UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LUKA REBEK

RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE NA OSNOVI TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE SKLOPLJENE Z MASNO SPEKTROMETRIJO ZA MERJENJE KONCENTRACIJ TOPIRAMATA IN NJEGOVIH METABOLITOV V PLAZEMSKIH VZORCIH

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR QUANTIFICATION OF TOPIRAMATE AND ITS METABOLITES IN PLASMA SAMPLES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

ZAHVALA

Za ves trud, nasvete in strokovno pomoč se iskreno zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm.

Izredno se zahvaljujem staršema, bratu, punci Manueli in celotni družini, kateri so mi ves čas študija stali ob strani, me podpirali in verjeli vame.

IZJAVA

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

Luka Rebek, Ljubljana 2015

Komisija za zagovor

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj

Mentor: izr. prof. dr. Robert Roškar

Član komisije: doc. dr. Alenka Zvonar Pobirk

VSEBINA

POVZETEK ... III
ABSTRACT ... IV
SEZNAM OKRAJŠAV ... V
1. UVOD ... 1
1.1 Epilepsija ... 1
1.2 Zdravljenje epilepsije ... 2
1.3 Topiramat ... 4
1.3.1 Farmakokinetika ... 6
1.4 Analitika topiramata ... 7
1.4.1 Priprava vzorca ... 9
1.4.2 Instrumentalna analiza ... 11
2. NAMEN DELA ... 15
3. MATERIALI IN METODE ... 16
3.1 MATERIALI ... 16
3.1.1 Biološki Material ... 16
3.1.2 Standardi ... 17
3.1.3 Reagenti in topila ... 17
3.1.4 Naprave in pribor ... 18
3.2 METODE ... 19
3.2.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ... 19
3.2.1.1 Priprava raztopin ... 19
3.2.1.2 Razvoj LLE postopka ... 21
3.2.1.3 Instrumentalna metoda ... 22
3.2.2 PRIPRAVA STANDARDA METABOLITA M1 ... 25
3.2.2.1 Čiščenje vzorca ... 25
3.2.2.2 Izolacija M1 frakcije ... 25
3.2.2.3 Karakterizacija M1 ... 26
3.2.3 VALIDACIJA ... 26
3.2.3.1 Priprava raztopin in topil ... 26
3.2.3.2 Priprava vzorcev ... 30
3.2.3.3 Instrumentalna metoda ... 30
3.2.3.4 Vrednotenje metode ... 32
3.2.4 ANALIZA REALNIH PLAZEMSKIH VZORCEV ... 35
4. REZULTATI IN RAZPRAVA ... 36
4.1 PRIPRAVA STANDARDA METABOLITA M1 ... 37

4.1.1 Čiščenje vzorca ... 37
4.1.2 Izolacija M1 ... 37
4.1.3 Karakterizacija M1 ... 39
4.2 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ... 39
4.2.1 Priprava vzorca ... 39
4.2.1.1 Ekstrakcija tekoče tekoče ... 40
4.2.1.2 Sušenje ... 42
4.2.1.3 Raztapljanje suhega ostanka ... 43
4.2.2 Instrumentalna metoda ... 44
4.2.2.1 Metoda MS/MS ... 44
4.2.2.2 Metoda LC ... 46
4.3 VALIDACIJA ... 48
4.3.1 Selektivnost ... 48
4.3.2 Linearnost ... 50
4.3.3 Točnost ... 51
4.3.4 Ponovljivost priprave vzorca in injiciranja ... 51
4.3.5 Spodnja meja določitve (LLOQ) ... 52
4.3.6 Stabilnost ... 53
4.3.7 Učinkovitost ekstrakcije ... 53
4.3.8 Učinek matrice ... 54
4.4 ANALIZA REALNIH PLAZEMSKIH VZORCEV ... 55
5. SKLEPI ... 57
6.LITERATURA ... 59

POVZETEK

Topiramat (TPM) je široko-spektralna protiepileptična učinkovina druge generacije. Indiciran je tako v samostojnem kot tudi dodatnem zdravljenju fokalnih in nekaterih oblikah generaliziranih epileptičnih napadov za odrasle in otroke starejše od dveh let. Kljub njegovi pogosti uporabi pa natančna kvantitativna opredelitev metabolnih poti TPM do danes še ni popolnoma razjasnjena. Razlog je predvsem v pomanjkanju dovolj občutljivih analiznih metod, katere bi omogočale sočasno merjenje koncentracij TPM in njegovih metabolitov v bioloških vzorcih.

Namen magistrske naloge je bil razviti in polno validirati dovolj občutljivo analizno metodo za sočasno merjenje koncentracij TPM in njegovih štirih do sedaj poznanih metabolitov v plazemskih vzorcih. Metoda temelji na tekočinski kromatografiji sklopljeni s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Postopek zajema ekstrakcijo 100 µL plazme z zmesjo etilacetata in dietiletra v volumskem razmerju 95:5, ločbo analitov na koloni Kinetex C18, 50×2,1 mm; 2.6 µm in elektrorazprševalno ionizacijo v negativnem načinu. Ugotovili smo, da dejanski standard glavnega metabolita (2,3-desizopropiliden TPM, M1) ni komercialno dostopen. Posledično smo v sklopu magistrske naloge pridobili standard M1 iz urinskega vzorca bolnika na stalnem zdravljenju s TPM. Postopek je zajemal ekstrakcijo urinskega vzorca na trdem nosilcu, izolacijo frakcije M1 s tekočinskim kromatografom in sušenje zbrane frakcije na liofilizatorju. Razvito metodo LC-MS/MS smo nato validirali. Pri tem smo dokazali linearnost v območju 0,1-20 mg/L za TPM, 0,01-2 mg/L za metabolit M1 in 0,001-0,2 mg/L za metabolite M2 (4,5-desizopropiliden TPM), M3 (10-hidroksi-TPM) in M4 (9-hidroksi-TPM). Dokazali smo ustrezno točnost (89-105%), ponovljivost (RSD<9%) in učinkovitost ekstrakcije (93-99%) za vse analite v celotnem območju linearnosti. Potrdili smo selektivnost metode, odsotnost absolutnega in relativnega učinka matrice ter dokazali stabilnost vseh analitov pri različnih pogojih shranjevanja.

Uporabnost analizne metode smo preizkusili z analizo realnih plazemskih vzorcev bolnikov na stalnem zdravljenju s TPM. Primernost metode potrjuje dejstvo, da smo v vseh vzorcih uspeli kvantitativno opredeliti tako TPM kot tudi vse njegove glavne metabolite. Z razvito metodo smo v realnih vzorcih uspeli zaznati in kvantitativno opredelit tudi nov metabolit, za katerega predvidevamo, da je izomer metabolitov M3 in M4.

Ključne besede: topiramat, metaboliti, LC-MS/MS, ekstrakcija tekoče tekoče

ABSTRACT

Topiramate (TPM) is a broad spectrum second generation antiepileptic agent. It is indicated as monotherapy and adjunctive therapy in partial and some forms of generalized seizures in adults and children older than two years. Despite its frequent use, to date, precise quantitative determinations of metabolic pathways of TPM have not yet been fully clarified. The main reason is the lack of sufficiently sensitive analytical methods, which would enable simultaneous determination of TPM and its metabolites in biological samples.

The purpose of this master's thesis was to develop and fully validate sufficiently sensitive analytical method for simultaneous therapeutic drug monitoring of TPM and its four so far known metabolites in plasma samples. The method is based on liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The procedure includes extraction of 100 µL plasma samples with a mixture of ethyl acetate and diethyl ether in a volume ratio of 95:5, separation of analytes on a Kinetex C18, 50×2,1 mm; 2.6 µm column and electrospray ionization in negative mode. We found out that the correct standard of the major metabolite (2,3-desisopropylidene TPM, M1) is not commercially available. Consequently we have developed a procedure for obtaining M1 standard from urine sample of a patient on continuous treatment with TPM. The procedure includes solid phase extraction, isolation of M1 fraction with liquid chromatography and drying with freeze dryer. The developed LC-MS/MS method was fully validated. We proved linearity in the range of 0,1-20 mg/L for TPM, 0,01-2 mg/L for metabolite M1 and 0,001-0,2 mg/L for metabolites M2 (4,5-desisopropylidene TPM), M3 (10-hydroxy-TPM) and M4 (9-hydroxy-TPM). We confirmed adequate accuracy (89-105%), reproducibility (RSD<9%) and extraction efficiency (93-99%) for all analytes across the entire concentration range. We have also confirmed selectivity of developed method, the absence of absolute and relative matrix effect and demonstrated stability of all analytes in various storage conditions.

Applicability of the analytical method was tested by analysing plasma samples of patients on continuous treatment with TPM. The suitability of the method was confirmed by the fact that we quantified TPM, as well as all four metabolites, in all analysed samples. With developed method we detected and quantified a new metabolite, for which we assume is an isomer of M3 and M4.

Key words: topiramate, metabolites, LC-MS/MS, liquid liquid extraction

SEZNAM OKRAJŠAV

AcN	Acetonitril
AE	Protiepileptične učinkovine
CYP450	Encimi skupine citokrom P 450
DCM	Diklorometan
DEE	Dietileter
DR	Delovna raztopina
EA	Etilacetat
ESI	Elektrorazprševalna ionizacija (ang. *Electrospray ionization*)
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (ang. *U S Food and Drug Administration*)
GABA	γ-aminobutanojska kislina
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. *High-performance liquid chromatography*)
ILAE	Mednarodna liga proti epilepsiji (ang. *International League Against Epilepsy*)
IS	Interni standard (topiramat d_{12})
LC	Tekočinska kromatografija (ang. *Liquid chromatography*)
LC-MS/MS	Tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (ang. *Liquid chromatography coupled with mass spectrometry*)
LLE	Ekstrakcija tekoče tekoče (*ang. Liquid liquid extraction*)
LLOQ	Spodnja meja določitve (ang. *Lower limit of quantification*)
M1	2,3-desizopropiliden topiramat (izoliran)
M1*	2,3-desizopropiliden topiramat (dobavljen)
M2	4,5-desizopropiliden topiramat
M3	10-hidroksi-topiramat
M4	9-hidroksi-topiramat
MeOH	Metanol

MF	Mobilna faza
MRM	Multirezidualna analiza (ang. *Multiple reaction monitoring*)
MS/MS	Tandemski masni spektrometer
m/z	Razmerje med maso in nabojem
OPV	Obogateni plazemski vzorci
QQQ	Trojni kvadrupolni masni analizator
R^2	Determinacijski koeficient
RSD	Relativni standardni odklon (ang. *Relative standard deviation*)
SF	Stacionarna faza
SPE	Ekstrakcija na trdem nosilcu (ang. *Solid phase extraction*)
TPM	Topiramat
UMa	Absolutni učinek matrice
UMr	Reativni učinek matrice
UP	Umeritvena premica

1. UVOD

1.1 Epilepsija

Epilepsija predstavlja eno najstarejših poznanih bolezni, saj zapisi o njej segajo v leto 4000 pred našim štetjem. Je kronična nevrološka motnja, katera prizadene skoraj 1% celotne svetovne populacije. Na splošno gre za izredno raznoliko bolezen, katera se lahko kaže v več kot trideset različnih oblikah in jo velikokrat spremljajo številne druge bolezni (npr. depresija). Karakterizirana je s ponavljajočimi se nepredvidljivimi epileptičnimi napadi, kateri so posledica nenadne nepravilne dejavnosti nevronov v osrednjem živčnem sistemu, brez točno določenega vzroka (1,2). Napadi so lahko emocionalne, motorične, vegetativne senzorične ali kognitivne narave, z ali brez izgube zavesti. Po ocenah ima v svetovnem merilu aktivno obliko epilepsije, katera je definirana z vsaj enim epileptičnim napadom v zadnjih petih letih, 5-10 ljudi na tisoč prebivalcev (3). Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije ocenjujejo, da je vsako leto na novo diagnosticiranih približno 2,4 milijona ljudi, pri čemer je pojavnost v državah tretjega sveta približno 2-krat višja (1). Pojavi se lahko v vseh starostnih obdobjih, a vendar je odkritje bolezni pogostejše v zgodnjem otroštvu ali starosti (4,5).

Kljub velikemu napredku sodobne znanosti, je zaradi kompleksnosti bolezni nevrokemija epileptičnih napadov še ne čisto razumljen proces. Študije nakazujejo, da so epileptični napadi posledica številnih dolgotrajnih sprememb v možganih. Te spremembe vplivajo na ekspresijo genov, sproščanje in prenos živčnih prenašalcev, sinaptično reorganizacijo, lastnosti receptorjev in ionskih kanalčkov ter aktivnost astrocitov (12).

Klasifikacija se predvsem opira na simptome bolezni (epileptične napade). Mednarodna liga proti epilepsiji (ILAE) tako deli epileptične napade v dve glavni skupini, in sicer generalizirane in fokalne. Pri generaliziranih napadih je značilno, da pride do nepravilnosti v delovanju celotnih možganov in so povezani z izgubo zavesti, medtem ko pri fokalnih napadih pride do nenormalnega proženja nevronov v le določenem omejenem predelu možganov (6).

Poznamo več različnih tipov *generaliziranih napadov*, med katerimi je najbolj poznana t.i. »grand-mal« oblika. Pri tej obliki pride do izgube zavesti in padca čemur sledi najprej splošna otrdelost telesa in nato močno nenadzorovano tresenje (*tonično-klonični* napad). Posebna oblika generaliziranega napada so *absence* (t.i. »petit mal«), kjer pride do kratkotrajne izgube spomina, česar pa se bolniki pogosto ne zavedajo. Značilne so pri

otrocih, kjer ponavadi pride do stanja zasanjanosti in neodzivnosti. Pri *miokloničnih* napadih gre za sunkovite in kratke nenadzorovane krče, katere bolniki opisujejo kot električne šoke, ki lahko zajamejo celo telo ali le del telesa. Pogosto pri teh napadih pride do padcev ali nehotenih metov stvari, ki jih imajo trenutno v rokah. Podobna oblika so tudi *kloničnі* napadi, kjer je tresenje ritmično in zajema obe strani telesa. Nasprotno pride pri *atoničnih* oblikah do nenadnega zmanjšanja mišičnega tonusa, predvsem v rokah in nogah, kar prav tako rezultira v padcih in poškodbah bolnikov. Za *tonično obliko*, je značilna popolna otrdelost in rigidnost mišic celotnega telesa (6-9).

Za *fokalne napade* je značilno, da se nenormalno proženje nevronov začne v določenem omejenem predelu možganov. V primeru, da se ti razširijo na celotne možgane, govorimo o *sekundarno generaliziranem* napadu. Poznamo enostavne in kompleksne oblike. Pri kompleksnih oblikah pogosto pride do izgube zavesti, kar za enostavne oblike ni značilno. Enostavne napade ILAE deli nadalje glede na naravo simptomov na motorične, avtonomne, senzorične in psihološke. V primeru, da napad traja več kot pet minut ali si napadi sledijo eden za drugim brez daljše prekinitve, govorimo o *statusu epileptika*. Takšno stanje je življenjsko ogrožajoče in se zdravi s takojšnjim vnosom zdravila intravensko (6-9).

1.2 Zdravljenje epilepsije

Glavni cilji zdravljenja epilepsije so preprečevanje nastanka ponovnih napadov s čim manj neželenih učinkov zdravil, izboljšanje kakovosti življenja in zmanjšanje smrtnosti bolnikov (10). Zdravljenje vključuje protiepileptične učinkovine (AE), nevrostimulacijo, nevrološke operacije in nekatere druge metode (11). Ob optimalnem zdravljenju z AE se je izkazalo, da pri približno 70% bolnikov ne pride do ponovnega pojava epileptičnega napada (13). Uspešnost zdravljenja je odvisna tako od izbire primernega zdravila, kot tudi od vrste epileptičnega napada. Pri bolnikih z generaliziranimi napadi je uspešnost zdravljenja z AE približno 80%, medtem ko je pri fokalnih napadih le 50% (14). Zdravljenje z AE uvajamo postopoma, kar pomeni, da začnemo z najnižjimi odmerki in jih nato v naslednjih tednih postopoma povečujemo. S tem se izognemo neželenim učinkom, ki so posledica delovanja na osrednji živčni sistem (npr. ataksija, zaspanost, glavoboli). V primeru dobrega prenašanja zdravila ob neuspešnem zdravljenju, se priporoča višanje odmerka do odmerka, katerega bolniki še dobro prenašajo. Če zdravljenje kljub najvišjemu odmerku ni uspešno, se priporoča ali zamenjava z drugim AE ali uvedbo racionalne dvojne terapije. Ta

odločitev je v rokah zdravnika, saj trdnih dokazov v prid ene ali druge možnosti ni. V praksi se pogosto uvede najprej drugo zdravilo in ob neuspešnem zdravljenju se postopoma ukine prvo (15). Pri 30% bolnikov se srečamo s težavo, da niti racionalna dvojna terapija ne prepreči ponovnega epileptičnega napada. V tem primeru govorimo o trdovratni obliki epilepsije, pri kateri se politerapiji pogosto ne moremo izogniti in zahteva razširjeno klinično obravnavo bolnika (20).

Danes poznamo veliko število AE, ki jih v osnovi lahko razdelimo v tri generacije. Čeprav natančni mehanizmi delovanja nekaterih AE niso pojasnjeni, jim je skupno, da vsi vplivajo na ravnotežje med vzdraženjem in zaviranjem nevronov. Na celični ravni delujejo preko modulacije napetostno odvisnih ionskih kanalčkov (Na^+, Ca^{2+}, K^+), indukcije γ-aminobutanojske (GABA) nevrotransmisije in zaviranja eksitatorne (glutamatne) nevrotransmisije (17). Vendar pa postaja vse bolj jasno, da večina predvsem novejših AE, izkazuje več mehanizmov delovanja preko katerih preprečujejo nastanek epileptičnih napadov. V *prvo generacijo* AE spadajo benzodiazepini, karbamazepin, etosuksimid, fenobarbital, fenitoin, klonazepam in valprojska kislina. Izkazujejo dobro učinkovitost proti različnim tipom epileptičnih napadov, vendar pa jih bolniki pogosto slabše prenašajo. *Drugo generacijo* AE učinkovin predstavljajo lamotrigin, topiramat, tiagabin, okskarbazepin, levetiracetam, zonisamid, gabapentin, felbamat, vigabatrin in pregabalin. Imajo podoben mehanizem delovanja kot AE prve generacije, vendar je njihova prednost, da povzročajo manj neželenih učinkov, manj interakcij z drugimi učinkovinami in imajo na splošno boljše farmakokinetične lastnosti (18,19). *Tretjo generacijo* AE predstavlja 20 učinkovin, katere so farmacevtska podjetja registrirala v številnih državah sveta z namenom izboljšanja učinkovitosti in zmanjšanja pojava neželenih učinkov. Nekatera med njimi so derivati že uveljavljenih AE (npr. valrocemide, eslikarbazepin) in imajo podobne mehanizme delovanja, medtem ko so druge, pridobljene s t.i. screeningom in imajo povsem drugačne mehanizme delovanja (npr. karabersat) (20). V Sloveniji so med AE tretje generacije registrirani: retigabin (Trobalt), lakozamid (Vimpat), eslikarbazepin (Zebinix), rufinamid (Inovelon) in stiripentol (Diacomit) (21).

Zaradi kompleksnega in raznolikega delovanja večine AE, so se nekatera uveljavila tudi pri zdravljenju drugih bolezenskih stanj, kot so npr. profilaksa migrenskih glavobolov, bipolarna motnja in nevropatska bolečina (18). V preglednici I so prikazani AE 1., 2. in 3. generacije ter njihove indikacije za zdravljenje epilepsije in drugih bolezenskih stanj.

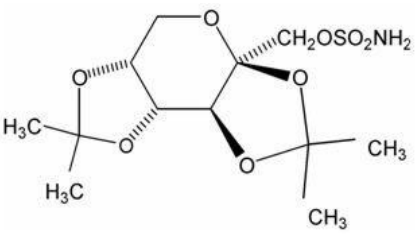
Preglednica I: Glavne indikacije AE, povzeto po (16, 18, 22-26).

PROTIEPILEPTIČNA UČINKOVINA	INDIKACIJE	DRUGA STANJA
1. Generacija		
Benzodiazepini	Status epileptikus, fokalni in generalizirani napadi	Anksioznost, nespečnost
Karbamazepin	fokalni in tonično-klonični napadi	Bipolarne motnje, nevralgije
Etosuksimid	Absence	/
Fenobarbital	Status epileptikus, fokalni in generalizirani (razen absenc) napadi	/
Fenitoin	Fokalni in tonično-klonični napadi, status epileptikus	/
Klonazepam	Absence in tonično-klonični napadi	/
Valprojska kislina	Fokalni in generalizirani napadi	Bipolarna motnja, migrenski glavoboli
2. Generacija		
Felbamat	Huda epilepsija odporna na ostale AE (Lennox-Gaustat)	/
Gabapentin	Fokalni napadi	Nevropatska bolečina
Lamotrigin	Fokalni in generalizirani napadi	Bipolarna depresija
Levetiracetam	Fokalni in generalizirani napadi	/
Okskarbazepin	Fokalni in tonično-klonični napadi	/
Pregabalin	Fokalni napadi	Nevropatska bolečina
Tiagabin	Fokalni napadi	/
Topiramat	Fokalni in generalizirani (pri absencah učinkovitost ni dokazana) napadi	Profilaksa migrenskih glavobolov
Vigabatrin	Fokalni napadi odporni na ostale AE in West sindrom	/
Zonisamid	Fokalni in generalizirani napadi	/
3. Generacija		
Retigabin	Fokalni napadi	/
Lakozamid	Fokalni napadi	/
Eslikarbazepin	Fokalni napadi	/
Rufinamid	Napadi povezani z Lennox-Gaustat sindromom	/
Stiripentol	Generalizirani tonično-klonični napadi in pri hudi mioklonični epilepsiji	/

1.3 Topiramat

Topiramat (TPM; 2,3:4,5-bis-O-(1-metiletiliden)-ß-D-fruktopiranoza 1-sulfamat) je široko spektralni AE druge generacije. Strukturno je derivat D-fruktoze in se popolnoma razlikuje od ostalih AE. Posebnost njegove strukture je, da kisikovi atomi predstavljajo približno 40% celotne mase in predstavljajo potencialne donorje elektronov za tvorbo vodikovih vezi, medtem ko amidna vez služi kot akceptor. Ključnega pomena za njegovo delovanje je sulfamatna skupina (OSO_2NH_2), vezana na fruktopiranozni obroč. Je šibka kislina

(pKa=8,7) in kljub svoji relativno nizki lipofilnosti (logP=0,5), zlahka prehaja krvno-možgansko pregrado (27,28).



