

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



JASNA ŠTUPAR

**KVANTIFIKACIJA NEKATERIH NOVIH ZAVIRALCEV BUTIRILHOLIN
ESTERAZE IZ MOŽGANSKEGA TKIVA IN KRVNE PLAZME PODGANE**

**QUANTIFICATION OF SELECTED NOVEL INHIBITORS OF
BUTYRYLCHOLINESTERASE IN BRAIN TISSUE AND BLOOD PLASMA OF A
RAT**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. Toksikološke študije so opravili na Inštitutu za patofiziologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

ZAHVALA

V dotičnem osebno izpovednem delu magistrske naloge je prostor namenjen za izraz zahvale nezadosten. Pa vendar velika dejanja ne potrebujejo hvalospevov, prihodnost jih namreč napiše sama. Ker pa spomini brez zabeleženja nimajo prave vrednosti, vas, ključne osebe za nastanek tega dela navajam:

- doc. dr. Jurij Trontelj, mentor in izreden strokovnjak in podpornik,
- doc. dr. Simon Žakelj, neformalni somentor in svetovalec,
- prof. dr. Stanislav Gobec, nosilec projekta, sklop katerega je ta magistrska naloga,
- Boris Brus, asistent in koordinator,

In vam izrekam hvala. Nikakor pa ne želim pozabiti na ostale sodelavce katedre, s katerimi so bile ure v laboratoriju nadvse prijetne.

Podjetju Krka, d.d., se zahvaljujem za strokovno in finančno podporo ter praktične izkušnje, ki mi jih je nudilo tekom izobraževalnega procesa.

Zadnje mesto pripada mojim staršem, ki imajo največ zaslug, da se danes lahko podpišem pod tem delom.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm.

Jasna Štupar

KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	VI
ABSTRACT.....	VII
KLJUČNE BESEDE.....	VIII
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV.....	IX
1. UVOD.....	1
1.1. ALZHEIMERJEVA BOLEZEN: opredelitev in terapevtski pristop.....	1
1.2. Načrtovanje spojin za prehajanje krvno-možganske pregrade (KMP).....	3
1.3. Predvidevanje in vrednotenje prehoda KMP.....	6
1.4. Uveljavljanje novih učinkovin.....	8
1.5. Analiza spojin v biološkem materialu.....	9
2. NAMEN DELA.....	12
3. MATERIALI IN METODE.....	13
3.1. REAGENTI.....	13
3.2. RAZTOPINE.....	13
3.2.1. Standardne raztopine preiskovanih spojin.....	13
3.2.2. V laboratoriju pripravljena topila.....	14
3.3. BIOLOŠKI VZORCI.....	15
3.4. LABORATORIJSKA OPREMA IN APARATURE.....	15
3.5. METODE.....	16
3.5.1. Priprava delovne standardne raztopine 1 (DR1).....	16
3.5.2. Priprava delovne standardne raztopine 2 (DR2).....	17
3.5.3. Homogenizacija možganskega tkiva.....	17
3.5.4. Centrifugiranje.....	18
3.5.5. Ekstrakcija na trdnih nosilcih.....	18
3.5.6. Sušenje in rekonstitucija.....	19
3.5.7. Kromatografska ločba in analiza vzorcev.....	19
3.6. Obravnava rezultatov in validacija metode.....	21
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	27
4.1. Določitev lastnosti preiskovanih spojin.....	27
4.2. Razvijanje analizne metode in UHPLC-MS/MS.....	28
4.2.1. Optimizacija analizne metode in metode UHPLC-MS/MS.....	28

4.2.2.	Optimizacija delovne raztopine standardov	30
4.2.3.	Izbor pipetnih nastavkov	33
4.2.4.	Določitev koncentracijskega območja delovne raztopine standardov.....	34
4.2.5.	Optimizacija postopka ekstrakcije in raztopine za ekstrakcijo.....	36
4.2.6.	Izbor optimalnih kartuš za ekstrakcijo.....	43
4.3.	Validacija analizne metode	44
4.4.	Analiza bioloških vzorcev	59
5.	SKLEP.....	61
6.	LITERATURA.....	63
PRILOGA 1		
PRILOGA 2		

KAZALO SLIK

Slika 1:	Nastajanje in metabolizem ACh.....	1
Slika 2:	Shematski prikaz krvno-možganske pregrade	4
Slika 3:	Trije vidiki obravnave KMP v povezavi z AB.....	5
Slika 4:	Kromatogram ločbe preiskovanih spojin	29
Slika 5:	Primerjava uspešnosti ekstrakcije glede na uporabljeno topilo za obogatitev	31
Slika 6:	Primerjava odzivov ob uporabi različnih pipetnih nastavkov.....	34
Slika 7:	Umeritvene krivulje delovnih raztopin preiskovanih spojin v DR1 (50% MeOH).....	37
Slika 8:	Raziskava izvora lažno pozitivnih koncentracij analitov v 4 vzorcih.....	39
Slika 9:	Diagram primerjave ekstrakcijskih topil v različnih delovnih raztopinah	42
Slika 10:	Primerjava odzivov 2 kartuš za SPE dveh različnih proizvajalcev	44
Slika 11:	Prekrita kromatograma slepega vzorca in vzorca s koncentracijo na LLOQ	46
Slika 12:	Primerjava odzivov IS (haloperidol)	59
Slika 13:	Grafični prikaz koncentracije preiskovanih učinkovin v realnih možganskih vzorcih	60

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I:	Pregled odobrenih zdravil s strani FDA.....	3
Preglednica II:	Pregled uporabljenih topil.....	13

Preglednica III: Pregled laboratorijske opreme in aparatur	15
Preglednica IV: Spreminjanje pretoka in sestave mobilne faze pri tekočinski kromatografiji	20
Preglednica V: Parametri trojnega kvadrupola.....	21
Preglednica VI: Strategija za razvoj bioanalizne metode.....	21
Preglednica VII: Ponovljivost pipetiranja z rumenimi pipetnimi nastavki Qualitips.....	32
Preglednica VIII: Primerjava odzivov realnih in obogatenih možganskih vzorcev	35
Preglednica IX: Določanje AUM, RE, PE pri DR1 v 50% MeOH.....	36
Preglednica X: Navzkrižni prenos	38
Preglednica XI: Določanje AUM, RE, PE pri delovni raztopini standardov DR2.....	40
Preglednica XII: Primerjava različnih ekstrakcijskih topil.....	41
Preglednica XIII: Ponovljivost ekstrakcije z ER3 in DR2-c	43
Preglednica XIV: Primerjava odzivov na dveh različnih kartušah	43
Preglednica XV: Ponovljivost bioloških vzorcev izražena kot RSD [%]	45
Preglednica XVI: Odzivi QC-vzorcev in preračunane koncentracije glede na parametre utežene umeritvene premice in odstopi od nominalne koncentracije za posamezne spojine v obogatenih vzorcih možganskega tkiva.....	49
Preglednica XVII: Odzivi QC-vzorcev in preračunane koncentracije glede na parametre utežene umeritvene premice in odstopi od nominalne koncentracije za posamezne spojine v obogatenih vzorcih plazme.....	50
Preglednica XVIII: Preračun parametra točnosti QC-vzorcev	51
Preglednica XIX: Relativni učinek matrice	53
Preglednica XX: Ocena AUM, RE, PE na možganskih vzorcih.....	53
Preglednica XXI: Stabilnost raztopine standardov.....	54
Preglednica XXII: Stabilnost spojin v elucijskem pufru	54
Preglednica XXIII: Pregled stabilnosti FTS, STS in LTS na QC-jih	56
Preglednica XXIV: Rezultati avtomatskega vzorčevalnika po 24 urah	58
Preglednica XXV: Možganski vzorci podgan tretiranih z izbranimi spojinami	60

POVZETEK

V okviru tega magistrskega dela smo postavili metodo za ekstrakcijo in kvantifikacijo nekaterih spojin z delovanjem na acetilholin esterazo in butirilholin esterazo. Delali smo na šestih različnih spojinah, in sicer takrinu in donepezilu, spojini, ki sta že bili v klinični praksi, pridružili smo jim še spojino CB-14948874 ter novo načrtovane GUK-779, GUK-791 in GUK-772. Analizirali smo prisotnost spojin v biološkem materialu, in sicer v možganskem tkivu ter plazmi. Postavljena metoda je osnova za nadaljnje predklinične študije predvsem na nivoju farmakokinetike. V razvojni fazi smo delali na možganskih vzorcih, metodo pa smo z nekaj prilagoditvami aplicirali še na plazemske vzorce, da bo možno oceniti porazdeljevanje v centralnem živčnem sistemu (CŽS). Postopek ekstrakcije je potekal v naslednjih korakih: homogenizacija, centrifugiranje, ekstrakcija na trdnih nosilcih, temu je sledila kvantifikacija z UHPLC-MS/MS. Med razvojem smo naleteli na nekaj težav zaradi nizke vodotopnosti in velike afinitete spojin za vezavo na plastiko. Z ustreznim izborom topil in delovnega materiala smo te težave uspeli v veliki meri odpraviti. Zaradi omenjenih težav sta bili ponovljivost in točnost metode nekoliko slabši, zato smo kriterije sprejemljivosti relativne standardne deviacije in relativne napake iz priporočenih 15% odstopa razširili na 30%.

Glede na meritve preliminarnih vzorcev smo določili pričakovana koncentracijska območja ter jih potrdili na naslednjih intervalih: 1,5-30,0 ng/mL za CB in GUK-791; 3,8-30,0 ng/mL za takrin; 7,5-150,0 ng/mL za GUK-779; 158,4-3168,0 ng/mL za donepezil z determinacijskim koeficientom korelacije $> 0,96$. V plazmi smo dosegli enaka območja za vse spojine razen za takrin, kjer smo uspeli doseči območje 1,5-30,0 ng/mL, z večjim koeficientom korelacije $> 0,99$. Spodnja meja območja je istočasno predstavljala spodnjo mejo določitve.

Težavnost spojin za kvantitativno delo se je odražala na parametrih točnosti, vendar smo jih uspeli validirati znotraj intervala odstopa 30%. Ponovljivost znotraj dneva je bila ustreznejša, saj so se vrednosti relativne standardne deviacije gibale do 20%. Prav tako smo uspeli dokazati, da ni značilnega vpliva relativnega in absolutnega učinka matrice, izkoristek oz. posledično učinkovitost ekstrakcijskega postopka pa se je gibala okoli 50% za večino spojin, s tem smo potrdili ustreznost naše metode za načrtovano predklinično študijo.

ABSTRACT

The aim of this work was to set a method for extraction and quantification of some compounds with an activity on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. We used the already known inhibitors tacrine and donepezil and added four new compounds CB-14948874, GUK-779, GUK-791 and GUK-772. Compounds were analysed within biological materials, namely in brain tissue and blood plasma. The developed method is basis for further preclinical studies, particularly for pharmacokinetics of the compounds. To assess the distribution in central nervous system we worked with brain samples in the development phase and introduce some adjustments to blood plasma samples. The extraction process was carried out in the following steps: homogenisation, centrifugation, solid phase extraction and quantification with UHPLC-MS/MS. Along the process we faced problems because of the low water solubility and high affinity of the compounds for plastic material. With the right solvents selection and laboratory materials these problems were largely eliminated. Because of these problems the repeatability and accuracy could not reach the usually applied acceptance criteria. The bias and relative standard deviation limits were expanded from generally accepted interval 15% to 30%.

According to preliminary results the expected concentration ranges were determined and validated at the following intervals: 1.5-30.0 ng/mL for CB-14948874 and GUK-791, 3.8-30.0 ng/mL for tacrine, 7.5-150.0 ng/mL for GUK-779 and 158.4-3168.0 ng/mL for donepezil with coefficients of determination > 0.96 in brain tissue. The same concentration ranges were achieved in plasma except from tacrine. The achieved concentration range for tacrine was 1.5-30.0 ng/mL. The coefficients of determination in plasma were > 0.99 .

The difficulty for the quantitative work with our compounds reflected in the parameters of accuracy and precision. The accuracy was proven within the interval of deviation of 30%. Repeatability within the same day was more successful, because the relative standard deviation values were around 20%. Our method was proven to be free from significant relative and absolute matrix effect. Extraction recovery and extraction efficiency were around 50% for most compounds, which confirms adequacy of our methods for the planned preclinical study.

KLJUČNE BESEDE

Alzheimerjeva bolezen, zaviralci holinesteraz, ekstrakcija iz možganov in plazme, UHPLC-MS/MS

KEY WORDS

Alzheimer disease, cholinesterase inhibitors, brain and plasma extraction, UHPLC-MS/MS

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

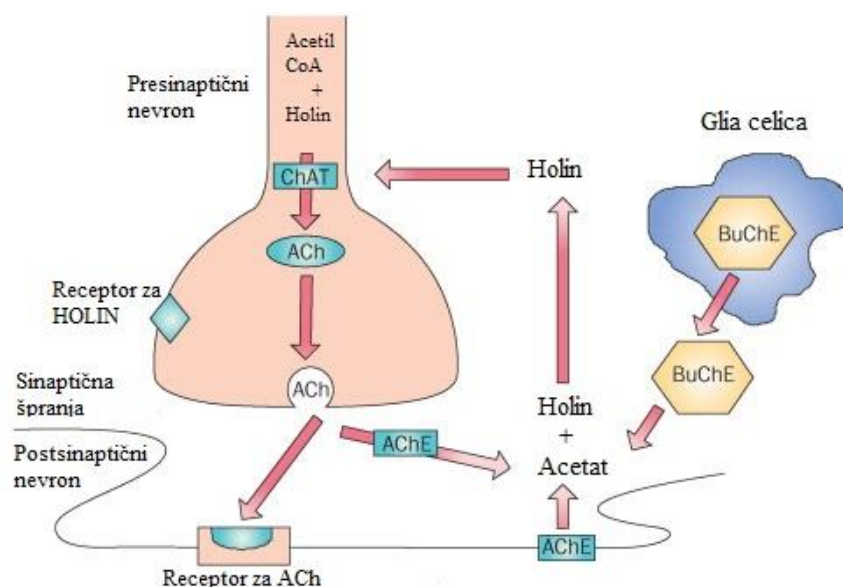
AB	Alzheimerjeva bolezen
ACh	acetilholin
AChE	acetilholin esteraza
AChR	receptor za acetilholin
AChT	acetilholintransferaza
AUM	absolutni učinek matrice
BChE	butirilholin esteraza
CB	CB-14948874
CŽS	centralni-živčni sistem
DR1	delovna standardna raztopina 1
DR2	delovna standardna raztopina 2 v 0,1% očetni kislini v 80% metanolu
DR2-a	delovna standardna raztopina 2 v 0,1% očetni kislini v 50% metanolu
DR2-b	delovna standardna raztopina 2 v 50% metanolu
EMA	European Medicines Agency (Evropska agencija za zdravila)
ER1	elucijska raztopina 1
ER2	elucijska raztopina 2
ER3	elucijska raztopina 3
FDA	Food and Drug Administration (Agencija za hrano in zdravila v ZDA)
FTS	freeze thaw stability (stabilnost ob zamrzovanju - odtajevanju)
KMP	krvno-možganska pregrada
LLOQ	lower limit of quantification (spodna meja določitve)
LogBB	porazdelitveni koeficient, odraža razmerje koncentracije spojine v možganih in koncentracije spojine v plazmi
LogK _{in}	logaritem kinetične konstante volumna distribucije v odvisnosti od časa
LogP	porazdelitveni koeficient, odraža razmerje porazdelitve spojine med dvema nemešajočima fazama (organska in vodna faza)
Mr	relativna molekulska masa

PE	proces efficiency (učinkovitost ekstrakcije)
PK	farmakokinetika
QC	kontrolni vzorec
R ²	determinacijski koeficient korelacije
RE	recovery (izkoristek ekstrakcije)
RN	relativna napaka
RPM	revolutions per minute (obradi na minuto)
RSD	relative standard deviation (relativna standardna deviacija)
RUM	relativni učinek matrice
SPE	solid phase extraction (ekstrakcija na trdnih nosilcih)
UHPLC-MS/MS	tekočinska kromatografija povezana s tandemsko masno detekcijo

1. UVOD

1.1. ALZHEIMERJEVA BOLEZEN: opredelitev in terapevtski pristop

Alzheimerjeva bolezen (AB) je kronična napredujoča nevrološka bolezen z značilnimi znaki demence. Gre za postopno propadanje možganskih celic, kar se kaže v motnjah mišljenja in pomnjenja (1,2). Evropske epidemiološke raziskave kažejo, da demenca, ki je najpogostejša posledica AB, prizadene ljudi nad 65. letom starosti. Bolnikov z demenco je v Evropi okoli 6,3 milijone, v Sloveniji je teh bolnikov okoli 22.800. Zaradi staranja populacije se pričakuje v naslednjih desetih letih porast števila bolnikov za 10% (3–5). Patološke spremembe se odražajo pretežno v predelih možganske skorje, hipokampusu in amigdaloidnih jedrih. Ob propadu nevronov se tako zmanjša holinerški, noradrenerški in serotoninerški prenos (6). Holinerška hipoteza je bila prva smernica za zdravljenje AB. Teorija je zasnovana na ugotovitvah Daviesa in Maloneya iz eksperimentalne študije, kjer dokazujeta, da je acetilholin (ACh) ključen za pomnjenje in učenje. V študiji s skopolaminom, ki je blokator prenosa ACh, so preiskovane osebe pokazale znaten upad kognitivnih funkcij. Holinerška hipoteza kaže, da upad količine ACh korelira z upadom kognitivnih sposobnosti pri bolnikih z AB (7).



Slika 1: Nastajanje in metabolizem ACh – povzeto po (8)

Nevrotransmitter ACh nastaja v presinaptičnem nevronu, in sicer z acetilacijo holina s pomočjo citosolnega encima acetilholin transferaze. Acilna skupina se odcepi iz acetil koencima A, ki nastane v procesu celičnega dihanja. ACh s pomočjo eksocitoze izstopi iz

presinaptičnega nevrona in difundira preko sinaptične špranje na postsinaptični nevron, kjer se nahajajo receptorji za ACh. Ti receptorji so dveh različnih tipov: muskarinski in nikotinski. Med pre- in postsinaptičnim nevronom leži encim acetilholin esteraza (AChE), ki hidrolizira ACh na holin in acetat in tako izniči učinek ACh (6,8).

Za izboljšanje holinergičnega prenosa so predlagani 4 pristopi:

1. povečanje sinteze ACh,
2. povečano presinaptično sproščanje ACh,
3. stimulacija delovanja ACh-receptorjev,
4. zmanjšana razgradnja ACh preko esteraz (8).

Zaenkrat so v terapiji samo učinkovine, ki delujejo na zmanjšano hidrolizo ACh preko esteraz. To so tako imenovani zaviralci acetilholinesteraze. V terapiji se uporabljajo naslednje štiri učinkovine: donepezil, galantamin, rivastigmin in takrin (4). V Sloveniji so registrirane vse naštetе učinkovine razen takrina (9).

V telesu sta prisotni holinesterazi dveh vrst, in sicer acetilholinesteraza (AChE) in butirilholinesteraza (BChE). Gre za serinski proteazi, ki sestojita iz globularnih katalitičnih enot prostih v cerebrospinalni tekočini (AChE) oz. v plazmi (BChE), glavna katalitična enota pa je preko proteina vezana na živčno povezavo v sinaptični špranji (6). Njuno razmerje glede na prisotnost v možganih je 99:1 v prid AChE. V napredovani AB pa se to razmerje poruši, in sicer celo do 65:35, kar kaže na to, da BChE zamenja vlogo AChE (10). Tako se odpira potencialno novo tarčno mesto, ki bi povečalo uspešnost zdravljenja. Gre za istočasno zaviranje obeh encimov, poleg AChE še BChE. Zaviralci AChE izkazujejo tudi alosterično delovanje na AChR, in sicer na nikotinske receptorje, kjer preko pozitivne modulacije okrepijo delovanje ACh (10,11).

V eni izmed študij za določitev farmakokinetike (PK) in farmakodinamike AChE zaviralcev so uporabili »Lister hooded rat model«. Študija je bila narejena na podganah z namenom ocene oz. oblikovanja modela za napoved sprememb pri ChE zaviranju z leti pri človeku. Dognanja raziskave so bila, da je aktivnost ChE bistveno večja v plazmi starejših podgan kot v primeru mlajših, medtem ko v možganih ta efekt ni prisoten. Celokupno delovanje ChE je pri starih podganah bistveno večje kot v primerjavi z mlajšimi (kar za faktor 20). V isti raziskavi so testirali še inhibicijo uveljavljenih učinkovin na posamezni ChE. Takrin se je izkazal za najbolj učinkovitega na BChE, medtem ko je najbolj selektivno na AChE deloval donepezil (12).

Od učinkovin, ki so že v uporabi, tako delovanje na oba encima izkazujeta samo rivastigmin in takrin. Takrin je bila prva učinkovina, ki je bila registrirana za indikacijo AB in deluje kot zaviralec AChE. Zaradi visoke hepatotoksičnosti se ne uporablja več v terapevtske namene, služi pa kot strukturni vzorec za načrtovanje novih (4,6,10).

Donepezil je najpogosteje uporabljena centralno delujoča učinkovina za indikacijo AB, ki pa deluje samo na AChE. Njena poglavitna prednost je visoka biološka uporabnost, saj izredno dobro prehaja KMP (4,6).

Rivastigmin je izkazal v študijah primerljivo nekoliko boljše rezultate kot donepezil in galantamin, deluje pa prav tako samo na AChE (4,9,13).

Galantamin zavira istočasno BchE in AChE, kar je njegova prednost. Gre za alkaloid, uporablja se za začetne oz. blažje oblike AB (4,10).

