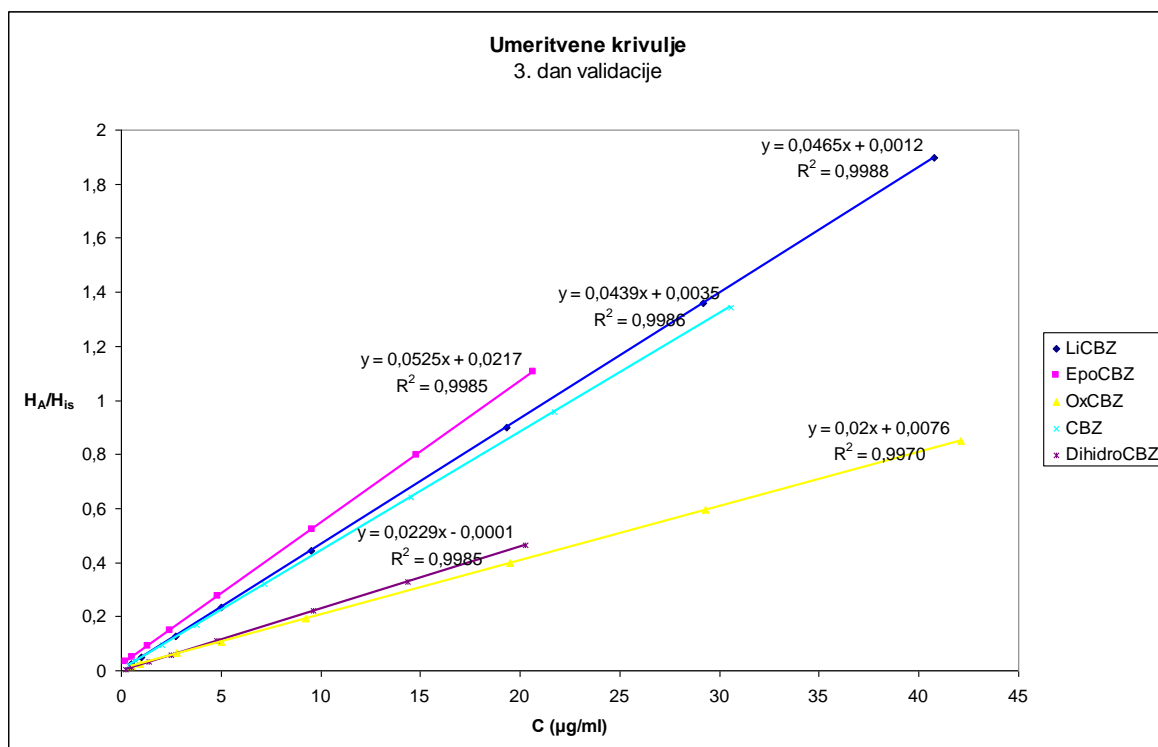
smo spreminjali pri statistični obdelavi podatkov z uteženo linearno regresijo, da bi dobili čim manjše odstopanje vseh izmerjenih odzivov analitov od umeritvene premice. Dobljene vrednosti k_u in n_u smo nato tudi uporabili za izračun točnosti ter ponovljivosti vseh QC vzorcev.



Slika 11: Umeritvene premice 1. dne validacije. Pri vsaki je še zapis enačbe premice in R^2 .



Slika 12: Umeritvene premice 2. dne validacije. Pri vsaki je še zapis enačbe premice in R^2 .



Slika 13: Umeritvene premice 3. dne validacije. Pri vsaki je še zapis enačbe premice in R².

Na zgornjih slikah vidimo, da so si umeritvene premice 2. in 3. dne zelo podobne. Umeritvene premice 1. dne imajo nekoliko drugačne vrednosti. Do tega je prišlo, ker smo 2. in 3. dan validacije naredili napako pri redčenju IS in pripravili večjo koncentracijo kot 1. dan. Po smernicah FDA bi morala biti koncentracija IS vse dni konstanta.

5.2.3 Točnost

Vsak dan smo s pomočjo QC vzorcev za vsako spojino ugotovili tudi točnost. Pri vsaki izmed treh izbranih koncentracij smo naredili 6 meritev. Da bi metoda ustrezala zahtevam za točnost, morajo biti povprečja meritev za posamezno koncentracijo znotraj območja 85 % do 115 %.

Preglednica XV: Točnost preračunanih koncentracij vseh QC vzorcev LiCBZ za vse tri dni validacije.

LiCBZ	QC _L (1,50 µg/ml)		QC _M (7,50 µg/ml)		QC _H (35,0 µg/ml)	
	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)
1. dan	1,59	106,3	7,03	93,7	34,5	98,4

	1,47	98,2	7,34	97,9	35,5	101,4
	1,34	89,2	7,48	99,8	34,4	98,3
	1,37	91,1	7,57	100,9	35,4	101,1
	1,36	90,9	7,37	98,2	33,6	96,1
	1,36	90,8	7,54	100,6	35,5	101,4
povprečje	1,42	94,4	7,39	98,5	34,8	99,5
2. dan	1,68	112,2	7,47	99,6	34,0	97,2
	1,45	96,6	7,23	96,5	34,7	99,2
	1,24	82,4	7,44	99,1	36,5	104,2
	1,40	93,3	7,35	98,0	35,4	101,1
	1,41	93,9	7,23	96,4	35,1	100,3
	1,40	93,6	7,11	94,8	35,0	100,1
povprečje	1,43	95,3	7,31	97,4	35,1	100,3
3. dan	1,43	95,6	7,23	96,4	35,5	101,5
	1,29	86,3	6,95	92,7	34,5	98,5
	1,37	91,2	7,39	98,5	34,3	97,9
	1,33	88,5	7,39	98,5	33,8	96,6
	1,26	84,0	7,07	94,3	35,1	100,1
	1,44	96,1	7,27	97,0	34,3	97,9
povprečje	1,35	90,3	7,22	96,2	34,6	98,8