Slika 1: Strukturna formula topiramata, povzeto po (29)

Indiciran je za odrasle, mladostnike in otroke starejše od šest let, kot samostojno zdravljenje pri fokalnih epileptičnih napadih z ali brez sekundarne generalizacije, ter pri tonično-kloničnih (»grand-mal«) oblikah napadov. Lahko se uporablja tudi kot dodatno zdravljenje pri otrocih nad dveh let za zdravljenje epileptičnih napadov, povezanih z Lennox-Gaustautovim sindromom, tonično-kloničnih oblikah in fokalnih napadih. Primeren je tudi za preprečevanje pojava migrenskih glavobolov, vendar pa ni namenjen akutnemu zdravljenju le teh (30).

Tako kot vse ostale protiepileptične učinkovine je tudi TPM potrebno uvajati postopoma. S tem se izognemo neželenim učinkom, za katere je značilno, da s časom izzvenijo. Zdravljenje je odvisno od individualnih značilnosti bolnika ter njegovega kliničnega odziva. Zdravljenje se ponavadi začne z odmerkom 25 mg, katerega bolnik jemlje 1-krat dnevno zvečer. Nato se odmerki višajo v dvotedenskih intervalih po 25 ali 50 mg in se razdelijo v dva dnevna odmerka. V primeru slabšega prenašanja zdravila, se lahko interval višanja odmerka tudi podaljša. Med najpogostejše neželene učinke spadajo: slabost, utrujenost, upočasnjena psihomotorika, tveganje za nastanek ledvičnih kamnov, zmanjšanje apetita in anoreksija, kognitivne motnje, zmanjšanje potenja, zamegljen vid, glavkom (27,31,32).

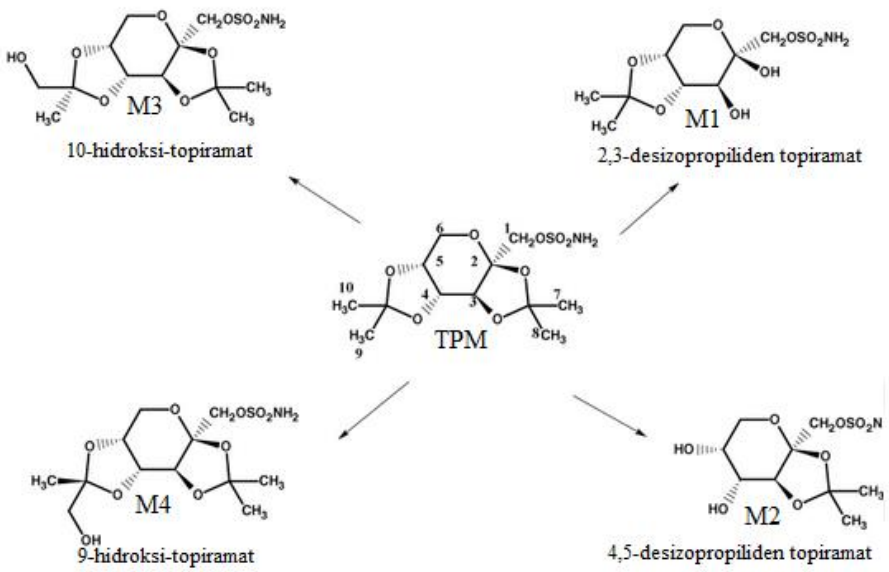
Farmakodinamski profil TPM je dokaj kompleksen, saj obsega vsaj štiri do sedaj poznane mehanizme delovanja. Mednje sodijo zaviranje napetostno odvisnih Na^+ in Ca^{2+} kanalčkov, zaviranje ionskih kanalčkov z vezavnim mestom za glutamat (predvsem AMPA in kainatni podtip), zvišanje koncentracije GABA v GABA-nergičnih nevronih in zaviranje delovanja nekaterih izomerov encima karboanhidraze. Vendar pa študije nakazujejo, da kljub različnim farmakodinamskim učinkom obstaja na molekularni ravni skupen mehanizem delovanja. Ta zajema oslabitev od ATP (adenozin 5-trifosfat) odvisne fosforilacije proteinov na vezavnih mestih ionskih kanalčkov, katera poteka s pomočjo

encimov protein kinaze A in C. Vezavna mesta na receptorjih vsebujejo namreč veliko proton donorskih skupin s katerimi TPM tvori vodikove vezi in s tem prepreči dostop encimom do serinske hidroksilne skupine, kar onemogoči fosforilacijo proteinov (27,28).

1.3.1 Farmakokinetika

Po peroralnem vnosu se TPM skoraj popolnoma absorbira in njegova biološka uporabnost znaša med 81% in 95%. Prisotnost sočasno zaužite hrane lahko upočasni absorpcijo za približno 2 uri, vendar pa ne vpliva na obseg absorpcije. Največjo plazemsko koncentracijo doseže v 2-4 urah po zaužiju (33). Študije so pokazale, da obstaja linearna povezava med terapevtskimi odmerki (200-800 mg/dan) in plazemskimi koncentracijami, katere so večinoma v območju 5-20 µg/mL. TPM se le v majhnem deležu veže na plazemske proteine (9-17%), zato je le malo verjetno, da prihaja do interakcij z drugimi učinkovinami zaradi kompetitivne vezave na plazemske proteine. Njegov navidezni volumen porazdelitve pri standardnih terapevtskih odmerkih v stanju ravnotežja znaša med 0,6 in 0,8 L/kg (34). Le majhen delež (<30%) zaužitega odmerka se metabolizira v jetrih in se po večini izloča nespremenjen skozi ledvica, kar je ugodno, saj se na ta način zmanjša variabilnost med bolniki (29,35,36). Njegov ledvični očistek znaša 17-18 mL/min in ima relativno dolgo razpolovno dobo (19-23 h) (34).

Metabolizem poteka preko oksidacije z encimi CYP450, pri čemer nastanejo štirje glavni metaboliti (Slika 2) (29). Ob sočasni uporabi induktorjev encimskega sistema CYP450 se obseg jetrnega metabolizma poveča, kar zviša njegov oralni očistek za približno 2-krat in posledično zmanjša njegovo razpolovno dobo na 10-12 h (36). V literaturi je mogoče zaslediti, da uvedba karbamazepina, kot drugega zdravila pri terapiji s TPM, zniža plazemske koncentracije slednjega za približno 40%, medtem ko dodatek fenitoina povzroči še večje, približno 50% znižanje. Ti podatki so predvsem pomembni ob ukinitvi zdravljenja z encimskimi induktorji, saj se v tem primeru zaradi zvišanja koncentracij TPM lahko pojavijo neželeni učinki in je zato potrebno spremljanje bolnika in prilagoditev odmerkov (34). Tudi starost lahko močno vpliva na očistek TPM in njegovo razpolovno dobo. Predvsem pri otrocih in dojenčkih je očistek po navedbah študij do 50% višji kot pri odraslih, zato so pri njih potrebni višji odmerki glede na kilogram telesne mase (37).



Slika 2: Metabolne poti TPM, povzeto po (29)

Zaradi različnih individualnih dejavnikov (starost, ledvična funkcija) in interakcij s sočasno uporabljanimi zdravili, je pri optimizaciji individualnega odmerjanja še kar nekaj prostora za izboljšave. Zato postaja predvsem zanimivo terapevtsko merjenje koncentracij, katero bi omogočilo tako individualno prilagoditev odmerjanja kot tudi spremljanje vodljivosti bolnikov (36).

1.4 Analitika topiramata

Zaradi spremenljivih farmakokinetičnih lastnosti in njegovega farmakološkega profila nam terapevtsko merjenje koncentracij topiramata v bioloških vzorcih (npr. plazma, serum, urin) lahko poda številne uporabne informacije (38). Te informacije so nam v pomoč predvsem pri diagnozi neželenih učinkov, ugotavljanju vodljivosti bolnikov s ponavljajočimi se napadi in pri zdravljenju občutljivih populacij (otroci, starostniki in nosečnice) (33). Zato je ključnega pomena uporaba dovolj občutljivih in polno validiranih analiznih metod, katere dajejo zanesljive in ponovljive rezultate (39).

Analitika TPM je otežena, saj je zaradi termolabilnosti neprimeren za analizo z metodami plinske kromatografije sklopljene z različnimi detektorji (GC-FID in GC-NPD), katere so bile kronološko gledano med prvimi razvitimi. Podobno kot ostali monosaharidi in njihovi derivati, v svoji strukturi ne vsebuje kromoforjev, kateri bi absorbirali svetlobo valovne dolžine nad 190 nm. Posledično je za analizo s klasičnimi HPLC metodami potrebna predhodna derivatizacija z ustreznimi reagenti, kateri omogočajo fluorescenčno (FLD) ali UV detekcijo (npr. FMOC-Cl in NBD-Cl), kar oteži in podaljša postopek priprave vzorca.

Za rutinsko ugotavljanje serumskih koncentracij TPM se danes pogosto uporablja fluorescentno-polarizacijska imunološka metoda (FPIA). Metoda ima zadovoljivo občutljivost in analitično območje (2-32 µg/mL), vendar pa prisotnost metabolitov moti natančnost dobljenih rezultatov (36). Zaradi omenjenih težav pri analitiki, se je v zadnjem času kot zlati standard uveljavila uporaba tekočinske kromatografije sklopljene s tandemsko masno detekcijo (LC-MS/MS) (35) (Preglednica II).

Preglednica II: Kronološki pregled razvoja novejših analiznih metod za merjenje koncentracij topiramata v bioloških vzorcih.

LETO	ANALIZNA METODA	PRIPRAVA VZORCA	VOLUMEN VZORCA	OBMOČJE (µg/mL)	LLOQ (µg/mL)
1999	GC-NPD (41)	LLE	100 µL P, K	0,5-50	0,5
2000	GC-NPD (42)	LLE	500 µL S	2,5-150	2,5
2001	LC-MS (38)	PP	500 µL P	1-20	0,25
	MS (43)	LLE	100 µL P	1-30	2
2002	LC-MS/MS (44)	PP	200 µL P	0,02-20	0,04
			200 µL CSF	1,5-20	1,5
2003	LC-MS/MS (40)	LLE	1mL U, 500 µL P	0,625-40	0,625
2004	HPLC-FLD (45)	LLE	1 mL S	0,02-5	0,02
2005	HPLC-UV (46)	LLE	1 mL S	0,04-40	0,04
	LC-MS/MS (29)	LLE	1mL U, 500 µL P	0,002-40	0,002
2006	HPLC-FLD (47)	LLE	1 mL S	0,01-12,8	0,01
2008	LC-MS/MS (48)	LLE	3,3 µL DBS	0,5-50	0,5
	LC-MS/MS (49)	LLE	100 µL P	0,02-5	0,02
2009	FPIA (50)	/	3 µL S	1,5-54	1,5
	LC-MS/MS (51)	SPE	N	0,01-2	0,01
2010	CZE-UV (52)	SPE	500 µL P	2-60	2
	HPLC-FLD (53)	SPE	500 µL P	1-50	1
	LC-MS/MS (54)	SPE	100 µL P	0,01-4,2	0,01
	LC-MS/MS (35)	LLE	100 µL P	0,5-30	0,5
2011	LC-MS/MS (55)	PP	100 µL P	0,8-40	0,8
2012	LC-MS/MS (56)	PP	50 µL P	2,1-52	2,1
	LC-MS/MS (39)	SPE	200 µL P	0,01-2	0,01
	GC-MS (57)	SPE	500 µL P	0,1-40	0,1
2013	LC-MS/MS (58)	SPE	200 µL P	0,02-0,605	0,02
	LC-MS/MS (59)	PP	50 µL P,S	0,1-46,6	0,1
	GC-NPD (60)	LLE	100 µL P	1-50	1
2014	HPLC-FLD (36)	LLE	500 µL P	0,01-24	0,01

K = polna kri; P = plazma; U = urin; LLE = ekstrakcija tekoče tekoče; SPE = ekstrakcija na trdem nosilcu; PP = obarjanje proteinov; N = ni podatka; DBS= posušeni krvni madeži; CSF= cerebralna spinalna tekočina

Poznavanje identitete metabolitov in kvantitativni doprinos posameznih metabolnih poti udeleženih v biotransformaciji učinkovine je ključnega pomena za njeno ustrezno vključitev v klinično prakso. Kljub velikemu številu razvitih bioanaliznih metod za terapevtsko spremljanje koncentracij TPM, so do danes le Malka Britzi in sodelavci razvili dve metodi LC-MS/MS za ugotavljanje TPM in štirih njegovih najpogostejših metabolitov v plazmi in urinu (29,40). Vendar pa je zaradi slabše občutljivosti teh objavljenih metod, pomanjkljive validacije in neovrednotenega učinka matrice zanesljivost dobljenih rezultatov vprašljiva.

Posledično še zmeraj obstaja potreba po razvoju dovolj občutljive, zanesljive in validirane bioanalizne metode, katera bi omogočala kvantitativno opredelitev metabolitov in posledično metabolizma TPM.

1.4.1 Priprava vzorca

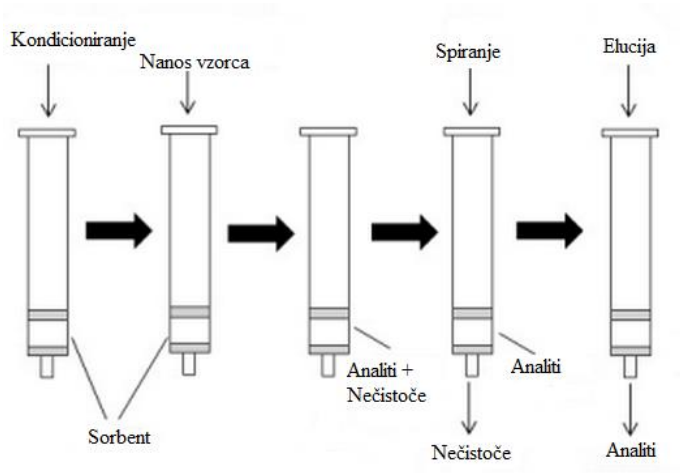
Ustrezna priprava vzorca je ključnega pomena za razvoj občutljive, zanesljive in selektivne bioanalizne metode. Biološki vzorci namreč, zraven preiskovanih analitov, vsebujejo še številne druge komponente matrice (npr. proteini, lipidi, soli), katere je potrebno z ustreznim postopkom čiščenja pred analizo odstraniti. Za ekstrakcijo TPM so v objavljenih metodah uporabljali precipitacijo proteinov (PP), ekstrakcijo tekoče tekoče (LLE) in ekstrakcijo na trdem nosilcu (SPE).

LLE je ena najpogosteje uporabljanih tehnik priprave vzorcev v analizni kemiji. Osnovni princip je porazdeljevanje analitov med vodno fazo (biološki vzorec) in organskim topilom, katerega dodamo vzorcu. Prednosti LLE so predvsem njena enostavna izvedba, nizki stroški izvedbe, kratek čas razvoja metode in široka izbira organskih topil. Vendar pa ima tudi nekatere slabosti, kot so tvorba emulzij, vzajemna topnost analitov v obeh fazah, dolg čas priprave pri vzorcih velikih volumnov ter poraba velikih volumnov strupenih in vnetljivih organskih topil (61). Najpogosteje uporabljani ekstrakcijski topili v objavljenih metodah merjenja koncentracij TPM sta diklorometan (DCM) (36,45,46,47), s katerim so dosegli izkoristke med 87% in 98%, ter dietileter (DEE) (29,35,40,41) kjer so bili izkoristki približno 86%. Avtorji ostalih analiznih metod navajajo kot primerna topila še acetonitril (AcN) (49), kloroform (43) in etilacetat (EA) (42). Predvsem uporaba EA se je izkazala kot izredno primerna, saj je bil izkoristek ekstrakcije pri tej metodi približno 100%.

SPE temelji na kromatografski ločbi, pri čemer gre za vezavo analitov iz tekoče (vzorca) na trdno fazo iz katere ga nato z uporabo ustreznega topila speremo. Prednost pred LLE je

v manjši porabi organskih topil, možnosti avtomatizacije, hitrejši izvedbi čiščenja večjega volumna bioloških vzorcev in odsotnosti nastanka emulzij (61). Proces priprave vzorca je sestavljen iz več korakov. Najprej je potrebno izbrati ustrezno SPE kolono, kjer odločitev temelji na fizikalno kemijskih lastnostih izbranih analitov. Temu sledi kondicioniranje z namenom omočitve in aktivacije sorbenta. Nanos vzorca dosežemo s pomočjo podtlaka, katerega ustvarimo z oljno ali membransko črpalko. Po nanosu vzorca sledi najprej spiranje šibko vezanih nečistot iz SPE kolone in nato elucija analitov z izbiro ustreznega topila (Slika 3)

Poznamo več vrst ekstrakcijskih kolon (reverzno-fazne, normalno-fazne, ionsko-izmenjevalne in adsorpcijske), katere se razlikujejo v različnih kemijskih sestavah sorbentov in posledično različnih mehanizmih zadrževanja analitov. Za pripravo vzorcev TPM se predvsem uporabljajo klasične reverzno-fazne (C8 ali C18) in polimerne reverzno-fazne SPE kolone. Osnovo zadrževanja na teh sorbentih predstavljajo Van der Walsove in hidrofobne vezi, zato so predvsem primerne za nepolarne ali srednje polarne spojine.



Slika 3: Shematski prikaz SPE, povzeto po (62)

Osnovo reverzno-faznih kolon predstavlja silikagel, na katerega so večinoma vezane oktilne (C8) ali oktadecilne (C18) verige ogljikovodikov. Ekstrakcijo TPM s tovrstnimi kolonami so uporabili v dveh metodah, pri čemer so v obeh primerih uporabili C18 reverzno-fazno kolono (Empore^{TM} C18 (57) in Varian BondElut C18 (52)). Kot primernejša se je izkazala SPE kolona Varian BondElut C18, saj so bili izkoristki z uporabo MeOH kot elucijskega topila bistveno višji (94%).

Pogosteje se za analizo TPM uporabljajo reverzno-fazni polimerni nosilci (npr. N-vinilpirolidon, divinilbenzen), katerih prednost je v tem, da za vzdrževanje interakcij

omočenje ni tako ključnega pomena (61). V praksi se je največ uporabljala kolona Oasis® HLB (51, 54) z MeOH kot elucijskim topilom. Izkoristiki pri tej SPE koloni so bili med 56 in 66%. Občutno višje izkoristke so dosegli z metodo, pri kateri so kot SPE kolono uporabljali Strata-X in AcN kot elucijsko topilo, saj so bile vrednosti med 103 in 105,5% (39).

1.4.2 Instrumentalna analiza

V farmakokinetičnih študijah se je kot najprimernejša metoda v zadnjem času uveljavila metoda tekočinske kromatografije sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Njena prednost je v tem, da omogoča visoko specifičnost in občutljivost ter kratek čas analize (64). Podobno velja tudi za analitiko TPM, saj analizne metode v zadnjem času temeljijo prav na LC-MS/MS (preglednica II).

Tekočinska kromatografija (LC) temelji na porazdeljevanju komponent vzorca med trdno ali tekočo stacionarno fazo (SF) in tekočo mobilno fazo (MF). Glede na mehanizem zadrževanja analitov na koloni ločimo porazdelitveno, adsorpcijsko, ionsko-izmenjevalno in izključitveno kromatografijo. Porazdelitveno kromatografijo lahko nadalje delimo na reverzno-fazno in normalno-fazno. Reverzno-fazna kromatografija je najprimernješa in tudi najbolj uporabljana vrsta kromatografije za ločbo učinkovin in njihovih metabolitov. Pri tem je SF (običajno vezana na nosilec) nepolarna, medtem ko je MF polarna in nam tako omogoča ločevanje nepolarnih do zmerno polarnih analitov (63). LC metode uporabljajo kot MF kombinacijo različnih vodnih raztopin (npr. pufrov) in organskega modifikatorja (AcN ali MeOH). Posebnost LC sklopljene z masno detekcijo je v tem, da MF ne sme vsebovati nehlapnih molekul (npr. fosforna kislina ali fosfatni pufer), saj lahko njihova prisotnost onesnaži ionski izvor masnega spektrometra in povzroči močno ionsko supresijo. V izogib temu se kot topljenci najpogosteje uporabljajo mravljična ali etanojska kislina, amonijev acetat ali amonijev formiat (61). Ključnega pomena za razvoj ustrezne kromatografske ločbe sta tako izbira ustrezne kolone (SF) in primerne MF.

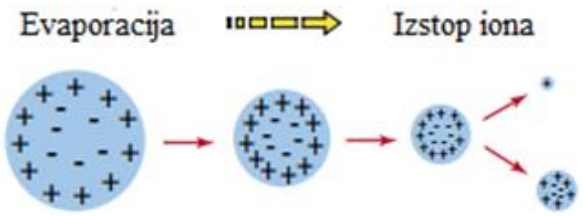
Pri LC-MS/MS metodah za merjenje koncentracij TPM so raziskovalci uporabljali predvsem C18 reverzno-fazne kolone ter *izokratsko izpiranje*. Sestave MF so se med različnimi metodami razlikovale in bile predvsem odvisne od načina ionizacije v masnem spektrometru. *Gradientno izpiranje* so uporabili le pri metodah, kjer so sočasno ugotavljali večje število protiepileptičnih učinkovin (55,56) in pri obeh metodah merjenja TPM in njegovih glavnih metabolitov (29,40). Pri slednjih so kot MF A uporabili 10 mM amonijev

acetat, kot MF B pa MeOH. Gradientno izpiranje so začeli s 5% MF B in nato v časovnem intervalu 2-6 min povečevali delež MF B od 5-50%. Na ta način so uspeli doseči zadovoljivo ločitev vseh analitov, katera je ključnega pomena, saj sta med metaboliti dva para izomerov. Zaradi identičnih masnih prehodov izomerov, le-teh brez ustrezne predhodne kromatografske ločbe ne moremo ločiti z masnim spektrometrom.

Masna spektrometrija deluje na principu ločevanja analitov glede na njihovo razmerje med maso in nabojem (m/z). Ob vstopu analitov iz kromatografske kolone v masni analizator se morajo le-ti pretvoriti v plinasto ionizirano stanje (64). Izbira primerne ionizacijske tehnike (*ionskega izvora*) je tako ključnega pomena za uspešno masno detekcijo in temelji na lastnostih preiskovanih analitov (61). Za termostabilne spojine z maso manjšo od 1000 Da in temperaturo vrelišča nižjo od 500 ºC so primerne t.i. »hard tehnike«, pri katerih se analit najprej uplini in v naslednjem koraku ionizira. Med temi tehnikami sta najbolj zastopani kemična ionizacija (CI) in ionizacija z elektroni (EI). Za termolabilne in manj hlapne spojine pa se uporabljajo t.i. »soft tehnike«, pri katerih se analiti iz tekočega stanja neposredno pretvorijo v ionsko obliko. Med te tehnike spadajo kemična ionizacija pri atmosferskem tlaku (APCI), elektrorazprševalna ionizacija (ESI), fotoionizacija pri atmosferskem tlaku (APPI), laserska desorpcija/ionizacija iz matriksa (MALDI) in bombardiranje s hitrimi atomi (FAB) (61,65,67).