Preglednica I: Pregled odobrenih zdravil s strani FDA (2)

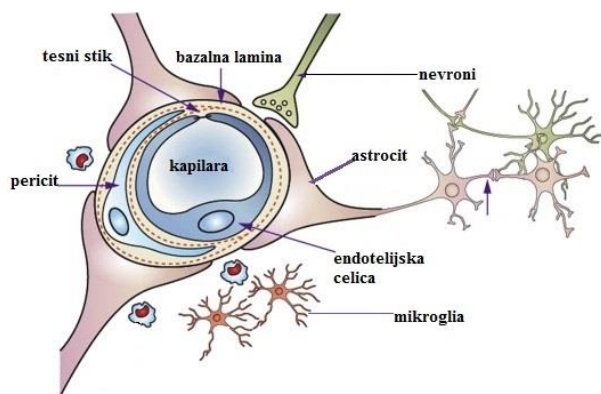
Ime učinkovine	INDIKACIJE	Leto odobritve (FDA)
DONEPEZIL	Vse oblike AB.	1996
GALANTAMIN	Blaga do zmerna oblika AB.	2001
RIVASTIGMIN	Vse oblike AB.	2000
MEMANTIN*	Zmerna do huda oblika AB.	2003
DONEPEZIL in MEMANTIN*	Zmerna do huda oblika AB.	2014

*ni AChE zaviralec

1.2. Načrtovanje spojin za prehajanje krvno-možganske pregrade (KMP)

Zgradba in transport preko KMP

Možgani so dobro zaščiten organ vključujoč dinamično regulacijo, saj na tak način varujejo CŽS. Vsaka spojina, ki bi jo želeli dostaviti po krvi v CŽS, je striktno kontrolirana preko KMP, ki skupaj s cerebrospinalno tekočino vodi v konstantno odplavljanje eksogenih substanc iz CŽS. Skupaj s KMP tvorijo endotelijske celice, bazalna lamina, periciti, astrociti in mikroglie fiziološki kompleks živčno-žilne enote. Substance, ki pridejo preko krvnožilnega sistema in želijo vstopiti v možgansko sredico, morajo preiti sistem KMP (14,15). Zgradbo tega fiziološkega kompleksa prikazuje slika 2.



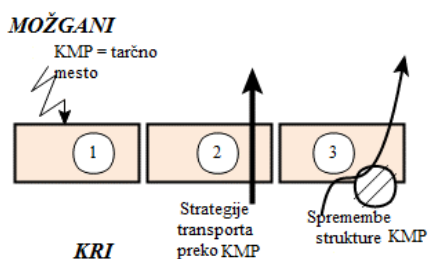
Slika 2: Shematski prikaz krvno-možganske pregrade in njej pripadajočih delov v žilno-živčni enoti; povzeto po (14).

Nizko in selektivno permeabilnost KMP omogočajo naslednje lastnosti pregrade: zmanjšana penetracija in pinocitoza, prisotnost tesnih stikov med endotelijskimi celicami vključujoč transmembranske proteine, astrocite (najštevilčnejša vrsta glia celic, najpomembnejše gradnice KMP) in pericite (imajo kontrolo nad angiogenezo, odlaganjem izvencelične tekočine, sodelujejo pri infiltraciji imunskih celic in regulirajo pretok krvi glede na potrebe možganov), prisotnost različnih črpalk (P-glikoprotein kot izločevalni prenašalec, GLUT1), sinergistično sodelovanje celic različnih tipov (makrofagi, astrociti, mikroglie), zmanjšana limfatična cirkulacija in filtracija (14,16). Spojine prehajajo KMP in vstopajo v možgansko tkivo preko različnih transportnih poti. Fiziološko le-te lahko vstopajo v možgane iz krvi preko naslednjih poti:

1. *Pasivna difuzija*: nepolarne substance, ki so lipofilnega značaja, prehajajo skozi membrano, hidrofilne molekule pa prehajajo preko tesnih stikov (ekstracelularno), vendar ne v neomejenih količinah. Priporočila za hidrofilne spojine so, da je njihova molekulska relativna masa < 500 , da ne ionizirajo, imajo vrednost $\log P$ blizu 2 in da skupno število H-vezi v molekuli ne presega 10.
2. *Transportni proteini*: vezava molekule na protein na eni strani membrane povzroči konformacijske spremembe le-tega, kar se izkaže kot izstop molekule na drugi strani membrane. Na ta način delujejo vstopni prenašalci za glukozo, aminokislino in iztočne črpalke (zagotavljanje homeostaze, komunikacije).
3. *Transcitoza*: makromolekule se preko mešička transportirajo na drugo stran membrane. Transcitoza je treh vrst, in sicer receptorsko posredovana (inzulin, transferin), pinocitoza (albumin in plazemski proteini) in celično posredovana oz. levkocitna (monociti, makrofagi) (14–17).

Patološke spremembe KMP in možnosti transporta preko KMP

Najpogostejši vzroki za nastanek sprememb na KMP so poškodbe, vnetja in degenerativni procesi. Pri nevroloških boleznih pride do patoloških procesov, ki se odražajo na zgradbi oz. integriteti ter funkciji KMP. V primeru AB pride do sprememb v prepustnosti membrane, torej v procesih difuzije in v receptorsko posredovani transcitozi (14,16,17). V kontekstu AB in KMP so z napredovanjem bolezni povezani tudi procesi produkcije in reabsorpcije cerebrospinalne tekočine, interakcij možganskega tkiva in cerebrospinalne tekočine ter različni mehanizmi nevronskega vnetja (17). Pri bolnikih z AB so ugotavljajo korelacijo med prizadetostjo KMP in poškodbami nevronov. Indikator za to je protitelo vrste IgG, ki nastaja na periferiji, vendar ga je ob večji prepustnosti CŽS in slabši integriteti KMP možno detektirati tudi v CŽS (18). Zaznati je tudi povečano izražanje transportnih proteinov, in sicer inzulinskega receptorja ter lipoproteinskega receptorja in zmanjšano izražanje receptorja za transferin. Le-ti se pri tehnologiji naprednih dostavnih sistemov uporabljajo kot tarče za načrtovanje novih terapevtskih možnosti, pri čemer ne gre zanemariti njihove fiziološke vloge (14). V preglednem članku v reviji za napredne dostavne sisteme za zdravilne učinkovine (ZU) so ugotavljali vlogo KMP v povezavi z AB. Obravnavali so tri vidike, kjer je KMP povezana z AB. Na sliki 3 je shematski prikaz teh vplivov.



Slika 3: Trije vidiki obravnave KMP (krvno-možganske pregrade) v povezavi z AB (Alzheimerjevo boleznijo); povzeto po (17).

1. KMP kot vzrok nastanka oz. napredovanja AB in posledično kot taka tarčno mesto za nove ZU.
2. Različne strategije transporta preko KMP (brez patoloških sprememb) z namenom dostave ZU v možgane za terapijo AB.
3. Upoštevanje strukturnih sprememb KMP kot posledica AB in implikacija teh sprememb na terapije istočasnih bolezni CŽS.

V prvem primeru je KMP obravnava kot vzrok nastanka AB in zato kot taka tudi tarčno mesto za načrtovanje dostave ZU. Navajamo nekaj pristopov. KMP izgublja na integriteti in obnova strukture oz. integritete membrane je ena izmed tarčnih mest delovanja. Druga možnost je zmanjšanje toka cerebrospinalne tekočine in povečanje privzema glukoze ter kisika, kjer se kaže nevroprotektivna vloga hormonov gastrointestinalnega trakta.

Drugi vidik obravnava KMP kot nespremenjeno pregrado in predlaga različne strategije transporta preko KMP. Strategije, ki jih predlagajo, so: modifikacija spojin z večjo afiniteto na IgG; načrtovanje učinkovin, ki so topne v lipidih, ne nujno majhnih molekul (navedeni so tudi primeri peptida iz 27 aminokislin); strategija protiteles; izkoriščanje endogenih prenašalcev.

Tretji vidik KMP v povezavi z AB pa je implikacija teh sprememb pri bolnikih z AB v odnosu do drugih pridruženih boleznih CZŠ. Pri teh bolnikih so spremenjene učinkovitost, varnost, terapevtsko okno, profil stranskih učinkov vseh zdravil, ki imajo delovanje v CZŠ. Potrebne so dodatne študije sočasne uporabe in PK (17).

1.3. Predvidevanje in vrednotenje prehoda KMP

Uspešnost vstopanja spojin v CZŠ oz. prehod spojin preko KMP je potrebno ovrednotiti. Pri tem se opremo na načela farmakokinetike, ki nam preko matematičnih modelov pove, kaj telo naredi s preiskovano spojino. PK je veda o hitrosti ter načinih procesov sproščanja, absorpcije, metabolizma, ekskrecije. Temelji na procesih LADME (L=sproščanje, A=absorpcija, D=distribucija, M=metabolizem, E=ekskrecija), dogajanje v telesu opisujemo z naslednjimi parametri: očistek, volumen distribucije, razpolovni čas in biološka uporabnost. Na podlagi teh lahko ocenimo, kaj se dogaja s substanco v telesu (6,19). Za oceno farmakokinetičnih parametrov merimo koncentracijo učinkovin v bioloških vzorcih, najpogosteje v urinu, mleku, slini, posušeni krvni kapljici (tu gre za neinvazivne metode), med invazivne metode pa prištevamo vzorčenje krvi ter spinalne tekočine in biopsijo tkiv. To so tako imenovane *in vivo* metode (20,21).

Glavni razlogi za zavrnitev velikega števila spojin kot kandidatki za nove ZU so tako imenovane slabe farmakokinetične lastnosti. Samo vzorčenje biološkega materiala ne zadošča za napoved ustrezne PK. Za napoved želenih farmakokinetičnih lastnosti potencialnih novih ZU so se razvile številne *in silico* ter *in vitro* metode. Pri načrtovanju spojin za prehajanje v CZŠ je potrebno upoštevati tudi fiziološko bariero KMP.

Izoblikovala so se številna priporočila, s katerimi lahko predvidimo prehajanje spojin skozi KMP. Vrstni red priporočil si sledi kronološko, torej od začetne faze (celotne knjižnice spojin) do končnega vrednotenja spojin vodnic (15,22).

1.3.1. Podatki *in silico*

Gre za tako imenovane računalniško podprte modele, ki so narejeni na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti spojin, na podlagi rezultatov pridobljenih iz predhodnih testiranj *in vitro* ali *in vivo*. Parametri za vrednotenje so vrednosti CŽS+ (prehaja KMP) oz. CŽS- (ne prehaja KMP), ki so pridobljeni iz predhodnih *in vitro* testiranja (22), ali vrednost logBB, ki predstavlja logaritem razmerja koncentracije spojine v možganih s koncentracijo spojine v krvi v stacionarnem stanju in je pridobljena z *in vivo* testi. Vrednost $\log BB > 0$ kaže na uspešno prehajanje preiskovane spojine skozi KMP v CŽS. Na osnovi teh vrednosti (CŽS+/CŽS- in logBB) so se oblikovale zbirke pravil in priporočil za predvidevanje prehoda KMP. Z različnimi *in silico* metodami je napovedna vrednost CŽS+/CŽS- v primerjavi z *in vitro* oz. *in vivo* meritvami 80%, vrednosti relativne napake logBB pridobljene *in silico* v primerjavi s tistimi, ki so bile pridobljene *in vivo*, pa so 0,3-0,4 enote (22,23).

Najbolj uveljavljena so pravila palca oz. pravila Lipinskega, ki priporočajo naslednje lastnosti spojine za prehod KMP: polarna površina 60-70 Å, skupno število atomov N in O ≤ 5 , $M_r < 450$, $\log P$ 1-5, $\log P - (N+O) > 0$ (22,24).

Molekulski parametri korelirajo z vrednostjo logBB na sledeče načine:

- Polarna površina je v obratnem sorazmerju z logBB, saj zaradi večjega števila H-vezi, oz. elektron akceptorjev/donorjev molekula postaja bolj polarna in težje prehaja KMP.
- Lipofilnost molekule oz. vrednost logP korelira pozitivno z vrednostjo logBB, vendar se kaže manj značilen vpliv kot pri polarni površini.
- Molekulski naboj vrednotimo glede na vrednost pH oz. pKa spojin. Pri pKa vrednostih nižjih od 4 in višjih od 10, spojine slabo prehajajo KMP, saj so ionizirane v krvi (pH=7,4). Vendar so uspeli dokazati, da spojine s pozitivnim nabojem boljše prehajajo KMP kot spojine z negativnim nabojem. Zato so spojine, ki so šibke baze, boljše za dostavo v CŽS kot šibke kisline (22).

1.3.2. Meritve *in vitro*

Tovrstne meritve nam dajo dodatne informacije o mehanizmu transporta preko KMP. Z njimi ne samo potrdimo prisotnost spojine v možganih, temveč tudi določimo stopnjo pasivne difuzije ali vrsto transporta preko specifičnih prenašalcev. Prednost teh meritev pred *in vivo* meritvami je, da lahko testiramo večje število spojin naenkrat. Za tovrstne meritve se uporabljajo različne umetne lipofilne membrane, ki oponašajo zgradbo in delovanje fiziološke membrane ter so namenjene analizam prepustnosti gastrointestinalnega trakta in KMP. Teste prepustnosti lahko izvajamo tudi na različnih celičnih kulturah, in sicer se kot najboljši model zaenkrat kažejo Caco-2 in MDCK-celične linije. Še boljši prikaz pa so celične linije, ki predstavljajo dinamični model KMP in zelo dobro oponašajo tesne stike, celične interakcije, saj z njimi lahko preučujemo različne mehanizme transporta na različnih fenotipih KMP (15).

1.3.3. Meritve *in vivo*

S tovrstnimi meritvami dobimo najbolj zanesljive informacije o PK preiskovane spojine. Zaradi zahtevnosti izvedbe in etičnih omejitev ne morejo biti edina možnost izbire (15,25). Najpogosteje se ocenjuje parameter $\log BB$ kot razmerje površin pod krivuljo (AUC) v možganih in v krvi. AUC predstavlja enega izmed osnovnih farmakokinetičnih parametrov, in sicer gre za podatek o koncentraciji spojine v odvisnosti od časa v preiskovanem biološkem vzorcu. S parametrom $\log BB$ dobimo podatke o absorpciji in distribuciji, ne pa o metabolizmu in izločanju. Preizkusi in meritve *in vivo* se izvajajo najpogosteje na miših in podganah (15,19). Drugi najpogostejši parameter je $\log K_{in}$, ki predstavlja kinetično konstanto in opisuje razmerje volumna distribucije v odnosu od časa. Prednost te metode je boljša napoved permeabilnosti, saj nam da podatek o koncentraciji proste spojine v možganih, za razliko od $\log BB$, ki upošteva le celokupno koncentracijo spojine v možganih. Težnja je, da parameter $\log K_{in}$ nadomesti $\log BB$ pri obravnavi in vrednotenju metod *in silico* (15,26).

1.4. Uveljavljanje novih učinkovin

Do uveljavitve nove zdravilne učinkovine v klinični praksi je dolga pot. Od odkritja potencialne nove učinkovine pa do pridobitve dovoljenja za promet za zdravilo lahko preteče tudi 15 let. Prva faza je tako imenovana »Predklinična faza«, kjer je potrebno zagotoviti varnost in učinkovitost *in vitro* oz. *in vivo* na podlagi laboratorijskih eksperimentov ali poskusov na živalih. V kolikor rezultati kažejo na obetavni terapevtski

učinek in zadostno mero varnosti, se lahko vloži vloga za odobritev izvajanja kliničnih testiranj, začevši s testiranjem na zdravih prostovoljcih. Klinična testiranja se izvajajo v treh fazah (27).

Faza I: Klinična testiranja na zdravih prostovoljcih, velikost populacije 20-80 posameznikov, cilj je pridobiti podatke o učinkovitem doziranju oz. pridobiti ustrezne farmakokinetične parametre (27,28).

Faza II: V tem koraku se testiranja izvedejo na večjem vzorcu, 200-800 bolnikov, z namenom ugotovitve želenih in neželenih učinkov oz. rizičnih faktorjev.

Faza III: Ko je dokazana učinkovitost zdravila na manjši populaciji bolnikov, se razvoj premakne v tretjo fazo. Tu se dodatno pridobiva podatke o učinkovitosti in varnosti.

Če zdravilo uspešno preide skozi zgoraj omenjene faze, lahko proizvajalec vloži dovoljenje za promet. S tem pa zgodba še ni zaključena, saj se tudi po odobritvi zdravilo spremlja v tako imenovani fazi IV in farmakovigilanci (28). V Evropi je za vzpostavitev znanstvenih smernic za regulativo na področju humane medicine odgovorna EMA (Evropska agencija za zdravila) (29), medtem ko je to v ZDA naloga FDA (30).

V predklinični fazi se tako izvajajo farmakološko-toksikološka testiranja. Treba je razviti ustrezno analizo metodo za pridobivanje parametrov farmakokinetike in toksikologije – toksikokinetika. V smernicah za analize metode FDA predpisuje, da naj bi bile analize metode specifične za preiskovano spojino z zadovoljivo natančnostjo in točnostjo. Prav tako postavlja zahteve glede limita kvantifikacije. Navaja tudi, da je treba pridobiti podatke o morebitnih interferencah z biološkim materialom (biološke tekočine in tkiva). Omenjene so še zahteve za racemate, enantiomere. Zaželeno je, da se ista analizo metoda uporabi tudi nadalje v kliničnih študijah (28,31).

1.5. Analiza spojin v biološkem materialu

Gre za tako imenovano bioanalizo, ki je podvrsta skupine farmacevtske analize in pokriva detekcijo zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov v biološkem materialu (32).

Biološki vzorci so izredno kompleksni in učinkovine v njih so prisotne običajno v nizkih koncentracijah. Kljub temu da so v uporabi sodobne in visoko učinkovite naprave za izvajanje analiz, je še vedno potrebna predhodna priprava biološkega vzorca.

Koraki za izvedbo klasične bioanalizne metode, so sledeči:

1.5.1. Vzorčenje

Biološki vzorec vzorčimo ob točno določenih časovnih točkah. Vedno poskušamo vzorčiti najmanjšo količino biološkega vzorca (32). V primeru, ko imamo opravka z živalskimi vzorci, moramo slediti istim pravilom kot za manipulacijo s človeškimi (28).

Vzorec jemanja je vedno polna kri, v kolikor želimo uporabiti serum ali plazmo za nadaljnjo analizo, moramo to izvesti takoj oz. v najkrajšem možnem času. Če takojšnja analiza ni mogoča, je treba vzorce shraniti v zamrzovalniku pri temperaturi -21°C , pogosto pa so izpostavljeni tudi nižjim temperaturam do -86°C . V tem primeru mora preiskovana spojina preстати tudi stabilnostna testiranja pri pogojih odmrzovanja/zamrzovanja (32).

1.5.2. Priprava vzorca

Ta faza je ključna pri pripravi vzorca za uspešno bioanalizo in je tudi časovno najbolj zamuden korak. Vzroki za to so sledeči:

- a) biološki vzorci lahko vsebujejo eno ali več substanc, ki dajejo napačne odzive oz. interferirajo s preiskovanim analitom,
- b) biološki vzorci lahko vsebujejo substance, ki kontaminirajo ali poškodujejo analizni instrument,
- c) koncentracija preiskovanega analita je lahko tako zelo nizka, da je ne moremo zaznati,
- č) biološki vzorci so lahko nekompatibilni z analiznim instrumentom (32).

V tem koraku se tako lahko poslužimo različnih strategij za čiščenje vzorca. Najpogostejši pristopi uporabljeni v farmacevtskih laboratorijih so: obarjanje proteinov, ekstrakcija tekoče-tekoče, ekstrakcija trdno-tekoče, ekstrakcija na trdnih nosilcih (SPE). S tem korakom želimo doseči naslednje: odstraniti neželene komponente matriksa, povečati koncentracijo analita za doseganje boljšega odziva in enostavnejše kvantificiranje, zamenjava topila, ki je ustrežnejše za kromatografski sistem oz. za nadaljnjo analizo (32). V magistrski nalogi smo se ukvarjali predvsem z izolacijo iz možganskega tkiva in krvi oz. plazme. Naš biološki vzorec je bil pridobljen iz toksikoloških študij na podganah. Spojine smo preiskovali v možganih in v plazmi.

V predhodnih študijah so za AChE zaviralce oz. za izolacijo le-teh iz biološkega materiala uporabili predvsem ekstrakcijo tekoče-tekoče in SPE. V eni izmed študij PK so uporabili metodo SPE za pripravo in določitev koncentracije galantamina in donepezila v možganskih vzorcih in v vzorcih plazme. Tako plazemski kot možganski vzorci so bili pripravljani na isti način, homogenizacija biološkega vzorca, obogateni vzorci za kalibracijo in analizo kontrolnih vzorcev ter ekstrahirani z metodo SPE. Za trdni nosilec je

bila uporabljena kartuša Oasis HLB (1 mL, 30 mg, Waters) z reverzno stacionarno fazo, ekstrakcija pa je potekala preko aktivacije z metanolom, ekvibracije s prečiščeno vodo, nanosom vzorca in nadaljnjim spiranjem z mešanico metanola in vode ter elucijo z metanolom. Validacija metode ni navedena (33). Ekstrakcija tekoče-tekoče v primeru donepezila in njegovih metabolitov je bila izvajana samo na vzorcih plazme. Metoda je bila tudi validirana (34), ekstrakcije AChE zaviralcev iz možganskih vzorcev na način tekoče-tekoče literatura ne navaja.

1.5.3. Separacija oz. ločitev

Standardna metoda v postopku ločitve pri bioloških vzorcih je kromatografija. Kromatografija je tehnika, pri kateri se komponente vzorca porazdeljujejo med stacionarno in mobilno fazo (tekočina, plin) s procesi sorpcije oz. desorpcije. V primeru tekoče mobilne faze so možne naslednje kromatografske metode: kiralna, ionsko-izmenjevalna, ionsko-afinitetna, normalno fazna, reverzno fazna in izključitvena. Najpogostejše so reverzno fazne kromatografije, in sicer na C18 nosilcih na tankih, kratkih in zelo učinkovitih kolonah visokotlačne tekočinske kromatografije (32,35).

1.5.4. Detekcija in identifikacija

Pri večini bioloških vzorcev je masni detektor (MS) metoda izbire. MS je običajno sklopljen s separacijskim instrumentom tekočinske kromatografije, saj lahko neposredno iz ločitve kromatografskih vrhov in z masno razklopitvijo (iz starševskih na hčerinske ione) poleg separacije istočasno opravimo tudi identifikacijo (32).

1.5.5. Kalibracija in kvantifikacija

Kalibracijo izvajamo običajno z uporabo metode eksternega ali internega standarda. Za uporabo internega standarda se priporoča uporaba spojin, ki so izotopsko označene verzije analita, ki pa so sorazmerno drage. Z internim standardom eliminiramo napake zaradi neponovljive ekstrakcije, variabilnosti pri volumnu injiciranja, hlapnosti topil. Kvantifikacijo opravimo s standardnimi raztopinami in pripravo umeritvenih premic (32).