Pri LiCBZ je samo ena meritev odstopala več kot 15 %. Vsa povprečja so bila znotraj zahtevanih meja, zato lahko rečemo, da so bile meritve koncentracije LiCBZ točne.

Preglednica XVI: Točnost preračunanih koncentracij vseh QC vzorcev EpoCBZ za vse tri dni validacije.

EpoCBZ	QC _L (0,75 µg/ml)		QC _M (3,75 µg/ml)		QC _H (17,5 µg/ml)	
	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)
1. dan	0,74	98,7	3,71	98,8	15,4	88,1
	0,83	110,6	3,81	101,7	18,7	106,6
	0,83	111,2	4,09	109,0	18,0	103,0
	0,82	108,7	3,93	104,9	17,6	100,4
	0,84	111,5	3,71	98,9	17,3	99,1
	0,77	102,2	4,07	108,5	18,1	103,3
povprečje	0,80	107,1	3,89	103,6	17,5	100,1
2. dan	0,75	99,5	3,10	82,7	15,2	86,8
	0,72	96,6	3,20	85,3	16,0	91,6
	0,64	85,4	3,47	92,4	15,3	87,5
	0,67	88,8	3,46	92,2	16,3	93,4

	0,63	84,6	3,42	91,2	16,6	94,7
	0,65	86,6	3,30	88,0	15,8	90,3
povprečje	0,68	90,2	3,32	88,6	15,9	90,7
3. dan	0,76	101,7	3,43	91,5	17,7	101,4
	0,65	87,3	3,39	90,3	17,1	97,5
	0,65	86,5	3,59	95,7	17,1	97,9
	0,62	82,8	3,55	94,7	16,9	96,3
	0,60	80,6	3,39	90,5	17,7	101,2
povprečje	0,70	92,8	3,63	96,8	17,3	99,0
povprečje	0,66	88,6	3,50	93,2	17,3	98,9

Pri EpoCBZ imamo 3 odstopanja QC_L vzorcev od zahtevane točnosti. Poleg tega smo zaznali preveliko odstopanje še pri eni meritvi QC_M vzorca. Odstopanja so vsa manjša od 15 %, zato so vsa povprečja znotraj zahtevanih meja, kar pomeni, da so bile meritve koncentracij EpoCBZ točne.

Preglednica XVII: Točnost preračunanih koncentracij vseh QC vzorcev OxCBZ za vse tri dni validacije.

OxCBZ	QC _L (1,50 µg/ml)		QC _M (7,50 µg/ml)		QC _H (35,0 µg/ml)	
	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)
1. dan	1,47	98,2	6,22	82,9	34,2	97,6
	1,54	102,6	6,68	89,1	33,3	95,1
	1,36	90,5	6,55	87,3	31,9	91,2
	1,49	99,1	7,13	95,1	35,0	100,0
	1,45	97,0	7,13	95,1	31,7	90,7
	1,43	95,4	5,92	79,0	33,3	95,2
povprečje	1,46	97,1	6,60	88,1	33,2	95,0
2. dan	1,63	108,6	7,22	96,2	34,4	98,3
	1,63	108,5	7,04	93,9	32,7	93,6
	1,35	90,2	7,23	96,4	37,1	106,1
	1,30	86,5	7,10	94,7	35,4	101,1
	1,26	83,8	6,99	93,2	33,1	94,5
	1,25	83,4	6,64	88,5	34,9	99,8
povprečje	1,40	93,5	7,04	93,8	34,6	98,9
3. dan	2,33	155,6	7,13	95,1	36,0	102,8
	2,20	146,9	6,97	92,9	33,9	96,8
	2,18	145,2	7,39	98,5	33,1	94,6
	1,95	130,2	7,53	100,4	34,7	99,1
	1,81	120,6	7,08	94,3	35,7	102,0

	1,91	127,6	8,20	109,3	33,8	96,7
povprečje	2,07	137,7	7,38	98,4	34,5	98,7

Najbolj opazno je odstopanje pri točnosti povprečne izračunane koncentracije OxCBZ v 3. dnevu validacije. V tem primeru je bilo vseh 6 meritev in posledično tudi njihovo povprečje izven zahtevanega območja točnosti. Tudi v 2. dnevu validacije sta bili dve vrednosti QC_L vzorcev izven zahtevanega območja. Razlog za to je prekrivanje vrha OxCBZ s koelucijami. Poleg tega smo imeli tudi preveliko odstopanje dveh meritev QC_M vzorcev. Ker povprečje meritev QC_L vzorcev 3. dne validacije odstopa od točne vrednosti več kot 15 %, merjenje koncentracij OxCBZ s pomočjo metode ni dovolj točno.