Elektrorazprševalna ionizacija (ESI) se je pri analitiki TPM izkazala kot metoda prvega izbora. ESI temelji na nastanku ionov s pomočjo razprševanja v šibkem električnem polju (3-6 kV). Mobilna faza z analiti se s pomočjo jeklene igle razprši (nebulizira) v komoro z atmosferskim tlakom, pri čemer v električnem polju nastanejo nabite kapljice. Med potovanjem skozi sušilni plin pride do izhlapevanja topila iz kapljic in kopičenja naboja na površini. Ko topilo popolnoma izhlapi, pride do izstopa iona, kar povzroči nastanek nabitih molekul, katere skozi kapilaro preidejo do masnega analizatorja (slika 4). ESI je metoda prvega izbora za analizo termolabilnih molekul, saj ionizacija poteka pri nižjih temperaturah in atmosferskem tlaku. Možna sta negativni (ESI-) in pozitivni (ESI+) način ionizacije, ki se razlikujeta v naboju nastalega iona. Nabitost iona je odvisna od lastnosti analita oz. vrste njegovih funkcionalnih skupin. Pri ionizaciji funkcionalnih skupin, katere oddajo proton (npr. –OH,-COOH), nastanejo ioni z negativnim nabojem. V nasprotnem primeru, ko funkcionalne skupine proton sprejmejo (npr. $–NH_2$), pa nastanejo ioni s pozitivnim nabojem. Seveda imajo nekatere spojine obe vrsti funkcionalnih skupin in jih posledično lahko analiziramo v ESI+ ali ESI- načinu. V tem primeru izberemo način, pri

katerem imamo boljšo občutljivost (65,66). Pri analitiki TPM se uporabljata tako ESI- (35,39,43,49,54,55) kot tudi ESI+ (29,40,56,59). Pri metodah z ESI+ načinom ionizacije so spremljali nastanek aduktov amonijaka s TPM, kar je iz vidika robustnosti metode slabo, saj je v tem primeru bolj izražena stabilnost odziva v odvisnosti od meddnevne kvalitete mobilne faze.



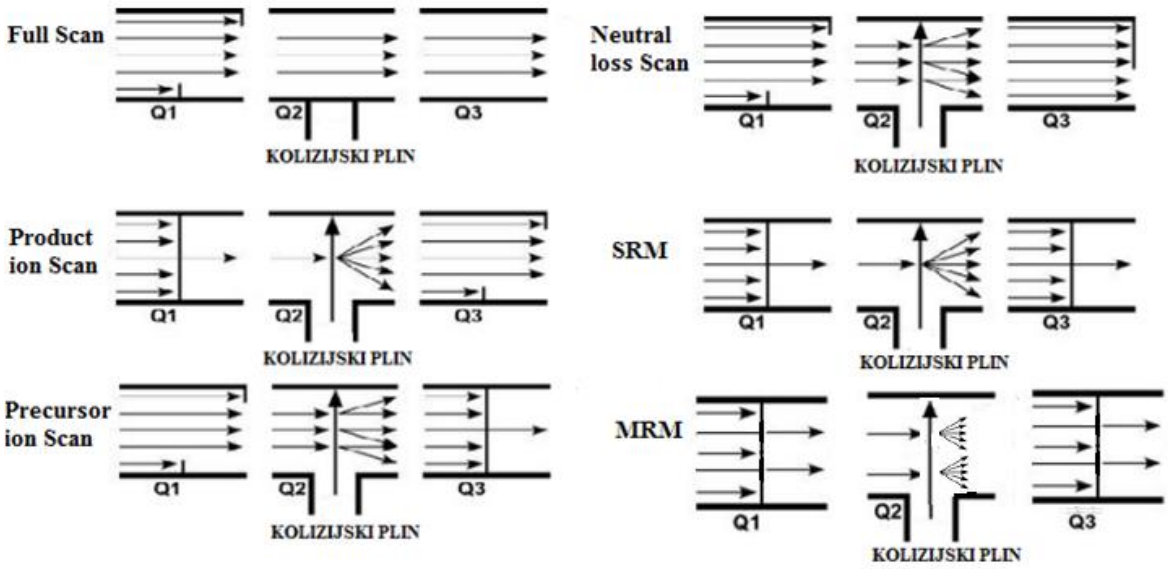
Slika 4: Princip nastanka nabitih molekul, povzeto po (67)

Poznamo več različnih tipov masnih analizatorjev, med katerimi se v povezavi z LC uporabljajo enojni (Q) in trojni (QQQ) kvadrupolni analizator, analizator časa preleta (TOF), analizator z ionsko pastjo (IT) in analizator s Fourierjevo transformacijo (FT-ICR) (62).

QQQ je sestavljen iz dveh masnih filtrov (kvadrupolov), med katerima je kolizijska celica. Vsak kvadrupol sestavljajo štiri nerjaveče palice, katere so priklopljene na vir izmenične napetosti in ustvarjajo oscilirajoče magnetno polje, s pomočjo različnih napetosti na elektrodah. Z nastavitvami izbranega magnetnega polja lahko posledično dosežemo, da skozi kvadrupol potujejo le ioni s točno določenim razmerjem med maso in nabojem (m/z) (t.i. prekurzorski ioni). Ostali ioni pa se zaletijo v palice. S tem želene analite ločimo od ostalih spojin, katere se sočasno ionizirajo v ionskem izvoru. Po filtriranju določenega iona na prvem kvadrupolu, ta potuje do kolizijske celice, kjer zaradi trkov z molekulami kolizijskega plina pride do razpada na fragmentne ione (ang. product ion). Ti nato potujejo skozi drugi kvadrupol, kjer se ponovno ločijo glede na izbrano m/z razmerje (65).

Detekcijo analitov na QQQ lahko izvajamo na več načinov. Kadar spremljamo ione v širokem spektru vrednosti m/z, govorimo o »Scan« načinih (ang. Full scan, Product ion scan, Precrusor ion scan in Neutral loss scan). V primeru, da spremljamo samo fragmentacijo izbranega prekruzorskega iona v določen fragmentni ion, govorimo o SRM načinu (ang. Selective reaction monitoring). Danes pa je najpogosteje uporabljena multirezidualna analiza (*MRM;*ang. *Multiple Reaction Monitoring*) način detekcije, kateri omogoča hkratno analizo večih SRM prehodov in tako lahko v sklopu ene analize

detektiramo več analitov. Prednost MRM je tudi v večji selektivnosti oziroma zanesljivosti dobljenih rezultatov. Po fragmentaciji prekurzorskega iona v različne produktne ione, izberemo ion z največjim odzivom za kvantitativno vrednotenje, druge produktne ione pa za kvalitativno vrednotenje. Razmerje med odzivov kvantifikacijskega in kvalifikacijskega iona nam namreč služi za dodatno potrditev identitete izbranega analita (slika 5) (64).



Slika 5: Shematski prikaz možnih načinov detekcije na QQQ, povzeto po (64)

Za razvoj zanesljive kvantitativne bioanalizne metode je ključnega pomena tudi izbira ustreznega *internega standarda (IS)*. Z uporabo primernega IS se izognemo napakam, katere so posledica izgube analitov med pripravo vzorca in nihanj v delovanju analiznega instrumenta. V ta namen dodamo vsakemu vzorcu pred začetkom analizne metode enako količino IS in ga tako izpostavimo vsem kritičnim točkam v procesu analize. Odziv analita nato izračunamo kot razmerje odziva analita in odziva IS. Pri metodah LC-MS/MS se v ta namen uporabljajo izotopsko označeni analogi osnovnih molekul (predvsem devterirani in označeni s ^{13}C), kateri imajo podobne fizikalno kemijske lastnosti in se med procesom analize obnašajo podobno kot preiskovani analit. Kromatografsko se zato IS običajno ne ločijo od osnovnih molekul, se pa ločijo pri masni detekciji zaradi razlik v molekulski masi (61).

2. NAMEN DELA

TPM je široko uporabljan AE druge generacije, kateri je indiciran tako samostojno kot tudi v dvojni oziroma politerapiji epileptičnih napadov. Zaradi metabolizma preko encimskega sistema CYP 450 vstopa v interakcije z nekaterimi zdravilnimi učinkovinami (tudi nekaterimi AE). Kljub velikemu številu raziskav in številnim analiznim metodam za merjenje koncentracij TPM v bioloških vzorcih, kvantitativna opredelitev njegovih metabolnih poti do danes še ni popolnoma razjasnjena. Razlog za to je predvsem v pomanjkanju dovolj občutljivih in polno validiranih analiznih metod za hkratno vrednotenje koncentracij TPM in njegovih glavnih metabolitov. Do danes sta bili v ta namen razviti le dve metodi (29,40), pri čemer so le z eno metodo (29) dosegli dovolj nizko LLOQ, katera je omogočala kvantitativno opredelitev metabolitov. Vendar pa je niso validirali. Prav tako pri nobeni od metod niso ovrednoti učinka matrice, zato je zanesljivost rezultatov teh analiz vprašljiva.

Namen našega dela bo razviti in validirati, predvsem dovolj občutljivo analizno metodo, katera bo omogočala merjenje koncentracij TPM in njegovih glavnih štirih metabolitov (2,3-desizopropiliden TPM, 4,5-desizopropiliden TPM, 9-hidroksi-TPM in 10-hidroksi-TPM) v plazemskih vzorcih.

Metodo bomo razvili na sistemu LC-MS/MS. Z uporabo standardov TPM in metabolitov bomo najprej optimizirali detekcijski del (MS/MS) in nato še kromatografskega (LC). Pripravo vzorca bomo optimizirali z uporabo obogatenih plazemskih vzorcev. Ta priprava bo temeljila na ekstrakciji tekoče tekoče (LLE), z naknadnim sušenjem pod tokom N_2 in raztapljanjem suhega ostanka v primernem topilu. Osredotočili se bomo na izbiro ustreznega ekstrakcijskega topila, razmerja med plazmo in topilom, primerne temperature za sušenje in ustreznega topila za raztapljanje suhega ostanka. Ustreznost razvite analizne metode bomo preverili z validacijo po FDA smernicah za bioanalizne metode (68) ter priporočilih Matuszevskega (69,70). Pri tem bomo vrednotili selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost, spodnjo mejo določitve, stabilnost, uspešnost ekstrakcije in učinek matrice. V zaključni stopnji laboratorijskega dela bomo validirano analizno metodo preizkusili z analizo realnih plazemskih vzorcev bolnikov na stalnem zdravljenju z različnimi dnevnimi odmerki TPM. Glavni cilj analize realnih vzorcev bo kvantitativno opredeliti vse štiri metabolite, saj bomo s tem dokazali, da smo razvili dovolj občutljivo analizno metodo, primerno za farmakokinetične študije metabolizma TPM.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Biološki Material

Plazma

Uporabljali smo človeško plazmo (antikoagulant EDTA), pridobljeno na Zavodu za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana. Imeli smo več različnih plazem, katere smo shranjevali v zamrzovalniku pri temperaturi -20 ˚C. Uporaba človeške plazme za razvoj analiznih metod je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št.77/1/07).

Priprava: Plazmo smo pustili odtajati na sobni temperaturi ali pa smo jo izjemoma odtalili v mlačni vodi. Odtaljeno plazmo smo nato dobro premešali, da smo tako zagotovili boljšo ponovljivost pipetiranja.

Realne plazemske vzorce bolnikov na stalnem zdravljenju s TPM smo uporabili za testiranje ustreznosti analizne metode. Pridobili smo jih iz klinične študije, katero je odobrila Komisija za Republike Slovenije za medicinsko etiko (št.25p/04/12). Vzorce smo do analize shranjevali v zamrzovalniku pri -80 ˚C in jih pred uporabo pustili na sobni temperaturi tako dolgo, da so se sami odtalili. Tudi te vzorce smo pred uporabo dobro premešali.

Uporabljene plazme:

Plazma 1: odvzem 7.1.2014 (št: 2237102)

Plazma 2: odvzem 19.9.2013 (št: 2164544)

Plazma 3: odvzem 19.9.2013 (št: 2164559)

Plazma 4: odvzem 19.9.2013 (št: 2205271)

Plazma 5: odvzem 6.5.2014 (št: 2298229)

Urin

Za izolacijo pravega metabolita M1 smo pridobili urin bolnika, ki je bil na stalnem zdravljenju s TPM. Za izvedbo izolacije smo imeli na razpolago 150 mL urina, katerega smo pridobili iz iste klinične študije kot realne plazemske vzorce. Urinski vzorec smo shranjevali v zamrzovalniku pri -80 ˚C in ga pred uporabo odtalili na sobni temperaturi ter dobro premešali. Zaradi motnosti vzorca smo le tega pred uporabo prefiltrirali čez filter papir z velikostjo por 0,45 µm.

3.1.2 Standardi

- *Topiramat (TPM)*: 2,3:4,5-bis-O-(1-metiletiliden)-ß-D-fruktopiranoza-1-sulfamat; MM = 339,4 g/mol (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg; Nemčija)
- *Topiramat-d_{12} (IS)*: 2,3:4,5-bis-O-(1-metiletiliden)-ß-D-fruktopiranoza-d12-1-sulfamat; MM = 351,44 g/mol (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg; Nemčija)
- *2,3-desizopropiliden topiramat (M1*a)*: 2,3-O-(1-metiletiliden)-ß-D-fruktopiranoza-1-sulfamat; MM = 299,30 g/mol (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg; Nemčija)
- *4,5-desizopropiliden topiramat (M2)*: 4,5-O-(1-metiletiliden)-ß-D-fruktopiranoza-1-sulfamat; MM = 299,30 g/mol (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg; Nemčija)
- *10-hidroksi-topiramat (M3)*: 2,3-O-(2-R-hidroksi-1-metiletiliden)-ß-D-fruktopiranoza-1-sulfamat; MM: 355,36 g/mol (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg; Nemčija)
- *9-hidroksi-topiramat (M4)*: 2,3-O-(2-S-hidroksi-1-metiletiliden)-ß-D-fruktopiranoza-1-sulfamat; MM: 355,36 g/mol (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg; Nemčija)
- *2,3-desizopropiliden topiramat (M1*b)*: 2,3-O-(1-metiletiliden)-ß-D-fruktopiranoza-1-sulfamat; MM = 299,30 g/mol (Carbosynth, Berkshire, UK)

3.1.3 Reagenti in topila

- *Ultračista voda – Mili-Q voda*, pridobljena z aparatom Mili-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
- *Metanol HPLC grade (≥ 99,9%)*- CH_3OH ChromasolV® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- *Metanol LC-MS grade (≥ 99,9%)*- CH_3OH ChromasolV® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)- za uporabo na sistemu LC-MS/MS
- *Acetonitril HPLC grade (≥ 99,9%)*- CH_3CN ChromasolV® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- *Acetonitril LC-MS grade (≥ 99,9%)*- CH_3CN ChromasolV® (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)- za uporabo na sistemu LC-MS/MS
- *Amonijev acetat* – NH_4CH_3COO (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- *Metanojska kislina* – HCOOH 98-100% Suprapur® (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- *Dietileter (DEE)* – $(CH_3CH_2)_2O$- Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur. (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

- *Etilacetat (EA)* – $CH_3COOC_2H_5$- Reag. Ph. Eur. (Panreac, Barcelona, Španija)
- *Diklorometan (DCM)* – CH_2Cl_2 Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur. (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- *Stisnjen dušik* – N_2 (Messer, Ruše, Slovenija)
- *Puferna raztopina za umeritev pH metra* – pH 4,00 Certipur® (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

3.1.4 Naprave in pribor

- *Avtomatske pipete:* 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- *Mešalnik Vibromix 10* (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- *Centrifuga – Centrifuge Eppendorf 5415®* (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- *Hladilnik 2-8 ºC* (LTH, Škofja Loka, Slovenija)
- *Zamrzovalnik* -20 ºC (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- *Zamrzovalnik* -80 ºC MDF – U50V (Sanyo Electric Bimedocal, Japonska)
- *Mikrocentrifugirke oz. plastične epruvete*: 1,5 mL in 2 mL (ISO LAB, Laborgeräte GmbH, Wertheim, Nemčija)
- *Tehtnica AG 245* (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica)
- *TurboVap® LV* (Caliper, Hopkinton, MA, ZDA)
- *Stekleni inventar:* merilne bučke, čaše, viale z inserti, zamaški
- *Ostali inventar:* spatule, nastavki za pipete, Parafilm®M, filtrirni papir (0,45 µm pore)
- *Ultrazvočni čistilnik Sonis 4* (Iskra, Šentjernej, Slovenija)
- *Filtrirni sistem Sartorius* s filtrirnim papirjem z velikostjo por 0,2 µm (Sartorius AG, Goettingen, Nemčija)
- *pH meter MP220 Basic* (Mettler-Toledo International Inc., Greifensee, Švica)
- *Liofilizator Christ beta 1-8 K (SciQuip Ltd., Newtown, Velika Britanija)*
- ***SPE sistem***
    - *Kadička*: Macherey-Nagel (Düren, Nemčija)
    - *Oljna vakumska črpalka*: Gast DOA-P504-BN (Gast, Michigan, ZDA)
    - *SPE kolone*: Strata-X 33 µm Polymeric Reversed Phase 120 mg/6 mL (Phenomenex, Torrance, California, ZDA)

- ***Analitski sistem LC-MS/MS:***
  - *Agilent 1290 Infinity UHPLC* (Agilent Technologies, Santa Clara, California, ZDA) vsebuje: razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV-VIS detektor (DAD *ang.Diode array detector*)
  - *Agilent 6460 Triple Quadropole LC-MS* (Agilent Technologies, Santa Clara, California, ZDA) z Jetstream® ESI ionskim izvorom
  - *Kolone*: KinetexC18 50×2,1 mm; 2,6µm (Phenomenex, Torrance, California, ZDA), Kinetex C18 100×3 mm; 2,6µm (Phenomenex, Torrance, California, ZDA)
  - *Predkolona*: Luna C18 4×2 mm; (Phenomenex, Torrance, California, ZDA)
  - *Programska oprema:* MassHunter Workstation software
- ***Analitski sistem HPLC:***
  - *Agilent 1100/1200 series HPLC* (Agilent Technologies, Santa Clara, California, ZDA) vsebuje razplinjevalec, kvarterno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV-VIS detektor in zbiralec frakcij
  - *Kolona*: Luna C18 50×4,6 mm, 3 µm (Phenomenex, Torrance, California, ZDA)
  - *Predkolona*: Luna C18 4×2 mm; (Phenomenex, Torrance, California, ZDA)
  - *Programska oprema*: ChemStation

3.2 METODE

3.2.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA

3.2.1.1 Priprava raztopin

Raztopine standardov TPM

Pripravili smo *osnovno raztopino* standarda TPM s koncentracijo 1 mg/mL. Na precizni tehtnici smo natehtali 1,28 mg TPM, ga kvantitativno prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko in raztopili v 1280 µL MeOH. Tako pripravljeno raztopino smo ovili s parafilmom in jo shranil zamrznjeno pri -20 ˚C.

Za pripravo standardne raztopine s koncentracijo 5 mg/L smo v 5 mL bučko odpipetirali 25 µL osnovne raztopine TPM jo razredčili z MeOH do oznake in dobro premešali. Bučko smo ovili s parafilmom in jo shranili v hladilniku pri temperaturi 4 ºC.

Raztopine standardov metabolitov (M1, M2, M3 in M4)*

Od dobavitelja smo kupili po 1 mg vsakega metabolita. V vsako vialo s posameznim metabolitom smo dodali po 1000 µL MeOH, mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix in tako dobili *osnovne raztopine* s koncentracijo 1 mg/mL. Te raztopine smo povili s parafilmom in jih shranili zamrznjene pri -20 ˚C.

Nato smo na enak način, kot je opisan pri pripravi standarda TPM, pripravili standardne raztopine metabolitov s koncentracijo 5 mg/L. Tudi te raztopine smo ves čas razvoja in optimizacije shranjevali v hladilniku pri 4 ºC.

Delovna raztopina za optimizacijo

Vsak dan razvoja in optimizacije analizne metode smo iz raztopin standardov TPM, M1*, M2, M3 in M4 s koncentracijo 5 mg/L pripravili delovno raztopino za obogatenje plazemskih vzorcev. V 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali po 300 µL posamezne standardne raztopine in mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix. V pripravljeni raztopini je bila koncentracija posameznih analitov 1 mg/L.

Obogateni plazemski vzorci (OPVr)

Odmrznjeno plazmo smo v 100 µL alikvotih prenesli v primerno označene 2 mL mikrocentrifugirke. Posameznim alikvotom smo dodali po 25 µL delovne raztopine in mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix. Koncentracija vseh analitov v plazemskih vzorcih je bila 0,2 mg/L.

Standard za vrednotenje uspešnosti priprave vzorca

Iz delovne raztopine smo vsak dan razvoja in optimizacije analizne metode pripravili standard s koncentracijo posameznih analitov 0,2 mg/L. V 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 200 µL delovne raztopine, dodali 800 µL MeOH in mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix.

2 mM amonijev acetat (pH ≈ 6,6)

Na precizni tehtnici smo zatehtali 77,2 mg standarda amonijevega acetata in ga kvantitativno prenesli v 500 mL bučko. Z mili Q vodo smo bučko dopolnili do oznake in dobro premešali, da se je amonijev acetat popolnoma raztopil. Vsebino bučke smo prefiltrirali skozi filter papir z velikostjo por 0,2 µm, jo prenesli v steklen vsebnik in jo razplinili z uporabo ultrazvočnega čistilnika Sonis.

10 mM amonijev acetat (pH ≈ 6,6 in PH=3,8)

Na precizni tehtnici smo zatehtali 772 mg standarda amonijevega acetata in ga kvantitativno prenesli v 1000 mL bučko. Z mili Q vodo smo bučko dopolnili do oznake in dobro premešali, da se je amonijev acetat popolnoma raztopil (pH je približno 6,6). Vsebino bučke smo nato razdelili na dva dela in enemu z uporabo mravljične kisline in predhodno umerjenega pH metra uravnali pH na 3,8. Obe raztopini smo prefiltrirali skozi filter papir z velikostjo por 0,2 µm, ju prenesli vsako v svoj steklen vsebnik in ju razplinili z uporabo ultrazvočnega čistilnika Sonis.