2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je razvoj analizne metode za detekcijo prehoda spojin v možgane, ki specifično zavirajo samo butirilholin esterazo. To so: GUK-779, GUK-791 in donepezil (ni specifičen zaviralec butirilholin esteraze, zavira tudi acetilholin esterazo). Prehodnost bomo določevali tudi spojinam CB-14948874, ki je izkazovala najboljšo permeabilnost v okviru raziskav predhodne magistrske naloge, ter GUK-772 in takrinu. Razvoj metode je potreben za nadaljnjo izvedbo predkliničnih in kliničnih študij za pridobitev informacij o varnosti in učinkovitosti novih spojin.

Najprej bomo razvili kromatografsko metodo za tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti sklopljeno z masnim detektorjem vrste trojni kvadrupol. Kromatografska metoda bo potrebna za detekcijo in kvantifikacijo izbranih učinkovin.

Predhodno bo treba razviti še metodo za učinkovito ekstrakcijo iz možganskega tkiva podgane. Najprej bomo razvili in testirali postopek ekstrakcije na trdnih nosilcih (SPE) za raztopino standardov brez zahtevanega matriksa, ugotovili morebitne izgube in jih preprečili z optimizacijo postopka. Ekstrakcijo bomo začeli na kartušah Strata XC, v primeru, da se izkažejo za neučinkovite, bomo poskusili še na drugih kartušah.

Delo bo potekalo z vzorci možganskega tkiva netretiranih podgan, ki bodo obogateni z raztopino preiskovanih spojin. Ko bomo določili optimalne pogoje, bomo skušali določiti koncentracijo izbranih učinkovin tudi na realnih možganskih vzorcih podgan, ki so prejemale intraperitonealno aplicirane izbrane učinkovine.

Postavljeno metodo bomo skušali validirati po smernicah ameriške agencije za hrano in zdravila FDA za validacijo bioanaliznih metod. Osredotočili se bomo predvsem na specifičnost, točnost, ponovljivost, mejo določitve, linearnost, stabilnost, izkoristek in učinek matrice.

Na isti način bomo obravnavali še plazemske vzorce, ki jih bomo prav tako obogatili z raztopino standardov, da zagotovimo ustreznost metode tudi na tem biološkem materialu, saj je ključen za nadaljnje farmakokinetične raziskave, npr. za določanje porazdelitve preko krvno-možganske pregrade ter ostalih farmakokinetičnih parametrov.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. REAGENTI

Preglednica II: Pregled uporabljenih topil.

TOPILO	PROIZVAJALEC
Metanol, Chromasol V	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, ZDA
Acetonitril, Chromasol V	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, ZDA
Ocetna kislina	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
Mravljična kislina	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
Heksan	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, ZDA
Etilacetat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, ZDA
Ortofosforna kislina	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
Amoniak 25%	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
Natrijev dihidrogenfosfat hidrat	Merck Chemicals, Darmstadt, Nemčija
0,1 M HCl	
0,1 M Natrijev hidroksid	

3.2. RAZTOPINE

3.2.1. Standardne raztopine preiskovanih spojin

PRVA ZATEHTA za razvoj metode in kalibracijo:

- osnovna raztopina 1 mg/mL TAKRIN: 10,51 mg takrina s 95% čistostjo raztopimo v 10 mL metanola ($c_{\text{takrin}} = 0,99$ mg/mL)
- osnovna raztopina 1 mg/mL CB-14948874: 1,00 mg raztopimo v 1 mL metanola ($c_{\text{CB}} = 1,000$ mg/mL)
- osnovna raztopina 1 mg/mL DONEPEZIL: 9,99 mg raztopimo v 10 mL metanola ($c_{\text{donepezil}} = 0,999$ mg/mL)
- osnovna raztopina 1 mg/mL GUK-791: 10,00 mg raztopimo v 10 mL metanola in za 2 min postavimo na ultrazvočno kopel ($c_{\text{GUK-791}} = 1,00$ mg/mL)
- osnovna raztopina 1 mg/mL GUK-779: 9,98 mg raztopimo v 10 mL metanola ($c_{\text{GUK-779}} = 0,998$ mg/mL)

f) osnovna raztopina 1 mg/mL GUK-772: 9,99 mg raztopimo v 10 mL metanola in za 3 min postavimo na ultrazvočno kopel ($c_{\text{GUK-772}} = 0,999 \text{ mg/mL}$)

DRUGA ZATEHTA za kontrolne vzorce QC:

a) osnovna raztopina TAKRIN: 10,51 mg raztopimo v 10 mL metanola ($c_{\text{takrin}} = 1,051 \text{ mg/mL}$)

b) osnovna raztopina 1 mg/mL DONEPEZIL: 10,56 mg raztopimo v 10 mL metanola ($c_{\text{donepezil}} = 1,056 \text{ mg/mL}$)

c) osnovna raztopina 1 mg/mL GUK-791: 10,00 mg raztopimo v 10 mL metanola in za 2 min postavimo na ultrazvočno kopel ($c_{\text{GUK-791}} = 1,000 \text{ mg/mL}$)

d) osnovna raztopina 1 mg/mL GUK-779: 10,00 mg raztopimo v 10 mL metanola ($c_{\text{GUK-779}} = 1,000 \text{ mg/mL}$)

CB nismo mogli ponovno natehtati, ker smo ga lahko dobili le v količini 1 mg. Uporabili smo isto osnovno raztopino iz prve zatehte za razvoj metode in kalibracijo.

Osnovna raztopina internega standarda – ločena priprave raztopina:

Kot interni standard smo uporabili haloperidol. Osnovna raztopina je bila pripravljena iz standardne raztopine v laboratoriju s koncentracijo $22,5 \mu\text{g/L}$, in sicer z redčenjem 1 mL na 10 mL z 0,1% očetno v 80% metanolu.

Določitev fizikalno-kemijskih lastnosti:

S prosto dostopnim programom Molinspiration smo določili molekulsko relativno maso (M_r) ter koeficient porazdelitve ($\log P$).

3.2.2. V laboratoriju pripravljena topila

a) vodna raztopina NaH_2PO_4 ; $\text{pH}=7,00$: Natehtali smo 6,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in ga raztopili v 900 mL prečiščene vode ter uravnali na $\text{pH}=7,00$ z 0,1 M NaOH.

b) vodna raztopina metanola: 50% raztopina metanola v vodi

c) raztopina amoniaka v organskem topilu: 5% raztopina amoniaka v organskem topilu (organsko topilo pripravljeno iz metanola in acetonitrila v razmerju 1:1)

d) raztopina metanola v 0,1% raztopini očetne kisline: 100% očetno kislino redčimo v razmerju 1:100 z 20 %, 50% in 80% raztopino metanola

e) raztopina metanola v 0,01 M HCl: 20% metanola v vodni raztopini 0,01 M HCl

f)) raztopina acetonitrila v 0,1% raztopini očetne kisline: 100% očetno kislino redčimo v razmerju 1:100 s 50% raztopino acetonitrila

- g) raztopina amoniaka v vodi, pH=11: vodna raztopina amoniaka umerjena na pH=11
- h) vodna raztopina 0,01 M HCl: 10 mL 0,1 M HCl razredčimo na 100 mL s prečiščeno vodo
- i) vodna raztopina 2% fosforne kisline: 20 μ L koncentrirane fosforne kisline (85%) razredčimo na 1 mL s prečiščeno vodo
- j) vodna raztopina 1% formične kisline: 10 μ L koncentrirane formične kisline razredčimo na 1 mL s prečiščeno vodo

Opomba: Če ni drugače označeno, označene enote pomenijo volumske odstotke.

3.3. BIOLOŠKI VZORCI

Realne vzorce smo pridobili iz predhodnih študij toksičnosti.

Možgane smo dobili iz predhodnih toksikoloških študij, ki so jih opravili na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani, in sicer na Inštitutu za Patofiziologijo. Študijo je odobrila Etična komisija za poskuse na živalih (št. vloge: U34401-2/2015.)

3.4. LABORATORIJSKA OPREMA IN APARATURE

Preglednica III: Pregled laboratorijske opreme in aparatur za razvoj in validacijo metode

Plastične epruvete oz. mikrocentrifugirke	Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija
SPE KARTUŠA: Bond Elut 96 Plexa PCX	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, ZDA
SPE KARTUŠA: Strata-XC, 33 μ m Cation Mixed Polymeric Sorbent	Phenomenex, Torrance, CA, ZDA
Viale z inserti za viale	
Skalpel	
Plastični podstavek za rezanje	
Tehtnica (za osnovne raztopine)	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica
Tehtnica (za biološke vzorce)	Kern, Nemčija
Ultrazvočna kadička – Sonis 4	Iskra Pio, d. o. o., Šentjernej, Slovenija

Homogenizator Bullet Blender®	Next Advance, Inc., NY, ZDA
0,5 mm steklene kroglice GB05	Next Advance, Inc., NY, ZDA
Centrifuga – Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
TurboVap®	Caliper Life Sciences, Inc., Hopkinton, MA, ZDA
Mešalnik (Vortex) – Vibromix 10	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Programska oprema Masshunter	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, ZDA
UHPLC Infinity 1290 v povezavi z MS/MS – 6460 TripleQuad LC/MS	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, ZDA
Brezoljna vakuumska SPE črpalka – Gast DOA-P504- BN	Gast, ZDA
Pipete – 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL	Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija
Nastavki za pipete: TipOne RPT (1-200 µL, 1000 µL)	Starlab, Ahrensburg, Nemčija
Nastavki za pipete: Low Retention-Reloads, Eppendorf Quality (1-200 µL, 1000 µL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Nastavki za pipete Qualitips (1-200 µL, 1000 µL)	Socorex, Švica
Mikrocentrifugirke ali Eppendorfove epruvete	Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija
Hladilnik (3°C) z zamrzovalnikom (-20°C)	Gorenje, Velenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80°C)	Sanyo Electric Biomedical, Osaka, Japonska

3.5. METODE

3.5.1. Priprava delovne standardne raztopine 1 (DR1)

Pripravimo standardne raztopine za kalibracijo v koncentracijskem območju, ki ga pričakujemo v naših bioloških vzorcih. Pričakovano območje za donepezil je po izvlečkih

literature v območju 10 ng/g možganskega tkiva (33,36). Osnovne raztopine standardov redčimo 30-tisočkrat s 50% metanolom, in sicer 50 µL osnovne raztopine standarda s koncentracijo 1 g/L redčimo na 50 mL. Vzamemo 750 µL raztopine prve redčitve in ponovno redčimo na 25 mL. Koncentracija spojin v tako pripravljene raztopini je 30 µg/L. Odločimo se za volumen 50 µL standardne raztopine, s katero bomo obogatili naše možganske homogenate, za razvoj in kalibracijo ekstrakcijske metode. S 50 µL DR1 naneseemo 1,5 ng posamezne spojine na 150 mg možganskega tkiva oz. biološkega vzorca, kar ustreza koncentraciji iz literature (33,36).

3.5.2. Priprava delovne standardne raztopine 2 (DR2)

Glede na rezultate možganskih vzorcev predhodno tretiranih podgan smo določili nova pričakovana koncentracijska območja. Tako smo v osnovni standardni raztopini koncentracijo GUK-779 povečali za faktor 5, koncentracijo donepezila pa za faktor 100. Nove standardne raztopine pripravimo na naslednji način: 50 µL osnovne raztopine standarda CB, takrin GUK-791 in GUK-772 ter 250 µL GUK-779 in redčimo na 50 mL z 0,1% oetno kislino v 80% metanolu (topilo smo optimizirali tekom razvoja metode). Vzamemo 750 µL tako pripravljene raztopine in ji dodamo še 75 µL osnovne raztopine standarda donepezil in redčimo na 25 mL. S 50 µL obogatitvijo možganskega tkiva oz. biološkega vzorca naneseemo 1,5 ng takrina, CB, GUK-791 in GUK-772, 7,5 ng GUK-779 in 150 ng donepezila.

3.5.3. Homogenizacija možganskega tkiva

Možgansko tkivo razrežemo na koščke in natehtamo 150 mg za enkratni vzorec v mikrocentrifugirko velikosti 2 mL. Dodamo steklene kroglice 0,5 mm, in sicer 1,5 odmerne žličke, kar je volumsko enako volumskemu deležu tkiva. Za razvoj metode uporabimo 50 µL te raztopine, medtem ko za validacijo uporabimo drugačne volumne. Za umeritveno krivuljo uporabimo volumne delovne raztopine standardov 10/25/50/100/200 µL iz DR2 pripravljene iz prve zatehte za razvoj metode in kalibracijo, za QC-vzorke pa 15/75/150 µL iz DR2 pripravljene iz druge zatehte za kontrolne vzorce. Nato dodamo k tkivu 300 µL pufra. Mikrocentrifugirko zapremo in postavimo v homogenizator Bullet Blender®. Pazimo, da uravnotežimo mikrocentrifugirke v homogenizatorju. Homogeniziramo 3 minute pri hitrosti 8. V primeru nezadostne homogenizacije postopek ponovimo, in sicer pri hitrosti 9 prav tako 3 minute.

Za homogenizacijo in nadaljnjo ekstrakcijo smo tekom razvoja metode preizkusili štiri različna topila:

- ER1: 0,01M HCl v 20% metanolu
- ER2: 0,1% očetna kislina v 50% metanolu
- ER3: 0,1% očetna kislina v 80% metanolu
- ER4: 0,1% očetna kislina v 50% acetonitrilu

3.5.4. Centrifugiranje

Naslednji korak v pripravi možganskega vzorca je centrifugiranje. Homogenat v mikrocentrifugirki postavimo v centrifugo, pazimo, da je le-ta uravnotežena. Centrifugiramo pri $T=21^{\circ}\text{C}$, s hitrostjo 10.000 RPM pri 9300-kratnem gravitacijskem pospešku, 7 minut. Nastali supernatant (približno 250 μL) s pipeto prenesemo v novo 2 mL mikrocentrifugirko. Možganski vzorec še enkrat speremo z 800 μL pufra. Uporabimo 0,1% očetno v 80% MeOH. Mikrocentrifugirko postavimo v centrifugo in ponovno izvedemo centrifugiranje pri istih pogojih, tj. pri $T=21^{\circ}\text{C}$, hitrosti 10.000 RPM, 7 minut. Novonastali supernatant s pipeto prenesemo v mikrocentrifugirko in združimo s predhodno zbranim supernatantom.

3.5.5. Ekstrakcija na trdnih nosilcih

Kartuša: Strata-XC

Odločimo se za kartuše z reverzno stacionarno fazo za močno kationsko izmenjavo. Ker so naši analiti šibke baze močno lipofilnega značaja, so kartuše za kationsko in nepolaro izmenjavo najustreznejša izbira. Adsorbent omogoča vezavo analita v pore stacionarne faze, medtem ko se velike endogene substance iz možganskega vzorca (fosfolipidi, proteini) sperejo in ne vežejo. Prav tako se sperejo kisle nečistote (37).

Postopek izvedbe ekstrakcije je sledeč:

Predhodno homogeniziran in centrifugiran vzorec možganov najprej razredčimo z 1 mL pufra soli NaH_2PO_4 s $\text{pH}=7$. Sledimo protokolu:

- kondicioniranje: 2 mL metanola
- ekvilibracija: 2 mL pufra NaH_2PO_4 s $\text{pH}=7$
- nanos vzorca
- spiranje:

a) 2 mL vode

b) 2 mL metanola.

Po spiranju vzorec sušimo 2 minuti pri podtlaku, s tem zagotovimo čim večji pretok zraka. Do tu vse ostanke zbiramo v odpad. Tlak na črpalki ves čas uravnavamo, da zagotovimo konstantni pretok približno 4 mL/min.

Elucija: z 1 mL 5% amoniaka v mešanici metanol:acetonitril=1:1

Eluat zbiramo v 1,5 mL v mikrocentrifugirko s pretokom 1mL/minuto.

Kartuša: Bond Elut Plexa PCX, 30 mg, 3 mL

Kartuše Bond Elut Plexa Agilent Technologies so kartuše z reverzno stacionarno fazo z močnim kationskim in nepolarnim izmenjevalcem. Namenjene so koncentriranju oz. čiščenju bazičnih analitov in odstranjevanju nevtralnih ter kislih nečistot (38).

Za boljšo izvedbo analize predhodno homogeniziran in centrifugiran vzorec razredčimo z 1 mL 2% H₃PO₄. Sledimo protokolu:

- kondicioniranje: 2 mL metanola
- ekvilibracija: 2 mL vode
- nanos vzorca
- spiranje

a) 2 mL 2% formične kislina

b) 2 mL metanol:acetonitril=1:1.

Po spiranju vzorec sušimo 2 minuti pri povišanem tlaku, da zagotovimo pogoje podtlaka. Do tu vse ostanke zbiramo v odpad. Tlak na črpalki ves čas uravnavamo, da zagotovimo konstantni pretok približno 4 mL/min.

Elucija: z 1 mL 5 % amoniaka v mešanici metanol:acetonitril=1:1

3.5.6. Sušenje in rekonstitucija

Eluiran vzorec is SPE smo posušili z napravo TurboVap, pri čemer so bili vzorci v mikrocentrifugirkah potopljeni v vodno kopel s 60°C. Z vrha pa je posebna šoba pod kotom preprihovala površino z dušikom pri povečanem tlaku. Vzorec smo rekonstituirali oz. ponovno raztopili v 200 µL 0,1% očetne kisline v 80% metanola.

3.5.7. Kromatografska ločba in analiza vzorcev

Zaradi pričakovanih izredno nizkih koncentracij preiskovanih spojin v bioloških vzorcih smo se odločili za analizo z metodo UHPLC-MS/MS. Gre za tandemski masni spektrometer, kjer sta povezana dva masna filtra.

Nastavitve UHPLC-MS/MS za analizo

Nastavitve UHPLC-dela

Kolona

Temperatura kolone: 50 ° C

Volumen injiciranja: 2,5 µL

Čas analize: 2,80 min

Mobilna faza:

Topilo A = 0,1 % raztopina mravljinčne kisline v milliQ vodi

Topilo B = 100 % acetonitril

Gradientna elucija

Preglednica IV prikazuje spreminjanje hitrosti pretoka in sestave mobilne faze s časom pri tekočinski kromatografiji. Prvi stolpec »Čas« so časovni koraki sprememb v analizi vsakega posameznega vzorca.

Preglednica IV: Spreminjanje pretoka in sestave mobilne faze pri tekočinski kromatografiji

Čas [min]	Pretok [mL/min]	Delež topila B [%]
0,25	0,65	15
0,50	0,65	28
1,00	0,65	45
1,25	0,65	55
2,00	0,65	65
2,10	0,65	10

Nastavitve MS QQQ MS

Parametri ionskega izvora:

Vir ionizacije: Agilent Jet Stream ESI (electrospray ionization)

Temperatura sušilnega plina: 275 °C

Pretok plina 5 L/min

Nebulizer : 45 psi

Temperatura plašča: 320 °C

Pretok plina v plašču: 11 L/min

Napetost na kapilari: 4000 V

Napetost na šobi: 1000 V

Preglednica V: Parametri trojnega kvadrupola

Analit	Prekurzorski ion [m/z]	Hčerinski ion (sekundarni)	Čas vzorčenja [ms]	Fragmentor [V]	Kolizijska energija [eV]	polariteta ionizacije
GUK-772	479,2	117,1 91,1	20	90	53	pozitivna
GUK-791	453,2	127 91,1	20	210	49 61	pozitivna
GUK-779	443,3	155,1 117,1	20	90	37 53	pozitivna
donepezil	380,2	91 65	20	86	37 97	pozitivna
CB	339,2	200,1 115	20	86	17 73	pozitivna
takrin	199,1	171 144	20	124	33 45	pozitivna

3.6. Obravnava rezultatov in validacija metode

Metodo določanja AChE in BChE zaviralcev v možganih in v krvi želimo uporabiti za nadaljnje farmakokinetične in klinične študije. Zato želimo analizni postopek tudi validirati. S procesom validacije zagotovimo, da uporabljena metoda daje rezultate, ki so zanesljivi in posledično je postopek uporaben za nadaljnje obravnave. Pri tem smo se držali smernic za validacijo bioanaliznih metod, ki jih predpisuje ameriška agencija za hrano in zdravila FDA (31).

Življenjski cikel razvoja bioanalizne metode za kvantifikacijo nekako prehaja skozi naslednje faze.

Preglednica VI: Strategija za razvoj bioanalizne metode (povzeto po (39)).

FAZA	Uporabnost	Vrsta metode	Pomembni validacijski parametri
RAZISKAVE	Preliminarne študije PK, metabolizma na živalih	Preliminarna	Specifičnost (AUM, PE, RE) stabilnost (kratkotrajna)

ZAČETNI RAZVOJ	Toksikokinetika in ADME	Predklinična	Ponovljivost, natančnost, kalibracijska krivulja s QC-ji
KONČNI RAZVOJ	Klinična faza I	Klinična	Natančnost, točnost, ponovljivost med serijami, dolgotrajna stabilnost
	Klinična faza II, III, IV	Polno avtomatizirana	Veliki vzorci oz. serije vzorcev

Razvoj naše metode je namenjen za začetni razvoj, zato bomo skušali validacijo izvesti glede na naslednje parametre: ponovljivost, limita kvantifikacije, območje, linearnost, točnost, specifičnost, izkoristek in učinek matrice ter stabilnost (31,39,40).

3.6.1. Ponovljivost

Ponovljivost je eden izmed parametrov natančnosti. Gre za parameter ujemanja med rezultati medsebojno neodvisnih meritev istega homogenega vzorca pod enakimi delovnimi pogoji v kratkem časovnem obdobju. Izražena je kot standardna deviacija ali relativna standardna deviacija serije meritev, predvidenih je vsaj 5 ponovitev pri vsaj 3 različnih koncentracijah. Relativna standardna deviacija mora biti manjša od 15%, razen pri LLOQ, ko je le-ta lahko manjša od 20%. Ponovljivost se deli še na ponovljivost znotraj serije, med serijami oz. znotraj dnevnega ali meddnevnega ponovljivost. Ponovljivost izračunamo na sledeči način:

$$RSD [\%] = \frac{\sigma}{\bar{y}} * 100 \quad (\text{enačba 1})$$

\bar{y} = povprečna vrednost odzivov; σ = standardni odklon (31).