Preglednica XVIII: Točnost preračunanih koncentracij vseh QC vzorcev CBZ za vse tri dni validacije.

CBZ	QC _L (1,13 µg/ml)		QC _M (5,63 µg/ml)		QC _H (26,3 µg/ml)	
	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)
1. dan	1,19	105,9	5,33	94,7	25,6	97,4
	1,14	101,7	5,42	96,3	26,4	100,7
	1,05	93,3	5,46	97,1	28,4	108,2
	1,07	95,5	5,55	98,7	26,4	100,5
	1,05	93,5	5,36	95,4	25,1	95,6
	1,04	92,8	5,46	97,1	26,4	100,5
povprečje	1,09	97,1	5,43	96,6	26,4	100,5
2. dan	1,17	104,3	5,55	98,7	25,8	98,3
	1,20	106,4	5,40	96,0	26,4	100,5
	1,02	90,5	5,59	99,5	27,6	105,2
	1,03	91,8	5,50	97,7	26,9	102,6
	1,04	92,5	5,37	95,5	26,6	101,4
	1,04	92,1	5,32	94,6	26,7	101,7
povprečje	1,08	96,3	5,46	97,0	26,7	101,6
3. dan	1,13	100,5	5,40	96,0	26,5	101,1
	1,03	91,2	5,20	92,5	25,8	98,5
	1,04	92,1	5,53	98,3	25,6	97,5
	1,01	89,7	5,52	98,2	25,3	96,6
	0,97	86,0	5,31	94,5	26,2	100,0
	1,09	97,3	5,42	96,3	25,7	98,0
povprečje	1,04	92,8	5,40	96,0	25,9	98,6

Pri CBZ so bile vse vrednosti QC vzorcev znotraj zahtevanih meja za točnost.

Preglednica XIX: Točnost preračunanih koncentracij vseh QC vzorcev DihidroCBZ za vse tri dni validacije.

DihidroCBZ	QC _L (0,75 µg/ml)		QC _M (3,75 µg/ml)		QC _H (17,5 µg/ml)	
	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)
1. dan	0,65	86,5	3,64	97,1	18,2	103,9
	0,63	84,4	3,71	99,1	18,8	107,7
	0,58	77,9	3,76	100,2	18,1	103,7
	0,76	101,5	3,79	101,1	18,8	107,3
	0,59	78,2	3,64	97,2	17,9	102,0
	0,55	72,9	3,68	98,3	18,8	107,4
povprečje	0,63	83,6	3,71	98,8	18,4	105,3
2. dan	0,80	106,7	3,72	99,2	17,3	98,8
	0,85	113,1	3,63	96,9	17,8	101,4
	0,70	93,3	3,75	99,9	18,5	105,6
	0,68	90,2	3,67	97,8	18,1	103,4
	0,68	90,9	3,62	96,5	17,9	102,4
	0,68	90,5	3,60	96,1	18,0	103,1
povprečje	0,73	97,4	3,67	97,7	17,9	102,4
3. dan	0,81	108,6	3,70	98,7	17,6	100,8
	0,81	107,4	3,61	96,1	17,2	98,2
	0,80	106,7	3,71	98,9	17,0	97,3
	0,72	95,6	3,67	98,0	17,0	97,0
	0,66	87,9	3,82	101,7	17,4	99,5
	0,84	111,6	3,71	99,0	17,2	98,3
povprečje	0,77	103,0	3,70	98,7	17,2	98,5

Preveliko odstopanje je bilo pri QC_L vzorcih DihidroCBZ v 1. dnevu validacije. Kar 4 meritve so odstopale več kot 15 % od točne vrednosti in posledično tudi njihovo povprečje. To se v naslednjih dveh dneh ni ponovilo. Drugi QC vzorci so ustrezali zahtevani točnosti. Kljub temu ne moremo reči, da je metoda dovolj točna za merjenje koncentracije EpoCBZ.

Če seštejemo vse meritve skozi vse tri dni validacije, ugotovimo, da zahtevam za točnost metode ustrezajo LiCBZ, EpoCBZ in CBZ. Pri OxCBZ je zelo odstopalo povprečje meritev QC_L vzorcev 3. dne validacije, kar 37,7 % od točne vrednosti. Pri DihidroCBZ je odstopalo povprečje meritev QC_L vzorcev 1. dne validacije, in sicer 16,4 %. Pri OxCBZ so bile neustrezne meritve posledica delnega prekrivanja vrha analita s koelucijami. Razloga zakaj je pri meritvah DihidroCBZ iz 1. dne validacije prišlo do toliko neustreznih meritev,

nismo našli. Na podlagi vseh rezultatov vidimo, da točnost metode ustreza kriterijem FDA za LiCBZ, EpoCBZ in CBZ, za OxCBZ in DihidroCBZ pa ne.

5.2.4 Ponovljivost znotraj dneva in med dnevi

Ponovljivost je v preglednicah XX - XXV izražena kot RSD, ki smo jo izračunali po enačbi 3. Metoda zahteva kriterijem za ponovljivost, če nobena od RSD vrednosti ne odstopa za več kot 15 %.

Preglednica XX: Ponovljivost izračunanih koncentracij QC vzorcev LiCBZ znotraj dneva za vse tri dni validacije.