0,1% Mravljična kislina

V 500 mL stekleno posodo, katero smo predhodno sprali z mili Q vodo, smo odpipetirali 500 µL mravljične kisline. Posodo smo nato dopolnili do oznake z mili Q vodo in vse skupaj dobro premešali.

Raztopina za optimizacijo kromatografske ločbe

V 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali po 100 µL posameznih standardov TPM, M1*, M2, M3 in M4 s koncentracijo 5 mg/L. Dodali smo 500 µL MeOH in mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix. V pripravljeni raztopini je bila koncentracija posameznih analitov 0,5 mg/L.

Raztopina za manualno optimizacijo nastavitev masnega analizatorja

V 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali po 40 µL standardov M2 in M3 s koncentracijo 5 mg/L. Dodali smo 920 µL MeOH in mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix. V pripravljeni raztopini je bila koncentracija posameznih analitov 0,2 mg/L.

3.2.1.2 Razvoj LLE postopka

S postopnim spreminjanjem posameznih parametrov procesa priprave vzorca smo v postopku razvoja in optimizacije želeli čim bolj izboljšati učinkovitost in ponovljivost LLE, sušenja vzorca in raztapljanja suhega ostanka. Izhajali smo iz postopka priprave, kot ga je v svojem članku opisal Kamal M. Matar (35). Uporabljali smo plazemske vzorce OPVr (3.2.1.1, *Obogateni plazemski vzorci (OPVr)*). Parametri, katere smo spreminjali pri razvoju LLE postopka, so prikazani v preglednici III.

Preglednica III: Vrednoteni parametri pri razvoju LLE postopka.

KORAK	PARAMETER	VREDNOSTI PARAMETROV
Priprava OPVr	/	/
Dodatek organskega topila	Izbira topila	DEE, EA, DCM in kombinacije
	Razmerje topilo:plazma	1:2; 1:2,5; 1:4; 1:5; 1:8; 1:10; 1:12
Mešanje	Čas mešanja	30, 60, 120 (sekund)
Centrifugiranje	Čas centrifugiranja	5, 10, 15 (minut)
Sušenje	Temperatura sušenja	40, 45, 50, 60 (ºC)
Raztapljanje suhega ostanka	Topilo za raztapljanje	20,50,60,70,80,90,100 (%MeOH)
	Čas mešanja	15,30,60,90 (sekund)

3.2.1.3 Instrumentalna metoda

Analizo vzorcev smo izvajali s tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti, sklopljeno s tandemskim masnim spektrometrom vrste trojni kvadrupol (LC-MS/MS). Najprej smo razvili in optimizirali detekcijski del (MS/MS), nato je sledila optimizacija kromatografske ločbe (LC).

Metoda MS/MS

Za analizo in detekcijo analitov smo uporabili masni spektrometer Agilent 6460, s trojnim kvadrupolnim analizatorjem. Najprej smo z direktnim injiciranjem posameznih standardov analitov s koncentracijo 5 mg/L v MS/MS sistem, z uporabo softwarskega programa Optimizer in programske opreme MassHunter določili optimalne MRM prehode za posamezne analite, vrednost fragmentorja in kolizijsko energijo.

Z manualno optimizacijo smo po predhodnem razvoju kromatografske ločbe določili optimalne vrednosti ostalih parametrov masnega analizatorja (preglednica IV). Pri tem smo uporabljali raztopino s koncentracijo posameznih analitov 0,2 mg/L (3.2.1.1, *Raztopina za manualno optimizacijo nastavitev masnega analizatorja*)

Preglednica IV: Spreminjanje nastavitev masnega analizatorja.

PARAMETER	SPREMINJANJE VREDNOSTI
Napetost na kapilari (V)	2000,2500,3000,3500,4000,4500
Napetost na šobi (V)	0,500,1000,1500,2000
Pretok nebulizacijskega plina (psi)	15,20,23,25,27,30,35,38,45,60
Delta EMV (V)	0,100,200,300,400
Temperatura sušilnega plina (ºC)	240,260,280,300,310,320,340
Pretok sušilnega plina (L/min)	3,5,6,7,9
Temperatura plina v plašču (ºC)	260,280,300,320,330,340
Pretok plina v plašču (L/min)	8,10,11,12
Širina masne ločljivosti na 1. kvadrupolu	widest (2,5), wide (1,2), unit (0,7)
Širina masne ločljivosti na 3. kvadrupolu	widest (2,5), wide (1,2), unit (0,7)

Metoda LC

Kromatografska ločba je potekala na kromatografu Agilent 1290 Infinity UHPLC. Ločbo smo optimizirali z injiciranjem raztopine, s koncentracijo posameznih analitov 0,5 mg/L (3.2.1.1, *Raztopina za optimizacijo kromatografske ločbe*), v analitski sistem LC-MS/MS. V postopku razvoja in optimizacije smo izbrali ustrezno mobilno fazo in kromatografsko kolono ter razvili primerno metodo izpiranja kolone.

Izbira mobilne faze

Preučevali smo vpliv uporabe različnih MF na velikost odziva analitov in obliko kromatografskih vrhov. V ta namen smo preizkusili pet različnih MF:

- 2 mM amonijev acetat (pH ≈ 6,6)
- 10 mM amonijev acetat (pH = 3,8)
- 10 mM amonijev acetat (pH ≈ 6,6)
- mili Q voda
- 0,1% mravljična kislina.

In dva organska modifikatorja:

- AcN (LC-MS grade)
- MeOH (LC-MS grade).

Izbira kromatografske kolone

Z namenom optimizacije kromatografske ločbe analitov smo raziskovali vpliv izbire kolone na ločitev kromatografskih vrhov analitov (resolucijo) in trajanje analize. Preizkusili sedem različnih kromatografskih kolon:

- Kinetex 50×2,1 mm C18; 2,6µm (Phenomenex)
- Kinetex 100×3 mm C18; 2,6µm (Phenomenex)
- Kinetex XB-C18 100×2,1 mm ; 2,6µm (Phenomenex)
- Poroshell C18 100×3 mm; 2,7µm (Agilent)
- Synergi Polar RP 100×3 mm; 2,5µm (Phenomenex)
- Synergi Fusion RP 100×2 mm; 2,5µm (Phenomenex)
- Titan C18 100×2,1 mm; 2,1µm (Supelco)

Razvoj metode izpiranja kolone

Razvijali smo metodo gradientnega izpiranja vzorca iz kolone, kar pomeni, da smo v različnih časovnih točkah spreminjali sestavo mobilne faze. Razvoj bistvenih metod je prikazan v preglednicah V in VI.

a) *Razvoj z vključenim M1* (Kolona: Kinetex C18 100×3 mm; 2,6µm)*

Mobilna faza A: mili Q voda

Mobilna faza B: MeOH

Pogoji: V_{inj}=1 µL; $T_{termostat\ za\ vzorce}$=10 ˚C; T_{kolone}=50 ˚C; pretok=0,50 mL/min

Preglednica V: Razvoj metode izpiranja kolone (vključen M1*)

ZAP. ŠT.	GRADIENTNI PROGRAM (%B)
m*1	0-2 min 2% B; 6min 50% B
m*2	0-2min 10% B; 6 min 50% B
m*3	0min 2% B; 1,9min 10% B; 6min 50% B
m*4	0min 2% B; 1-2min 10% B; 6min 50% B
m*5	0min 2% B; 1-2min 5% B; 6min 50% B
m*6	0-2min 5% B; 6min 95% B
m*7	0-1min 5% B; 5min95% B; 6min 5% B
m*8	0min 5% B; 5,9min 40% B; 6min 95% B
m*9	0min 5% B; 4min 20% B; 6min 95% B
m*10	0min 2% B; 4min 15% B; 6min 95% B
m*11	0min 2% B; 4min 10% B; 6min 95% B
m*12	0min 2% B; 6min 14% B; 7min 40% B; 10min 95% B
m*13	0min 2% B; 8min 10% B; 12min 95% B

b) *Razvoj z vključenim M1 (Kinetex C18 50×2,1mm; 2,6µm)*

Mobilna faza A: mili Q voda

Mobilna faza B: MeOH

Pogoji: V_{inj}=1 µL; $T_{termostat\ za\ vzorce}$=10 ˚C; T_{kolone}=50 ˚C; pretok=0,50 mL/min

Preglednica VI: Razvoj metode izpiranja kolone (vključen M1)

ZAP. ŠT.	GRADIENTNI PROGRAM (%B)
m1	0min 2%B; 4min 6%B; 6min 90%B
m2	0min 2%B; 5min 6%B; 7min 20%B; 9min 95%B
m3	0min 2%B; 2min 3%B; 6min 95%B
m4	0-2min 2%B; 6min 95%B
m5	0-2min 2%B; 2,5min10%B; 5min 95%B
m6	0-2min 2%B; 3min 20%B; 5min 95%B
m7	0-2min 2%B; 2,5min 20%B; 5min 80%B
m8	0-2min 2%B; 2,5min 30%B; 6min 60%B
m9	0-2min 2%B; 2,5min 30%B; 6min 90%B
m10	0-2min 2%B; 2,5min 30%B; 6min 40%B
m11	0-2min 2%B; 2,5min 25%B; 6min 40%B
m12	0-2min 2%B; 2,1min 20%B; 5,5min 40%B
m13	0-2min 2%B; 2,1min 20%B; 3,5min 25%B; 5min 50%B
m14	0-2min 2%B; 2,1min 20%B; 3,5min 25%B; 5min 90%B
m15	0-2min 2%B; 2,1min 20%B; 35min 25%B; 4,5min 90%B

3.2.2 PRIPRAVA STANDARDA METABOLITA M1

Standard metabolita M1 smo pridobili iz urina bolnika kateri je bil na stalnem zdravljenju s TPM. Uporabili smo 150 mL urinskega vzorca. Postopek je potekal v treh stopnjah. Najprej smo se lotili čiščenja in koncentriranja vzorca, čemur je sledila izolacija M1 frakcije. Tretjo stopnjo je predstavljala karakterizacija izolata, kjer smo z analizo pripravljenega standarda na sistemu LC-MS/MS potrdili njegovo čistost.

3.2.2.1 Čiščenje vzorca

Čiščenje in koncentriranje urinskega vzorca smo izvedli z uporabo metode SPE. Za 150 mL urinskega vzorca smo uporabili dve SPE koloni Strata-X. Podroben opis SPE postopka je prikazan v preglednici VII.

Preglednica VII: Postopek čiščenja in koncentriranja urinskega vzorca na SPE.

KORAK	PODROBNOSTI
Priprava urinskega vzorca	Filtriranje (0,45 µm pore filtra)
Kondicioniranje	10 mL MeOH
Ekvilibracija	10 mL mili Q vode
Nanos vzorca	75 mL na posamezno SPE kolono
Spiranje kolone	3 mL mili Q vode
Sušenje	5 min pri podtlaku 10 mm Hg
Elucija	4×750 µL AcN:MeOH (1:1)

Po nanosu vzorca na kolono smo odpad zbirali v čašo. Slednjega smo nato še 2-krat čistili po enakem postopku z uporabo novih SPE kolon. Eluate smo zbirali v posamezne 2 mL mikrocentrifugirke in jih v naslednjem koraku posušili do suhega pod tokom N_2 pri temperaturi 45 ºC. V posamezno mikrocentrifugirko smo dodali 1500 µL 20% raztopine MeOH v vodi in mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix, da se je suhi ostanek popolnoma raztopil. Vsebino posamezne mikrocentrifugirke smo kvantitativno prenesli v 2 mL viale in nadaljevali z izolacijo M1 frakcije.

3.2.2.2 Izolacija M1 frakcije

Za izolacijo M1 metabolita smo uporabili instrument Agilent 1100/1200 series HPLC, ki vključuje zbiralec frakcij. Uporabljali smo kolono Luna 50×4,6mm; 3 µm. MF je predstavljala mili Q voda (MF A), kateri smo kot organski modifikator dodali MeOH (MF B). Razvili smo metodo gradientnega izpiranja vzorca na koloni (preglednica VIII) in nastavili avtomatsko zbiranje frakcij v časovnem intervalu 2,2 -3,1 min.

Pogoji: V_{inj}= 200 µL; T_{kolone}=50 ˚C; valovna dolžina detekcije= 210 nm

Preglednica VIII: Metoda gradientnega izpiranja kolone pri izolaciji M1

ČAS (min)	DELEŽ MF B (%)	Pretok MF (mL/min)
0	10	0,8
3	10	0,8
3,5	50	0,8
4	70	0,8
4,01	70	2
4,5	90	2
6	90	2
6,1	10	2
8,1	10	0,8

3.2.2.3 Karakterizacija M1

Zbrane izolate smo v naslednjem koraku sušili do suhega ostanka na liofilizatorju pri sobni temperaturi in tlaku 0,090 mbar. Nato smo na precizni tehtnici zatehtali 1 mg suhega ostanka, ga kvantitativno prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko, dodali 1000 µL MeOH in mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix. Tako smo dobili osnovno raztopino metabolita M1 s koncentracijo 1 mg/mL.

S postopkom redčenja z MeOH smo iz osnovne raztopine pripravili raztopino s koncentracijo 2,5 mg/L. To raztopino smo uporabili za analizo čistosti dobljenega standarda na instrumentu LC-MS/MS, po metodi opisani v poglavju 3.2.3.3.

Za pripravo standardne raztopine s koncentracijo 5 mg/L smo v 5 mL bučko odpipetirali 25 µL osnovne raztopine M1, jo razredčili z MeOH do oznake in dobro premešali. Bučko smo ovili s parafilmom in jo shranili v hladilniku pri temperaturi 4 ºC. Standardno raztopino M1 smo nato uporabili za pripravo delovne raztopine za optimizacijo in raztopine za optimizacijo kromatografske ločbe (3.2.1.1, *Delovna raztopina za optimizacijo; Raztopina za optimizacijo kromatografske ločbe*). Pri tem smo namesto M1* raztopine uporabili standardno raztopino M1.

3.2.3 VALIDACIJA

3.2.3.1 Priprava raztopin in topil

Osnovna raztopina internega standarda

Pripravili smo *osnovno raztopino* IS (topiramat-d_{12}) s koncentracijo 25 mg/L po naslednjem postopku. Najprej smo v vialo z 2,5 mg IS odpipetirali 2,5 mL MeOH in mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix, ter tako dobili raztopino s koncentracijo 1 mg/mL. Nato smo 125 µL te raztopine prenesli v 5 mL bučko, z enakim topilom dopolnili

do oznake in dobro premešali. Bučko smo povili s parafilmom in jo ves čas validacije shranjevali v hladilniku na temperaturi 4 ºC.

Iz osnovne raztopine IS smo nato pripravili še raztopino s koncentracijo IS 2,5 mg/L (IS 2,5). V 5 mL bučko smo odpipetirali 500 µL IS 25 in dopolnili do oznake z MeOH. Raztopino IS 2,5 smo kasneje uporabili pri pripravi vzorcev za vrednotenje relativnega učinka matrice.

Raztopina internega standarda za redčenje (ISr)

Pripravili smo raztopino IS s koncentracijo 1 mg/L. Izhajali smo iz osnovne raztopine IS. V 25 mL bučko smo odpipetirali 1 mL osnovne raztopine IS (25 mg/L), dopolnili z MeOH do oznake in dobro premešali. Bučko smo povili s parafilmom in jo ves čas validacije shranjevali v hladilniku pri temperaturi 4 ºC. Tako pripravljeno raztopino smo uporabljali za redčenje delovnih raztopin.

Raztopine standardov M1, M2, M3 in M4

Pripravili smo raztopine posameznih standardov metabolitov s koncentracijo 25 mg/L po naslednjem postopku. Izhajali smo iz osnovnih raztopin standardov metabolitov M2, M3 in M4 s koncentracijo 1 mg/mL (3.2.1.1, *Raztopine standardov metabolitov (M1*, M2, M3 in M4*)). Za metabolit M1 pa smo uporabili osnovno raztopino s koncentracijo 1 mg/mL pridobljeno iz urinskega vzorca (3.2.2.3). V primerno označene 5 mL bučke smo, v vsako posebaj, odpipetirali po 125 µL posamezne osnovne raztopine, dopolnili z MeOH do oznake in dobro premešali. Bučke smo povili s parafilmom in jih ves čas validacije shranjevali v hladilniku na temperaturi 4 ºC. Te raztopine smo nato uporabili za pripravo delovni raztopin z najvišjo koncentracijo (DR1 in DR-Qcs).

Delovne raztopine za pripravo umeritvene premice (DR)

Z namenom izdelave umeritvene premice smo prvi dan validacije pripravili delovne raztopine osmih različnih koncentracij. Izhajali smo iz osnovne raztopine TPM (1 mg/mL, 3.2.1.1, *Raztopine standardov TPM*), raztopin standardov metabolitov (25 mg/L) in osnovne raztopine IS (25 mg/L). Najprej smo pripravili raztopino z najvišjo koncentracijo analitov. V dve 2 mL mikrocentrifugirki smo, v vsako posebej, odpipetirali po 200 µL osnovne raztopine TPM, 80 µL standardov M2, M3, M4, 80 µL osnovne raztopine IS, 800 µL standarda M1, in 680 µL MeOH, ter mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix (DR1, DR-Qcs). Vse naslednje raztopine smo pripravili s postopnim redčenjem z raztopino ISr. S takšnim postopkom priprave smo v vseh DR vzorcih imeli koncentracijo IS 1 mg/L.

Koncentracije analitov v posameznih DR in njihov postopek priprave prikazuje preglednica IX.

Preglednica IX: Delovne raztopine za pripravo umeritvene premice.

VZOREC	TPM (mg/L)	M1 (mg/L)	M2,M3,M4 (mg/L)	PRIPRAVA
DR1	100	10,0	1,00	/
DR2	50,0	5,00	0,500	1000 µL DR1 + 1000 µL ISr
DR3	37,5	3,75	0,375	1200 µL DR2 + 400 µL ISr
DR4	30,0	3,00	0,300	1000 µL DR3 + 250 µL ISr
DR5	10,0	1,00	0,100	500 µL DR4 + 1000 µL ISr
DR6	5,00	0,500	0,050	750 µL DR5 + 750 µL ISr
DR7	3,00	0,300	0,030	750 µL DR6 + 500 µL ISr
DR8	0,500	0,050	0,005	250 µL DR7 +1250 µL ISr

Delovne raztopine za pripravo kontrolnih vzorcev (DR-Qc)

Pripravili smo tri delovne raztopine za pripravo kontrolnih plazemskih vzorcev pri nizki (DR-Qcl), srednji (DR-Qcm) in visoki (DR-Qch) koncentraciji. Izhajali smo iz raztopine DR-Qcs, katere priprava je opisana v prejšnjem poglavju in s postopki redčenja z raztopino ISr dobili raztopine želenih koncentracij (preglednica X).

Preglednica X: Delovne raztopine za pripravo kontrolnih vzorcev.

VZOREC	TPM (mg/L)	M1 (mg/L)	M2,M3,M4 (mg/L)	PRIPRAVA
DR-Qcs	100	10,0	1,00	/
DR-Qch	75,0	7,50	0,750	1500 µL DR-Qcs + 500 µL ISr
DR-Qcm	15,0	1,50	0,150	300 µL Qch + 1200 µL ISr
DR-Qcl	1,50	0,150	0,015	200 µL Qcm + 1800 µL ISr

Obogateni plazemski vzorci (OPVv)

Z uporabo DR oziroma DR-Qc smo pripravili obogatene plazemske vzorce (npr. DR1 smo uporabili za pripravo PL1). V primerno označene 2 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali 100 µL plazme in 25 µL ustreznega DR oz. DR-Qc, ter vse skupaj mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix. Koncentracije analitov v plazemskih vzorcih so prikazane v preglednici XI. Te vzorce smo uporabili za vrednotenje analizne metode. Vzorec slepe plazme (PL-SL) smo pripravili po enakem postopku le, da smo namesto DR v plazmo dodali 25 µL MeOH. V vseh plazemskih vzorcih je bila koncentracija IS 0,2 mg/L.

Preglednica XI: Obogateni plazemski vzorci za validacijo.

VZOREC	TPM (mg/L)	M1 (mg/L)	M2,M3,M4 (mg/L)
PL1	20	2,0	0,200
PL2	10	1,0	0,100
PL3	7,5	0,75	0,075
PL4	6,0	0,60	0,060
PL5	2,0	0,20	0,020
PL6	1,0	0,10	0,010
PL7	0,60	0,06	0,006
PL8	0,10	0,01	0,001
PL-Qch	15	1,5	0,150
PL-Qcm	3,0	0,30	0,030
PL-Qcl	0,30	0,03	0,003

Raztopine za poznejše obogatenje

Pripravili smo raztopine s koncentracijami analitov, ki so enake končnim koncentracijam v pripravljenih plazemskih vzorcih (PL-Qcl, PL-Qcm, PL-Qch). V ustrezno označene 2 mL mikrocentrifugirke smo, v vsako posebej, odpipetirali po 150 µL posamezne DR-Qc in 600 µL MeOH, ter vse skupaj mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix. Te raztopine smo uporabili za vrednotenje izkoristka ekstrakcije in absolutnega učinka matrice.

Raztopine za vrednotenje relativnega učinka matrice

Iz osnovnih raztopin TPM in metabolitov (M1, M2, M3, M4) s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili delovno raztopino s koncentracijo 6,25 mg/L. V 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali po 12,5 µL posamezne osnovne raztopine in 1937,5 µL MeOH ter vse skupaj dobro premešali. S postopki redčenja z MeOH smo nato v primerno označenih mikrocentrifugirkah pripravili raztopine šestih različnih koncentracij (Preglednica XII). Vsaki raztopini smo v naslednjem koraku dodali raztopino IS 2,5 v volumskem razmerju 1:4 in tako dobili delovne raztopine za analizo relativnega učinka matrice (DR-m). Z uporabo DR-m smo nato pripravili obogatene plazemske vzorce za vrednotenje relativnega učinka matrice. V primerno označene 2 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali 100 µL plazme in ji dodali 25 µL DR-m, ter mešali 30 sekund. Koncentracija IS je bila v vseh plazemskih vzorcih 0,1 mg/L.

Preglednica XII: Koncentracije analitov v raztopinah za vrednotenje relativnega učinka matrice.

KONCENTRACIJA PRED DODATKOM IS (mg/L)	KONCENTRACIJA PO DODATKU IS (mg/L)	KONCENTRACIJA V PLAZEMSKIH VZORCIH(mg/L)
6,2500	5,00	1,00
3,1250	2,50	0,500
0,6250	0,500	0,100
0,31250	0,250	0,050
0,06250	0,050	0,010
0,03125	0,025	0,005

3.2.3.2 Priprava vzorcev

Za pripravo vzorcev smo uporabljali metodo LLE z naknadnim sušenjem s sistemom TurboVap® LV in raztapljanjem suhega ostanka v primernem topilu. Podroben postopek priprave vzorca prikazuje preglednica XIII.