3.6.2. Limita kvantifikacije oz. spodnja meja določljivosti (LLOQ)

Najnižji standard umeritvene krivulje se določi kot limita kvantifikacije oz. spodnja meja določljivosti (LLOQ). LLOQ je sprejeta, če zanjo veljata ustrezna točnost in natančnost. Odziv analizirane spojine mora biti identifikacijski, diskreten in ponovljiv z natančnostjo 20% in v območju točnosti 80-120%. Odziv LLOQ mora biti najmanj 5-krat višji od odziva vzorca brez analizne spojine (31).

3.6.3. Območje

Ko govorimo o območju analiznega postopka, se le-to nanaša na interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo, pri kateri sta še ustrezna točnost in ponovljivost. Pri metodi UHPLC-MS/MS ciljamo na konstanto (linearno) zvezo med koncentracijo in odzivom, vendar ta korelacija ni nujno linearna. Območje je običajno omejeno z linearnim odzivom

analita. S širšim območjem se tako ognemo redčenju vzorca, vendar moramo biti previdni, da ostanemo v dinamičnem območju detektorja. Naše območje je bilo omejeno s spodnjo mejo določljivosti (LLOQ), ki je pripadla koncentraciji raztopine najnižjega kalibratorja, navzgor pa smo ga omejili z maksimalno koncentracijo zadnje točke umeritvene krivulje (31,39).

3.6.4. Kalibracijska oz. umeritvena krivulja in linearnost

Kalibracijska oz. umeritvena krivulja opisuje razmerje med odzivom instrumenta in znano koncentracijo analizne spojine. Konstruirana mora biti za vsako preiskovano spojino, in sicer z obogatitvijo preiskovanega biološkega vzorca z znano koncentracijo standardne raztopine preiskovane spojine. Koncentracijsko območje določimo glede na preiskovano območje posamezne spojine, pri čemer moramo vključiti vsaj 6 različnih točk in slepi vzorec (31).

Izračunane vrednosti standardov, razen standarda na spodnji meji določljivosti, smejo odstopati manj kot 15% od njihove nominalne vrednosti. Za spodnjo mejo določljivosti je dovoljeno 20% odstopanje. Pogojem mora zadostiti vsaj 75% standardov.

$$y = k * x + n \quad (\text{enačba 2})$$

k = naklon premice, **n** = odsek na ordinati, **x** = koncentracija ali neodvisna spremenljivka, **y** = razmerje odzivov analita in internega standarda ali odvisna spremenljivka (31,39).

Umeritveno premico smo določali v računalniškem programu MS Excel. Ker je območje pri metodi UHPLC-MS/MS lahko nelinearno, določimo razmerje med odzivom in koncentracijo analizne spojine s pomočjo utežitvenega faktorja. Utežitveni faktor predstavlja obratno vrednost koncentracije analita oz. obratno vrednost kvadrata koncentracije ($1/x$ ali $1/x^2$; x = koncentracija analita) in se določi s pomočjo funkcije Reševalec v programski opremi MS Excel, kjer x predstavlja koncentracijo analita (41).

3.6.5. Točnost

Parameter točnosti nam opiše, kako blizu je meritev posameznega vzorca glede na pričakovano oz. referenčno vrednost. Točnost se izračuna z vsaj 5 določitvami koncentracije na 3 točkah v pričakovanem koncentracijskem razponu. Za to običajno uporabimo QC-vzorke. Točnost oz. odstopanje od referenčne vrednosti ne sme presežati 15%. Izjema je LLOQ, kjer je to odstopanje lahko +/- 20%.

Točnost podamo kot *odstopanje* in jo izračunamo na sledeči način(31):

$$c \text{ (izračunana)} = \frac{y-n}{k} \quad (\text{enačba 3})$$

y, n, k = parametri umeritvene premice

$$\text{odstopanje [\%]} = \frac{100 (c \text{ izračunana} - c \text{ referenčna})}{c \text{ referenčna}} \quad (\text{enačba 4})$$

c izračunana = povprečna vrednost izračunanih koncentracij pridobljenih z analizo

c referenčne = predpisana oz. pričakovana koncentracija

3.6.6. Specifičnost in učinek matrice

S parametrom specifičnost opišemo sposobnost analizne metode, da kljub prisotnosti drugih komponent v biološkem vzorcu naša postavljena metoda detektira in kvantificira našo iskano komponento. Specifičnost določimo tako, da odziv slepega vzorca ustreznega biološkega tkiva primerjamo z odzivom obogatene biološkega vzorca na spodnji meji določitve (31).

Učinek matrice mora biti ocenjen, v kolikor imamo opravka z biološkimi vzorci, da zagotovimo parametrom točnosti, natančnosti in občutljivosti (31). Do učinka matrice pride zaradi prisotnosti številnih endogenih substanc v biološkem materialu (fosfolipidi, beljakovine itn.), ki lahko spremenijo ionizacijo ali porazdelitev preiskovanih komponent, zato pride do različnih odzivov. Eliminiranje učinka matrice je ključno za pridobitev oz. zagotovitev zanesljivih bioanaliznih podatkov o farmakokinetiki (40). Učinek matrice ocenimo kot absolutni in relativni učinek matrice.

Absolutni učinek matrice (AUM)

Učinek matrice določimo tako, da primerjamo odziv analita obogatene biološkega vzorca po ekstrakciji z odzivom analita v čistem topilu. V obeh vzorcih mora analit nastopati v isti koncentraciji. Na tak način določimo *absolutni učinek matrice*:

$$\text{AUM [\%]} = \frac{\text{odziv naknadno obogatene vzorca možganov}}{\text{odziv analita v čistem topilu}} * 100 \quad (\text{enačba 5})$$

Relativni učinek matrice (RUM)

Pri validaciji bioanalizne metode je pomembnejši in bolj reprezentativen parameter *relativni učinek matrice* (RUM). Relativni učinek matrice se nanaša na primerjavo različnih vrednosti AUM med različnimi viri bioloških vzorcev. Relativni učinek matrice lahko ocenimo na dva načina. Prvi način je, da pripravimo QC vzorce v »praznem« biološkem materialu iz vsaj 6 različnih osebkov ter nato izračunamo absolutne učinke

matric, iz njih pa RSD, ki sme biti največ 15%. Takšna navodila ima EMA (28), FDA še nima uradnega določila oz. ima zaenkrat le osnutek s podobno zahtevo (30).

Drugi način je, da izračunamo naklone posameznih bioloških vzorcev (priporočeno je z uteževanjem) in potem izračunamo RSD naklonov (40).

Za odsotnost značilnega učinka matrice mora biti za uporabnost metode za klinične študije RSD naklonov manj kot 3-4%, pri tem pa moramo uporabiti vsaj 5 različnih dajalcev biološkega materiala. 5% RSD lahko pomeni do 15% napako v določitvi koncentracije, kar je glede na FDA smernice še zadovoljivo. Metoda ni validirana, če so odstopanja med serijami analiz bioloških vzorcev iz različnih virov preveč variabilna razen v primeru, ko temu trendu sledi tudi trend internega standarda (40).

3.6.7. Izkoristek ekstrakcije (RE)

Izkoristek ekstrakcije nam da odstotek analita, ki smo ga uspeli zbrati od začetka pa do konca postopka priprave vzorca. Če je izkoristek ekstrakcije 100%, pomeni, da smo tekom postopkov priprave vzorca uspeli ohraniti naš analit v celoti. Merimo ga med procesom razvoja metode in validacije, saj je najboljši pokazatelj učinkovitosti ekstrakcije. V našem primeru smo se želeli znebiti še vpliva učinka matrice, zato smo namesto čiste raztopine analita uporabili naknadno obogaten biološki vzorec. Izkoristek ekstrakcije tako izračunamo s sledečo enačbo (31,40):

$$RE [\%] = \frac{(\text{odziv predhodno obogatenega biološkega vzorca})}{(\text{odziv naknadno obogatena biološkega vzorca})} * 100 \text{ (enačba 7)}$$

3.6.8. Učinkovitost ekstrakcije (PE)

Učinkovitost ekstrakcije je parameter, ki združuje tako izkoristek ekstrakcije kot učinek matrice. Izračunamo ga na naslednji način (40):

$$PE [\%] = \frac{(\text{odziv predhodno obogatenega biološkega vzorca})}{(\text{odziv obogatene raztopine topila})} = AUM \times RE \text{ (enačba 8)}$$

3.6.9. Stabilnost

Stabilnost analita v biološkem vzorcu je odvisna od pogojev shranjevanja, kemijskih lastnosti preiskovane substance, matrice in vsebnikov. Tako lahko stabilnost določimo le za posamezne vsebnike in matrico, le-te ne moremo ekstrapolirati na druge sisteme za shranjevanje oz. na druge biološke vzorce. Stabilnostni testi, ki jih izvajamo, so:

- stabilnost analitov v topilu za raztopino standardov in topilu za elucijo,

- stabilnost po izpostavitvi homogenata biološkega vzorca ciklusu zamrzovanja in odtajevanja,
- kratkoročna stabilnost homogenata pri sobni temperaturi tekom priprave vzorca,
- dolgoročna stabilnost homogenata pri pogojih zamrzovanja,
- stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku na kromatografskem sistemu(31).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

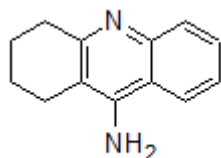
Cilj našega eksperimentalnega dela je bil razviti analizno metodo za določanje prehajanje novih zaviralcev butirilholinesteraze (BChE) v možgane. Po razvoju smo želeli metodo validirati skladno s smernicami za validacijo bioanaliznih metod, na koncu pa le-to uporabiti za določanje koncentracije v realnih možganskih vzorcih. Isto metodo smo želeli z nekaj modifikacijami prilagoditi še za vzorce krvne plazme, saj je za določanje farmakokinetike ključen podatek prisotnosti spojine v plazmi.

Najprej smo želeli razviti SPE-postopek za standardno raztopino snovi brez zahtevanega matriksa.

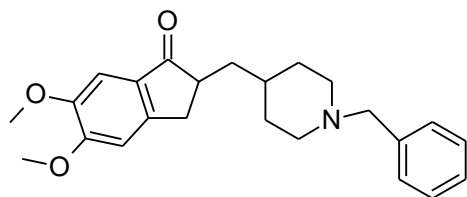
4.1. Določitev lastnosti preiskovanih spojin

S programom Molinspiration smo določili porazdelitveni koeficient preiskovanih spojin in na osnovi tega sklepali o lipofilnih lastnosti spojin.

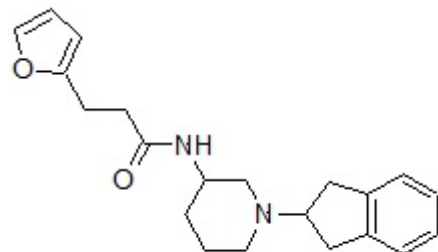
Spojina **1**: **Takrin**, $C_{13}H_{14}N_2$; Mr = 198,26; log P = 3,10



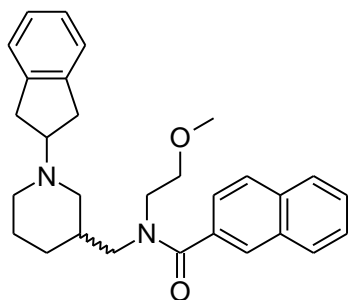
Spojina **2**: **Donepezil**: $C_{24}H_{29}NO_3$; Mr = 379,50; logP = 4,10



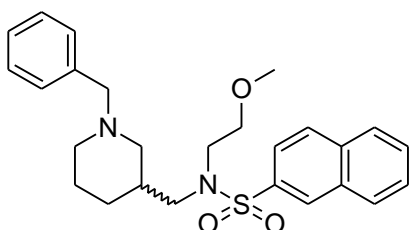
Spojina **3**: **CB**: $C_{21}H_{26}N_2O_2$; Mr = 339,45; logP = 2,95



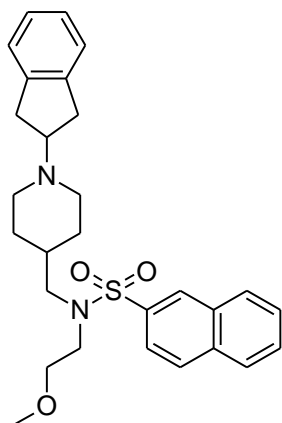
Spojina **4**: GUK-779: $C_{29}H_{34}N_2O_2$; Mr = 442, 59; logP = 4,66



Spojina **5**: GUK-791: $C_{26}H_{32}N_2O_2$; Mr = 452,60; logP = 4,62



Spojina **6**: GUK-772: $C_{28}H_{34}N_2O_3S$; Mr = 478, 65; logP = 5,01



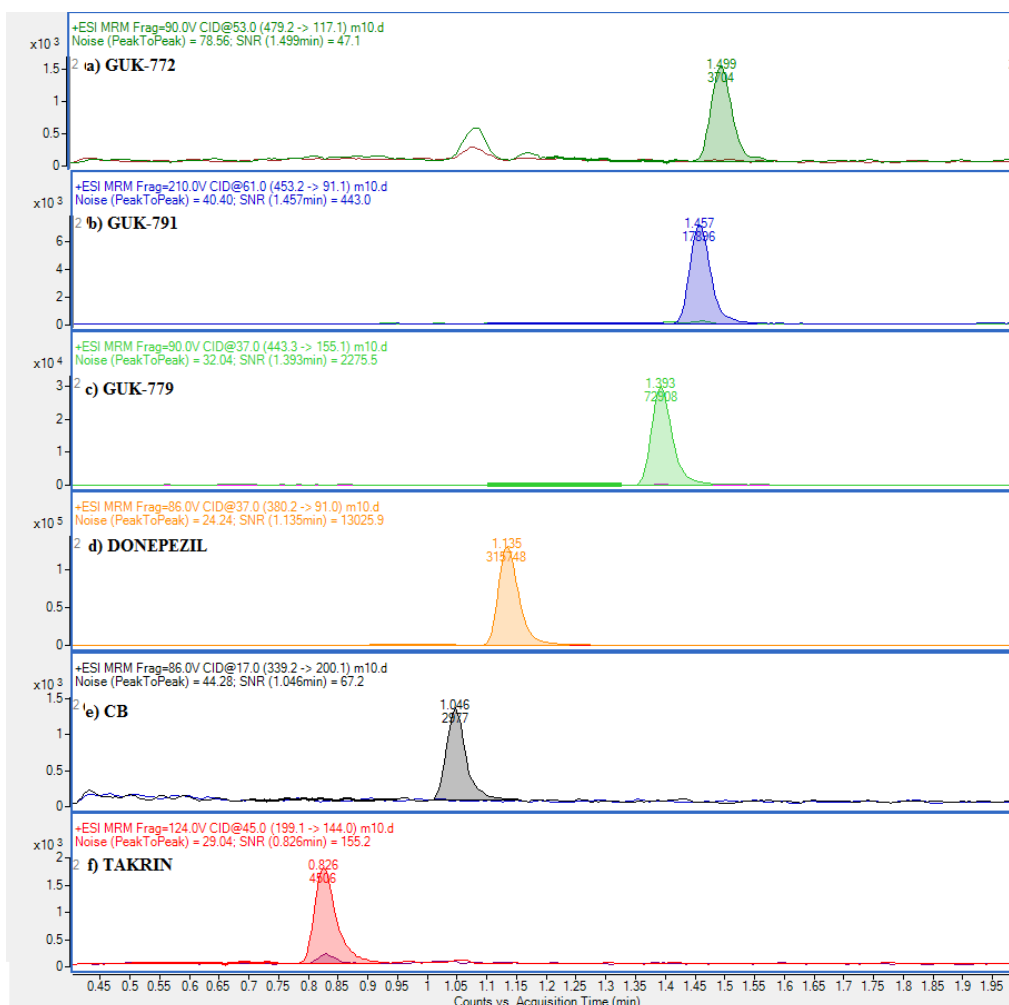
4.2. Razvijanje analizne metode in UHPLC-MS/MS

4.2.1. Optimizacija analizne metode in metode UHPLC-MS/MS

Na začetku smo optimizirali pogoje na UHPLC-MS/MS.

V separacijskem delu sklopitvene metode smo do ustreznih (med seboj čim bolj ločenih) retencijskih časov prišli s spreminjanjem sestave mobilne faze, in sicer s spreminjanjem časovno odvisnega deleža organskega topila acetonitrila (gradientna elucija). Za ustrezno občutljivost smo povečevali volumen injiciranja. Z začetnega 0,5 μ L smo prišli do končnega 2,5 μ L. Na delu masnega spektrometra smo spreminjali parametre trojnega quadropola (QQQ). Iz začetne vrednosti dodatnega potenciala na detektorju 0 V smo prišli

do končne napetosti 250 V. »Odprtost prepustnosti okna« masnega filtra smo prilagodili na Q1 in Q2 enoti tako, da smo dobili optimalno razmerje med intenziteto odziva ter šumom. Cilja in rezultata optimizacije sta bila povečanje občutljivosti zaradi izredno nizkih pričakovanih koncentracij preiskovanih spojin v naših vzorcih in dobra kromatografska ločba komponent. Za analizo smo uporabili DR2. Slika 4 prikazuje končno ločbo preiskovanih spojin, in sicer na nivoju najnižje koncentracije DR2, ki smo jo uporabili za pripravo umeritvene krivulje. Mastna črta kromatograma prikazuje območje za izračun amplitude šuma.



Slika 4: Kromatogram ločbe preiskovanih spojin s prikazanim razmerjem signal/šum za posamezne spojine v 10 μ L DR2 (od zgoraj navzdol): GUK-772 = 47,1; GUK-791 = 443,0; GUK-779 = 2275,5; donepezil = 13025,9; CB = 67,2; takrin = 155,2

Spojine so bile prisotne v koncentraciji 10 μ L DR2, ki smo jo uporabili za razvoj analizne metode. Tako je bila koncentracija takrina, CB, GUK-779 in GUK-772 1,5 ng/mL, koncentracija GUK-791 7,5 ng/mL in koncentracija donepezila 150 ng/mL.

Tule je še seznam časov retencije (t_R) posamezne spojine:

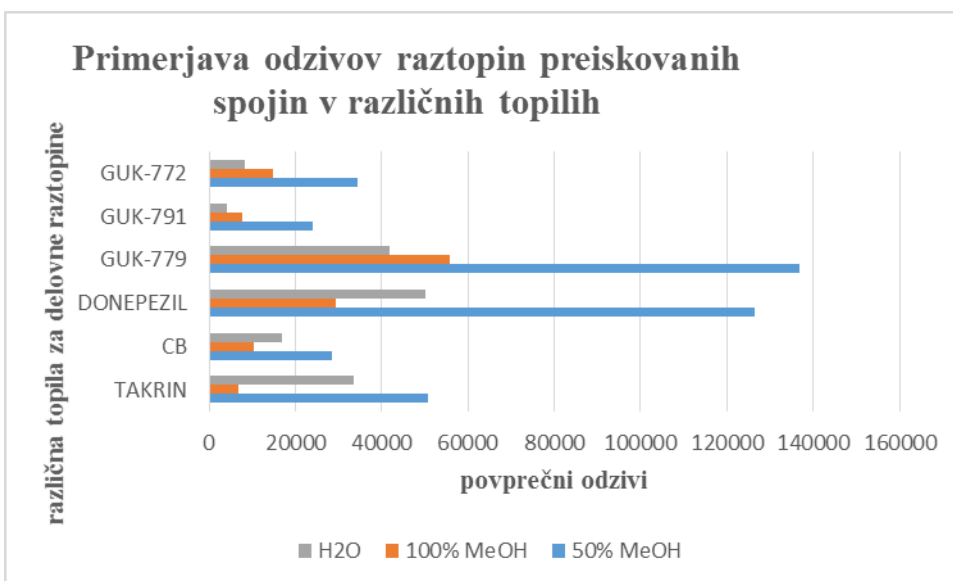
- t_R takrin=0,83 min
- t_R CB=1,04 min
- t_R donepezil=1,14 min
- t_R GUK-779=1,39 min
- t_R GUK-791=1,46 min
- t_R GUK-772=1,50 min

4.2.2. Optimizacija delovne raztopine standardov

Raztopine standardov smo pripravili v metanolu s koncentracijo 1 mg/mL. Za pripravo delovne raztopine smo uporabili 50% metanol. Le-ta je bila namenjena obogatitvi možganskega tkiva. Pripravili smo jo v masni koncentraciji 0,03 mg/L, saj je pričakovana koncentracija donepezila in njemu podobnih spojin v možganskem tkivu v območju 10 ng donepezila na 1 mg možganskega tkiva (33). Masa možganskega tkiva v posamičnem vzorcu je bila 150 mg in volumen raztopine za obogatitev 50 μ L. V primeru realnih vzorcev iz študije smo zaradi primerljivosti s kalibratorskimi vzorci dodali k vsakemu vzorcu 50 μ L 50% metanola.

Prvotno smo postopek ekstrakcije izvedli v naslednjih ključnih korakih: homogenizacija možganskega tkiva, obogatitev možganov, prenos celotnega homogenata na SPE Strata XC kartuše in ekstrakcija na trdnih nosilcih z nadaljnjo UHPLC-MS/MS analizo. Poskus smo izvedli v 4 paralelah. Pri izvajanju SPE smo zavrgli 2 od 4 vzorcev, saj je zmes zamašila SPE kartušo in topila za elucijo niso prodrle skozi tudi ob spremembah pogojev (topilo, tlak na črpalki itn.). V 4 paralelah smo izvedli postopek homogenizacije z dodanim korakom centrifugiranja, kjer smo samo supernatant prenesli na SPE kartušo. Tu je bil pretok pri vseh vzorcih primerljiv in eluat smo uspešno zbrali v mikrocentrifugirke za nadaljnje UHPLC-MS/MS analize.

V naslednji analizi smo preizkusili odziv spojin v različnih topilih za pripravo delovne raztopine. Primerjali smo uspešnost ekstrakcije glede na uporabljeno topilo za obogatitev praznih vzorcev možganov. V tem preizkusu smo možgansko tkivo nadomestili z vodo. Ta »biološki« vzorec smo nato izpostavili vsem korakom priprave: homogenizacija, centrifugiranje, ekstrakcija, sušenje oz. odparevanje ter rekonstitucija in analiza z UHPLC-MS/MS. Odzive, ki smo jih dobili, smo predstavili na sliki 5.