LiCBZ	C (µg/ml)	1. dan			2. dan			3. dan		
		\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)	\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)	\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)
QC _L	1,50	1,42	0,09	7,02	1,43	0,14	10,1	1,35	0,07	5,47
QC _M	7,50	7,39	0,20	2,69	7,31	0,14	1,89	7,22	0,17	2,42
QC _H	35,0	34,8	0,77	2,20	35,1	0,81	2,30	34,6	0,62	1,78

Ponovljivost meritev znotraj dneva je bila pri vseh QC vzorcih LiCBZ znotraj zahtevanega območja. Največje odstopanje je bilo 10,1 % pri QC_L vzorcu v 2. dnevu validacije.

Preglednica XXI: Ponovljivost izračunanih koncentracij QC vzorcev EpoCBZ znotraj dneva za vse tri dni validacije.

EpoCBZ	C (µg/ml)	1. dan			2. dan			3. dan		
		\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)	\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)	\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)
QC _L	0,75	0,80	0,04	5,02	0,68	0,05	6,96	0,66	0,06	8,65
QC _M	3,75	3,89	0,17	4,37	3,32	0,15	4,54	3,50	0,11	3,04
QC _H	17,5	17,5	1,12	6,40	15,9	0,55	3,45	17,3	0,36	2,06

Ponovljivost meritev znotraj dneva je pri vseh QC vzorcih EpoCBZ znotraj zahtevanega območja. Največje odstopanje je bilo 8,65 % pri QC_L vzorcu v 3. dnevu validacije.

Preglednica XXII: Ponovljivost izračunanih koncentracij QC vzorcev OxCBZ znotraj dneva za vse tri dni validacije.

OxCBZ	C (µg/ml)	1. dan			2. dan			3. dan		
		\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)	\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)	\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)
QC _L	1,50	1,46	0,06	4,18	1,40	0,18	12,7	2,07	0,20	9,81
QC _M	7,50	6,60	0,49	7,35	7,04	0,22	3,05	7,38	0,45	6,11
QC _H	35,0	33,2	1,26	3,79	34,6	1,61	4,65	34,5	1,13	3,29

Ponovljivost meritev znotraj dneva je bila pri vseh QC vzorcih OxCBZ znotraj 15 %. Največje odstopanje je bilo 9,81 % pri QC_L vzorcu v 3. dnevu validacije.

Preglednica XXIII: Ponovljivost izračunanih koncentracij QC vzorcev CBZ znotraj dneva za vse tri dni validacije.

CBZ	C (µg/ml)	1. dan			2. dan			3. dan		
		\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)	\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)	\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)
QC _L	1,13	1,09	0,06	5,59	1,08	0,08	7,39	1,04	0,06	5,66
QC _M	5,63	5,43	0,08	1,46	5,46	0,11	1,98	5,40	0,12	2,30
QC _H	26,3	26,4	1,13	4,30	26,7	0,60	2,24	25,9	0,44	1,70

Ponovljivost meritev znotraj dneva je bila pri vseh QC vzorcih OxCBZ znotraj zahtevanega območja. Največje odstopanje je bilo 7,39 % pri QC_L vzorcu v 2. dnevu validacije.

Preglednica XXIV: Ponovljivost izračunanih koncentracij QC vzorcev DihidroCBZ znotraj dneva za vse tri dni validacije.

Dihidro CBZ	C (µg/ml)	1. dan			2. dan			3. dan		
		\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)	\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)	\bar{C} izračun (µg/ml)	SD	RSD (%)
QC _L	0,75	0,63	0,08	12,0	0,73	0,07	10,2	0,77	0,07	8,93
QC _M	3,75	3,71	0,06	1,63	3,67	0,06	1,57	3,70	0,07	1,84
QC _H	17,5	18,4	0,42	2,30	17,9	0,39	2,20	17,2	0,25	1,44

Ponovljivost meritev znotraj dneva je bila pri vseh QC vzorcih DihidroCBZ znotraj zahtevanega območja. Največje odstopanje je 12,0 % pri QC_L vzorcu v 1. dnevu validacije.

Preglednica XXV: Točnost in ponovljivost med dnevi.

		C (µg/ml)	\bar{C} izračun (µg/ml)	RSD (%)
LiCBZ	QC _L	1,50	1,40	7,75
	QC _M	7,50	7,30	2,43
	QC _H	35,0	34,8	2,09
EpoCBZ	QC _L	0,75	0,72	11,1
	QC _M	3,75	3,57	7,79
	QC _H	17,5	16,9	6,09
OxCBZ	QC _L	1,50	1,64	20,9
	QC _M	7,50	7,01	7,13
	QC _H	35,0	34,1	4,18
CBZ	QC _L	1,13	1,07	6,23
	QC _M	5,63	5,43	1,88
	QC _H	26,3	26,3	3,07
DihidroCBZ	QC _L	0,75	0,71	13,1
	QC _M	3,75	3,69	1,66
	QC _H	17,5	17,9	3,40

V preglednici XXV imamo podane rezultate za točnost povprečnih vrednosti QC vzorcev vseh tri dni validacije. Poleg tega smo izračunali tudi ponovljivost med dnevi, ki je pri skoraj vseh QC vzorcih znotraj zahtevanega 15-odstotnega odstopanja od točne vrednosti. Z 20,9-odstotnim odstopanjem zahtevam za ponovljivost med dnevi ne ustreza edino QC_L vzorec OxCBZ. Ponovljivost metode, razen pri OxCBZ, ustreza kriterijem FDA.