Preglednica XIII: Postopek priprave plazemskih vzorcev.

KORAK	PODROBNOSTI
Priprava OPVv	100 µL plazme + 25 µL DR in mešanje 30s (Vibromix)
Dodatek organskega topila	1500 µL EA:DEE (95:5 v/v)
Mešanje	30s, pri polni hitrosti (Vibromix)
Centrifugiranje	5 minut pri hitrosti 12000× g in temperaturi 21 ºC
Ločitev organske faze	1350 µL zgornje faze prenesemo v 2 mL mikrocentifugirko
Sušenje	Prepihovanje z N_2 pri 45 ºC
Raztapljanje suhega ostanka	125 µL MeOH in mešanje 15 s (Vibromix)

3.2.3.3 Instrumentalna metoda

Metoda LC

Kromatografsko ločbo smo izvedli na kromatografu Agilent 1290 Infinity UHPLC. Ustrezno ločbo analitov smo dosegli z uporabo kolone Kinetex C18, 50×2,1mm, 2,6µm. Pogoji kromatografske ločbe so prikazani v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Pogoji kromatografske ločbe analitov.

PARAMETER	PODROBNOSTI
Volumen injiciranja	0,5 µL
Temperatura vzorčevalnika	10 ˚C
Mobilna faza A	Mili Q voda
Mobilna faza B	MeOH
Pretok mobilne faze	0,5 mL/min
Temperatura kolone	50 ˚C

Mobilno fazo smo prečrpavali na kolono iz dveh rezervoarjev v sistemu binarnih črpalk. Za izvajanje analize smo uporabili metodo gradientnega izpiranja kolone, katero prikazuje preglednica XV.

Preglednica XV: Metoda gradientnega izpiranja kolone.

ČASOVNI INTERVAL (min)	DELEŽ MF B (%)
0	2
2	2
2,1	20
3,5	25
4,5	90
4,6	2
5,5	2

Retencijski časi analitov so bili: 1,210 min (M1), 1,722 min (M2), 3,051 min (M3), 3,618 min (M4) in 4,207 min (TPM). Čas celotne analize je znašal 5,5 minute.

Metoda MS/MS

Uporabljali smo masni analizator Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim analizatorjem. V masni analizator smo vodili frakcijo med 0,9 in 4,6 minute, ostalo pa v odpad. Nastavitve masnega analizatorja so podane v preglednici XVI.

Preglednica XVI: Nastavitve masnega analizatorja

Vir ionizacije	Negativna ionizacija (ESI-)
Sušilni plin	320˚C; 6 L/min
Jetstream plin	320˚C; 11 L/min
Nebulizacijski plin	30 psi
Delta EMV	200 V
Napetost na šobi	2000 V
Napetost na kapilari	2500 V
Širina masne ločljivosti	2,5 (M1, M2, M3, M4); 0,7 (TPM)
Razdelilni čas	50 ms
TPM•	338,1-77,8; CE: 29eV; FR: 134V 338,1-95,8; CE: 17eV; FR: 134V
M1*•	298,1-77,8; CE: 37eV; FR: 144V 298,1-95,8; CE: 13eV; FR: 144V
M2•	298,1-77,8; CE: 21eV; FR: 134V 298,1-95,8; CE: 21eV; FR: 134V
M3•	354,1-77,8; CE: 37eV; FR: 164V 354,1-95,8; CE: 13eV; FR: 164V
M4•	354,1-77,8; CE: 29eV; FR: 154V 354,1-95,8; CE: 21eV; FR: 154V
TPM-d_{12} (IS)•	338,1-77,8 ; CE: 29eV; FR: 134V

•MRM prehodi, kolizijska energija (CE), fragmentor (FR)
••podčrtane vrednosti predstavljajo MRM prehode za kvantitativno vrednotenje

3.2.3.4 Vrednotenje metode

V sklopu vrednotenja analizne metode smo kot osnovo uporabili smernice Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA) za bioanalizne metode (68). Pri tem smo vrednotili selektivnost, linearnost, točnost, stabilnost, ponovljivost in mejo določitve. Absolutni in relativni učinek matrice ter učinkovitost ekstrakcije smo ugotavljali po priporočilih Matuszewskega (69,70).

Vsak dan validacije smo najprej pomerili vzorce slepe plazme in nato vzorce naraščajočih koncentracij. Vsak vzorec smo injicirali 3-krat in pri vrednotenju naštetih validacijskih parametrov (razen učinkovitosti ekstrakcije) kot odziv analitov upoštevali razmerje odziva posameznega analita (površina pod kromatografskim vrhom) in odziva IS (površina pod kromatografskim vrhom) (*enačba 1*).

$$Odziv = \frac{odziv\ analita}{odziv\ IS} \qquad \textit{(enačba 1)}$$

Selektivnost

Selektivnost smo dokazali z analizo ekstrahiranih vzorcev slepe plazme (PL-SL), plazme obogatene raztopino ISr (PL-IS) in kontrolnega plazemskega vzorca PL-Qcl. Pri analizi vzorca PL-SL v kromatogramu opazujemo pojavnost morebitnih interferenc endogenih komponent vzorca pri retencijskih časih preiskovanih analitov. Pri analizi vzorca PL-IS smo opazovali morebitno pojavnost odziva pri MRM prehodih za TPM. Analiza PL-Qcl vzorca pa nam je služila za ugotavljanje selektivnosti ločevanja metabolitov, saj sta med analiti po dva para izomerov z identičnimi MRM prehodi (preglednica XVI).

Linearnost

Linearnost smo opredelili s pomočjo statistične obdelave odzivov analitov v OPVv vzorcih. Z metodo linearne regresije smo določili umeritveno premico (UP) za posamezen analit z naslednjo enačbo:

$$y = kx + n \qquad \textit{(enačba 2)}$$

Pri tem predstavlja *y* odziv analita (*enačba 1*), *x* koncentracijo analita v posameznem vzorcu, *k* naklon premice in *n* odsek na ordinatni osi. Korelacijo med koncentracijo v vzorcu in odzivom smo ovrednotili z determinacijskim koeficientom (R^2). Za mejo, ki še zagotavlja ustrezno linearnost, smo izbrali vrednost $R^2 \geq 0{,}99$. Za vrednotenje linearnosti smo uporabili osem obogatenih plazemskih vzorcev (PL1-PL8, 3.2.3.1 *Obogateni plazemski vzorci*). Iz pridobljenih rezultatov smo s pomočjo reševalca v programu Exel izračunali naklon in odsek UP, ter koeficient R^2.

Točnost

Točnost metode smo vrednotili s pomočjo kontrolnih plazemskih vzorcev (PL-Qc) na treh različnih koncentracijskih nivojih, ki pokrivajo celotno območje metode za posamezen analit (preglednica XI). Točnost znotraj prvega dneva smo ugotavljali na petih paralelkah. Drugi in tretji dan validacije pa smo točnost ugotavljali v treh paralelkah. Izračunali smo jo z uporabo naslednje enačbe:

$$Točnost(\%) = \left(\frac{ci}{ct}\right) * 100 \qquad \textit{(enačba 3)}$$

Pri tem je C_t dejanska koncentracija analitov v vzorcu, C_i pa predstavlja izračunano koncentracijo iz UP. Kot kriterij pri vrednotenju točnosti na ekstrahiranih plazemskih vzorcih smernice podajajo vrednost 100±15%.

Ponovljivost

Ponovljivost metode znotraj enega dne in med tremi dnevi smo vrednotili z uporabo istih vzorcev kot smo jih uporabljali za preverjanje točnosti. Ponovljivost znotraj prvega dneva smo ugotavljali na petih paralelkah, medtem ko smo drugi in tretji dan validacije ponovljivost ugotavljali v treh paralelkah. Ponovljivost injiciranja smo vrednotili z 6-kratnim injiciranjem samo enega vzorca na posameznem koncentracijskem nivoju. Rezultate ponovljivosti smo podali v obliki relativnga standardnega odklona (RSD). Kot kriterij sprejemljivosti ponovljivosti injiciranja smo postavili vrednost RSD ≤ 5%, za ponovljivost analizne metode pa RSD ≤ 15%.

Spodnja meja določitve (LLOQ)

Za LLOQ FDA smernice predpisujejo zahteve za točnost med 80 in 120%, ter ponovljivost z RSD manjšim od 20%. V namen ugotavljanja LLOQ smo pripravili pet paralelk vzorca PL8 (preglednica XI) in na podlagi dobljenih rezultatov iz UP ovrednotili točnost in ponovljivost za posamezen analit.

Stabilnost

V procesu validacije smo ugotavljali stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev (PL-Qc). Za vrednotenje posamezne oblike stabilnosti smo pripravili po tri paralele vzorcev na vsakem koncentracijskem nivoju (3.2.3.1, *Obogateni plazemski vzorci(OPVv)*). Stabilnost smo vrednotili z razmerjem med izmerjeno koncentracijo analitov v vzorcu izpostavljenemu določenemu pogoju glede na izmerjeno koncentracijo analitov v nominalnih vzorcih PL-Qc izraženo v odstotkih. Kot mejo spremenljivosti smo določili

odstopanje manj kot 15%. Kot kriterij ustreznosti postoperativne stabilnosti pa smo si zadali vrednost manj kot 5%.

a) Stabilnost pri sobni temperaturi

Pri analizi »bench-top« stabilnosti smo obogatene plazemske vzorce pustili pri sobni temperaturi (25˚C) 24 h. Nato smo vzorce ekstrahirali in jih analizirali.

b) Stabilnost med zamrzovanjem in odtajanjem

Prvi dan validacije smo obogatene plazemske vzorce za 24 h postavili v zamrzovalnik na -80˚C. Naslednji dan smo vzorce vzeli ven in jih pustili na sobni temperaturi toliko časa, da so se popolnoma odtalili. Po treh takšnih ciklih zamrzovanja in odtajanja smo zadnji dan validacije vzorce ekstrahirali in jih analizirali.

c) Dolgoročna stabilnost

Obogatene plazemske vzorce smo za pet mesecev shranili v zamrzovalniku pri -80 ˚C. Vzorce smo nato odtalili na sobni temperaturi, jih ekstrahirali in analizirali.

d) Postoperativna stabilnost

Ugotavljali smo tudi stabilnost ekstrahiranih in raztopljenih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku pri temperaturi 10 ˚C. Pripravljene vzorce smo takoj analizirali, jih nato pustili v avtomatskem vzorčevalniku in ponovno analizirali po 24 h.

Učinkovitost ekstrakcije

Uspešnost ekstrakcije smo vrednotili po priporočilih Matuszewskega (69). Računali smo razmerje odzivov ekstrahiranega PL-Qc vzorca, raztopljenega v 125 µL MeOH in ekstrahiranega vzorca slepe plazme (PL-SL), katerega smo raztopili v 125 µL raztopine za poznejše obogatenje enake koncentracije (3.2.1.1, Raztopine za poznejše obogatenje) *(enačba 4)*. Na vsakem koncentracijskem nivoju smo analizirali tri paralele vzorcev in učinkovitost ekstrakcije podali kot povprečje izračunanih izkoristkov. Kot odziv v tem primeru nismo upoštevali razmerja odzivov analita in IS, temveč samo odziv analita.

$$\% \, Re = \frac{odziv(ekstrahirani\ PL{-}Qc)}{odziv(naknadno\ obogatena\ ekstrahirana\ slepa\ plazma)} * 100 \quad \textit{(enačba 4)}$$

Priporočila ne zahtevajo nujno 100% izkoristka, vendar pa morajo biti rezultati konsistentni, natančni in ponovljivi. Kot kriterij smo si zadali vrednost izkoristka ekstrakcije nad 70%, glede ponovljivosti pa smo postavili mejo RSD < 15%.

Učinek matrice

V sklopu validacije analizne metode smo ugotavljali učinek matrice (UM) po priporočilih Matuszewskega (69,70). Raziskovali smo tako absolutni kot tudi relativni UM.

a) Absolutni učinek matrice (UMa):

Absolutni učinek matrice smo vrednotili s primerjavo odziva ekstrahiranega vzorca slepe plazme (PL-SL), katerega smo raztopili v 125 µL raztopine za poznejše obogatenje (3.2.1.1, Raztopine za poznejše obogatenje) z odzivom enake raztopine za poznejše obogatenje, direktno injicirane v LC-MS/MS sistem *(enačba 5)*.

$$UMa\% = \frac{odziv(naknadno\ obogatena\ ekstrahirana\ slepa\ plazma)}{odziv(raztopina\ za\ obogatenje)} \qquad \textit{(enačba 5)}$$

b) Relativni učinek matrice (UMr):

V namen vrednotenja relativnega učinka matrice smo uporabili pet različnih plazem (3.1.1**,** *Plazma***)**. Za obogatitev posameznih plazem smo uporabljali delovne raztopine šestih različnih koncentracij (3.2.3.1, *Raztopine za vrednotenje relativnega učinka matrice*). Pri vsaki koncentracijski točki smo za vsako plazmo pripravili in analizirali dve paraleli, ter povprečje uporabili za izdelavo posameznih UP. Odsotnost relativnega učinka matrice dokažemo, če so nakloni UP pri uporabi različnih plazem praktično enaki (RSD naklonov ne sme biti večji od 3-4%) (70).

3.2.4 ANALIZA REALNIH PLAZEMSKIH VZORCEV

Po uspešni validaciji smo preveriti ustreznost razvite metode na realnih vzorcih šestih bolnikov na stalnem zdravljenju s TPM. K 100 µL posameznega plazemskega vzorca smo dodali 25 µL raztopine ISr in mešali 30 sekund na mešalniku Vibromix. Vzorce smo nato pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.3.2 in jih analizirali po postopku opisanem v poglavju 3.2.3.3. Koncentracije posameznih analitov smo izračunali iz enačb UP.

.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Namen magistrske naloge je bil razviti, optimizirati in validirati analizno metodo, ki bo omogočala rutinsko spremljanje koncentracij TPM in njegovih štirih do sedaj poznanih metabolitov v plazmi bolnikov. Pri našem delu smo se odločili, da razvijemo metodo na osnovi tekočinske kromatografije ultra visoke ločljivosti sklopljene s tandemskim masnim spektrometrom (LC-MS/MS). Postopek razvoja instrumentalnega dela metode je temeljil na ustaljeni praksi, pri čemer smo najprej optimizirali detekcijski del metode (MS/MS), nato je sledil razvoj in optimizacija kromatografske ločbe (LC). Po razvoju instrumentalnega dela metode je sledila optimizacija priprave vzorca. Z uporabo obogatenih plazemskih vzorcev smo s postopnim spreminjanjem parametrov postopka LLE, sušenja vzorca in raztapljanja suhega ostanka želeli čim bolj izboljšati izkoristek in ponovljivost postopka priprave vzorca. Tako razvito metodo smo nato pred validacijo preizkusili na treh realnih plazemskih vzorcih, kjer pa smo naleteli na težavo. Izkazalo se je, da od dobavitelja (Santa Cruz Biotechnology) nismo dobili enakega standarda metabolita M1, kot se pojavlja v realnih vzorcih. Isti standard metabolita smo zato nabavili še od podjetja CarboSynth, a vendar se je izkazalo, da smo dobili enako spojino kot od podjetja Santa Cruz Biotechnology. Posledično smo prišli do zaključka, da je edina sprejemljiva pot do dejanskega metabolita, njegova izolacija iz biološkega vzorca. Po uspešni pridobitvi standarda M1 smo zaradi drugačnih fizikalno–kemijskih lastnosti tega metabolita ponovno prilagodili kromatografske pogoje. Preverili smo tudi vpliv posameznih parametrov priprave vzorca na izkoristek ekstrakcije izoliranega M1. V ta namen smo ponovili optimizacijo za parametre, kateri so se predhodno v razvoju izkazali za najbolj ključne oziroma z največjim vplivom na izkoristek in ponovljivost priprave vzorca (izbira ekstrakcijskega topila in razmerje plazma:topilo). Sledila je validacija metode po smernicah Ameriške agencije za prehrano in zdravila (FDA) za bioanalizne metode (68), kjer smo preverjali selektivnost, linearnost, ponovljivost, točnost, LLOQ in stabilnost. Po priporočilih Matuszewskega (69,70) smo preverili tudi prisotnost relativnega in absolutnega učinka matrice ter učinkovitost ekstrakcije. Po uspešno zaključeni validaciji smo primernost razvite analizne metode preverili še z analizo šestih plazemskih vzorcev bolnikov na stalnem zdravljenju s TPM.

Zaradi lažjega razumevanja besedila bomo v nadaljevanju za izoliran metabolit uporabljali oznako M1, medtem ko bo dobavljen označen z M1*.

4.1 PRIPRAVA STANDARDA METABOLITA M1

Pred začetkom pridobivanja pravega standarda M1 smo morali najprej izbrati primeren biološki vzorec, kateri bi omogočil izolacijo zadostne količine metabolita. Na voljo smo imeli realni plazemski in urinski vzorec istega bolnika na stalnem zdravljenju s 450 mg TPM dnevno (RV 5, preglednica XXVII). Po LC-MS/MS analizi obeh bioloških vzorcev bolnika smo ugotovili, da so bili odzivi metabolita v urinskem vzorcu približno 20-krat višji kot v plazemskem vzorcu. Dodaten razlog pri izbiri urinskega vzorca je bila tudi količina, ki smo jo imeli na razpolago. Imeli smo namreč 150 mL urinskega in le 1,5 mL plazemskega vzorca. Posledično smo se odločili, da standard M1 raje pripravimo iz urinskega vzorca.

Postopek izolacije smo izvedli v več korakih. Najprej smo s SPE metodo urinski vzorec očistili, nato smo s pomočjo kromatografske ločbe na instrumentu Agilent 1100/1200 series HPLC izolirali frakcijo, katera je vsebovala željen metabolit. Zbrane frakcije smo posušili do suhega ostanka, raztopili s primerno količino topila in tako dobili osnovno raztopino M1. Z analizo na LC-MS/MS smo nato preverili še čistost pridobljenega standarda.

4.1.1 Čiščenje vzorca

Pred izolacijo željene frakcije metabolita M1 na sistemu HPLC smo morali 150 mL urinskega vzorca očistiti in ga zaradi velikega volumna skoncentrirati. Odločili smo se, da v namen čiščenja in koncentriranja uporabimo metodo SPE. V primeru uporabe obstoječe metode LLE, kjer uporabljamo alikvote po 100 µL, bi namreč celoten postopek trajal izredno dolgo, pri tem pa bi porabili tudi velike količine organskih topil. Glede na lastnosti analita smo kot SPE kolono uporabili Strata-X, ki vsebuje polimerno osnovo iz stiren divinil benzena in je predvsem primerna za izolacijo nepolarnih do srednje polarnih spojin (71). Proces čiščenja in koncentriranja smo izvedli po postopku opisanem v poglavju 3.2.2.1.

4.1.2 Izolacija M1

Vzorec pridobljen po SPE postopku smo v naslednji stopnji dodatno kromatografsko čistili, saj smo želeli izolirati metabolit M1 od ostalih strukturno podobnih analitov iz vzorca. Zaradi omejitve glede maksimalnega volumna injiciranja (20 µL) in nedostopnosti avtomatskega zbiralca frakcij, izolacije ni bilo smiselno izvesti na sistemu LC-MS/MS.

Hkrati pa s postopkom dodatnega čiščenja nismo želeli onečistiti tega zelo občutljivega instrumenta.

Zato smo se odločili, da izoliramo M1 na HPLC-UV sistemu, ki vključuje tudi zbiralec frakcij. Vendar smo se v tem primeru soočili s problematičnostjo analitike TPM in metabolitov, saj zaradi odsotnosti kromoforjev, teh analitov ne moremo detektirati v UV in vidnem območju. Zato je bilo nujno, da postopek razvoja HPLC metode za izolacijo M1 izvedemo v dveh korakih.

V prvem koraku smo izbrali drugo kolono (Luna C18 50×4,6mm; 3 µm, namesto Kinetex 50×2,1, 2,6 µm), katera ima zaradi večjega premera večjo kapaciteto nanosa in zato omogoča injiciranje večjih volumnov (do 900 µL). Sprva smo na sistemu LC-MS/MS razvili metodo gradientnega izpiranja za kolono Luna C18 (preglednica VIII). Z izokratsko elucijo v prvih treh minutah smo dosegli zadovoljivo ločitev metabolitov M1 in M2, medtem ko smo z nadaljnim strmim gradientom v kratkem času dosegli elucijo ostalih metabolitov in TPM ter morebitnih endogenih spojin iz vzorca. Zaradi nizkega deleža organskega modifikatorja v MF ob eluciji M1 in pričakovanih velikih volumnov injiciranja, smo posušene SPE ekstrakte urinskega vzorca raztopili v 20% raztopini MeOH v vodi. Pri močnejšem topilu vzorca bi se namreč kromatografski vrhovi premaknili h krajšim retencijskim časom in razširili, kar bi onemogočilo uspešno ločbo predvsem M1 in M2.

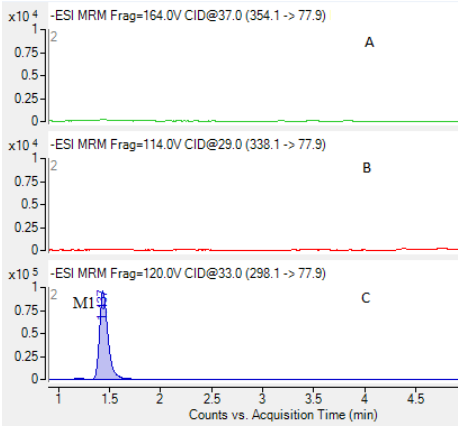
Izbrano kolono in kromatografske pogoje smo v naslednjem koraku prenesli na HPLC-UV sistem. Vendar pa se je po LC-MS/MS analizi zbrane frakcije izkazalo, da zaradi večjega mrtvega volumna in drugih karakteristik sistema HPLC-UV, retencijski časi analitov niso ostali enaki kot pri LC-MS/MS sistemu. Posledično smo zato morali poiskati območje v katerem se eluira metabolit M1. To delo je bilo zelo zahtevno, saj smo morali vsako zbrano frakcijo na HPC-UV sistemu, z namenom preverjanja ustrezne ločbe M1 od M2, preveriti z LC-MS/MS analizo. Teh preverjanj je bilo več kot 50. Z zbiranjem frakcij v kratkih časovnih intervalih (0,5 min) ob različnih začetnih časih zbiranja (npr. 1,9-2,4 ali 2,1-2,6) ter s postopnim povečevanjem volumna injiciranja (od 10 do 250 µL) smo poiskali optimalni volumen injiciranja s pripadajočim časovnim intervalom, v katerem zberemo le metabolit M1.