Slika 5: Primerjava uspešnosti ekstrakcije glede na uporabljeno topilo za obogatitev praznih vzorcev možganov

Iz slike 5 lahko vidimo, da so bili odzivi vseh spojin najvišji v topilu 50% MeOH. Največji odziv je imel v tem topilu GUK-779, nato so mu sledili donepezil, takrin, GUK-772, CB in GUK-791. Za vse preiskovane spojine smo dobili največje odzive, ko smo za topilo uporabili 50% MeOH. Razmerje odzivov je bilo podobno tudi pri ostalih topilih, v čistem metanolu se je spremenilo razmerje najvišjih odzivov med GUK-779 in donepezilom. Najmanjši odzivi so bili pri vodi pričakovani, saj so naše spojine precej lipofilnega značaja.

Pri pripravi delovne raztopine smo opravili še eno spremembo. Povečali smo delež organskega topila in dodali kislino. To spremembo smo uvedli po preizkusu različnih ekstrakcijskih topil in delovnih raztopin (razprava v poglavju Optimizacija postopka ekstrakcije in raztopine za ekstrakcijo), ko se je izkazalo, da je bila največja učinkovitost ekstrakcije v primeru uporabe 0,1% očetne kisline v 80% metanolu kot ekstrakcijskega medija. Očetna kislina namreč omogoča, da so spojine, ki so po svoji naravi šibke baze, tako v ionizirani obliki in morebiti bolj topne ter imajo manjšo afiniteto do lepljenja na stene vsebnikov in pipetnih nastavkov. To so zgolj predvidevanja, testov topnosti nismo izvajali.

Tako smo pripravili novi delovni raztopini v koncentracijskem območju, ki smo ga določili z analizami biološkega materiala. To sta bili 0,1% očetna v 80% metanolu in 0,1% očetna v 50% metanolu. Delovni raztopini z dvema različnima topiloma smo odpipetirali v volumnu 50 μ L. Izvedli smo rekonstitucijo v 50% metanolu, torej smo našemu vzorcu

samo odparili topilo s prepihovanjem raztopine z dušikom in ga ponovno rekonstituirali. Vsak pipetni nastavek smo uporabili dvakrat, da smo preverili, ali spojine morebiti zaostajajo na samih nastavkih. Uporabili smo 4 pipetne nastavke in tako dobili skupno 8 vzorcev iste raztopine. Preračunali smo povprečni odziv ter RSD za isti vzorec glede na odziv 1. in 2. pipetiranja z istim nastavkom ter celokupno RSD glede na odzive vseh 8 vzorcev. Uporabili smo klasične - rumene pipetne nastavke Qualitips.

Preglednica VII: Ponovljivost pipetiranja z rumenimi pipetnimi nastavki Qualitips

n=8		takrin	CB	donepezil	GUK-779	GUK-791	GUK-772
0,1% očetna v 80%MeOH DR2	Povprečni odziv	50148	27226	2506242	702934	28170	44286
	RSD celokupna [%]	8,4	5,2	4,5	2,2	4,4	1,8
	RSD med 2 prenosoma [%]	1,9	1,6	1,5	0,6	2,1	1
	RN med 2 prenosoma [%]	-2,1	-4,3	3,8	-1,7	-0,9	-0,6
0,1% očetna v 50%MeOH DR2-b	Povprečni odziv	39043	19282	1976463	502833	23622	36926
	RSD celokupna [%]	16,4	15	15,6	16,4	16,2	14,8
	RSD med 2 prenosoma [%]	1,1	1,9	1,1	0,6	1,3	0,5
	RN med 2 prenosoma [%]	-0,7	0,4	2,1	0,7	0,8	-0,2

Iz preglednice VII je razbrati, da so bili odzivi v 80% metanolu višji v primerjavi z odzivi spojin v isti koncentraciji v 50% metanolu. To ponovno kaže na to, da so spojine bolj lipofilne in zato najverjetneje bolje topne v raztopini z večjim deležem metanola, to je v bolj organskem topilu. Odstopanja med prvim in drugim spustom iz pipetnega nastavka so bila izredno majhna. RSD in RN vrednosti med 2 prenosoma pri nobeni spojini niso presegle 5%, kar je bil indikator za dokaj dobro ponovljivost ter da se spojine najverjetneje ne zadržujejo na pipetnih nastavkih. Ko smo primerjali odzive med različnimi pipetiranjmi in različnimi pipetnimi nastavki, se je vrednost RSD precej povečala. Povečana RSD morda kaže tudi na različno močljivost nastavkov in s tem različen preneseni volumen. RSD in RN vrednosti so bile med istimi nastavki bistveno manjše. Pri uporabi raztopine 0,1% očetna v 80% metanolu celokupna RSD ni presegla 10%, medtem ko je bila pri uporabi 0,1% očetne v 50% metanolu celokupna RSD v območju 15%. Ponovljivost je bila slabša za standardne raztopine spojin v topilu z manjšim deležem metanola. Do izgube analita in s tem posledično do nižjih odzivov je prišlo najverjetneje v začetnih korakih, to so

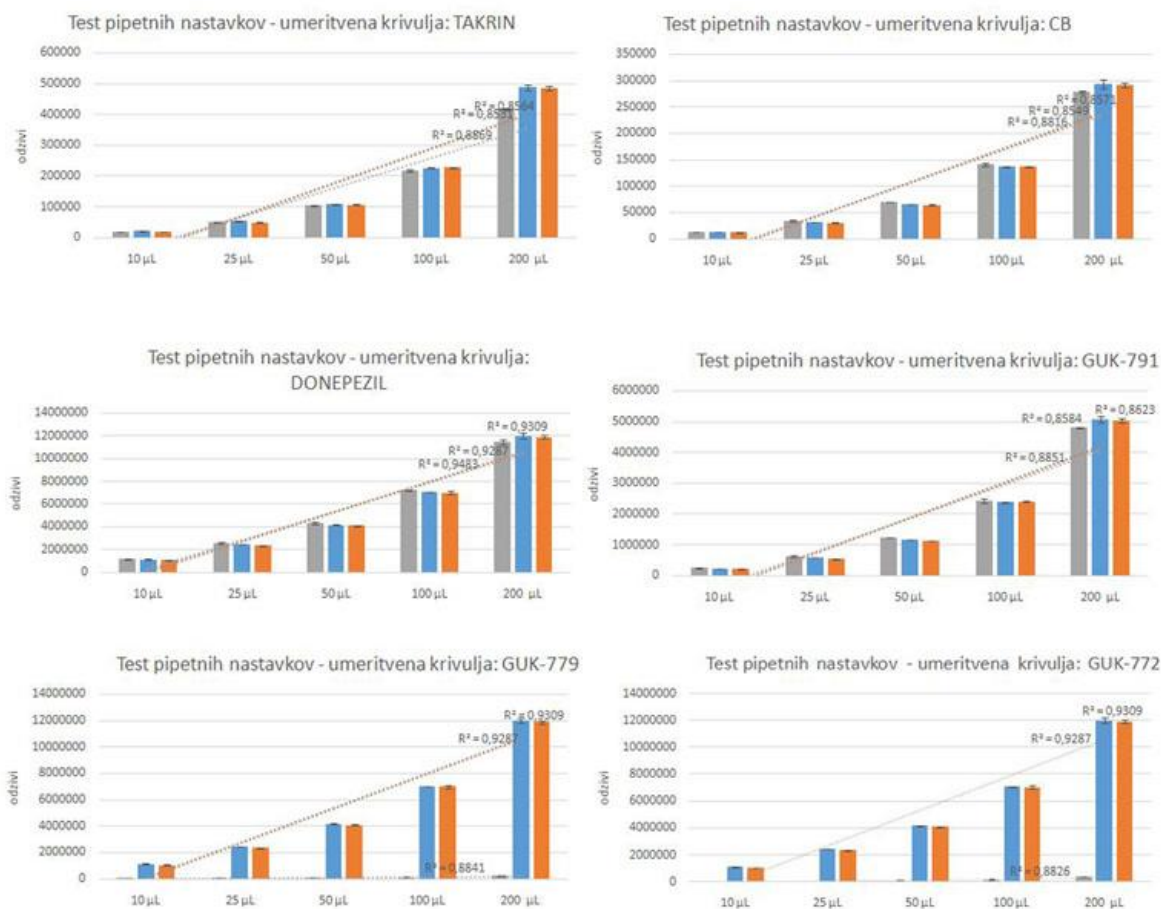
homogenizacija, centrifugiranje in ekstrakcija. Očitno so spojine izkazovale večjo afiniteto do organskega topila in je bil zato njihov odziv v mediju z nižjim deležem metanola nižji. Ugotovitev je bila, da so spojine najverjetneje zaostajale na komponentah plastičnega materiala, steklenih kroglicah, kartušah za ekstrakcijo. Odločili smo se, da delovno standardno raztopino pripravljamo v 0,1% očetni kislini v 80% metanolu (DR2). Na tem mestu moramo še poudariti, da smo pri vseh vzorcih dobili vsaj navidezne raztopine, torej raztopine z odsotnimi vidnimi delci.

4.2.3. Izbor pipetnih nastavkov

Primerjali smo tri različne pipetne nastavke, saj so bili rezultati neponovljivosti v preglednici VII lahko tudi posledica zadrževanja na pipetnih nastavkih. Uporabili smo 3 različne pipetne nastavke, in sicer:

1. običajno v naših laboratorijih uporabljeni pipetni nastavki Qualitips,
2. pipetni nastavki z nizko retencijo 1: Eppendorf,
3. pipetni nastavki z nizko retencijo 2: TopOne.

Izvedli smo preprost poskus pipetiranja in redčenja z rekonstitucijskim topilom, to je 0,1% očetna kislina v 80% metanolu. DR2 smo odpipetirali v volumnih 10, 25, 50, 100 in 200 μL in redčili z 0,1% očetno v 80% metanolu do skupnega volumna 200 μL . Tako pripravljene vzorce smo analizirali z UHPLC-MS/MS. Odzive za posamezne spojine in umeritvene premice glede na uporabo različnih pipetnih nastavkov smo prikazali na sliki 6.



Slika 6: Primerjava odzivov ob uporabi različnih pipetnih nastavkov. V diagramu so prikazani odzivi spojin pri pripravi umeritvene krivulje ob uporabi pipetnih nastavkov: običajni pipetni nastavki Qualitips (sivi stolpci), pipetni nastavki z nizko retencijo 1 (oranžni stolpci), pipetni nastavki z nizko retencijo 2 (modri stolpci).

Iz slike 6 je razvidno, da so bili odzivi za spojini GUK-779 in GUK-772 skoraj odsotni pri uporabi običajnih pipetnih nastavkov, medtem ko so bili odzivi vedno prisotni pri uporabi pipetnih nastavkov z nizko retencijo (pipetni nastavki z nizko retencijo 1 in pipetni nastavki z nizko retencijo 2). Pri najvišji koncentraciji posamezne spojine se je ta razlika pojavila tudi pri ostalih štirih spojinah: takrinu, CB, donepezilu in GUK-791. Koeficient linearne regresije R^2 je bil ugodnejši pri omenjenih spojinah pri uporabi običajnih pipetnih nastavkov, vendar so se pojavile bistveno večje razlike pri koeficientu R^2 pri odzivih za spojini GUK-779 in GUK-772. Med posameznimi pipetnimi nastavki z nizko retencijo ni bilo prisotnih signifikantnih razlik, zato smo se odločili za uporabo pipetnih nastavkov z nizko retencijo tipa 2.

4.2.4. Določitev koncentracijskega območja delovne raztopine standardov

Za določitev območja analize oz. koncentracije nove delovne raztopine smo analizirali realne možganske vzorce podgan iz predhodnih študij toksičnosti. Podgane so bili tretirane s posameznimi spojinami, in sicer donepezil, GUK-779 ter GUK-791. Realne možganske vzorce smo obdelali na enak način kot prazne možganske vzorce, le da jih nismo obogatili z delovno raztopino standardov. oz. smo izpustili standardni dodatek. Nato smo primerjali odzive realnih možganskih vzorcev podgan, ki so prejemale intraperitonealno donepezil, GUK-779, GUK-791 in obogatenih možganskih vzorcev z DR1 v koncentraciji 0,03 mg/L ter jih predstavili v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Primerjava odzivov realnih in obogatenih možganskih vzorcev

- DR1 (delovna raztopina 1)

- F (faktor koncentriranja): razmerje med odzivom realnega vzorca možganov in odzivom obogatenega vzorca možganov z DR1

	realni vzorec	RSD realni [%]	obogateni z DR 1	RSD DR1 [%]	F (realni/obogateni)
DONEPEZIL	2969767	19,2	40172	7,5	74
GUK-779	274331	62,8	18425	13,9	15
GUK-791	16040	12,9	3823	18,9	4

Na osnovi rezultatov te analize predstavljenih v preglednici VIII smo postavili nova območja in pripravili novo delovno raztopino – DR2. Ker spojine takrin, CB in GUK-772 ne bodo uporabljene v nadaljnjih kliničnih študijah in jih tudi nismo imeli v realnih možganskih vzorcih, smo jih ohranili v istih koncentracijah, kot so bile v DR1. Takrin smo uporabili zato, ker je edini zaviralec, ki deluje tako na AChE kot tudi BChE (8), CB je izkazoval najboljšo permeabilnost v okviru predhodnih študij (42), GUK-772 pa je strukturno podoben preiskovanima spojinama GUK-779 in GUK-791 in smo ga želeli uporabiti kot interni standard. Za ostale spojine smo določili nove koncentracije v delovnih raztopina. Donepezilu smo koncentracijo povečali za 100-krat glede na DR1, GUK-779 smo koncentrirali za faktor 5 glede na DR1. Za GUK-791 so bili odzivi v realnih vzorcih primerljivi z odzivi iz DR1, zato smo se odločili, da ga tudi v DR2 pripravimo v isti koncentraciji kot v DR1.

Priprava nove delovne raztopine je potekala po protokolu opisanem med metodami za delovno raztopino 2 (DR2) (glej poglavje 3.5.2). Tekom raziskave smo izbrali tudi najprimernejšo raztopino za pripravo delovne raztopine 2, optimizacija je opisana v prejšnjem poglavju.

4.2.5. Optimizacija postopka ekstrakcije in raztopine za ekstrakcijo

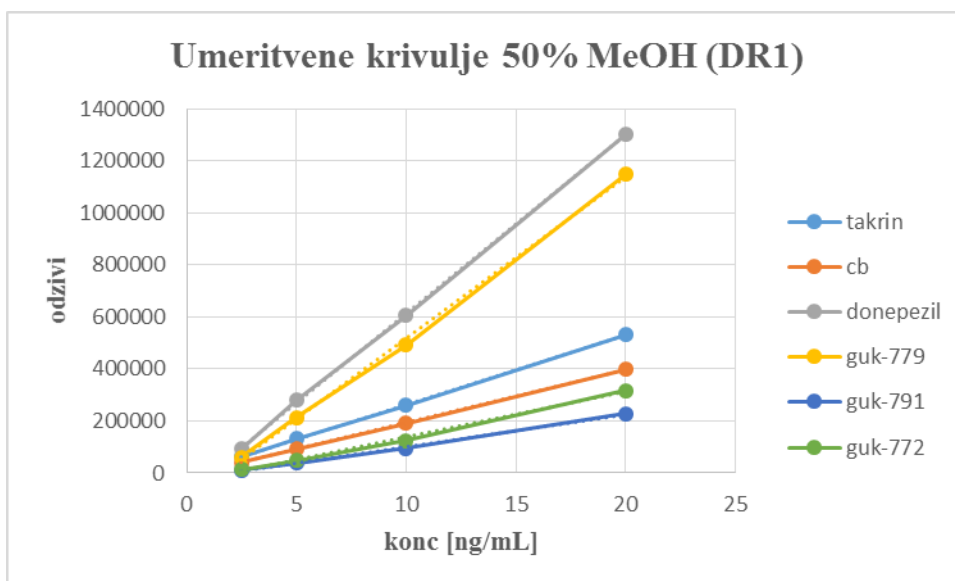
Našo analizno metodo smo morali postaviti skladno s smernicami za validacijo bioanalizne metode (31). Tako smo proces ekstrakcije sprotno preverjali s parametri za validacijo, in sicer specifičnost in učinek matrice sta bila glavna kriterija za spremembo ekstrakcijskih pogojev. Določali smo absolutni učinek matrice (AUM), izkoristek ekstrakcije (RE) in učinkovitost ekstrakcije (PE).

Prvi preizkus, ki smo ga opravili, je bil z delovno raztopino standardov v 50 % metanolu (DR1) in ekstrakcijsko raztopino 1 (ER1) 0,01 M HCl v 20% MeOH. Preizkus je bil opravljen, še preden smo določili koncentracijsko območje. Koncentracija preiskovanih spojin je bila enaka za vse spojine. V volumnu 50 μ L DR1, ki smo jo uporabili za obogatitev možganov, je bila le-ta 30 ng/mL.

Preglednica IX: Določanje AUM, RE, PE pri delovni raztopini standardov v 50% MeOH (DR1) in z ekstrakcijo z 0,01M HCl v 20% MeOH (ER1)

	takrin	CB	donepezil	GUK-779	GUK-791	GUK-772
AUM [%]	123,8	108,5	199,7	127,8	127,0	113,3
RE [%]	67,7	87,5	80,5	77,8	81,9	70,8
PE [%]	83,9	94,9	160,7	99,4	104,0	80,3

Krepko označene številke v preglednici IX so odstopale od naših zelenih ciljnih vrednosti oz. teoretično pričakovanih, zato smo morali pristopiti k postopku optimizacije. Predvsem so bile presenetljive višje vrednosti AUM pri vseh vzorcih. Pričakovane vrednosti bi bile okoli 100%, vendar se je pri nas faktor AUM precej povečal. Posumili smo na prisotnost preiskovanih spojin v kateri izmed uporabljenih raztopin. Za RE so bile vrednosti nižje od 100% pričakovane, saj se običajno tekom manipulacije z vzorcem koncentracija spojine zmanjša in ne poveča. Istočasno smo preverjali tudi linearnost odziva DR1. Premico smo pripravili iz analize delovne raztopine standardov (DR1) brez biološkega matriksa, in sicer v štirih točkah pri koncentracijah: 2,5/5/10/20 ng/mL. Odzive analize in umeritvene premice smo prikazali na sliki 7.



Slika 7: Umeritvene krivulje delovnih raztopin preiskovanih spojin v DR1 (delovna raztopina standardov v 50% MeOH)

K grafom umeritvenih premic iz slike 7 sodijo determinacijski koeficienti korelacije (R^2):

1. **takrin:** $y=266694x-4379$; $R^2=0,9998$
2. **CB:** $y=17477x-38508$; $R^2=0,9987$
3. **donepezil:** $y=68761x-74819$; $R^2=0,9999$
4. **GUK-779:** $y=62174x-104471$; $R^2=0,9998$
5. **GUK-791:** $y=12573x-25497$; $R^2=0,9963$
6. **GUK-772:** $y=20456x-11172$; $R^2=0,9977$

Spojine so izkazovale linearno korelacijo. Za potrditev odsotnosti analitov v preostalih raztopinah, ki jih uporabljamo v postopku ekstrakcije, smo morali dokazati odsotnosti odziva pri injiciranju raztopine v UHPLC-MS/MS in odsek na ordinati umeritvenih premic blizu izhodišča glede na odzive standardnih raztopin. Zato smo pripravili tako imenovani »slepi« oz. kontrolni vzorec (tj. 50% MeOH brez preiskovanih spojin), kjer smo skozi SPE-kartušo spustili samo topilo za pripravo DR1. Pojavila se je težava, da so bili odzivi prisotni tudi pri kontrolnih vzorcih. V preglednici X so odzivi, ki smo jih dobili, ko smo izvedli ekstrakcijski postopek na isti način kot z obogatenim možganskim tkivom z DR1 v 50% MeOH, le da smo možgansko tkivo zamenjali z vodo in DR1 s samim topilom (50% MeOH). Preračun koncentracij smo opravili s koeficienti umeritvenih krivulj iz grafa na sliki 7.

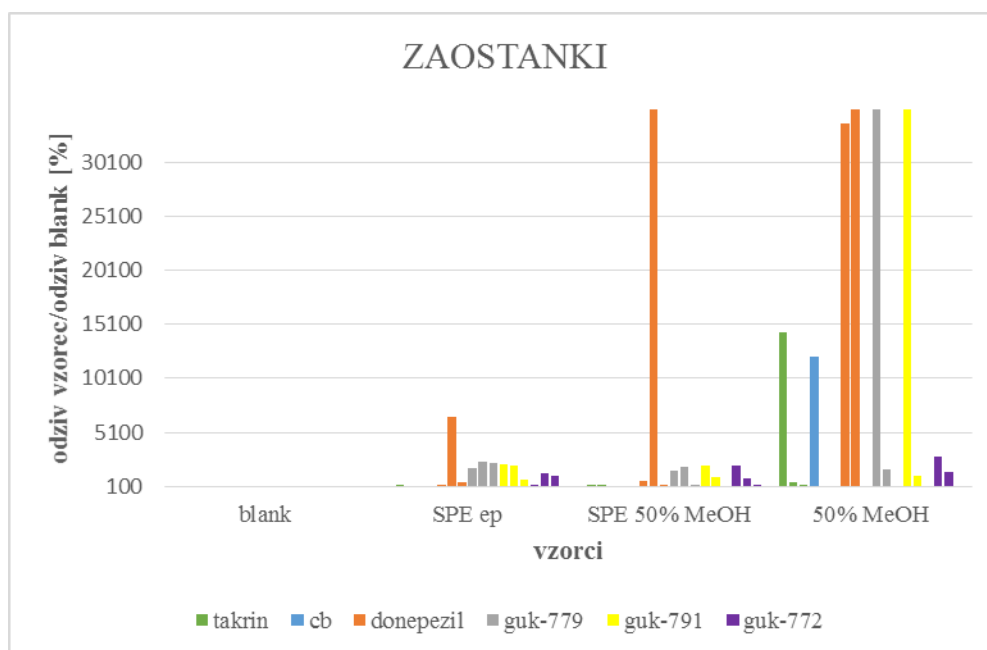
Preglednica X: Navzkrižni prenos (odzivi in preračunane koncentracije kontrolnih vzorcev k preizkusu delovne raztopine s 50% MeOH)

	takrin	CB	donepezil	GUK-779	GUK-791	GUK-772
SPE kontrola (y)	2373	649	21336	5932	2574	3752
c [ng/mL]	0,3	0,6	1,4	1,8	2,2	2,4

Najbolj moteči so bili odzivi za donepezil in vse GUK-e, ki so bile ravno naše spojine preiskave. Naš sklep je bil, da so spojine morda prisotne v kateri izmed raztopin za izvedbo ekstrakcije oz. da zaostajajo kje na sami aparaturi. Odločili smo se za popolno čiščenje SPE aparature in pripravo novih raztopin, ki smo jih uporabljali za celotni postopek ekstrakcije. Ponovno smo izvedli tako imenovano »slepo ekstrakcijo« na SPE. Namesto DR1 smo uporabili samo 50% MeOH, možgansko tkivo pa smo nadomestili z vodo.