5.2.5 Izkoristek ekstrakcije

Pri izračunu deleža ekstrakcije analitov nismo upoštevali meritev QC_L vzorcev pri OxCBZ iz 1. dne validacije, saj je njihovo povprečje precej odstopalo od drugih dveh QC vzorcev, poleg tega je visoka tudi njihova RSD vrednost (15,3 %). Razlog za visoko vrednost RSD so bile moteče koelucije, ki so imele en dan precej večji vpliv na kvantifikacijo meritev

OxCBZ kot v preostalih dneh validacije. Tudi pri QC_L vzorcih EpoCBZ je opazno precejšnje odstopanje povprečja od drugih dveh vrednosti, ampak je RSD majhen, zato smo rezultat upoštevali. Povprečje ekstrakcij je bilo pri LiCBZ 82,2 %, pri EpoCBZ 81,7 %, pri CBZ 82,8 % in pri DihidroCBZ 81,8 %. Precej manjše je bilo povprečje pri OxCBZ, in sicer samo 46,2 %.

Preglednica XXVI: Izkoristek ekstrakcije analitov iz DBS papirčkov.

	LiCBZ		EpoCBZ		OxCBZ		CBZ		DihidroCBZ	
	povprečje (%)	RSD (%)	povprečje (%)	RSD (%)	povprečje (%)	RSD (%)	povprečje (%)	RSD (%)	povprečje (%)	RSD (%)
QC _L	75,6	7,52	97,3	4,77	56,7*	15,3	80,4	5,11	81,8	8,13
QC _M	83,6	4,70	75,3	6,61	45,5	8,09	81,9	4,41	82,2	5,05
QC _H	87,4	1,54	72,4	5,59	47,0	6,37	86,0	2,69	85,5	1,74
povprečje (%)	82,2	7,75	81,7	14,8	46,2	15,1	82,8	4,99	83,2	5,79
* Neupoštevana vrednost.										

5.2.6 Stabilnost

Preverili smo post preparativno stabilnost vzorcev 12 h in 24 h po ekstrakciji ter dolgoročno stabilnost analitov na filtrirnih papirčkih pri treh različnih temperaturah. Dolgoročno stabilnost smo ugotovili tako, da smo vzorce 4 tedne hranili pri -20 °C, pri sobni temperaturi in pri 40 °C, ter jih vsak teden analizirali.

Preglednica XXVII: Post preparativna stabilnost vzorcev pripravljenih za kromatografsko analizo 12 h in 24 h po ekstrakciji.

	LiCBZ		EpoCBZ		OxCBZ		CBZ		DihidroCBZ	
	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)	C _{izračun} (µg/ml)	točnost (%)
QC _L 12h	1,50	100,3	0,75	100,3	1,40	93,3	1,11	98,9	0,83	110,9
QC _M 12 h	7,24	96,5	3,66	97,6	7,95	106,0	5,41	96,2	3,69	98,5
QC _H 12 h	34,3	97,9	17,3	99,0	33,7	96,3	25,7	98,1	17,2	98,3

QC _L 24 h	1,42	94,4	0,69	92,7	1,35	90,2	1,09	97,2	0,79	105,0
QC _M 24 h	7,26	96,8	3,71	99,0	7,90	105,3	5,38	95,6	3,67	97,9
QC _H 24 h	34,2	97,8	17,3	98,8	33,6	95,9	25,7	98,1	17,2	98,2

Točnost QC vzorcev je med 90,2 % in 110,9 %, kar ustreza pogojem za ustrezno točnost. Vsi vzorci pripravljani za kromatografsko analizo so bili stabilni najmanj 24 h po ekstrakciji.

Preglednica XXVIII: Dolgoročna stabilnost LiCBZ. Točnost povprečnih vrednosti QC vzorcev in ponovljivost meritev.

LiCBZ	C (µg/ml)	0. teden		1. teden		2. teden		3. teden	
		točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)
-20 °C QC _L	1,50	93,6	0,35	97,9	4,95	94,5	11,0	92,3	8,17
-20 °C QC _H	35,0	100,5	0,52	101,2	0,63	97,8	1,61	99,0	2,72
RT QC _L	1,50	93,6	0,35	97,0	2,86	91,9	3,69	92,1	1,14
RT QC _H	35,0	100,5	0,52	102,4	2,16	97,8	3,13	96,3	1,44
40 °C QC _L	1,50	93,6	0,35	98,5	8,56	103,8	2,86	115,6	5,51
40 °C QC _H	35,0	100,5	0,52	100,0	2,02	93,9	2,62	94,7	2,16

Kot vidimo iz preglednice XXVIII je LiCBZ stabilen v vseh razmerah, tudi pri temperaturi 40 °C, kjer šele v 3. tednu povprečje QC_L vzorcev ne ustreza zahtevam točnosti, saj odstopa več kot 15 % od točne vrednosti.

Preglednica XXIX: Dolgoročna stabilnost EpoCBZ. Točnost povprečnih vrednosti QC vzorcev in ponovljivost meritev.