Po optimizaciji kromatografskih pogojev za izolacijo M1 (3.2.2.2) smo z zaporednim avtomatskim injiciranjem raztopljenih SPE ekstraktov zbirali frakcije M1 v 25 mL bučke.

Preden smo vsebino vseh bučk združili za nadaljno sušenje na liofilizatorju, smo na sistemu LC-MS/MS preverili čistost frakcij v posameznih bučkah.

4.1.3 Karakterizacija M1

Vzorec za karakterizacijo standarda M1 smo pripravili po metodi opisani v poglavju 3.2.2.3 in analizo izvajali na LC-MS/MS instrumentu po metodi opisani v poglavju 3.2.3.3. Iz kromatograma katerega prikazuje slika 6 je razvidno, da smo z razvito metodo izolacije standarda M1, uspeli pridobiti čisto raztopino M1, katera ni vsebovala M2, M3, M4 ali TPM. Pridobljeno osnovno raztopino standarda M1 smo ustrezno redčili in M1 uporabili za ponovno optimizacijo ključnih parametrov priprave vzorca in validacijo razvite analizne metode. Osnovno raztopino M1 pa shranili na -20°C.



Slika 6: Kromatogram pridobljenega standarda M1 s koncentracijo 2,5 mg/L. A: MRM prehod za M3 in M4; B: MRM prehod zaTPM ; C: MRM prehod za M1 in M2

4.2 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA

4.2.1 Priprava vzorca

Priprava vzorca predstavlja časovno najbolj potraten del analiznega postopka, a vendar je ključnega pomena za zagotavljanje selektivnosti, občutljivosti in zanesljivosti analizne metode. Izbira ustreznega postopka temelji na velikosti vzorca, karakteristikah analitov in pričakovanih koncentracijah (61). Pri našem delu smo se odločili, da za pripravo vzorca uporabimo metodo ekstrakcije LLE, z naknadnim sušenjem in raztapljanjem suhega ostanka. V celotnem postopku razvoja in optimizacije smo zaradi enotnosti izvedbe uporabljali obogatene plazemske vzorce s koncentracijo posameznih analitov 0,2 mg/L (3.2.1.1, *Obogateni plazemski vzorci (OPVr)*). Za preučevanje posameznega parametra smo pripravili po tri paralele vzorcev in izkoristek ekstrakcije izračunali kot razmerje

povprečja odzivov ekstrahiranih plazemskih vzorcev in odziva standarda z enako koncentracijo analitov (3.2.1.1, *Standard za vrednotenje parametrov priprave vzorca*). Za lažji prikaz vpliva posameznega parametra v postopku priprave vzorca smo rezultate podali kot relativni izkoristek. Optimizirana metoda priprave vzorca je opisana v poglavju 3.2.3.2.

4.2.1.1 Ekstrakcija tekoče tekoče

Namen optimizacije ekstrakcijskega postopka je bil s čim krajšim postopkom doseči čim boljšo ponovljivost in zadovoljiv izkoristek ekstrakcije TPM in metabolitov iz plazemskih vzorcev. Za LLE smo se odločili zaradi enostavnosti izvedbe in širokega nabora topil, ki jih pri tem lahko uporabimo. Prav tako smo po pregledu literature (preglednica II) ugotovili, da so pri največ metodah za merjenje koncentracij TPM kot postopek priprave vzorcev uporabljali LLE.

Postopek optimizacije smo začeli z izbiro najprimernejšega ekstrakcijskega topila, nato smo preverili vpliv razmerja volumnov topila in plazme, ter čas mešanja in centrifugiranja obeh faz.

Izkazalo se je, da je ključnega pomena za uspešno ekstrakcijo izbira ustreznega topila. Pri izbiri organskega topila mora le-to izkazovati čim večjo selektivnost za izbrane analite, imeti čim boljši porazdelitveni koeficient za snovi, ki jih ekstrahiramo in čim manjšo topnost v vodi. Koristno je tudi, da ima relativno nizko vrelišče, saj ga lahko po uporabi enostavno odstranimo z odparevanjem. Pri našem delu smo se glede na lastnosti topil in relativno visoko polarnost preiskovanih analitov (predvsem metabolitov) odločili, da preverimo primernost DEE, EA in DCM ter različna volumska razmerja le teh. V prvem poskusu smo preverili uporabo čistih topil in njihove mešanice v razmerjih 1:1. V tej stopnji se je kot izredno slab kandidat izkazal DCM, medtem ko smo z uporabo EA dosegli zadovoljive rezultate. V naslednjem poskusu smo zato z namenom natančnejše opredelitve ekstrakcijskega topila preizkusili še različna razmerja EA in DEE. Kot lahko vidimo iz preglednice XVII, je izbira ustreznega topila najbolj vplivala na izkoristke metabolitov (predvsem M1, M1* in M2), kar je posledica njihove večje polarnosti in se zato težje porazdeljujejo v organsko fazo. Kot najprimernejše topilo se je izkazala zmes EA in DEE v volumskem razmerju 95:5 (preglednica XVII).

Preglednica XVII: Relativni izkoristki (%) analitov pri različnih parametrih LLE.

	M1*	M2	M3	M4	TPM	M1
TOPILO ZA EKSTRAKCIJO						
100% DEE	21	46	72	78	87	28
100% EA	98	96	95	95	93	93
100% DCM	2	2	35	62	66	4
DEE:DCM(50:50)	17	34	72	80	82	/
EA:DEE(50:50)	76	88	95	98	97	/
EA:DCM(50:50)	40	55	87	94	92	/
EA:DEE(60:40)	79	83	91	92	86	/
EA:DEE(70:30)	82	85	90	88	85	/
EA:DEE(80:20)	93	92	95	95	94	/
EA:DEE(90:10)	97	96	96	96	97	/
EA:DEE(95:5)	100	100	100	100	100	100
RAZMERJE (PLAZMA:TOPILO)						
1:2	36	54	72	73	80	/
1:2,5	46	66	75	79	85	60
1:4	60	73	86	86	89	/
1:5	74	86	92	92	94	85
1:8	92	97	98	97	96	/
1:10	97	98	98	100	94	/
1:12	100	100	100	100	100	100
ČAS MEŠANJA (PLAZMA:TOPILO)						
30s	100	100	100	100	100	/
60s	97	95	95	90	94	/
120s	81	81	85	81	92	/
ČAS CENTRIFUGIRANJA						
5min	99	100	100	100	100	/
10min	100	94	98	99	100	/
15min	93	95	94	95	96	/

Pri uporabi zmesi EA in DEE v volumskem razmerju 95:5 je bila tudi ponovljivost postopka izredno dobra in zato IS v nadaljnjih korakih razvoja in optimizacije priprave vzorca nismo potrebovali. Rezultati ponovljivosti, ki smo jo vrednotili na osnovi RSD (n=3), so prikazani v preglednici XVIII. Izbrano ekstrakcijsko topilo se razlikuje od navedb virov (29,40), kjer opisujejo dober izkoristek ekstrakcije TPM in vseh metabolitov z uporabo DEE. Vendar pa pri teh dveh metodah niso navedli točnega izkoristka ekstrakcije, zato je zanesljivost njihovih rezultatov vprašljiva.

Preglednica XVIII: Ponovljivost ekstrakcije pri uporabi različnih topil (n=3).

	M1*	M2	M3	M4	TPM	M1
TOPILO	RSD (%)					
100% DEE	7,49	8,57	7,81	8,57	10,1	12,5
100% EA	3,46	3,40	3,33	2,11	2,36	3,58
100% DCM	9,27	16,8	14,4	13,4	13,5	11,7
DEE:DCM(50:50)	17,8	13,4	11,4	11,7	10,9	/
EA:DEE(50:50)	2,03	2,74	2,87	3,36	3,16	/
EA:DCM(50:50)	4,29	5,14	6,69	7,38	7,46	/
EA:DEE(60:40)	3,91	2,03	4,07	5,15	3,86	/
EA:DEE(70:30)	3,11	3,35	4,08	5,67	3,97	/
EA:DEE(80:20)	1,34	0,47	2,13	1,54	1,20	/
EA:DEE(90:10)	2,46	3,03	2,70	1,66	2,02	/
EA:DEE(95:5)	1,24	1,26	1,35	1,44	1,17	2,19

Z izbranim ekstrakcijskim topilom smo v naslednjem koraku optimizacije preverili vpliv volumna topila (oz. razmerja plazma:topilo) na izkoristek. Ta parameter ima velik vpliv na izkoristek, saj gre pri ekstrakciji za porazdeljevanje topljenca med organsko fazo (topilo) in vodno fazo (plazma). Iz preglednice XVII je razvidno, da večanje razmerja najbolj vpliva na izkoristek ekstrakcije metabolitov (predvsem M1, M2 in M1*). Le-ti so zaradi večje polarnosti slabše topni v organskem topilu in zato za njihovo ekstrakcijo potrebujemo večji volumen topila. Glede na rezultate iz tega poskusa lahko zaključimo, da je najprimernejše razmerje plazma topilo 1:12, katerega smo uporabljali tudi v nadaljnem procesu optimizacije in kasnejše validacije metode.

Želeli smo preveriti tudi vpliv časa mešanja obeh faz in časa centrifugiranja na izkoristek ekstrakcije analitov. V nasprotju s pričakovanji smo prišli do ugotovitve, da se s podaljševanjem časa mešanja izkoristek ekstrakcije znižuje (preglednice XVII) in da dosežemo najboljši izkoristek že po času 30 sekund. Centrifugiranje je pomembno za ponovno ločitev organske in vodne faze, kar smo dosegli že po 5 minutah. Kot lahko vidimo iz preglednice XVII so tudi izkoristki pri tem času najvišji, vendar bistveno ne vpliva na uspešnost ekstrakcije.

4.2.1.2 Sušenje

Postopku ekstrakcije je sledilo sušenje s prepihovanjem pod tokom N_2 pri povišani temperaturi. Preveriti smo želeli stabilnost TPM in njegovih metabolitov pri različnih temperaturah sušenja. Vzorce smo sušili pri temperaturah 40, 45, 50 in 60 ºC ter jih po sušenju raztopili v MeOH.

Preglednica XIX: Relativni izkoristki (%) analitov pri različnih temperaturah sušenja.

TEMPERATURA	M1*	M2	M3	M4	TPM
40 ºC	97	98	98	98	100
45 ºC	100	99	100	97	100
50 ºC	93	98	97	97	97
60 ºC	95	100	99	100	98

Iz preglednice XIX je razvidno, da so vsi analiti tekom sušenja stabilni tudi pri temperaturah do 60 ºC, saj so med različnimi temperaturami razlike znotraj eksperimentalne napake. Za najbolj optimalno temperaturo sušenja smo izbrali temperaturo 45 ºC.

4.2.1.3 Raztapljanje suhega ostanka

Zelo pomemben parameter, za uspešno pripravo vzorca, je tudi izbira ustreznega topila za raztapljamje. Zato smo preverili vpliv različnih koncentracij MeOH (20-100%) na izkoristek priprave vzorcev. Iz preglednice XX je razvidno, da je najprimernejše topilo za raztapljanje suhega ostanka 100% MeOH.

Ugotovili smo, da čas mešanja po raztapljanju nima pomembnega vpliva na izkoristek. Je pa pomemben iz vidika trajanja celotnega postopka metode, saj se pri velikem številu vzorcev le-ta lahko občutno skrajša. Zato smo pri nadaljnem delu uporabljali čas mešanja 15 sekund.

Preglednica XX: Vpliv topila za raztapljanje suhega ostanka in časa mešanja na izkoristek priprave vzorca.

	M1*	M2	M3	M4	TPM
ČAS MEŠANJA					
15 s	100	100	100	100	100
30s	100	99	100	99	100
60s	95	96	97	95	98
90s	95	96	96	95	98
TOPILO ZA RAZTAPLJANJE					
100%MeOH	100	100	100	100	100
90%MeOH	96	97	97	97	98
80%MeOH	97	95	94	91	94
70%MeOH	95	94	91	91	91
60%MeOH	94	93	91	90	92
50% MeOH	97	90	96	93	95
20%MeOH	100	93	96	89	92

4.2.2 Instrumentalna metoda

Za analizo obogatenih plazemskih vzorcev smo razvili metodo LC-MS/MS. Uporabljali smo instrument Agilent 6460 Triple Quadropole LC-MS/MS. Pri tem smo želeli doseči učinkovito kromatografsko ločbo preiskovanih analitov ter specifično in dovolj občutljivo detekcijo.

4.2.2.1 Metoda MS/MS

Iskanje MRM prehodov

Z direktnim injiciranjem standardov TPM in metabolitov (M1, M2, M3, M4) v masni analizator in s pomočjo programske opreme MassHunter ter programa Optimizer smo določili MRM prehode za posamezne analite. Za vsak analit smo izbrali dva masna prehoda. Prehod z večjim odzivom nam je služil za kvantitativno določitev, drugi pa za kvalitativno identifikacijo, saj smo z razmerjem med njima dodatno potrdili identiteto posameznega analita. V tem delu razvoja analizne metode smo s pomočjo avtomatske optimizacije določili tudi vrednosti fragmentorja in kolizijske energije, ki pomembno prispevata k optimalni MRM detekciji (preglednica XVI)

Izbira ionskega izvora

Pri našem delu smo kor vir ionizacije uporabljali elektrorazprševalno ionizacijo vzorca (ESI). Preveriti smo vpliv pozitivne in negativne ionizacije (ESI- in ESI+) v kombinaciji z različno sestavo MF na velikost odzivov oz. občutljivost metode. Kot izhodišče smo izbrali MF, katero so uporabljali v metodi za sočasno merjenje koncentracij TPM in metabolitov (40). Pri tej metodi je vodni del MF predstavljal amonijev acetat z MeOH kot organskim modifikatorjem. V prvi stopnji smo tako najprej preverili ESI- in ESI+ ionizacijo z uporabo različnih koncentracij amonijevega acetata (2 mM in 10 mM) v kombinaciji z MeOH. Prišli smo do zaključka, da je pri uporabi 2 mM in 10 mM amonijevega acetata boljša izbira negativna ionizacija. Z uporabo ESI+ smo dobili namreč slabšo občutljivost, pri čemer pa so nastajali predvsem adukti z amonijakom, kar je iz vidika robustnosti metode slabo, saj je bolj izražena stabilnost odziva v odvisnosti od meddnevne kvalitete mobilne faze.

V naslednji stopnji smo amonijev acetat zamenjali z mili Q vodo. V negativni ionizaciji smo dobili približno 5-krat boljšo občutljivost vseh metabolitov, medtem ko je bila občutljivost TPM nekoliko slabša (~25%). Ker je TPM v realnih vzorcih približno 10- do 100-krat več kot metabolitov, izboljšanje njegove občutljivosti lahko kvečjemu škodi. V

pozitivni ionizaciji z mili Q vodo kot MF smo ugotovili, da dobimo za metabolita M3 in M4 približno 5-krat boljšo občutljivost kot pri ESI-. Vendar pa se je ponovno pojavil zgoraj opisan problem robustnosti, saj so večino teh odzivov predstavljali adukti z Na^+. Prav tako je bil odziv metabolita M2 izredno nizek (12-krat manjši kot pri ESI-).

Zaradi težav z nastajanjem aduktov v pozitivnem načinu ionizacije smo preverili tudi uporabo 0,1% mravljične kisline kot vodnega dela MF. Izkazalo se je, da 0,1% mravljična kislina ni primerna, saj je bila občutljivost vseh analitov bistveno slabša kot v primeru uporabe mili Q vode.

Preverili smo tudi AcN kot organski modifikator v kombinaciji mili Q vodo v negativni ionizaciji. Izkazalo se je, da so odzivi vseh analitov nižji in da AcN tudi ni primeren iz vidika kromatografske ločbe analitov. Posledično je bilo tudi raziskovanje njegovega vpliva na ionizacijo v pozitivnem načinu brezpredmetno.

Na osnovi dobljenih rezultatov smo zaključili, da je iz vidika občutljivosti in robustnosti metode najprimernejša izbira ESI- ionizacija z uporabo mili Q vode in MeOH kot MF.

Optimizacija nastavitev masnega analizatorja

Po uspešni kromatografski ločbi analitov na koloni Kinetex 100×3 mm C18; 2,6 µm (4.2.2.2) smo z manualnim spreminjanem ostalih parametrov masnega spektrometra želeli doseči optimalne nastavitve masnega analizatorja. Ker imamo med metaboliti dva para izomerov, smo za optimizacijo zaradi skrajšanja časa analize uporabljali le po enega predstavnika izomerov - M2 in M3 (3.2.1.1, *Raztopina za manualno optimizacijo nastavitev masnega analizatorja*). Uporabili smo izokratsko metodo izpiranja kolone z 25% MeOH v mili Q vodi. S takšno metodo izpiranja kolone smo uspeli skrajšati čas analize iz 12,5 (m*13, preglednica V) na le 1,4 minute. Privzeli smo namreč, da bodo morebitni vplivi na M1 oz. M4 primerljivi z vplivi na M2 oz. M3. Standarda TPM v optimizacijo nismo vključili, saj je njegova koncentracija v realnih vzorcih 10-100-krat višja od koncentracij metabolitov in je zato večanje njegovega odziva prej slabost kot prednost. Spreminjali smo naslednje nastavitve: temperaturo in pretok sušilnega plina, temperaturo in pretok plina v plašču, napetost na šobi in kapilari, pretok nebulizacijskega plina, delta EMV, ter širino masne ločljivosti na prvem in tretjem kvadrupolu. Izbrane nastavitve in njihov vpliv na velikost odziva obeh analitov prikazuje preglednica XXI.

Preglednica XXI: Spremembe nastavitev masnega analizatorja in relativni odziv (%) glede na nove nastavitve.

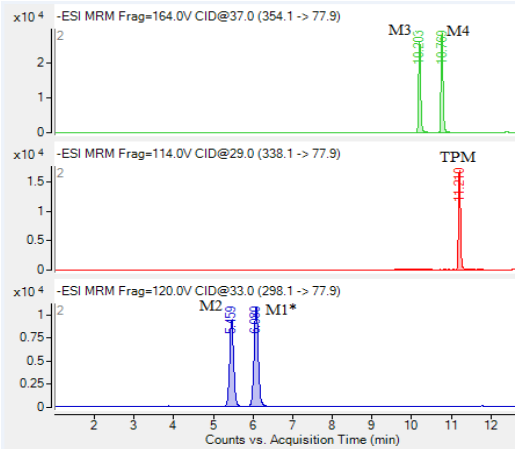
PARAMETER	OSNOVNA VREDNOST	IZBRANA VREDNOST	ODZIV (M2%/M3%)
Napetost na kapilari	4500 V	2500 V	115/110
Napetost na šobi	500 V	2000 V	143/198
Nebulizacijski plin	45 psi	30 psi	102/129
Delta EMV	200 V	200 V	/
Temperatura sušilnega plina	300 ºC	320 ºC	107/106
Pretok sušilnega plina	5 L/min	6 L/min	102/104
Temperatura plina v plašču	320 ºC	320 ºC	/
Pretok plina v plašču	11 L/min	11 L/min	/
Širina masne ločljivosti	2,5-2,5	2,5-2,5	/

4.2.2.2 Metoda LC

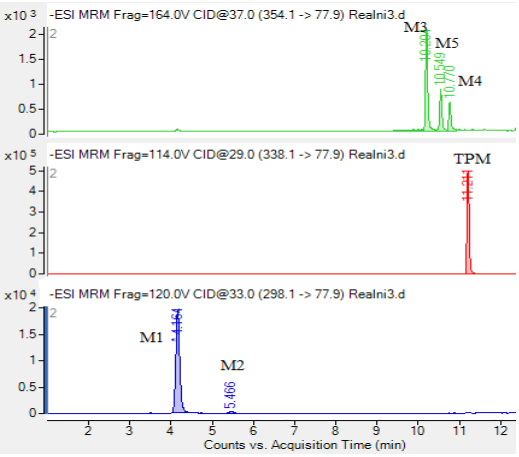
Namen razvoja metode tekočinske kromatografije je bila učinkovita ločba metabolitov M1 in M2 ter M3 in M4 ob čim višjem odzivu analitov. Pri metodah sklopljenih z masno detekcijo je predvsem pomembna ločba preiskovanih analitov od fronte topila oz. matrice vzorca. Popolna kromatografska ločba analitov pa ponavadi ni ključnega pomena, saj se analiti ločijo na osnovi njihovih MRM prehodov. Ker sta med metaboliti po dva para izomerov, ki imajo identične MRM prehode, jih brez ustrezne predhodne kromatografske ločbe ne moremo selektivno določiti z masnim detektorjem. Posledično je bila ustrezna kromatografska ločba ključnega pomena za zagotavljanje selektivnosti metode. Proces optimizacije kromatografskih pogojev je zaradi zapletov z napačnim metabolitom M1* potekal v dveh korakih. Za razvoj smo uporabili zmes analitov s koncentracijo 0,5 mg/L (3.2.1.1, *Raztopina za optimizacijo kromatografske ločbe*).

Razvoj metode smo začeli na koloni Kinetex 50×2,1; 2,6 µm, z uporabo 2mM amonijevega acetata kot vodnega dela MF in MeOH kot organskega modifikatorja. Po preizkusih različnih kombinacij vodnega dela MF in MeOH (3.2.1.3, *Izbira mobilne faze*) ter različnih programih gradientnega izpiranja kolone pri posamezni sestavi MF smo prišli do zaključka, da izbrana kolona ni primerna za ustrezno kromatografsko ločbo predvsem M1* in M2 in da za ustrezno ločitev le-teh potrebujemo daljšo kolono. V tem delu razvoja smo ugotovili, da še najboljšo ločbo M1* in M2 dobimo z uporabo 2mM amonijevega acetata ali mili Q vode kot vodnega dela MF. Zaradi drastično višjih odzivov vseh analitov pri uporabi mili Q vode (5x) smo se odločili, da uporabljamo v nadaljevanju mili Q vodo kot vodni del MF. Z uporabo izbrane MF (mili Q voda in MeOH) smo v nadaljevanju preizkusili šest 100 mm kolon (3.2.1.3, *Izbira kromatografske kolone*), pri čemer se je kot

najperspektivnejša izkazala kolona Kinetex C18 100×3 mm; 2,6µm. Po izbiri najprimernejše kolone je sledil razvoj optimalnega gradientnega programa izpiranja. Pri tem smo s postopnim spreminjanjem sestave MF v različnih časovnih intervalih poiskali metodo pri kateri smo dosegli ustrezno ločbo vseh analitov. Potek razvoja bistvenih metod gradientnega izpiranja prikazuje preglednica V. Zaradi relativno dolgega časa razvite metode (12,5 min; metoda m*13) smo v naslednjem koraku preverili uporabo AcN kot organskega modifikatorja. Izkazalo se je, da so bili retencijski časi vseh analitov pričakovano krajši, vendar pa so bile površine vseh vrhov manjše in vrhovi slabše ločeni. Prišli smo do zaključka, da uporaba AcN ni primerna.