Vzorci smo posušili in rekonstituirali v 50% MeOH in opravili UHPLC-MS/MS analizo. Pridružili smo jim še vzorec 50% MeOH kot odziv topila. Vse odzive smo primerjali z odzivom »blank«, to je tisti ničelni odziv, ki ga ima aparatura pri injiciranju mobilne faze namesto vzorca na kolono. Po **1. analizi** naštetih vzorcev smo detektirali na UHPLC-MS/MS odzive vseh spojin v vzorcu topila – 50% MeOH. Očitno je prišlo do onečiščenja pri pripravi obogatitve možganov oz. pri manipulaciji z različnimi vzorci. Pri aplikaciji topila na SPE se je del spojin najverjetneje zadržal na ekstrakcijski koloni in je zato odziv po SPE analizi nižji. Na novo smo pripravili raztopino 50% MeOH in elucijskega pufera ter ponovno opravili analizo – **2. analiza**. Pri tokratnem poskusu je bil odziv donepezila na SPE najvišji, odziv ostalih se je zmanjšal. Odločili smo se še za intenzivno čiščenje steklovine (detergent, UV-kadička, metanol in UV-kadička ter ponovno spiranje). Sprali smo tudi SPE analizator po sledečem protokolu: Najprej smo ga sprali z 0,1% očetno kislino. Nato smo vse občutljive dele postavili na UV-kadičko za 3 minute, sprali z vodo in na koncu še z metanolom. Ponovno smo pripravili raztopino 50% MeOH in elucijski pufer. Opravili smo še **3. analizo**. Šele po tretjem čiščenju so bile spojine dejansko sprane iz vseh predelov SPE aparature oz. so bili odzivi donepezila, GUK-779 in GUK-791 le rahlo višji od odzivov »blank vzorca« z injiciranjem mobilne faze. Z diagramom na sliki 8 smo prikazali zaostanke oz. lažno pozitivne vrednosti analitov po vsakem koraku čiščenja za 4 različne vzorce: blank, SPE ep, SPE 50% MeOH, 50% MeOH. V vsakem vzorcu so bili odzivi posameznih spojin predstavljeni z različno obarvanimi stolpci. Za vsako spojino v

vsakem vzorcu so bili lahko prisotni maksimalno trije stolpci, kar je pomenilo prisotnost spojine v vseh 3 analizah, oz. po vseh 3 uvedenih korakih čiščenja.



Slika 8: Raziskava izvora lažno pozitivnih (previsokih) izmerjenih koncentracij analitov v 4 vzorcih: blank (mobilna faza), SPE ep (ekstrakt iz SPE samo z elucijskim pufrom), SPE 50% MeOH (ekstrakt iz SPE kontrolnega vzorca), MeOH (topilo za pripravo delovne raztopine)

Na abscisi na diagramu na sliki 8 so bili nanizani posamezni vzorci, ki so predstavljali:

- *blank*: odziv aparature pri injiciranju mobilne faze namesto vzorca na kolono
- *SPE ep*: odzivi po izvedbi ekstrakcije na SPE samo z elucijskim pufrom
- *SPE 50% MeOH*: odzivi po izvedbi slepe oz. kontrolne ekstrakcije (možgansko tkivo zamenjano z vodo in delovna raztopina standardov (DR1) zamenjana s topilom 50% MeOH)
- *50% MeOH*: odziv topila za pripravo standardne raztopine

Izvedli smo tri analize, kar smo predstavili v treh stolpcih, v kolikor je bila spojina prisotna. Opaziti je bilo, da je v zadnji, to je tretji analizi, prisoten odziv samo še donepezila, GUK-779 in GUK-772 (vzorec: SPE 50% MeOH) ter takrina (vzorec: 50% MeOH). Ko so bile težave z zaostanki rešene, smo se lotili preizkusa metode na možganskem tkivu v koncentracijskem območju DR2, kjer smo kot delovno standardno raztopino uporabili DR2-a (0,1% očetna kislina v 50% metanolu). Vzorci so bili obogateni možgani pred ekstrakcijo, po ekstrakciji, neobogateni možgani in DR2-a. Metodo oz. postopek smo vrednotili glede na predhodno omenjene parametre, to so: absolutni učinek

matrice (AUM), izkoristek ekstrakcije (RE) in učinkovitost postopka ekstrakcije (PE).

Rezultate analize smo prikazali v preglednici XI.

Preglednica XI: Določanje AUM, RE, PE pri delovni raztopini standardov DR2 v 0,1% očetni kislini v 50% MeOH in z ekstrakcijo z ER1. (Vrednosti v tabeli so izražene kot povprečje analiz 3 vzorcev, zato pov = povprečna vrednost, RSD pa predstavlja odstop od povprečne vrednosti posameznih odzivov.)

n=3	takrin		CB		donepezil		GUK-779		GUK-791		GUK-772	
	pov	RSD	pov	RSD	pov	RSD	pov	RSD	pov	RSD	pov	RSD
AUM [%]	62,3	3,0	44,5	2,5	41,2	10,1	68,2	6,3	117,2	7,4	114,2	4,5
RE [%]	36,2	14,3	39,9	9,5	36,7	17,3	26,1	20,5	25,6	11,8	21,2	4,3
PE [%]	22,6	11,7	18,2	7,7	16,2	14,1	16,6	16,7	27,6	9,7	22,7	3,5

Najprej so nas zmotile nizke vrednosti AUM v primerjavi z želenimi 100%. Te so se izrazile predvsem pri donepezilu in GUK-779, ki sta bili tudi naši glavni preiskovani substanci. Presenečalo nas je tudi to, da je bil AUM različen pri različnih spojinah, in sicer pri GUK-791 in GUK-772 je AUM odstopal v pozitivni smeri, pri ostalih spojinah pa v negativni smeri. Pozitivni odstop v splošnem pomeni, da spojina izkazuje večji odziv ob prisotnosti matriksa kot v sami čisti delovni raztopini. Ta efekt smo si razlagali s prisotnostjo človeške napake, zaostajanjem teh dveh spojin (GUK-791 in GUK-772) bolj kot preostalih na možganskem tkivu oz. slabše raztapljanje v pripravljene osnovni raztopini. Kar je bilo pri tem poskusu najbolj moteče, so bile nizke vrednosti za RE in PE in slaba ponovljivost. PE nikoli ni presegla vrednosti 30%, medtem ko je RE ostal pod mejo 40%, ponovljivost pa je dosegla kar 20,5% RSD. Po drugi strani je bil lahko tak odstop zgolj posledica običajne analitske napake (za sprejemljivost imamo mejo +/- 30%). Naš cilj je bil, da dosežemo ponovljivost vsaj 15%, če želimo metodo validirati kot veljavno bioanalizno metodo po smernicah FDA ali EMA (vendar te veljajo predvsem za klinično fazo). Zaradi slabe ponovljivosti smo se odločili, da pripravimo nove raztopine za homogenizacijo in centrifugiranje. V začetni fazi razvoja smo izbrali ER1 (0,01M HCl v 20% MeOH). Zanj smo se odločili na podlagi literaturnih podatkov (26). Kislini delež je namreč omogočal ionizacijo preiskovanih spojin, metanol pa je predstavljal organsko topilo, ki dobro raztaplja naše spojine. Odločili smo se zamenjati 0,01M HCl z 0,1% očetno kislino. Prav tako smo se odločili povečati organski delež, to je delež metanola. Metanol smo zamenjali še z acetonitrilom, saj so le-tega že uporabljali za ekstrakcijo iz možganskega tkiva (44,45). Raztopine za ekstrakcijo 0,01 M HCl v 20 % MeOH nismo vključili v to analizo.

Za raztopine za ekstrakcijo smo tako uporabili:

ER1: 0,01 M HCl v 20% metanolu (le-te nismo vključili v ta preizkus),

ER2: 0,1% očetna kislina v 50% metanolu,

ER3: 0,1% očetna kislina v 80% metanolu,

ER4: 0,1% očetna kislina v 50% acetonitrilu.

Pri tem smo preizkusili 2 različni delovni raztopini standardov:

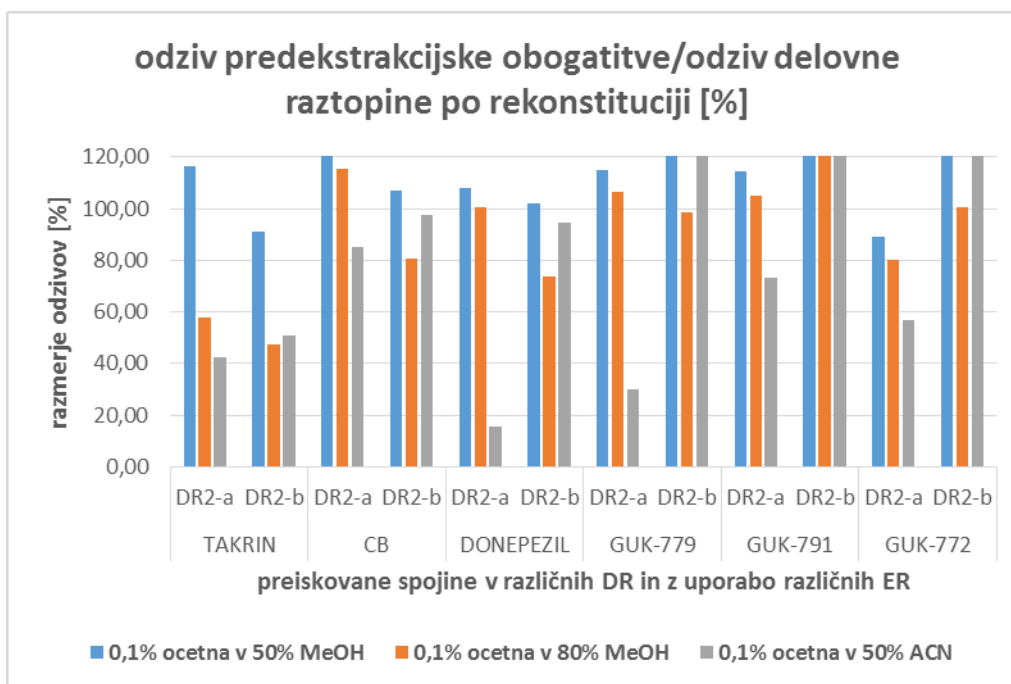
DR2-a: delovna raztopina standardov 2 v 0,1% očetni kislini v 50% metanolu,

DR2-b: delovna raztopina standardov 2 v 50% metanolu

Opravili smo postopek ekstrakcije brez možganov. Modifikacija tovrstnih poizkusov je bila, da smo namesto možganskega tkiva dodali 150 μ L vode. Ostali koraki so bili po protokolu. Za SPE smo uporabili SPE Strata XC kartuše. Posamezne raztopine smo primerjali med seboj tako, da smo odziv spojine iz posamezne delovne raztopine (DR2-a ali DR2-b) ekstrahirane z enim od ekstrakcijskih topil primerjali z odzivom same delovne raztopine (DR2-a ali DR2-b) z isto koncentracijo. Rezultat smo podali kot PE v %, idealna vrednost je 100%.

Preglednica XII: Primerjava različnih ekstrakcijskih rztopin (ER2: 0,1% očetna kislina v 50% metanolu, ER3: 0,1% očetna kislina v 80% metanolu, ER4: 0,1% očetna kislina v 50% acetonitrilu) v različnih delovnih raztopinah (DR2-a: raztopina standardov v 0,1% očetni kislini v 50% metanolu; DR2-b: raztopina standardov v 50% metanolu), podana kot vrednost PE

PE [%]		ER 2	ER 3	ER 4
TAKRIN	DR2-a	116,40	57,59	42,59
	DR2-b	91,21	47,27	50,78
CB	DR2-a	127,30	115,68	85,22
	DR2-b	107,13	80,58	97,68
DONEPEZIL	DR2-a	108,25	100,51	15,36
	DR2-b	102,17	73,48	94,54
GUK-779	DR2-a	114,82	106,62	29,88
	DR2-b	126,65	98,61	121,13
GUK-791	DR2-a	114,41	104,83	73,05
	DR2-b	208,13	160,23	202,80
GUK-772	DR2-a	89,14	80,12	56,99
	DR2-b	139,30	100,47	123,72



Slika 9: Diagram primerjave različnih ekstrakcijskih topil v različnih delovnih raztopinah (DR2-a: raztopina standardov v 0,1% očetni kislini v 50% metanolu; DR2-b: raztopina standardov v 50% metanolu).

V preglednici XII in na sliki 9 smo prikazali razmerja med odzivi možganov obogatenih pred ekstrakcijo z odzivi standardne raztopine pri isti koncentraciji analita. Razmerja smo predstavili kot odstotke, teoretično pričakovane vrednosti so bile 100%. Za validacijo je sicer bistveno, da so parametri ponovljivi, kljub temu težimo k temu, da bi bile vrednosti čim bližje teoretičnim 100%. S krepko pisavo so označene vrednosti, ki so najustreznejše. Razvidno je, da je največ krepkega obarvanja pri ER3 (0,1% očetna kislina v 80% metanolu). Pri uporabi te ekstrakcijske raztopine se za raztopino standardov najbolje izkaže DR2-a, to je 0,1% očetna kislina v 50% metanolu. V primerjavi z DR2-b je ta vsebovala dodatek kisline, kar je bil razlog, da so bile naše preiskovane spojine, ki so po naravi rahlo bazične, bolj ionizirane. Pri ekstrakcijskem topilu smo uporabili kisel medij pri vseh. Acetonitril (ER4) ni izkazal boljših ekstrakcijskih lastnosti v primerjavi z metanolom (ER2 in ER3). Primerjava različnega deleža metanola pa se je izkazala v prid večjemu deležu organskega topila, to je 80% metanola. To je bil pričakovan rezultat, saj so naše preiskovane spojine (predvsem GUK-779, GUK-791, GUK-772) lipofilne substance z log P vrednostjo okoli 5 in zato kot take bolj topne v raztopini z večjim deležem organskega topila. Odločili smo se za uporabo 0,1% očetne kisline v 80% metanolu (ER3). Izvedli smo preizkus ponovljivost z izbrano ekstrakcijsko raztopino na 6 vzorcih in rezultate prikazali v preglednici XII.

Preglednica XIII: Ponovljivost ekstrakcije z izbranim topilom ER3 in izbrano delovno raztopino DR2-c (0,1% očetna v 80% MeOH)

n = 6	TAKRIN	CB	DONEPEZIL	GUK-779	GUK-791	GUK-772
odziv	62560	37398	4192330	987100	45937	59161
RSD [%]	15,28	3,12	1,37	5,56	6,46	10,05

RSD odzivov srednje vrednosti je bila za vse spojine razen takrina znotraj zelenih 15%. Odstopa le pri spojini takrin, vendar ker ta spojina ni bistvena pri razvoju naše analizne metode, smo rezultate ocenili kot ustrezne. Tako smo se odločili za uporabo ekstrakcijske raztopine 0,1% očetne kisline v 80% metanolu.

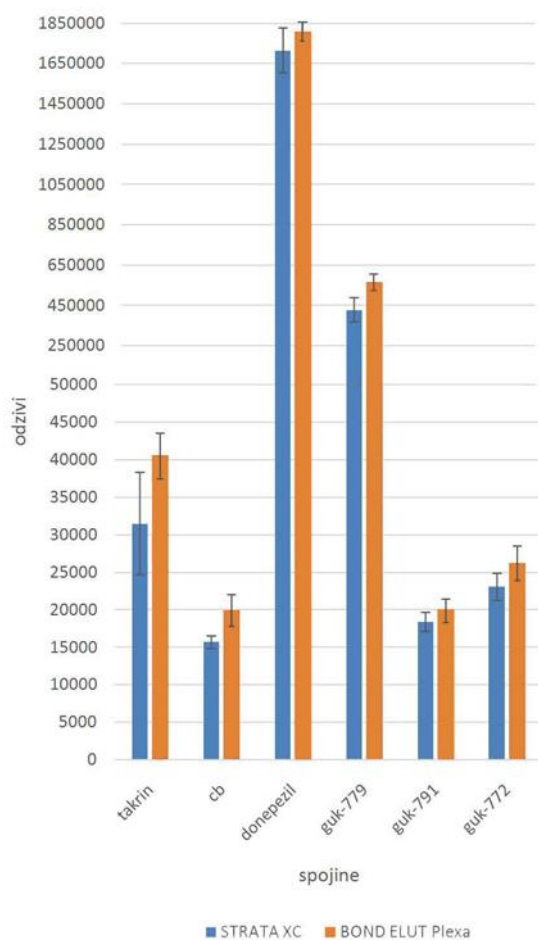
4.2.6. Izbor optimalnih kartuš za ekstrakcijo

Po težavah z zaostanki na SPE kartušah smo se lotili tudi preizkusa kartuš drugega proizvajalca. Mehanizem adsorpcije je ostal isti, torej na principu ionskih interakcij. V obeh primerih smo uporabili kartuše z reverzno stacionarno fazo in močnim kationskim izmenjevalcem. Tako smo poleg SPE kartuš Strata XC proizvajalca Phenomex uporabili kartuše proizvajalca Agilent, in sicer kartuše Bond Elut Plexa PCX

Izvedli smo tako imenovano »slepo« ekstrakcijo, torej brez biološkega materiala. Namesto možganskega tkiva smo uporabili vodo v enaki količini, zaradi tega da smo porabili čim manj biološkega materiala, kar je pomenilo zmanjšanje števila žrtvovanih živali na minimum. Preostali del postopka je ostal enak. Za vsako kartušo smo izvedli poskus v štirih vzporednih vzorcih. V preglednici XIV smo zbrali povprečne odzive in odstopanja, na sliki 10 pa smo grafično prikazali vrednosti.

Preglednica XIV: Primerjava odzivov na dveh različnih kartušah; Strata XC in Bond ElutPlexa PCX

Kartuša	n=4	takrin	CB	donepezil	GUK-779	GUK-791	GUK-772
STRATA XC	povprečje	31477	15711	1714588	426306	18383	23056
	SD	6834	836	111620	60152	1268	1787
	RSD	21,71	5,32	6,51	14,11	6,90	7,75
Bond ElutPlexa PCX	povprečje	40545	19918	1807861	564758	20003,13	26193
	SD	3012	2093	47185	40719	1368	2321
	RSD	7,43	10,51	2,61	7,21	6,84	8,86



Slika 10: Primerjava odzivov 2 kartuš za SPE dveh različnih proizvajalcev: Strata XC (modri stolpci) Bond Elut Plexa PCX (oranžni stolpci)

Odzivi na SPE kartuši Bond Elut Plexa PCX so bili v povprečju višji za vse preiskovane spojine. Prav tako so bili odkloni oz. RSD med posameznimi vzorci nižji pri uporabi iste kartuše za večino spojin. Ugodnejši RSD parameter pri uporabi kartuše Strata XC se je pojavil samo pri 2 spojinah, in sicer takrinu, ki ni bil naš glavni analit, in pri GUK-772, katerega namen je bil zgolj uporaba kot interni standard in prav tako ni bil bistven za razvoj te analizne metode. Zato smo se odločili za uporabo kartuš Bond Elux Plexa PCX.

4.3. Validacija analizne metode

Po optimizaciji vseh parametrov smo se lotili validacije metode. Parametre metode smo preizkušali le na možganskem tkivu, validacijo pa smo izvajali tako na možganskih kot tudi na plazemskih vzorcih.

4.3.1. Ponovljivost

Analizo smo opravili na treh različnih koncentracijskih nivojih QC-vzorcev, in sicer smo uporabili 15/75/150 μ L delovne raztopine za obogatitev (DR2). Vzorec je bil obogaten pred ekstrakcijo z DR2. Rezultate smo podali kot RSD [%] med odzivi (preglednica XV Preglednica XV).

Ponovljivost smo določali glede na:

- *Ponovljivost injiciranja*: Šlo je za 5-kratno injiciranje istega vzorca v eni analizi ter primerjava odzivov. Za vzorec smo vzeli obogatene ekstrakte možganov.
- *Znotrajdnevna ponovljivost*: Analizirali smo po 3 QC-vzorci vsakega nivoja znotraj istega dne. Kot biološke vzorce smo vzeli vzorce možganov in plazme.