EpoCBZ	C (µg/ml)	0. teden		1. teden		2. teden		3. teden	
		točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)
-20 °C QC _L	0,75	95,0	5,85	85,1	10,1	77,1	11,5	96,6	8,33
-20 °C QC _H	17,5	93,2	1,66	95,2	1,78	90,4	1,66	103,8	4,39
RT QC _L	0,75	95,0	5,85	87,2	1,07	83,4	1,26	100,6	4,86
RT QC _H	17,5	93,2	1,66	98,8	4,10	90,8	4,33	85,5	4,50

40°C QC _L	0,75	95,0	5,85	86,4	9,04	111,4	21,1	136,4	6,57
40°C QC _H	17,5	93,2	1,66	90,4	4,02	80,5	2,01	75,2	1,57

Iz preglednice XXIX je razvidno, da je bil EpoCBZ pri temperaturi 40 °C stabilen samo en teden. Kasneje so bili skoraj vse vrednosti QC vzorcev izven zahtevanega območja točnosti. Presenečajo pa rezultati točnosti QC vzorcev pri dugih dveh temperaturah. Točnost QC vzorcev v 1. in 2. tednu analize je bila na spodnji meji oziroma jo je prekoračila. Naslednji teden so bili rezultati pri tej temperaturi spet vsi znotraj zahtevanega območja za točnost. Razlog za to je, da je verjetno prišlo do prekrivanja vrha EpoCBZ z motečimi koelucijami na kromatogramu.

Preglednica XXX: Dolgoročna stabilnost OxCBZ. Točnost povprečnih vrednosti QC vzorcev in ponovljivost meritev.

OxCBZ	C (µg/ml)	0. teden		1. teden		2. teden		3. teden	
		točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)
-20 °C QC _L	1,50	95,1	12,5	134,7	13,9	87,3	18,8	105,4	4,77
-20 °C QC _H	35,0	99,8	1,40	103,6	3,19	95,2	2,84	96,4	5,34
RT QC _L	1,50	95,1	12,5	102,6	9,97	92,6	6,20	134,6	2,86
RT QC _H	35,0	99,8	1,40	103,3	3,63	92,9	3,06	85,0	1,65
40°C QC _L	1,50	95,1	12,5	105,5	11,1	108,1	1,62	140,2	6,06
40°C QC _H	35,0	99,8	1,40	97,7	3,34	84,3	4,14	79,9	1,76

Stabilnost OxCBZ je bila dobra pri sobni temperaturi in nekoliko slabša pri -20 °C. Pri obeh temperaturah smo imeli po en primer, ko QC_L vrednosti precej odstopajo navzgor. Razlog za to je prekrivanje vrha OxCBZ z motečimi koelucijami na kromatogramu. Pri 40 °C je bil OxCBZ stabilen en teden, nato so vrednosti padle pod dovoljeno mejo.

Preglednica XXXI: Dolgoročna stabilnost CBZ. Točnost povprečnih vrednosti QC vzorcev in ponovljivost meritev.

CBZ	C (µg/ml)	0. teden		1. teden		2. teden		3. teden	
		točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)
-20 °C QC _L	1,13	100,6	7,44	97,0	6,26	95,4	11,4	91,6	8,14
-20 °C QC _H	26,3	101,7	0,61	102,2	0,67	98,8	1,93	98,2	2,28

RT QC _L	1,13	100,6	7,44	98,8	4,06	94,4	3,92	97,4	2,35
RT QC _H	26,3	101,7	0,61	103,4	2,15	98,6	3,24	95,6	1,45
40°C QC _L	1,13	100,6	7,44	103,5	7,86	111,6	3,10	122,3	2,75
40°C QC _H	26,3	101,7	0,61	101,3	2,08	94,5	2,65	94,6	2,36

V preglednici XXXI so vse vrednosti QC vzorcev CBZ pri sobni temperaturi in -20 °C znotraj zahtevane točnosti, zato lahko rečemo, da je CBZ pri teh temperaturah stabilen. Tudi pri 40 °C je prišlo do odstopanja QC_L vzorcev šele v tretjem tednu.

Preglednica XXXII: Dolgoročna stabilnost DihidroCBZ. Točnost povprečnih vrednosti QC vzorcev in ponovljivost meritev.

Dihidro CBZ	C (µg/ml)	0. teden		1. teden		2. teden		3. teden	
		točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)	točnost (%)	RSD (%)
-20 °C QC _L	0,75	96,7	9,09	94,9	7,37	92,0	10,1	89,7	12,8
-20 °C QC _H	17,5	100,9	1,85	104,7	1,57	99,6	1,70	98,8	1,84
RT QC _L	0,75	96,7	9,09	94,5	6,61	85,6	7,25	87,9	5,04
RT QC _H	17,5	100,9	1,85	104,5	2,45	99,5	3,09	96,0	1,41
40°C QC _L	0,75	96,7	9,09	91,9	11,7	89,7	12,1	87,3	8,09
40°C QC _H	17,5	100,9	1,85	101,8	2,56	94,8	2,91	94,0	2,39

Pri pregledu zgornje tabele takoj ugotovimo, da točnost QC vzorcev DihidroCBZ pri vseh temperaturah pada iz tedna v teden. Kljub temu so še v 3. tednu vse vrednosti QC vzorcev znotraj predpisanih meja točnosti in ponovljivosti.