Slika 7: Kromatogram obogatenega plazemskega vzorca (vključen M1*)-kolona Kinetex C18 100×3 mm; 2,6µm (metoda m*13)



Slika 8: Kromatogram realnega plazemskega vzorca (RV1; bolnik na stalnem zdravljenju s 450 mg TPM dnevno) - kolona Kinetex C18 100×3 mm; 2,6µm (metoda m*13)

Analiza treh realnih plazemskih vzorcev bolnikov na stalnem zdravljenju s TPM je pokazala, da od dobavitelja nismo prejeli pravega metabolita M1 (M1*). V vseh treh

vzorcih se je namreč pojavil isti metabolit M1 kateri se je, za razliko od M1*, iz kolone spiral pred M2 (slika 8), kar je potrdilo, da gre za dve različni spojini.

V drugi stopnji razvoja kromatografske metode smo se po uspešni izolaciji standarda M1 iz realnega urinskega vzorca (3.2.2) odločili, da prilagodimo metodo kromatografske ločbe. Z uporabo pravega metabolita M1 namreč izbira daljše 100 mm kolone, zaradi boljše ločbe metabolitov M1 in M2 kot M1* in M2, ni bila smiselna. Izbrali smo enako, vendar krajšo kolono (Kinetex C18, 50×2,1mm; 2,6um), saj nismo želeli preveč spreminjati že optimizirane metode (metoda m*13). Z uporabo enake MF smo nato, s postopnim spreminjanjem gradienta v različnih časovni intervalih, razvili novo metodo gradientnega izpiranja (preglednica VI, metoda m15). Kot je razvidno iz slike 9B smo z izbrano krajšo kolono in razvito metodo dosegli zadovoljivo ločbo vseh analitov. Pri tem smo uspeli tudi skrajšati čas celotne analize v primerjavi z optimizirano metodo na daljši koloni (metoda m13) za približno 7 minut, kar je izrednega pomena predvsem ko imamo opravka z velikim številom vzorcev.

4.3 VALIDACIJA

Validacija predstavlja zaključni del v postopku razvoja in optimizacije metode. Je v celoti dokumentiran proces, katerega izvajamo z namenom dokazovanja, da metoda zagotavlja zanesljive in ponovljive rezultate.

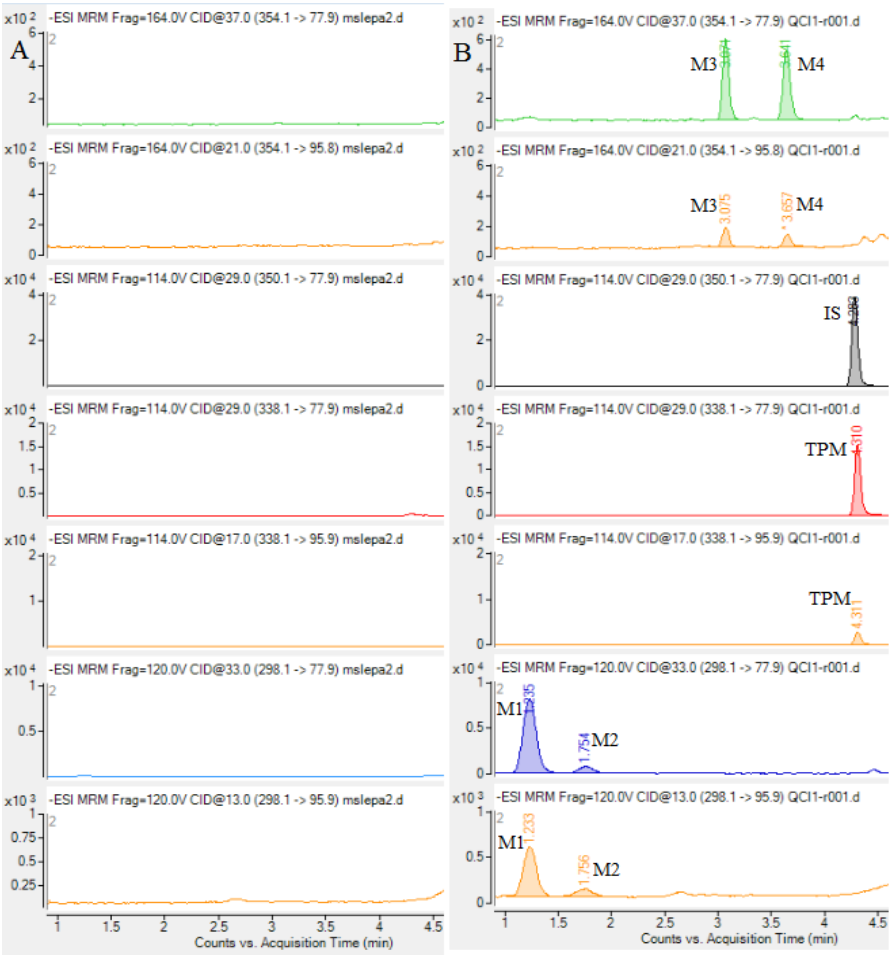
4.3.1 Selektivnost

Selektivnost je sposobnost analizne metode, da nedvoumno loči in kvantificira preiskovane analite od ostalih endogenih komponent za katere predvidevamo, da so lahko sočasno prisotne v vzorcu. Med te komponente spadajo deli biološkega materiala, razkrojni produkti učinkovin in ostale nečistote. Pri analizi večjega števila analitov je pomembno, da metoda tudi nedvoumno loči preiskovane analite med seboj. Pri LC-MS/MS metodah se analiti med seboj nedvoumno ločijo na podlagi njihovih MRM prehodov oz. razmerja med dvema ali več prehodi za posamezen analit. Vendar pa sta med glavnimi metaboliti TPM po dva para izomerov, kateri imajo oba MRM prehoda identična. V tem primeru je predpogoj selektivnosti metode ustrezna kromatografska ločba.

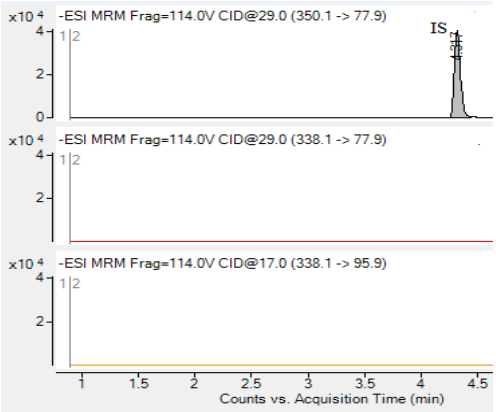
Ker so TPM in njegovi metaboliti strukturno sorodne snovi, ki fragmentirajo v iste fragmente, smo pri vseh analitih spremljali nastanek dveh najintenzivnejših hčerinskih ionov z m/z 77,9 in 95,9. Zaradi višjega odziva iona z m/z 77,9, smo tega pri vseh analitih

uporabili za kvantitativno vrednotenje. Razmerje med obema MRM prehodoma pa smo uporabili za dodatno potrditev posameznega analita (slika 9).

Iz slike 9 je razvidno, da je metoda selektivna saj pri analizi ekstrahiranega slepega plazemskega vzorca (PL-SL) ne opazimo odzivov pri retencijskih časih posameznih analitov. Z analizo vzorca PL-Qcl smo tudi potrdili, da so metaboliti M1 in M2, ter M3 in M4 ustrezno kromatografsko ločeni in jih lahko tako selektivno kvantitativno vrednotimo. Ker gre pri IS za devteriran TPM, ki ima enak retencijski čas in enak fragmentiran hčerinski ion (m/z 77,9), smo morali dokazati, da med ionizacijo ne prihaja do prehoda ionov med MRM kanali IS in TPM (ni »cross talk-a«). Z analizo vzorca plazme obogatene z raztopino ISr (PL-IS) smo potrdili ustreznost izbire IS, saj na kromatogramu PL-IS vzorca (slika 10) ni odziva pri nobenem od obeh MRM prehodov za TPM. S tem smo dokazali, da izbran IS ne moti odziva TPM.



Slika 9: A: Kromatogram slepega plazemskega vzorca (PL-SL); B: Kromatogram kontrolnega plazemskega vzorca (PL-Qcl); Kvali MRM prehodi so označeni z oranžno bavo, ostale barve predstavljajo kvanti MRM prehode.



Slika 10: Kromatogram plazemskega vzorca obogatenega z raztopino ISr (PL-IS); oranžna barva predstavlja kvali, rdeča pa kvanti MRM prehod TPM. Črna je MRM prehod IS.

4.3.2 Linearnost

Linearnost je sposobnost analizne metode, da znotraj določenega območja daje rezultate, kateri so premosorazmerni koncentraciji posameznega analita. Linearnost smo ugotavljali znotraj analiznega območja na osmih različnih koncentracijah (3.2.3.1, *Obogateni plazemski vzorci (OPVv)*). V literaturi je mogoče zaslediti, da se terapevtske koncentracije TPM gibljejo med 5 in 20 mg/L (36). Prav tako literatura navaja približno 10- do 20-krat nižje koncentracije metabolita M1 in več kot 100-krat nižje koncentracije ostalih metabolitov (72). Posledično smo se odločili, da pri vrednotenju linearnosti uporabimo različna koncentracijska območja za različne analite (0,1-20 mg/L za TPM; 0,01-2 mg/L za M1; 0,001-0,2 mg/L za M2, M3, M4). Zaradi velikega razpona med najnižjo in najvišjo koncentracijo za posamezen analit smo se odločili, da vsa delovna območja metode razdelimo na dva dela, saj smo s tem zagotovili boljšo linearnost in posledično tudi boljšo točnost metode čez celotno koncenteracijsko območje.

Preglednica XXII: Rezultati vrednotenja linearnosti.

	OBMOČJE (mg/L)	NAKLON (k)	ODSEK (n)	R^2
M1	0,01 - 0,40	10.936	0,07744	0,9993
	0,20 - 2,00	10,507	0,01393	0,9994
M2	0,001 - 0,04	9,4473	0,01209	0,9993
	0,02 - 0,20	10,884	-0,07463	0,9997
M3	0,001 - 0,04	4,8571	0,00231	0,9999
	0,02 - 0,20	5,6988	-0,03321	0,9998
M4	0,001 - 0,04	4,7354	0,00169	1,000
	0,02 - 0,20	5,4840	-0,03277	0,9998
TPM	0,10 – 4,00	1,1632	0,04663	1,000
	2,00 – 20,0	0,82167	1,3323	0,9990

Iz preglednice XXII je razvidno da smo z razvito analizno metodo dosegli izredno dobro linearnost v celotnem koncentracijskem območju za vse analite. Determinacijski koeficienti (R^2) so bili namreč povsod višji od 0,999, kar je precej višje od postavljenega kriterija $R^2 > 0,99$.

4.3.3 Točnost

Točnost metode izraža ujemanje izračunane oziroma izmerjene koncentracije posameznega analita z dejansko koncentracijo analitov v vzorcu. Točnost metode smo preverjali po postopku opisanem v poglavju 3.2.3.4, *Točnost*. Zaradi dveh območij linearnosti za vsak analit smo točnost meritev PL-Qcm vzorcev izračunali na podlagi obeh enačb in rezultat podali kot povprečje obeh vrednosti.

Preglednica XVIII: Dnevna (n=5) in meddnevna (n=3) točnost analizne metode.

		M1	M2	M3	M4	TPM
VZOREC	DAN	TOČNOST (%)				
PL-Qcl	1. Dan	96,5	99,9	93,5	99,1	89,1
	2. Dan	105,8	103,5	95,1	103,1	90,6
	3. Dan	107,1	109,8	100,6	106,8	104,3
	Povpr.	103,1	104,4	96,4	103,0	94,7
PL-Qcm	1. Dan	96,3	101,0	98,8	99,3	96,6
	2. Dan	100,8	99,6	99,1	99,8	102,8
	3. Dan	101,0	99,9	100,6	100,7	106,0
	Povpr.	99,3	100,2	99,5	99,9	101,8
PL-Qch	1. Dan	99,3	101,2	98,1	99,9	101,9
	2. Dan	103,0	104,1	92,3	96,1	98,5
	3. Dan	101,8	98,4	101,2	102,7	104,2
	Povpr.	101,4	101,2	97,2	99,6	101,5

Kot lahko vidimo iz preglednice XVIII, je bila točnost znotraj prvega dne med 89,1 in 102%, točnost znotraj treh dni pa je zanašala med 89,1 in 107,1%. Po pričakovanju so bila največja odstopanja pri vzorcih z najnižjo koncentracijo (PL-Qcl). Iz rezultatov lahko zaključimo, da je metoda točna znotraj celotnega koncentracijskega območja za vse analite, saj vrednosti ne presegajo postavljene meje 100±15%.

4.3.4 Ponovljivost priprave vzorca in injiciranja

Ponovljivost analizne metode pomeni natančnost znotraj analiznega postopka. Vrednotimo jo lahko kot stopnjo ujemanja rezultatov med serijo analiz istega biološkega vzorca pod enakimi pogoji. Podajamo jo kot standardni odklon (SD) ali še pogosteje kot relativni standardni odklon (RSD). V okviru validacije smo vrednotili tako ponovljivost znotraj

enega dne kot tudi meddnevno ponovljivost (3.2.3.5, *Ponovljivost*). Vrednotili smo tudi ponovljivost večkratnega injiciranja posameznega vzorca. Rezultati vrednotenja ponovljivosti so prikazani v preglednici XXIII.

Preglednica XXIII: Dnevna (n=5) in meddnevna (n=3) ponovljivost ter ponovljivost injiciranja (n=6).

		M1	**M2**	**M3**	**M4**	**TPM**
VZOREC	VRSTA	RSD (%)				
PL-Qcl	Dnevna	7,47	8,75	2,51	4,31	1,97
	Meddnevna	7,90	8,13	1,51	3,60	6,35
	Injiciranje	1,41	3,05	1,93	1,61	1,44
PL-Qcm	Dnevna	2,14	3,19	1,42	1,20	1,04
	Meddnevna	5,13	8,74	2,04	1,76	3,01
	Injiciranje	1,61	1,52	1,80	0,91	0,80
PL-Qch	Dnevna	1,38	2,82	1,24	1,75	0,79
	Meddnevna	3,91	6,74	3,02	1,38	4,73
	Injiciranje	1,02	0,88	0,84	0,95	1,24

Iz preglednice XXIII je razvidno, da je metoda ponovljiva v celotnem koncentracijskem območju. Ponovljivost priprave vzorca je izredno dobra, saj vrednosti RSD ne presegajo 9%, kar je precej manj od postavljene meje sprejemljivosti (RSD<15%). Podobno velja za ponovljivost injiciranja kjer so vrednosti RSD manjše od 2 %.

4.3.5 Spodnja meja določitve (LLOQ)

Spodnja meja določitve predstavlja najnižjo koncentracijo analita, katero lahko kvantitativno opredelimo. Po smernicah za bioanalizne metode (68) je najstrožji kriterij za LLOQ tista najmanjša koncentracija analita, ki ustreza pogoju za ponovljivosti (RSD < 20%) in točnost metode (80-120%). LLOQ za posamezen analit smo preverjali na podlagi podatkov pridobljenih iz UP, pri čemer smo analizirali pet paralelk vzorca z najnižjo koncentracijo (PL8). Zaradi različnih območij linearnosti posameznih analitov (4.3.2, *Linearnost*), smo posledično potrjevali tudi različne LLOQ (preglednica XXIV).

Preglednica XXIV: Ponovljivost in točnost analitov pri LLOQ (n=5)

	M1	M2	M3	M4	TPM
LLOQ (mg/L)	0,01	0,001	0,001	0,001	0,1
RSD (%)	9,10	10,44	8,87	8,68	4,02
Točnost (%)	101,6	92,2	91,5	98,6	104,3

Kot lahko vidimo iz preglednice XXIV, smo uspeli potrditi izredno nizko LLOQ za metabolite M2, M3 in M4 (1 ng/mL). Le-ti se v realnih vzorcih pojavljajo v izredno nizkih

koncentracijah in je za njihovo kvantitativno vrednotenje ključnega pomena razvoj dovolj občutljive metode. Ker pričakujemo v realnih vzorcih višje vrednosti za M1 in TPM, smo zanju izbrali višje LLOQ. Na ta način smo pokrili tako minimalne kot tudi maksimalne pričakovane koncentracije v realnih vzorcih. Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da smo uspeli razviti zelo občutljivo metodo z nižjo LLOQ (za M2, M3 in M4) od ostalih do sedaj razvitih metod za merjenje koncentracij TPM in njegovih metabolitov v plazemskih vzorcih.

4.3.6 Stabilnost

Stabilnost učinkovine je specifična lastnost spojine, matrice v kateri se nahaja in vsebnika v katerem jo shranjujemo. Odvisna je predvsem od kemijskih značilnostih spojine, matrice in vsebnika, ter od pogojev katerim je spojina izpostavljena med shranjevanjem (68). V procesu vrednotenja analizne metode smo testirali stabilnost PL-Qc vzorcev, katere smo izpostavili različnim pogojem shranjevanja. Vrednotili smo tudi stabilnost ekstrahiranih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku. Stabilnost primarnih raztopin v steklenih bučkah shranjenih v hladilniku nismo vrednotili, saj so v do sedaj objavljenih metodah za merjenje TPM potrdili stabilnost osnovnih raztopin (preglednica II).

Preglednica XXV: Stabilnost pri sobni temperaturi (B-T) in stabilnost med cikli zamrzovanja in odtajanja (F-T), dolgoročna stabilnost (L-T) in postoperativna stabilnost (P-O).

		M1	M2	M3	M4	TPM
		RELATIVNI ODZIV (%)				
PL-Qcl	B-T	99,5	103,3	99,1	99,8	99,1
	F-T	95,8	99,5	99,8	96,5	103,3
	L-T	105,4	103,5	100,9	106,7	96,7
	P-O	99,3	98,1	101,9	100,1	101,2
PL-Qcm	B-T	100,5	98,2	98,4	96,7	96,9
	F-T	103,2	104,0	98,1	100,6	103,8
	L-T	92,7	91,9	100,4	96,7	92,2
	P-O	102,0	100,6	99,9	96,8	103,7
PL-Qch	B-T	98,2	95,1	97,1	98,0	99,6
	F-T	103,8	104,8	99,8	99,3	104,3
	L-T	94,9	95,3	100,0	96,4	94,4
	P-O	102,2	100,7	99,2	98,5	100,6

Iz preglednice XXV je razvidno, da so vsi analiti stabilni pri vseh raziskanih pogojih. Spremembe odzivov v vzorcih kratkoročne stabilnosti so znašale med 0,25 in 4,9% kar je potrdilo, da lahko vzorce po odvzemu pustimo na sobni temperaturi vsaj 24 ur in jih šele

nato pripravimo in analiziramo. Dokazali smo tudi stabilnost vzorcev v procesu večkratnega zamrzovanja in odtajanja, čemur so realni vzorci pogosto izpostavljeni tekom farmakokinetičnih študij. Pri tem so bila odstopanja povsod manjša od 5%. Tudi v primeru analize dolgoročne stabilnosti so bila odstopanja v odzivu manjša od 10%, kar je še vedno znotraj eksperimentalne napake metode. S tem smo dokazali, da lahko plazemske vzorce shranimo zamrznjene na -80 ºC, do pet mesecev po odvzemu, in jih šele nato poanaliziramo. Potrdili smo tudi, da lahko analizo izvedemo ali ponovimo vsaj znotraj enega dneva. Po analizi vzorcev, shranjenih 24 h v avtomatskem vzorčevalniku pri 10 ºC, je namreč prišlo le do majhnih razlik znotraj kriterija sprejemljivosti RSD < 5%.

4.3.7 Učinkovitost ekstrakcije

Učinkovitost ekstrakcije (UE) smo vrednotili na treh koncentracijskih nivojih za posamezen analit, ki pokrivajo celotno območje linearnosti metode.

Kot je razvidno iz preglednice XXVI, smo z razvito metodo dosegli povprečne izkoristke ekstrakcije od 93 do 99%, kar je precej bolje od zastavljene meje 70%. Izredno dobra je bila tudi ponovljivost, saj so bili RSD pri vseh analitih manjši od 3% (kriterij RSD < 15%).

Preglednica XXVI: Izkoristek (UE) in ponovljivost ekstrakcije (RSD) (n=3), ter absolutni (UMa) in relativni učinek matrice (UMr).

		M1*	M2	M3	M4	TPM
		IZKORISTEK (%)				
UE	PL-Qcl	94,6	99,3	91,8	93,5	99,4
	PL-Qcm	94,8	96,3	92,9	92,0	97,2
	PL-Qch	90,4	94,5	97,1	95,3	100,4
	Skupaj	93,3	96,7	93,9	93,6	99,0
	RSD (%)	2,71	2,51	2,99	1,78	1,65
UMa	RELATIVNI ODZIV (%)					
	PL-Qcl	102,4	104,3	99,5	104,8	101,3
	PL-Qcm	98,4	100,2	101,7	101,8	99,3
	PL-Qch	100,7	99,3	102,6	101,5	99,7
RSD NAKLONOV PREMIC (%)						
UMr		1,44	1,53	1,07	1,45	0,35

4.3.8 Učinek matrice

Učinek matrice opisuje vpliv morebitnih komponent biološkega vzorca, katere se iz kromatografskega sistema eluirajo skupaj z analiti in vplivajo na njihovo ionizacijo. Zanje je značilno, da jih pri analizi na LC-MS/MS sistemu ne zaznamo, vendar pa je ocenjevanje njihovega vpliva ključno za razvoj zanesljive analizne metode. Pomemben vpliv na zniževanje učinka matrice ima uporaba izotopsko označenega IS. Zato smo tudi mi izbrali

devteriran TPM (TPM-d_{12}). Po načelih Matuszewskega (69,70) smo v okviru vrednotenja analizne metode ocenjevali absolutni (UMa) in relativni (UMr) učinek matrice (3.2.3.4, *Učinek matrice*)

Kot je razvidno iz preglednice XXVI, metoda ni podvržena učinku matrice. Rezultati meritev UMa izkazujejo največji vpliv na odzive analitov pri najnižji koncentraciji, a vendar so te vrednosti izredno nizke in se gibljejo med 0,53 in 4,8%, kar je znotraj eksperimentalne napake metode. Prav tako metoda izkazuje izredno majhen UMr, saj so RSD vrednosti naklonov UP za posamezen analit med 0,35 in 1,5%, kar je bistveno nižje od postavljenega kriterija RSD < 3-4%. Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da smo potrdili odsotnost UM in zagotovili dodatno zanesljivost razvite analizne metode.