Preglednica XV: Ponovljivost bioloških vzorcev izražena kot RSD [%]

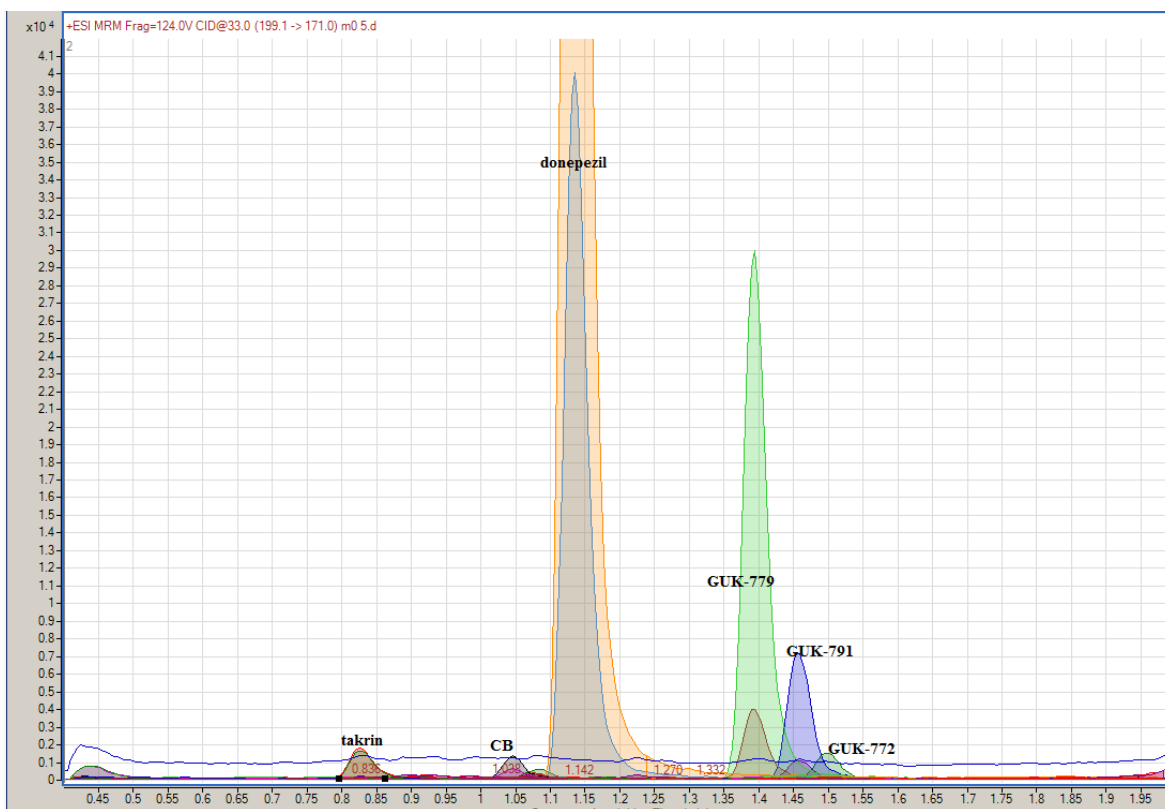
<i>Ponovljivost injiciranja izražena kot RSD – vzorci možganov [%]</i>					
$n_{injiciranj}=5$	TAKRIN [%]	CB [%]	DONEPEZIL [%]	GUK-779 [%]	GUK-791 [%]
QC _L	4,4	5,7	1,1	1,5	3,5
QC _M	2,0	2,2	0,8	1,3	1,5
QC _H	1,2	0,7	0,5	0,2	1,3
<i>Znotrajdnevna ponovljivost izražena kot RSD – vzorci možganov [%] ($n_{vzorcev}=3$)</i>					
$n_{injiciranj}=9$	TAKRIN [%]	CB [%]	DONEPEZIL [%]	GUK-779 [%]	GUK-791 [%]
QC _L	7,2	3,8	5,2	4,7	4,5
QC _M	5,6	21,9	15,1	19,4	19,9
QC _H	1,1	12,0	8,2	9,5	10,6
<i>Znotrajdnevna ponovljivost izražena kot RSD – vzorci plazme [%] ($n_{vzorcev}=3$)</i>					
$n_{injiciranj}=9$	TAKRIN [%]	CB [%]	DONEPEZIL [%]	GUK-779 [%]	GUK-791 [%]
QC _L	4,9	12,3	18,6	11,9	14,5
QC _M	13,6	10,9	16,6	9,5	14,9
QC _H	13,9	18,9	3,3	6,4	3,6

RSD ni bil v območju najstrožjih kriterijev za razvoj bioanalizne metode, tj. na intervalu 15%. Ker je bil vpleten biološki material, je bilo ponovljivost v tako strogem območju težko zagotoviti. Namen naše metode je bil v prvi vrsti oceniti velikostni red pojava teh spojin v možganskem tkivu oz. če spojine sploh dosežejo možgane in v kakšnem razmerju

glede na plazmo. Zato je bila ponovljivost v območju 20% sprejemljiva. Edina spojina, ki ni ostala v tem intervalu, je bila CB, ki pa se je v nadaljnje študije tako ali tako ne bo vključilo.

4.3.2. Limita kvantifikacije in območje

Limito kvantifikacije smo določali posebej za možgane in plazmo. Za določitev smo uporabili najnižjo koncentracijo kalibratorja, to je 1,5 ng/mL za takrin, CB, GUK-791 in GUK-772, za GUK-779 je ta koncentracija 7,5 ng/mL, za donepezil pa 158,4 ng/mL.



Slika 11: Prekrita kromatograma slepega vzorca in vzorca s koncentracijo na spodnji limiti kvantifikacije (QL). Različne barve kromatografskih vrhov predstavljajo različne spojine, v vrstnem redu od leve proti desni: takrin (temno rjav), CB (temno vijoličen), donepezil (rdeč), GUK-779 (zelen), GUK-791 (moder), GUK-772 (zelen).

Za določanje LLOQ smo uporabili najnižjo koncentracijo kalibratorja. Dejansko to niso realne ocene LLOQ, saj smo ocenili območje meritev glede na potrebe naše študije. Območje in posledično LLOQ smo določili glede na izmerjene preizkuse realnih možganskih vzorcev. Izhajali smo iz prisotnosti preiskovanih spojin glede na ocenjene koncentracije v realnih možganskih vzorcih. Za spojini CB in takrin nismo imeli teh podatkov, zato smo ju pustili na istem koncentracijskem nivoju kot GUK-791. Ker sta bili spojini GUK-779 in donepezil prisotni v višji koncentraciji, smo zvišali tudi mejo LLOQ,

kljub temu da za donepezil, ki odlično ionizira, dokazujejo vrednosti LLOQ tudi do 1000-krat nižje kot pri nas (LLOQ okoli 0,1 ng/mL) (34).

Spodnjo limito kvantifikacije smo določali s pomočjo točnosti, ponovljivosti in razmerja signal vzorca/slepa raztopina ter razmerja signal/šum. Razmerja signal/šum morajo biti na nivoju LLOQ večja od 5, kar smo uspeli doseči, saj so pri nas vse vrednosti na nivoju spodnje točke umeritvene krivulje višje od 40 (vrednosti razmerij smo prikazali na sliki 4). Rezultati določevanja LLOQ in območja v možganih so prikazani v prilogi 1. Vse spojine razen takrina so izkazovale točnost na območju LLOQ z relativno napako manjšo od 30%. FDA dovoljuje odstop za 20%. To vrednost bi najverjetneje dosegli z večjim številom ponovitev, a smo zaradi varčevanja z biološkim materialom delali z najmanjšim možnim številom vzorcev. Iz istih razlogov, kot smo jih obravnavali pri ponovljivosti in točnosti, smo razširili sprejemljivostni interval relativne napake na 30%. Zato smo za vse spojine določili LLOQ na nivoju najnižjega kalibratorja, tj. 1,5 ng/mL za CB, GUK-791, 7,5 ng/mL za GUK-779 in 158,4 ng/mL za donepezil. Pri takrinu smo izjemoma določili LLOQ na nivoju drugega kalibratorja, to je 3,8 ng/mL, saj je odstopala vrednost najnižjega kalibratorja za več kot 100%, prav tako pa je odstopala vrednost Q_{CL} za več kot 30%. V plazemskih vzorcih smo določali LLOQ na isti način. Tu se je izkazala najnižja koncentracija kalibratorja za ustrezno, saj so bile vrednosti relativne napake znotraj 20% dovoljenega odstopa. Rezultati so podani v prilogi 2. LLOQ za plazmo je bil tako 1,5 ng/mL za CB, GUK-791 in takrin, 7,5 ng/mL za GUK-779 in 158,4 ng/mL za donepezil.

Območje smo določali glede na ponovljivost, točnost in moč povezave z determinacijskim koeficientom na vnaprej določenem koncentracijskem območju analitov, ponovno glede na odzive vzorcev iz pilotnega poskusa. Pri določevanju območja smo za spodnjo mejo določili LLOQ (razen za takrin v možganih), za zgornjo mejo pa smo določili najvišjo vrednost kalibratorja. Območje smo določali posebej za možganske in posebej za plazemske vzorce. V možganskih vzorcih so vse vrednosti kalibratorja ustrezale predpisanim zahtevam in so bile znotraj območja dovoljenega odstopa 15%, vrednosti R^2 pa večje od 0,96, iz česar smo lahko potrdili linearnost v tem koncentracijskem območju. Tako smo privzeli območje 1,5-30,0 ng/mL za CB, GUK-791, 2,3-30,0 ng/mL za takrin, 7,5-150 ng/mL za GUK-779, in 158,4-3168,0 ng/mL za donepezil. V plazemskih vzorcih smo se lotili določevanja območja na enak način. Tu je spodnja meja območja sovpadala z LLOQ, tudi na zgornji meji so bile vrednosti znotraj dovoljenega intervala odstopa in

vrednosti R^2 večje od 0,99. Tu smo privzeli območja 1,5-30,0 ng/mL za takrin, CB, GUK-791, 7,5-150 ng/mL za GUK-779, in 158,4-3168,0 ng/mL za donepezil določenih na plazemskih vzorcih.

4.3.3. Linearnost (Kalibracijska oz. umeritvena krivulja)

Kalibracijska oz. umeritvena krivulja opisuje povezavo med odzivom instrumenta in znano koncentracijo analizne spojine. Konstruirana mora biti za vsako preiskovano spojino, in sicer z obogatitvijo preiskovanega biološkega vzorca z znano koncentracijo standardne raztopine preiskovane spojine. Koncentracijsko območje smo določili glede na preiskovano območje posamezne spojine, pri čemer smo vključili 6 točk. Šlo je za volumne DR2, pripravili smo jo iz prve zatehte za razvoj metode in kalibracijo 10/25/50/100/200 μ L, z njimi smo obogatili biološke vzorce s preiskovanimi spojinami v koncentracijah:

- takrin: 1,5/3,8/7,5/15,0/30,0 ng/mL
- CB: 1,5/3,8/7,5/15,0/30,0 ng/mL
- donepezil: 158,4/396,0/792,0/1584,0/3168,0 ng/mL
- GUK-779: 7,5/18,8/37,5/75,0/150,0 ng/mL
- GUK-791: 1,5/3,8/7,5/15,0/30,0 ng/mL

Za QC-vzorke smo vzeli 3 točke, in sicer v volumnih 15/75/150 μ L DR2, pripravili smo jo iz druge zatehte za QC-vzorke v pripadajočih koncentracijah za posamezne spojine.

Vrednosti rezultatov analiz QC-vzorcev v obogatenih možganskih vzorcih, odziv ter glede na odziv preračune vrednosti koncentracije in odstop le-teh od nominalnih vrednosti, in njihove nominalne koncentracije smo tabelarično predstavili v preglednici XVI. Preračun koncentracij QC-vzorcev smo opravili glede na koeficiente uteženih umeritvenih krivulj. Grafične in tabelarične prikaze kalibratorjev za pripravo umeritvenih krivulj in kontrolnih vzorcev v možganskih vzorcih smo prikazali v prilogi 1. Umeritvene premice so pokazale linearno korelacijo. Donepezila in GUK-779 sta izkazovala odstopanje od linearosti pri višjih koncentracijah. Ta efekt smo opazili tudi pri nadaljnjih obravnavah specifičnosti, kjer se je pri višji koncentraciji spojine (predvsem za donepezil) izkazalo, da je učinkovitost ekstrakcije nekoliko višja. Pri GUK-779 tega učinka nismo zaznali, izgledalo pa je, kot da v višjem koncentracijskem območju ne sledi več linearosti. Skupaj z umeritvenimi krivuljami smo določali tudi ujemanje QC-vzorcev z umeritveno premico. Odstopi preračunanih koncentracij QC-vzorcev glede na parametre utežitvene premice od

nominalnih koncentracij so bili za vse spojine znotraj razširjena dopustnega intervala odstopa 30%. Izven tega intervala je bila samo vrednost QC_L-vzorca takrina. Za kvantitativno oceno je bila razširitev dopustnega intervala ustrezna.

Preglednica XVI: Odzivi QC-vzorcev in preračunane koncentracije glede na parametre utežene umeritvene premice in odstopi od nominalne koncentracije za posamezne spojine v obogatenih vzorcih možganskega tkiva

TAKRIN			Izračun		
	V [μ L]	C nom [μ g/L]	Odziv	C ut [ng/mL]	Odstop [%]
QC_L	15	2,3	6254	0,4	-82,2
QC_M	75	11,3	29367	8,9	-20,8
QC_H	150	22,5	74652	25,6	13,7
CB			Izračun		
	V [μ L]	C nom [μ g/L]	Odziv	C ut [ng/mL]	Odstop [%]
QC_L	15	2,3	4169	1,7	-23,8
QC_M	75	11,3	22542	9,3	-17,6
QC_H	150	22,5	55927	23,0	2,2
DONEPEZIL			Izračun		
	V [μ L]	C nom [μ g/L]	Odziv	C ut [ng/mL]	Odstop [%]
QC_L	15	224,8	461808	254,0	13,0
QC_M	75	1123,9	1885736	1037,2	-7,7
QC_H	150	2247,8	4053002	2229,3	-0,8
GUK-779			Izračun		
	V [μ L]	C nom [μ g/L]	Odziv	C ut [ng/mL]	Odstop [%]
QC_L	15	11,2	110186	8,3	-26,1
QC_M	75	56,1	530687	40,1	-28,8
QC_H	150	112,3	1440980	108,8	-3,3
GUK-791			Izračun		
	V [μ L]	C nom [μ g/L]	Odziv	C ut [ng/mL]	Odstop [%]
QC_L	15	2,3	4686	2,4	3,8
QC_M	75	11,3	20320	9,9	-10,0
QC_H	150	22,3	57764	27,5	27,9

Umeritvene krivulje in odstopi kontrolnih vzorcev od umeritvene premice smo prav tako določali na vzorcih plazme. Vrednosti rezultatov analiz QC-vzorcev v obogatenih plazemskih vzorcih, odziv ter glede na parametre utežene umeritvene premice preračunane koncentracije in odstop le-teh od nominalnih koncentracij, ter njihove nominalne koncentracije smo tabelarično predstavili v preglednici XVII.

Grafični in tabelarni prikazi kalibratorjev za pripravo umeritvenih krivulj in kontrolnih vzorcev v možganskih vzorcih smo prikazali v prilogi 2.

Pri vzorcih plazme so točke kalibratorjev bolj sledile umeritveni premici, kar se kazalo v determinacijskem koeficientu korelacije, ki je bil bliže 1. Odzivi so bili višji v primerjavi z možganskimi vzorci. Presenetljivo večje je bilo odstopanje preračunanih vrednosti QC-vzorcev glede na parametre uteženih umeritvenih premic od nominalnih koncentracij QC-vzorcev. Tudi tu smo se sklicevali na dopustnost razširitve intervala odstopa na 30%, saj je bila za namen ocene prehoda takšna ocena zadostna. Izven intervala < 30% se je nahajala samo vrednost QC_L-vzorca za donepezil. Najverjetneje bi vrednosti QC-vzorcev lahko približali vrednostim kalibratorjev oz. parametrom umeritvenih premic ob večjem številu analiziranih plazemski in možganskih vzorcev. Vendar smo zaradi varčevanja z biološkim materialom analize izvajali na najmanjšem možnem številu bioloških vzorcev.

Preglednica XVII: Odzivi QC-vzorcev in preračunane koncentracije glede na parametre utežene umeritvene premice in odstopi od nominalne koncentracije za posamezne spojine v obogatenih vzorcih plazme

TAKRIN			Izračun		
	V [μL]	C nom[μg/L]	Odziv	C ut [ng/mL]	Odstop [%]
QC_L	15	2,2	11640	2,5	29,0
QC_M	75	11,2	55751	13,6	23,6
QC_H	150	22,5	85763	21,1	-4,9
CB			Izračun		
	V [μL]	C nom[μg/L]	Odziv	C ut [ng/mL]	Odstop [%]
QC_L	15	2,3	5754	1,7	-24,6
QC_M	75	11,3	27703	8,2	-27,4
QC_H	150	22,5	64734	19,1	-15,2
DONEPEZIL			Izračun		
	V [μL]	C nom[μg/L]	Odziv	C ut [ng/mL]	Odstop [%]
QC_L	15	224,8	714255	303,5	35,0
QC_M	75	1123,9	3049784	1295,7	15,3
QC_H	150	2247,8	4325212	1837,6	-18,2
GUK-779			Izračun		
	V [μL]	C nom[μg/L]	Odziv	C ut [ng/mL]	Odstop [%]
QC_L	15	11,3	199501	11,6	3,6
QC_M	75	56,3	1027305	59,8	6,6

QC_H	150	112,5	1554481	90,5	-19,5
GUK-791			Izračun		
	V [μL]	C nom[μg/L]	Odziv	C ut [ng/mL]	Odstop [%]
QC_L	15	2,3	7760	2,5	6,7
QC_M	75	11,3	39146	12,4	9,8
QC_H	150	22,5	59356	18,8	-16,4

4.3.4. Točnost

Točnost smo preračunali glede na odstope od nominalne koncentracije in rezultate podali kot relativne odstopne oz. relativne napake (RN) v odstotkih. Točnost smo določevali na QC-vzorcih.

Preglednica XVIII: Preračun parametra točnosti QC-jev v možganskih in plazemskih vzorcih izražen kot RN [%]

MOŽGANI			
TAKRIN	RN (QC_L) [%]	RN (QC_M) [%]	RN (QC_H) [%]
1.	4,5	-2,7	-18,2*
2.	-16,4	-16,4*	7,2
3.	-8,0	-17,0*	-12,3
CB			
1.	13,7	-16,0*	-2,3
2.	34,8*	0,0	4,0
3.	-26,1*	-31,9*	-21,3*
DONEPEZIL			
1.	14,1	0,0	-8,0
2.	-24,9*	-18,9*	-9,1
3.	-12,7	-13,7	-11,3
GUK-779			
1.	30,4*	-11,2	-12,6
2.	-19,3	-28,6*	-18,5*
3.	14,7	-25,9*	-7,7
GUK-791			
1.	-9,1	-18,8*	-17,9*
2.	-4,2	-29,3*	-18,7*
3.	-0,5	-14,9	21,5*

PLAZMA

TAKRIN	RN (QC _L) [%]	RN (QC _M) [%]	RN (QC _H) [%]
1.	5,6	1,6	14,3
2.	16,1*	16,5	11,6
3.	14,5	19,3	7,5
CB [%]			
1.	-4,3	-7,9	-9,0
2.	-21,0*	-10,5	-28,0*
3.	-24,1*	-11,1	-27,1*
DONEPEZIL [%]			
1.	-18,9*	-7,4	-18,6*
2.	4,0	15,0	-17,4*
3.	6,1	16,9*	-15,4*
GUK-779 [%]			
1.	-24,8*	-24,8*	-28,9*
2.	-4,6	-4,4	-29,8*
3.	-6,4	-3,5	-27,8*
GUK-791 [%]			
1.	20,8*	22,0*	24,5*
2.	0,7	3,9	24,0*
3.	3,8	4,7	20,6*

*vrednost ni skladna z navodili ali zahtevami FDA za validacijo bioanalizne metode

Parameter točnosti je bil eden ključnih za validacijo bioanalizne metode. Problemi s točnostjo so se pojavili pri koncentraciji QC_M in QC_H, saj so vrednosti odstopale za več kot 15%. Tu se je še enkrat pokazala težavnost spojin za delo, ki so svojo variabilnost izkazovale s precejšnje neponovljivostjo in netočnostjo. Kljub neskladnosti z zahtevami FDA za validacijo bioanalizne metode smo potrdili točnost kot ustrezno, saj je bila za namen naše metode, tj. ocena prehajanja v možgane in robustna kvantifikacija, relativna napaka na intervalu < 30% dopustna.

4.3.5. Specifičnost in učinek matrice

Specifičnost in učinek matrice smo izvajali samo na možganskih vzorcih, saj nismo imeli zadostne količine plazemskih vzorcev, da bi lahko izvedli vse analize. Možgane smo uspeli pridobiti iz različnih podgan in tako smo lahko tudi ocenili relativni učinek matrice

(RUM). RUM smo ocenili kot RSD odzivov 3 različnih možganskih vzorcev v 3 dneh, in sicer na QC-vzorcih. V preglednici XIX smo prikazali relativni učinek matrice.

Preglednica XIX: Relativni učinek matrice podan na 3 vzorcih podgan izražen kot RSD [%]

RUM [%]					
	CB	takrin	donepezil	guk-779	guk-791
QC L	18,9	18,9	23,1	16,0	16,1
QC M	12,9	15,7	13,0	31,2	18,8
QC H	19,5	13,1	19,3	44,1	16,9

Smernice FDA priporočajo odstopanje $RUM < 15\%$, vendar za namen naše metode je ta zahteva presegala potrebe. Vrednosti so nakazovale, da obstajajo precejšnje variabilnosti med različnimi osebki podgan. Za kvantifikacijo oz. oceno velikostnega razreda in prehodnosti KMP so bile te vrednosti sprejemljive, za nadaljnje klinične študije pa bi bile potrebne modifikacije metode, npr. sprememba postopka homogenizacije in centrifugiranja, optimizacija topil glede na optimalno topnost preiskovanih spojin, uporaba materialov, na katerih spojine ne zaostajajo, zamenjava kartuš za SPE-analizo. Prav tako bi bil potreben premislek o zamenjavi elucijskega pufra, in sicer prehod na šibkejšo bazo, saj je koncentracija spojin v puftru za elucijo sčasoma upadala (preglednica XXII). Poleg relativnega učinka matrice smo ugotavljali tudi parametre AUM, RE in PE. Prikazali smo vrednosti na nivojih QC-vzorcev, in sicer na najnižjem in najvišjem koncentracijskem nivoju. V preglednici XX smo z vrednostmi v oklepaju predstavili RSD v %.