6 SKLEP

Namen magistrske naloge je bil razvoj nove analizne metode za ugotavljanje OxCBZ, CBZ, LiCBZ, EpoCBZ in DihidroCBZ s pomočjo tehnike vzorčenja DBS. Metoda je namenjena za TDM bolnikov, ki za zdravljenje delnih epileptičnih in generaliziranih tonično - kloničnih napadov jemljejo zdravila z učinkovino OxCBZ, ki je predzdravilo z aktivno obliko LiCBZ ali CBZ.

Kromatografsko metodo smo razvili na koloni Luna 5u, Phenyl-Hexyl, ki smo jo segreti na 55 °C. MF je bila sestavljena iz MeOH in 25 mM KH₂PO₄ s pH 3,0 v razmerju 50:50 (v/v). Volumen injiciranja je bil 50 µl. Imeli smo izokratsko elucijo, pretok MF je bil 1,0 ml/min. Detekcija z DAD detektorjem tipa UV/VIS je potekala pri valovni dolžini 215 nm.

Pri razvoju metode smo se soočili z dvema večjima težavama. Prva je bila nizek izkoristek ekstrakcije OxCBZ iz DBS papirčka. Izboljšali smo ga z uporabo zmesi topil ACN/H₂O v razmerju 4/1 (v/v) z dodatkom 0,5 % FA. Druga težava je bila prisotnost motečih koelucij pri retencijskih časih EpoCBZ in OxCBZ. Izboljšano separacijo vrhov smo poskušali doseči s spreminjanjem ekstrakcijskih in kromatografskih razmer, vendar nam to ni uspelo. Kljub pomanjkljivosti metode smo jo validirali po smernicah FDA. Preverjali smo selektivnost, točnost, ponovljivost, mejo kvantifikacije, linearnost, izkoristek ekstrakcije ter stabilnost. Koncentracijska območja, ki smo jih analizirali so bila 0,50 do 40,0 µg/ml za LiCBZ ter OxCBZ, 0,38 do 30,0 µg/ml za CBZ in 0,25 do 20,0 µg/ml za EpoCBZ ter DihidroCBZ. Selektivnost zaradi motečih koelucij ni bila dovolj dobra. Linearnost je bila ustrezna pri izbranih koncentracijskih območjih vseh spojin. Vrednost LLOQ je bila pri LiCBZ in DihidroCBZ 0,50 µg/ml, pri CBZ 0,38 µg/ml, pri EpoCBZ ter OxCBZ pa zaradi motečih koelucij 2,50 µg/ml in 10,0 µg/ml. Zahtevam za točnost metode so ustrezali LiCBZ, EpoCBZ in DihidroCBZ. Z 20,9-odstotnim odstopanjem zahtevam za ponovljivost med dnevi ni ustrezal edino QC_L vzorec OxCBZ. Drugi vzorci so ustrezali kriterijem FDA za ponovljivost znotraj dneva in med dnevi. Izkoristek ekstrakcije je bil pri LiCBZ 82,2 %, pri EpoCBZ 81,7 %, pri OxCBZ 46,2 %, pri CBZ 82,8 % in pri DihidroCBZ 81,8 %. Vzorci so pri 5 °C stabilni tudi 24 h po ekstrakciji, najboljše razmere za shranjevanje DBS vzorcev pa so pri sobni temperaturi. Vsi analiti so bili stabilni vsaj tri tedne, razen OxCBZ, ki je bil stabilen dva tedna.

Načrtovali smo še test vpliva koncentracije hematokrita na odzive analitov. Za to se nismo odločili, ker metoda ni bila dovolj selektivna, točna in ponovljiva za vse analite.

Kljub temu je razvita metoda primerna za analizo LiCBZ v koncentracijskem območju 0,50 do 40,0 $\mu\text{g/ml}$ in za analizo CBZ v območju 0,38 do 30,0 $\mu\text{g/ml}$. Da bi bila primerna za analizo EpoCBZ, OxCBZ ter DihidroCBZ bi lahko poskusili s spreminjanjem kromatografije. Še bolj smiselno bi bilo dodatno čiščenje vzorca po ekstrakciji. Poskusili bi lahko tudi z analizo na MS/MS. Poleg tega bi morali namesto kloramfenikola poiskati ustrežnejši IS, ki bi bil popolnoma ločen od kromatografskih vrhov analitov. Za boljšo ločitev vrhov kloramfenikola in EpoCBZ bi lahko poskusili tudi z gradientno elucijo, vendar bi morali poskrbeti, da se čas analize ne bi preveč podaljšal.