4.4 ANALIZA REALNIH PLAZEMSKIH VZORCEV

Po uspešno izvedeni validaciji smo uporabnost analizne metode preverili na realnih plazemskih vzorcih bolnikov na stalnem zdravljenju s TPM. Analizirali smo šest vzorcev bolnikov, kateri so bili na stalnem zdravljenju z različnimi odmerki TPM. Plazemske koncentracije posameznih analitov smo izračunali iz enačb UP (preglednica XXII).

Rezultati merjenja koncentracij TPM in njegovih metabolitov v teh vzorcev so pokazali, da je metoda primerna za analizo realnih plazemskih vzorcev. V vseh vzorcih smo uspeli kvantitativno opredeliti tako TPM, kot tudi vse njegove glavne metabolite (preglednica XXVII). Analiza realnih vzorcev (razen RV 1 in RV 3) je pokazala, da pri metabolizmu TPM nastane daleč največ metabolita M1 (9-17% glede na koncentracijo TPM v plazmi). Pojavnost ostalih metabolitov v realnih vzorcih (razen RV 1 in RV 3) pa je bistveno manjša, pri čemer nastane največ M3 (~0,35%), temu sledijo M2 (~0,14%), M5 (~0,08%) in M4 (~0,03%). Obseg celotnega metabolizma TPM znaša med 10 in 18% glede na koncentracijo , kar je nekoliko manj kot navajajo viri iz literature, kateri poročajo o manj kot 30% metabolizma TPM (29,35,36,40).

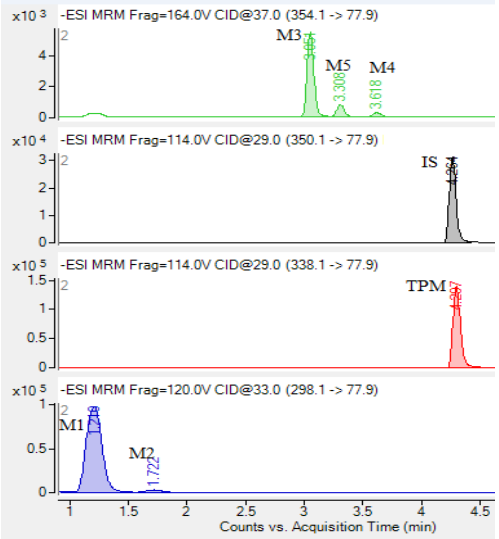
Za razliko od ostalih realnih vzorcev, je bil pri analizi RV 1 in RV 3 obseg celotnega metabolizma TPM bistveno višji (35% pri RV 1 in 28% pri RV 3). Večji delež nastalih metabolitov glede na TPM je pri teh dveh bolnikih najverjetneje posledica sočasne uporabe karbamazepina, ki je znan induktor encimskega sistema CYP 450.

Pri analizi realnih vzorcev smo uspeli detektirati in kvantitativno opredelit tudi nov metabolit (M5), za katerega pred začetkom magistrske naloge nismo vedeli. Metabolit se eluira iz kolone med M3 in M4 in ima enake MRM prehode kot omenjena metabolita

(slika 11). Iz teh podatkov lahko sklepamo, da je M5 verjetno izomer omenjenih metabolitov (7- ali 8- hidroksi-TPM), vendar pa njegove strukturne formule v okviru našega dela, nismo uspeli opredeliti. Ker za novo odkrit metabolit nismo imeli na voljo standarda in izdelane UP, smo njegove koncentracije izračunali oziroma ocenili iz UP za metabolit M4, saj so bili njuni odzivi primerljivi.

Preglednica XXVII: Dnevni odmerki TPM in izmerjene plazemske koncentracije TPM in njegovih metabolitov.

VZOREC	ODMERK (mg/dan)	M1 (mg/L)	M2 (mg/L)	M3 (mg/L)	M4 (mg/L)	TPM (mg/L)	M5 (mg/L)
RV 1	100 mg	1,215	0,009	0,022	0,002	2,325	0,004
RV 2	200 mg	0,634	0,017	0,032	0,002	6,289	0,004
RV 3	200 mg	0,564	0,004	0,006	0,002	1,494	0,006
RV 4	400 mg	1,138	0,009	0,023	0,002	6,580	0,005
RV 5	450 mg	2,271	0,019	0,055	0,008	11,279	0,021
RV 6	500 mg	1,739	0,005	0,032	0,003	11,390	0,007



Slika 11: Kromatogram RV 2 (bolnik na stalnem zdravljenju s 200 mg TPM dnevno).

5. SKLEPI

V okviru diplomske naloge smo na analitskem sistemu LC-MS/MS razvili in polno validirali izredno občutljivo analizno metodo za sočasno merjenje koncentracij TPM in njegovih štirih metabolitov v plazemskih vzorcih. Metoda omogoča merjenje koncentracij TPM v območju 0,1-20 mg/L, metabolita M1 v območju 0,01-2 mg/L in metabolitov M2, M3 in M4 v območju 0,001-0,2 mg/L.

Z zmesjo EA in DEE v volumskem razmerju 95:5 kot ekstrakcijskega topila, smo z uporabo LLE, dosegli visoke izkoristke ekstrakcije vseh analitov med 93 in 99 %. Ustrezno ločbo vseh analitov smo dosegli s kolono Kinetex C18, 50×2,1 mm; 2,6um in gradientnim izpiranjem. Za MF smo uporabljali mili Q vodo (MF A) z MeOH kot organskim modifikatorjem (MF B). Izpiranje smo začeli z izokratsko elucijo v prvih dveh minutah z 2% MF B. S tem smo dosegli zadovoljivo ločbo metabolitov M1 in M2 ter zadrževanje ostalih analitov na koloni. Z različnimi gradienti v različnih časovnih intervalih, smo s povišanjem deleža MF B do 95% v naslednjih 2,5 minutah uspeli doseči ustrezno ločbo M3, M4 in TPM ter zadovoljivo kratek čas celotne analize.

Tekom razvoja analizne metode smo prišli do ugotovitve, da lahko standard metabolita M1 dobimo le z izolacijo iz biološkega vzorca, saj smo od dveh dobaviteljev (Santa Cruz Biotechnology in CarboSynth) dobili napačni standard. Posledično smo v okviru našega dela razvili metodo, s katero smo uspeli standard M1 pridobiti iz urinskega vzorca bolnika na stalnem zdravljenju s TPM. Z uporabo Strata-X SPE kolone in izolacijo M1 frakcije na instrumentu HPLC-UV smo uspeli pridobiti čisti standard M1. Njegovo čistost smo potrdili z analizo na sistemu LC-MS/MS.

V procesu validacije smo dokazali, da je metoda linearna, ponovljiva in točna v zgoraj omenjenih koncentracijskih območjih. Ugotovili smo stabilnost vseh analitov v plazemskih vzorcih do 24 ur na sobni temperaturi, v procesih zamrzovanja in odtajanja, ter v avtomatskem vzorčevalniku. Analiza dolgoročne stabilnosti je pokazala, da so vzorci stabilni do pet mesecev zamrznjeni na -80 ^{o}C, saj v tem času pride do odstopanj manjših od 10%. Kot se je izkazalo, metoda tudi ni podvržena vplivom komponent matrice na ionizacijo analitov. Analizi absolutnega in relativnega učinka matrice sta namreč pokazali zanemarljivo majhen vpliv sočasno eluiranih komponent vzorca na ionizacijo analitov.

Z analizo realnih vzorcev bolnikov na stalnem zdravljenju s TPM smo v zaključni stopnji laboratorijskega dela potrdili ustreznost razvite analizne metode. V vseh analiziranih vzorcih smo namreč uspeli kvantitativno opredeliti tako TPM kot tudi vse štiri metabolite.

Zanimivo je, da smo z razvito metodo zaznali tudi prisotnost novega metabolita (M5), kateri se eluira med metabolitoma M3 in M4, ter ima enake MRM prehode kot omenjena metabolita (354,1-77,8; 354,1-95,8). Posledično smo prišli do sklepa, da je M5 verjetno izomer M3 in M4 (7- ali 8-hidroksi-TPM). Zaradi nedostopnosti standarda, smo njegove koncentracije ocenili na podlagi UP metabolita M4.

Povzamemo lahko, da smo razvili enostavno, relativno hitro, polno validirano in zelo občutljivo analizno metodo. Od obeh do sedaj razvitih analiznih metod za sočasno merjenje koncentracij TPM in metabolitov (29,40) smo dosegli nižjo mejo določitve (LLOQ) za metabolite M2, M3 in M4 (1 ng/mL). Prav tako smo za razliko od ostalih dveh metod našo metodo popolno validirali vključno z ugotavljanjem učinka matrice, kateri je ključnega pomena za zagotavljanje zanesljivosti bioanalizne metode. Iz navedenega lahko zaključimo, da smo razvili najprimernejšo analizno metodo za terapevtsko spremljanje koncentracij TPM z namenom kvantitativne opredelitve metabolitov in posledično metabolizma TPM.

Kljub obsežnemu raziskovalnemu delu, pa sta ostali še dve odprti vprašanji, kateri potrebujeta nadaljne raziskave. Potrebno bi bilo raziskati identiteto izoliranega standarda M1 in dokončno potrditi njegovo kemijsko strukturo. S tem bi odgovorili na vprašanje zakaj nismo uspeli od nobenega dobavitelja analitskih standardov pridobiti ustreznega standarda. Ali je napaka v sinteznem postopku spojine? Ali gre za zmotno poznavanje identitete glavnega metabolita TPM? Na ta vprašanja nam niso uspeli (ali morda niso hoteli) odgovoriti niti pri originatorju TPM podjetju Janssen pharmaceuticals inc. Kot drugo pa ostaja odprto vprašanje metabolita M5, katerega identitete v okviru našega dela nismo uspeli ugotoviti.

6.LITERATURA

1.) World Health Organization. Epilepsy: Epidemiology, Aetiology and Prognosis. WHO Factsheet. 2001.
2.) Thurman DJ, Beghi E, Begley CE: Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. Epilepsia 2011; 52: 22–26.
3.) Neligan A, Hauser WA, Sander JW: The epidemiology of the epilepsies. Handbook of Clinical Neurology 2012; 107: 113–133.
4.) Hauser WA, Annegers J.F., Elveback L.R.: Mortality in patients with epilepsy. Epilepsia 1980; 21 (4): 399–412.
5.) Rahman A, Md F, Akhtar AJ, Mateen SA: Current therapeutic approaches to epilepsy. International Journal of Pharmacy & Life Sciences 2013; 4 (1): 2282-7.
6.) Engel J: Report of the ILAE classification core group. Epilepsia 2006; 47 (9): 1558-1568.
7.) Shorvon SD: The etiologic classification of epilepsy. Epilepsia 2011; 52(6): 1052–1057.
8.) Berg AT, Scheffer IE: New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. Epilepsia 2011; 52(6): 1058–1062.
9.) Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D, Scheffer IE: Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. Epilepsia 2010; 51(4): 676-685.
10.) Bootsma HP, Ricker L, Hekster YA, Hulsman J, Lambrechts D, Majoie M, de Krom M, Aldenkamp A: The impact of side effects on long-term retention in three new antiepileptic drugs. Seizure 2009; 18(5): 327–331.
11.) Gilliam F: Optimizing health outcomes in active epilepsy. Neurology 2002; 58(8): 9–20.
12.) Kumar S, Madaan R, Bansal1 G, Jamwal A, Sharma A: Plants and plant products with potential anticonvulsant activity - a review. Pharmacognosy Communications 2012; 2(1): 3-97.
13.) Kwan P, Brodie MJ: Early identification of refractory epilepsy. The New England Journal of Medicine 2000; 342(5): 314–319.
14.) Bergey GK: Neurostimulation in the treatment of epilepsy. Experimental Neurology 2013; 244: 87–95.
15.) Mohanraj R, Brodie MJ: Pharmacological outcomes in newly diagnosed epilepsy. Epilepsy & Behavior 2005; 6(3): 382–387.
16.) Zgonc V, Čebular B: Sodobno medikamentno zdravljenje epilepsije pri odraslih. Zdravniški Vestnik 2006; 75: 379–388.
17.) White HS: Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of established and newer antiepileptic drugs. Epilepsia 1999; 40(5): 2–10.
18.) Perucca E: An introduction to antiepileptic drugs. Epilepsia 2005; 46(4): 31-37.
19.) Bialer M: New antiepileptic drugs that are second generation to existing antiepileptic drugs. Expert Opinion on Investigational Drugs 2006; 15(6): 637-647.
20.) Łuszczki JJ: Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. Pharmacological Reports 2009; 61(2): 197-216.
21.) Centralna baza zdravil, dostopno preko: http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm?SearchView (dostop september 2015)
22.) Glaxo Group Ltd: Povzetek temeljnih značilnosti zdravila, dostopno preko: https://mediately.co/si/drugs/FJMguhRVSxa1ehiaBipe55iZPhz/trobalt-100-mg-filmsko-oblozene-tablete#indications (dostop september 2015)
23.) UCB Pharma SA: Povzetek temeljnih značilnosti zdravila, dostopno preko: http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_Product_Information/human/000863/WC500050338.pdf (dostop september 2015)
24.) BIAL- Portelia & Co: Povzetek temeljnih značilnosti zdravila, dostopno preko: https://mediately.co/si/drugs/1z0z7CMRMbLbDzCO7q4CcOePxxf/zebinix-800-mg-tablete(dostop september 2015)
25.) Eisai Ltd.: Povzetek temeljnih značilnosti zdravila, dostopno preko: http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/20165/SPC/ (dostop september 2015)
26.) Biocodex: Povzetek temeljnih značilnosti zdravila, dostopno preko: https://mediately.co/si/drugs/EIMlZ4HIz8WbAIEFYrr6QpkX9w2/diacomit-250-mg-prasek-za-peroralno-suspenzijo#undesirable (dostop september 2015)
27.) Shank RP, Maryanoff BE: Molecular pharmacodynamics, clinical therapeutics, and pharmacokinetics of topiramate. CNS Neuroscience & Therapeutics 2008; 14(2): 120-142.
28.) Shank RP, Gardocki JF, Streeter AJ, Maryanoff BE: An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. Epilepsia 2000; 41(1): 3-9.

29.) Britzi M, Perucca E, Soback S, Levy RH, Fattore C, Crema F, Gatti G, Doose DR, Maryanoff BE, Bialer M: Pharmacokinetic and metabolic investigation of topiramate disposition in healthy subjects in the absence and in the presence of enzyme induction by carbamazepine. Epilepsia 2005; 46(3): 378-384.
30.) Jonson & Jonson: Povzetek temeljnih značilnosti zdravila, dostopno preko: http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-003284.pdf&dir=smpc (dostop avgust 2015)
31.) Štuhec M: Optimizacija zdravljenja z antiepileptičnimi zdravili glede na neželene učinke zdravil: kako pristopiti. Farmacevtski Vestnik 2015; 66: 28-34.
32.) Kwan P, Graeme JS, Martin JB: The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. Pharmacology & Therapeutics 2001; 90(1): 21-34.
33.) Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, Leppik IE, Tomson T, Perucca E: Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. Epilepsia 2008; 49(7): 1239-1276.
34.) Garnett WR: Clinical pharmacology of topiramate: a review. Epilepsia 2000; 41(1): 61-65.
35.) Matar KM: Therapeutic drug monitoring of topiramate by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clinica Chimica Acta 2010; 411(9): 729-734.
36.) Milosheska D, Vovk T, Grabnar I, Roškar R: Simple and sensitive high performance liquid chromatography method with fluorescence detection for therapeutic drug monitoring of topiramate. Acta Chimica Slovenica 2015; 61(2): 411-419.
37.) Zanotta N, Raggi ME, Radice L, Degrate A, Bresolin N, Zucca C: Clinical experience with topiramate dosing and serum levels in patients with epilepsy. Seizure 2006; 15(2): 86-92.
38.) Contin M, Riva R, Albani F, Baruzzi A: Simple and rapid liquid chromatographic–turbo ion spray mass spectrometric determination of topiramate in human plasma. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 2011; 761(1): 133-137.
39.) Popov Vnučec T, Cvitkovič Maričič L, Prosen H, Brodnjak Vončina D: Determination of topiramate in human plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Acta Chimica Slovenica 2013; 60(1): 144-150.
40.) Britzi M, Soback S, Isoherranen N, Levy RH, Perucca E, Doose DR, Maryanoff BE, Bialer M: Analysis of topiramate and its metabolites in plasma and urine of healthy subjects and patients with epilepsy by use of a novel liquid chromatography–mass spectrometry assay. Therapeutic Drug Monitoring 2003; 25(3): 314-322.
41.) Riffitts JM, Gisclon LG, Stubbs RJ, Palmer ME: A capillary gas chromatographic assay with nitrogen phosphorus detection for the quantification of topiramate in human plasma, urine and whole blood. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1999; 19(3): 363-371.
42.) Wolf CE, Crooks CE, Poklis A: Rapid gas chromatographic procedure for the determination of topiramate in serum. Journal of Analytical Toxicology 2000; 24(7): 661-663.
43.) Chen S, Carvey PM: Validation of liquid-liquid extraction followed by flow-injection negative ion electrospray mass spectrometry assay to Topiramate in human plasma. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2001; 15(2): 159-163.
44.) Christensen J, Højskov CS, Poulsen JH: Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for topiramate analysis in plasma and cerebrospinal fluid: validation and comparison with fluorescence-polarization immunoassay. Therapeutic Drug Monitoring 2002; 24(5): 658-664.
45.) Bahrami G, Mirzaeei S, Kiani A: Sensitive analytical method for Topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies. Journal of Chromatography B 2004; 813(1): 175-180.
46.) Bahrami G, Mirzaeei S, Mohammadi B, Kiani A: High performance liquid chromatographic determination of topiramate in human serum using UV detection. Journal of Chromatography B 2005; 822(1): 322-325.
47.) Bahrami G, Mohammadi B. A novel high sensitivity HPLC assay for topiramate, using 4-chloro-7-nitrobenzofurazan as pre-column fluorescence derivatizing agent. Journal of Chromatography B 2007; 850(1): 400-404.
48.) la Marca G, Malvagia S, Filippi L, Fiorini P, Innocenti M, Luceri F, Pieraccini G, Moneti G, Francese S, Dani FR, Guerrini R: Rapid assay of topiramate in dried blood spots by a new liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2008; 48(5): 1392-1396.
49.) Park JH, Park YS, Lee MH, Rhim SY, Song JC, Lee SJ, Kim JM, Shaw LM, Kang JS: Determination of plasma topiramate concentration using LC-MS/MS for pharmacokinetic and bioequivalence studies in healthy Korean volunteers. Biomedical Chromatography 2008; 22(8): 822-829.

50.) Snozek C, Rollins L, Peterson PW, Langman LJ: Comparison of a new serum topiramate immunoassay to fluorescence polarization immunoassay. Therapeutic Drug Monitoring 2010; 32(1): 107-111.
51.) Goswami D, Kumar A, Khuroo AH, Monif T, Rab S: Bioanalytical LC-MS/MS method validation for plasma determination of topiramate in healthy Indian volunteers. Biomedical Chromatography 2009; 23(11): 1227-1241.
52.) Mandrioli R, Musenga A, Kenndler E, De Donno M, Amore M, Raggi MA: Determination of topiramate in human plasma by capillary electrophoresis with indirect UV detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2010; 53(5): 1319-1323.
53.) Mercolini L, Mandrolini R, Amore M, Raggi MA: Simultaneous HPLC-F analysis of three recent antiepileptic drugs in human plasma. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2010; 53(1): 62-67.
54.) Kuchekar SR: Rapid and specific approach for direct measurement of topiramate in human plasma by LC-MS/MS: application for bioequivalence study. Journal of Bioanalysis & Biomedicine 2010; 2(5): 107-112
55.) Kim KB, Seo KA, Kim SE, Bae SK, Kim DH, Shin JG; Simple and accurate quantitative analysis of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2011; 56(4): 771-777.
56.) Shibata M, Hashi S, Nakanishi H, Masuda S, Katsura T, Yano I: Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. Biomedical Chromatography 2012; 26(12): 1519-1528.
57.) Conway JM, Birnbaum AK, Marino SE, Cloyd JC, Remmel RP: A sensitive capillary GC-MS method for analysis of topiramate from plasma obtained from single-dose studies. Biomedical Chromatography 2012; 26(9): 1071-1076.
58.) Das GK: Estimation of topiramate in human plasma using LC-MS/MS method. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2013; 6(3): 217-220.
59.) Kuhn J, Knabbe C: Fully validated method for rapid and simultaneous measurement of six antiepileptic drugs in serum and plasma using ultra-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. Talanta 2013; 110 : 71-80.
60.) Hahn RZ, Kreutz OC, Antunes MV, Linden R, Silva JD, Silva CA: Simultaneous determination of topiramate, carbamazepine, phenytoin and phenobarbital in plasma by gas chromatography with nitrogen phosphorus detector. Química Nova 2013; 36(5): 720-724.
61.) Roškar R, Trdan Lušin T: Analytical Methods for Quantification of Drug Metabolites in Biological Samples. INTECH Open Access Publisher, 2012; Ch. 4: 79-126.
62.) Siddiqui WA: New Protein Purification Approaches. Department of Biochemistry, Jamia Hamdard (Hamdard University), Hamdard Nagar, New Delhi, India.
63.) Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW: Introduction to modern liquid chromatography. John Wiley & Sons 2011; Ch.6.
64.) Grebe SK, Singh RJ: LC-MS/MS in the Clinical laboratory–Where to from here?. The Clinical Biochemist Reviews 2011; 32(1): 5-16.
65.) Skoog DA, West DM: Principles of instrumental analysis. New York: Saunders College Publishing, 1997, 5. Edicija; Ch. 20: 499-534
66.) Herbert, Christopher G., and Robert AW Johnstone. Mass spectrometry basics. CRC press, 2002.
67.) Agilent Technologies Pimer: Basics of LC/MS. Publication 5988-2045EN
68.) Food and Drug Administration: FDA guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research 1 2001: 124-129.
69.) Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng. CM: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Analytical Chemistry 2003; 75(13): 3019-3030.
70.) Matuszewski BK: Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC–MS bioanalysis. Journal of Chromatography B 2006; 830(2): 293-300.
71.) Phenomenex: Chromatography Product Guide 13/14.
72.) Mimrod D, Specchio LM, Britzi M, Perucca E, Specchio N, Neve AL, Soback S, Levy RH, Gatti G, Dose DR, Bialer M: A comparative study of the effect of carbamazepine and valproic acid on the pharmacokinetics and metabolic profile of topiramate at steady state in patients with epilepsy. Epilepsia 2005; 46(7): 1046-1054.