7 VIRI

1. Ribarič S. et al.: Temelji patološke fiziologije, 2.izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: 284-6.
2. <https://en.wikipedia.org/wiki/Epilepsy>, dostopano 13.7.2015.
3. Perrucca E: An introduction to antiepileptic drugs, *Epilepsia*, 2005; 46: 31-37.
4. Johannessen Landmark C, Patsalos P: Drug interactions involving the new second- and third- generation antiepileptic drugs, *Expert Review Neurother.*, 2010; 10: 119-40.
5. Perrucca E: The clinical pharmacology and therapeutic use of new antiepileptic drugs, *Fund Clin Pharmacol*, 2001; 15: 405-7.
6. Flesch G: Overview of the clinical pharmacokinetics of oxcarbazepine, *Clin Drug Invest*, 2004; 24: 185-203.
7. May T, Korn-Merker E, Rambeck B: Pharmacokinetics of oxcarbazepine, *Clin Pharmacokinet*, 2003; 42: 1023-42.
8. Thorn C F, Leckband S G, Kelsoe J, Steven L J, Müller D J, Klein T E, Altman R B. Pharmacogenetics and genomics, 2011, "[PharmGKB summary: carbamazepine pathway](#)".
9. Italiano D, Perrucca E: Clinical pharmacokinetics of new-generation antiepileptic drugs at the extremes of age: an update, *Clin Pharmacokinet*, 2013; 52: 627-45.
10. Ju-Seop K, Min-Ho L: Overview of therapeutic drug monitoring, *Korean J Intern Med*, 2009; 24: 1-10.
11. Krasowski M: Therapeutic drug monitoring of the newer anti-epilepsy medications, *Pharmaceuticals*, 2010; 3: 1909-35.
12. Krasowski M, McMillin G: Advances in anti-epileptic drug testing, *Clinica Chimica Acta*, 2014; 436: 224-36.
13. Fröscher W, Eichelbaum M, Gugler R, Hildenbrand D, Penin H: A prospective randomised trial on the effect of monitoring plasma anticonvulsant levels in epilepsy, *Journal of Neurology*, 1981; 224: 193-201.
14. Jannuzzi G, Cian P, Fattore C, Gatti G, Bartoli A, Monaco F, Perrucca E: A multicenter randomized controlled trial on the clinical impact of therapeutic drug monitoring in patients with newly diagnosed epilepsy, *Epilepsia*, 2000; 41: 221-30.

15. Unruh GE, Paar WD: Gas chromatographic assay for oxcarbazepine and its main metabolites in plasma, *J Chromatogr*, 1985; 345(1): 67-76.
16. Unruh GE, Paar WD: Gas chromatographic/mass spectrometric assays for oxcarbazepine and its main metabolites, *Biomed Environ Mass Spectrom*, 1986; 13(12): 651-6.
17. Shah NM, Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, McElnay JC: A simple bioanalytical method for the quantification of antiepileptic drugs in dried blood spots, *J Chromatogr B*, 2013; 923: 65-73.
18. Breton H, Cociglio M, Bressolle F, Peyriere H, Blayac JP, Hillaire-Buys D: Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005; 828(1-2): 80-90.
19. Paglia G, D'Apolito O, Garofalo D, Scarano C, Corso G: Development and validation of a LC/MS/MS method for simultaneous quantification of oxcarbazepine and its main metabolites in human serum, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007; 860(2): 153-9.
20. Pucci V, Kenndler E, Raggi MA: Quantitation of oxcarbazepine and its metabolites in human plasma by micellar electrokinetic chromatography, *Biomed Chromatogr*, 2003; 17(4): 231-8.
21. Klitgaard NA, Kristensen O: Use of saliva for monitoring oxcarbazepine therapy in epileptic patients, *Eur J Clin Pharmacol*, 1986; 31(1): 91-4.
22. Milosheska D, et al. Dried blood spots for monitoring and individualization of antiepileptic drug treatment, *Eur. J. Pharm. Sci*, 2015, "<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.04.008>".
23. McDade T: Development and validation of assay protocols for use with dried blood spots samples. *American journal of human biology*, 2014; 26: 1-9.
24. Timmerman P, White S, Cobb Z, de Vries R, Thomas E, van Baar B: Update of EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS-microsampling consortium, *Bioanalysis*, 2013; 5.
25. Emmons G, Rowland M: Pharmacokinetics considerations as to when to use dried spot sampling, *Bioanalysis*, 2010; 2(11): 1791-1796.

26. Li W, Tse FL: Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules, *Biomedical Chromatography*, 2010; 24: 49-65.
27. De Vries R, Barfield M, van de Merbel N, Schmid B, Siethoff C, Ortiz J, Verheij E, van Baar B, Cobb Z, Timmerman P: The effect of hematocrit on bioanalysis of DBS: results from EBF DBS-microsampling consortium, *Bioanalysis*, 2013; 5(17): 2147-2160.
28. Cobb Z, De Vries R, Spooner N, Williams S, Staelens L, Doig M, Broadhurst R, Barfield M, van de Merbel N, Schmid B, Siethoff C, Ortiz J, Verheij E, van Baar B, Timmerman P, White S: In-depth study of homogeneity of DBS using two different techniques: results from EBF DBS-microsampling consortium, *Bioanalysis*, 5(17).
29. Timmerman P, White S, Globig S, Lüdtko S, Brunet L, Smeraglia J: EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots, *Bioanalysis*, 2011; 3(14): 1567-1575.
30. Van Baar B, Verhaeghe T, Heudi O Rohde M, Wood S, Wieling J, de Vries R, White S, Cobb Z, Timmerman P: IS addition in bioanalysis of DBS: results from the EBF DBS-microsampling consortium, *Bioanalysis*, 2013; 5(17): 2137-2145.
31. Ramšak J. Razvoj in validacija analizne metode za ugotavljanje plazemskih koncentracij karbamazepina, okskarbazepina in njunih presnovkov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Magistrsko delo v pripravi.
32. <https://en.wikipedia.org/wiki/Chloramphenicol>, dostopano 26.6.2015.
33. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, 2013.
34. Ederveen J.: A Practical Approach to Biological Assay Validation, <http://www.scribd.com/doc/33265309/A-Practical-Approach-to-Biological-Assay-Validation#scribd>, 2010.