Preglednica XX: Ocena AUM, RE, PE na možganskih vzorcih, število v oklepaju je vrednost RSD, ki vključuje 5 vzorcev

n=5	takrin	CB	donepezil	GUK-779	GUK-791	GUK-772
QC L						
AUM [%]	77,8 (8,1)	85,1 (3,6)	86,3 (5,3)	100,7 (2,5)	96,5 (3,7)	116,7 (1,2)
RE [%]	41,7 (2,0)	43,5 (0,4)	55,6 (0,8)	47,0 (1,5)	45,2 (2,3)	49,9 (3,8)
PE [%]	32,4 (16,5)	37,0 (1,6)	48,0 (4,5)	47,3 (3,6)	43,7 (8,5)	58,2 (4,5)
QC H						
AUM [%]	80,4 (4,2)	88,2 (3,1)	91,1 (2,6)	107,2 (1,2)	92,9 (6,7)	117,8 (0,7)
RE [%]	39,0 (1,9)	50,1 (0,8)	67,9 (1,1)	57,6 (1,8)	54,4 (1,9)	55,3 (1,4)
PE [%]	31,3 (7,9)	44,2 (2,4)	61,9 (2,8)	61,8 (2,2)	50,5 (13,0)	65,1 (0,9)

Glede na vrednosti zgornjih parametrov ni bilo bistvenih razlik med nizkimi in visokimi koncentracijami. Osredotočili smo se predvsem na naslednje tri spojine, to so donepezil, GUK-779 in GUK-791, saj so bile s temi tudi izvedene predhodne toksikološke študije in

so v načrtovanju tudi nadaljnje. Za te tri spojine je bil AUM večji od 85%, kar je bilo zadovoljivo. Bolj problematične so bile vrednosti za izkoristek ekstrakcije oz. RE. V celem procesu ekstrakcije se je izgubila več kot polovica preiskovanih spojin, saj se je RE gibal med 45-60%. Zmnožek parametrov AUM in RE nam je podal vrednost PE (učinkovitost ekstrakcije analitov), ki se je prav tako gibala v območju 47-62% za omenjene spojine. Zgornje vrednosti smo privzeli kot ustrezne za validacijo za namen uporabnosti naše metode.

4.3.6. Stabilnost

Najprej smo določali stabilnost analitov v topilu za raztopino standardov in topilu za elucijo. Ker smo za preiskovanje različnih tkivnih vzorcev uporabili iste raztopine standardov, smo stabilnostne teste izvajali samo na eni raztopini standardov. Za to smo uporabili raztopino standardov DR2 iz prve zatehte, ki smo jo uporabili za pripravo umeritvene krivulje. Za analizo smo uporabili koncentracije spojin na nivoju vzorca QC_M.

4.3.7. Stabilnost raztopine standardov

Preglednica XXI: Stabilnost raztopine standardov

	takrin	CB	donepezil	GUK-779	GUK-791
c ₀ [ng/mL] t = 0	11,8	11,2	1149,9	51,3	14,4
c ₁ [ng/mL] t = 7 dni	13,9	12,40	1190,9	59,7	15,4
(c ₁ -c ₀)/c ₀ × 100 [%]	17,4	10,6	3,6	16,5	6,9

Razlika koncentracij kaže na to, da se je koncentracija vseh spojin s časom povečala. Najverjetneje je bila to posledica hlapnosti topila v raztopini. Možna je bila tudi fluktuacija odzivov masnega spektrometra, saj nismo imeli na voljo izotopno označenih internih standardov.

4.3.8. Stabilnost spojin v elucijskem pufu

Preglednica XXII: Stabilnost spojin v elucijskem pufu (5 % amoniak v mešanici metanol:acetonitril=1:1)

	Takrin	CB	donepezil	GUK-779	GUK-791
c ₀ [ng/mL] t = 0	10,4	7,7	973,5	60,1	10,5
delež = 100%	100,0 %	100,0 %	100 %	100 %	100 %

c₁ [ng/mL]	9,8	9,4	838,4	54,8	8,9
t = 2 h					
delež [%]	94,2%	127,0%	86,1%	91,2%	84,8%
c₂ [ng/mL]	8,2	8,1	665,2	49,9	8,0
t = 4 h					
delež [%]	78,8%	105,2%	68,3%	83,0%	76,2%

Ta preizkus smo opravili tako, da smo izvedli celoten postopek ekstrakcije brez matriksa oz. brez možganskega tkiva ali plazme. Po končani SPE smo pustili stati spojine v elucijskem puftru dve oz. štiri ure. Ker je bil elucijski pufer bazičen (5 % amoniak v mešanici metanol:acetonitril=1:1), so bile spojine v njem neionizirane. Po preteklem času smo postopali kot običajno, in sicer s sušenjem ter rekonstitucijo. Za vsako časovno točko smo izvedli samo eno analizo. Analizo smo izvedli na istem koncentracijskem nivoju kot za analizo stabilnosti raztopin. Iz preglednice XXII je razvidno, da je s časom upadala koncentracija vseh preiskovanih spojin, če jih pustimo v elucijskem puftru. Do povišanja je prišlo le pri CB, vendar obstaja verjetnost analizne napake. Ker pri kromatografski ločbi nismo odkrili drugih kromatografskih vrhov, razpada le-teh spojin ne moremo potrditi. Glede na pretekle analize lahko posumimo na vezavo spojin na plastiko, vendar je bil ta odstop (donepezil kar za 30%, GUK-791 za 20 %) prevelik, da bi bil to edini razlog. Najverjetneje je šlo za vpliv baze. Očitno je bil 5% amoniak premočna baza za naše spojine, saj se ob daljšem stiku z elucijskim pufrom zmanjšal odziv preiskovanih spojin. V običajni analizi so bile spojine v elucijskem puftru pred naslednjim korakom sušenja maksimalno pol ure.

4.3.9. Stabilnost zamrzovanje in odtajevanje (FTS=freeze thaw stability)

To analizo smo opravili tako, da smo pripravili homogenate QC-jev v treh koncentracijskih območjih. Del homogenata smo nadalje analizirali po protokolu, preostali del pa smo zamrznili za 24h, nato odtajali, ponovno zamrznili in odtajali ter analizirali. Zamrzovanje ni bilo povsem uspešno, saj zaradi visoke vsebnosti metanola vzorci niso povsem zmrznili. Rezultate smo prikazali v preglednici XXIII. FTS smo podali kot razmerje koncentracije analita po zamrzovanju s koncentracijo analita pred zamrzovanjem. Analizo smo izvajali v treh ponovitvah.

4.3.10. Kratkoročna stabilnost (STS)

Za ugotavljanje kratkoročne stabilnosti smo primerjali koncentracijo oz. odzive vzorcev homogenatov (plazma in možgansko tkivo) s takojšnjo obdelavo in obdelavo po štirih urah. Naredili smo tri ponovitve na vzorcih QC. STS smo podali kot razmerje koncentracije analita po 4 urah s koncentracijo analita ob času 0. Ti deleži so podani kot % v preglednici XXIII.

4.3.11. Dolgoročna stabilnost (LTS)

Dolgoročno stabilnost smo prav tako ugotavljali na vzorcih QC, in sicer na vseh treh koncentracijskih nivojih in v treh ponovitvah. Obogatene vzorce plazme in možganskega tkiva po ekstrakciji smo pustili 14 dni v zamrzovalniku na temperaturi -20°C. Po tem smo izvedli analizo vzorcev brez predhodne izpostavljenosti nizki temperaturi in vzorcev, ki so bili izpostavljeni nizki temperaturi. Razmerje odzivov oz. iz odzivov preračunanih koncentracij smo navedli kot delež LTS. Rezultati so prikazani skupaj s FTS in STS v predglednici XXIII.

Preglednica XXIII: Pregled stabilnosti FTS, STS in LTS na QC-jih za posamezne spojine v možganih (M) in plazmi (P)

		takrin		CB		donepezil		GUK-779		GUK-791	
		M	P	M	P	M	P	M	P	M	P
Q C L	FTS	48,2	62,9	137,2	115,	77,7	91,3	80,0	91,4	74,0	100,
	[%]	**	**	**	5*	*		*		*	2
	STS	50,2	82,4	105,3	87,4	114,0	93,3	107,9	93,3	100,9	96,9
	[%]	**	*		*						
	LTS	48,7	49,5	74,8	99,1	70,4	81,3	81,0	86,9	67,9	74,8
	[%]	**	**	*		*	*	*		**	*
Q C M	FTS	60,4	78,1	102,2	134,	69,7	100,4	66,8	94,8	65,2	94,5
	[%]	**	*		5**	**		**		**	
	STS	130,2	100,6	136,6	90,9	126,1	93,3	131,7	99,3	132,8	98,8
	[%]	**		**		*		**		**	
	LTS	64,0	73,2	104,1	126,	128,0	95,5	73,9	85,3	86,4	89,8
	[%]	**	*		7*	*		*			
Q C	FTS	67,4	64,4	180,1	94,8	89,9	77,8	92,9	70,3	87,4	77,9
	[%]	**	**	**			*		*		*

H	STS [%]	93,0	94,1	118,5	84,6 *	112,8	95,0	114,3	94,3	116,3	89,4
	LTS [%] *	78,6	109,6	92,0	158, 0**	92,6	113,4	81,0 *	105, 8	98,9	80,5 *

*Odstopanja od začetne vrednosti za več kot 15%.

** Odstopanja od začetne vrednosti za več kot 30%

Vrednosti, ki so odstopale za več kot 15% glede na začetno vrednost, smo označili z zvezdico (*), vrednosti, ki so od začetne vrednosti odstopale za več kot 30%, pa smo označili z dvema zvezdicama (**). Upoštevajoč parametre točnosti in ponovljivosti za naše preiskovane spojine lahko rečemo, da so spojine prestale stabilnostne teste. Pri testu STS na QC_M možganskem vzorcu lahko posumimo na onečiščenje s spojinami, saj so se pri vseh deleži izmerjenih koncentracij glede na izhodiščno povečali. Veliko označenih vrednosti je bilo znotraj razširjenega intervala dopustnega odstopa < 30%. Za najbolj kritične parametre so se izkazale vrednosti za FTS, saj so za posamezne QC-vzorke končne koncentracije padle tudi na 50% začetne koncentracije. Testiranje FTS bi bilo smiselno ponoviti, saj izvedba testa ni bila optimalna zaradi nezmrnjena vzorca (prevelik delež metanola). Zato so bile te vrednosti nereprezentativne, potrebna bi bila ponovna izvedba. Zamrzovanje bi lahko izvedli s tekočim dušikom.

4.3.12. Avtomatski vzorčevalnik

Stabilnost na avtomatskem vzorčevalniku smo izvedli tako, da smo tkivne obogatene vzorce analizirali še enkrat po 24 urah. To smo naredili na vzorcih plazme, in sicer ponovno na nivojih QC-vzorcev. Rezultate smo podali kot relativne odstopne vrednosti odzivov po 24 urah glede na vrednosti odzivov ob času 0 v preglednici XXIV.

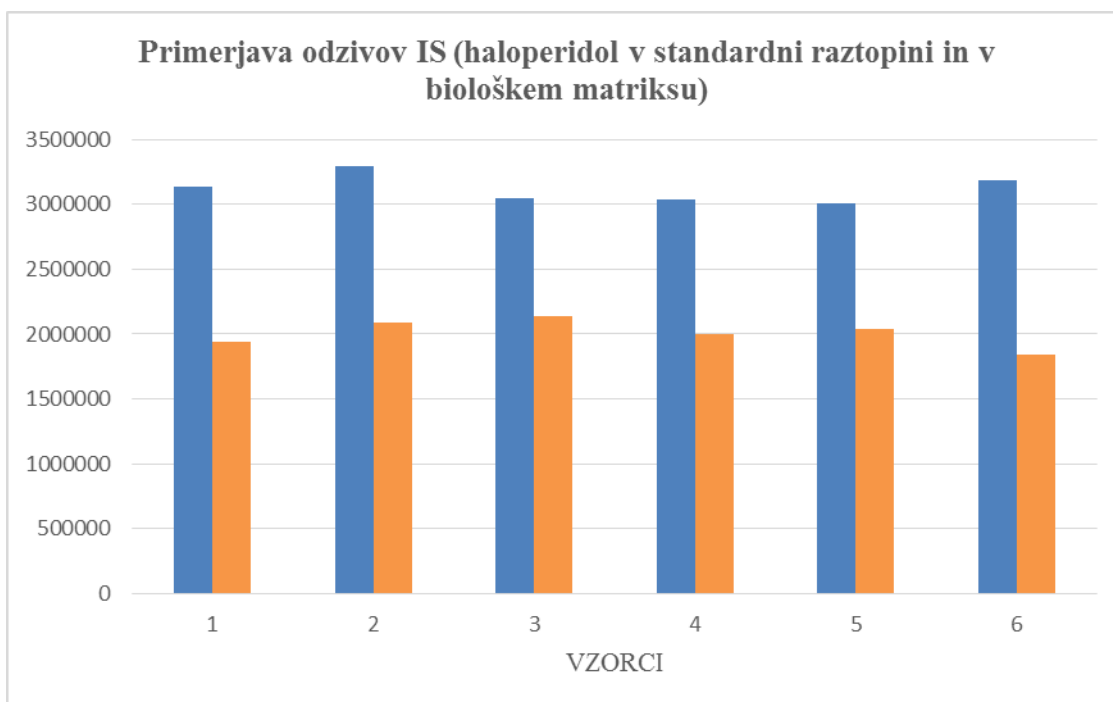
Preglednica XXIV: Rezultati avtomatskega vzorčevalnika po 24 urah na plazemskih QC-vzorcih

Meddnevna ponovljivost izražena kot RN – vzorci plazme [%]					
n_{injiciranj}=6 n_{vzorcev}=3	TAKRIN [%]	CB [%]	DONEPEZIL [%]	GUK-779 [%]	GUK-791 [%]
QC_L	0,8	0,6	5,0	5,8	2,9
QC_M	1,1	3,5	3,1	5,5	2,7
QC_H	0,3	1,4	3,2	8,1	3,1

Rezultati so nam pokazali, da so odzivi po 24 urah razmeroma ponovljivi oz. medsebojno primerljivi. Sklepali smo, da spojine tako ne razpadajo na našem analiznem instrumentu in ne razpadajo v topilu za rekonstitucijo (0,1% očetna kislina v 80% MeOH) pri nastavljenih pogojih UHPLC-MS/MS.

4.3.13. Uporaba internega standarda

V razvojni fazi smo izpustili uporabo internega standarda. Za kasnejšo uporabo smo kljub vsemu izvedli teste s spojino, ki bi jo lahko uporabili kot interni standard. Izbrali smo haloperidol, saj je po naravi šibka baza, prav tako kot naše preiskovane spojine, ima podoben retencijski čas na uporabljeni koloni in izkazuje podobne lipofilne lastnosti ter se dobro loči od preiskovanih spojin. Preizkus z internim standardom smo opravili na obogatenih možganskih vzorcih za pripravo umeritvene krivulje. Primerjali smo ponovljivost odzivov, ki so prikazani na sliki 12. Primerjali smo odzive 6 vzorcev, to so kalibratorji za pripravo umeritvene krivulje. Koncentracija haloperidola je bila v vseh vzorcih enaka. V standardni raztopini haloperidol ni šel skozi postopek ekstrakcije, pri vzorcih obogatenega biološkega matriksa pa je šel skozi vse korake v metodi ekstrakcije.



Slika 12: Primerjava odzivov IS (haloperidol) v vzorcih standardne raztopine z vzorci obogatene biološkega matriksa: IS v delovni raztopini (modri stolpci), IS v obogatenem možganskem tkivu (oranžni stolpci), na abscisi so vzorci 1-6 kalibratorji za umeritveno krivuljo, haloperidol kot IS jim je dodan v isti koncentraciji

Iz diagrama na sliki 12 je očitno, da so bili odzivi v čisti raztopini standardov višji v primerjavi z odzivi vzorcev, ki so bili podvrženi ekstrakcijskemu postopku. V obeh primerih so bili odzivi ponovljivi. RSD za vzorce standardne raztopine je znašal 3,4%, medtem ko je bil pri vzorcih iz biološkega materiala le-ta 5,2%. Iz teh rezultatov smo sklepali, da bi bil haloperidol ustrezen za uporabo kot IS.

4.4. Analiza bioloških vzorcev

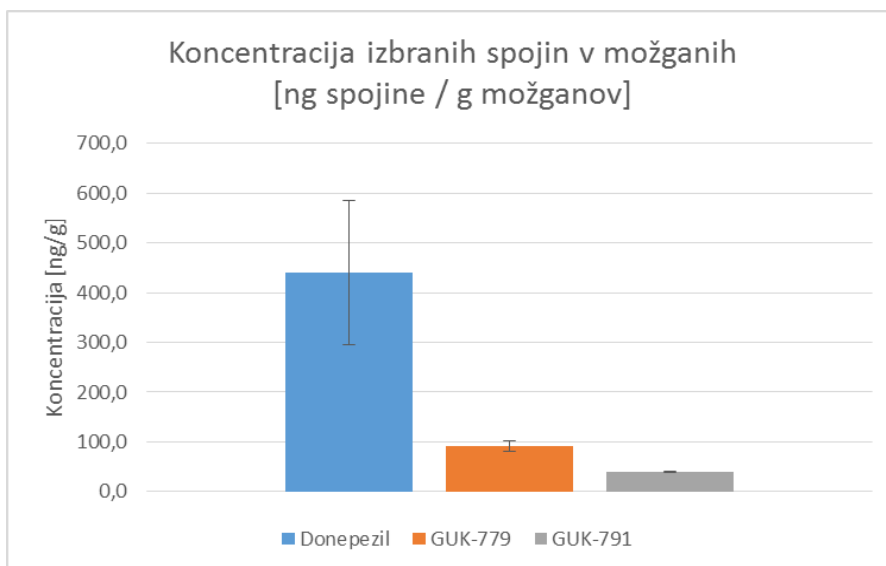
Iz predhodnih študij toksičnosti smo uspeli pridobiti možganske vzorce podgan, ki jim je bila aplicirana intraperitonealno ena izmed preiskovanih spojin. Za eno spojino smo imeli možganske vzorce ene podgane. Odmerek donepezila je bil 2mg/kg telesne teže podgane, medtem ko sta bila odmerka za GUK-779 in GUK-791 10 mg/kg telesne teže podgane.

Iz tkiva enih možganov smo pripravili po tri vzorce. Obdelali smo jih na način, ki smo ga postavili z našo metodo. Plazma teh podgan žal ni bila na voljo, tako da biološkega vzorca plazme nismo mogli analizirati. Vzorce možganov ene podgane smo analizirali v treh paralelah za vsak analit. Rezultate smo predstavili v preglednici XXV. Koncentracijo smo preračunali glede na parametre umeritvene premice pridobljene v procesu validacije

(priloga 1). Povprečno koncentracijo preiskovanih spojin v možganih smo predstavili tudi z diagramom na sliki 13.

Preglednica XXV: Možganski vzorci podgan tretiranih z izbranimi spojinami

REALNI VZORCI	Vzorec	Odziv	C iz umer[$\mu\text{g/L}$]	C v možg[ng/g]	C v možg povp [ng/g]
	donepezil	56178	265,0	353,3	439,8
	donepezil	86545	454,9	606,5	
	donepezil	56928	269,7	359,6	
	GUK-779	82136	61,5	82,0	91,6
	GUK-779	10426	76,6	102,1	
	GUK-779	91830	68,1	90,8	
	GUK-791	63039	29,9	39,9	40,6
	GUK-791	59524	28,3	37,7	
GUK-791	69788	33,1	44,1		



Slika 13: Grafični prikaz koncentracije preiskovanih učinkovin v realnih možganskih vzorcih

Iz diagrama na sliki 13 in odzivov v preglednici XXV smo razbrali, da so vse spojine dosegle možgane in tako prešle KMP. Donepezil je dosegel možgane v najvišji koncentraciji kljub najnižjemu odmerku v primerjavi z GUK-oma. Glede na to, da je šlo za posamezno preiskovano spojino za vzorce možganov ene živali in razmeroma visokemu RSD (sploh pri donepezilu), lahko variabilnost v odzivih pripišemo različnemu porazdeljevanju spojin v možganih.

Prisotnost v najvišji koncentraciji sama po sebi še ne pomeni najboljšega delovanja. Le-to je odvisno od konstante zaviranja BChE in farmakokinetičnih parametrov.

5. SKLEP

Namen naše naloge je bil dosežen – postavili smo metodo za ekstrakcijo in detekcijo novih BChE zaviralcev v možganih in plazmi. Metodo smo želeli tudi validirati skladno s smernicami za validacijo bioanalizne metode FDA. Žal nam to ni povsem uspelo, saj smo bili za točno in natančno kvantifikacijo izven območja intervalov sprejemljivosti pri točnosti, ponovljivosti in stabilnosti v elucijskem pufru. V predklinični fazi je bistveno, da zagotovimo točnost, ponovljivost, območje in limito kvantifikacije. Zaradi težavnosti preiskovanih spojin sta bili ponovljivost in točnost metode nekoliko slabši od pričakovanih, zato smo kriterije sprejemljivosti razširili iz splošno sprejetih 15% odstopa relativne napake za točnost in RSD za ponovljivost na 30%.

Izkazalo se je, da je ponovljivost postopka ekstrakcije in izvedbe analize znotraj dneva ustrezna. Sklepamo lahko, da se je variabilnost pojavila, ko smo delali z različnimi tkivnimi vzorci. Lahko je tudi posledica koncentracijskih razlik v sami delovni raztopini, s katero smo obogatili naše vzorce. Potrdili smo območje in limito kvantifikacije v koncentracijskem rangu, v katerem pričakujemo vse realne vzorce. Za spojine takrin, CB, donepezil in GUK-791 zastavljenega območja ustreznosti nismo mogli potrditi, ker teh ni bilo v realnih vzorcih. Na možganskih vzorcih smo določili tudi specifičnost in učinek matrice. Tako smo uspeli skorajda popolnoma izničiti absolutni učinek matrice (AUM), vrednosti AUM so bile na intervalu 90-110%, dosegli smo želeni izkoristek ekstrakcije (RE), ki je znašal v povprečju okoli 50%. Učinkovitost ekstrakcije je bila prav tako 50%.

Izbrali smo najustreznejše topilo za spojine in raztopino za ekstrakcijo, kartuše za ločevanje in metodo ekstrakcije. Prav tako smo opravili še testne analize realnih vzorcev, kjer smo potrdili prehajanje spojin skozi KMP. S pomočjo preliminarnih poskusov smo ugotovili, da novi spojini GUK-779 in GUK-791 dosežeta možgansko tkivo v približno 5-krat oz. 10-krat nižji koncentraciji kot donepezil, vendar bi bilo za oceno prehoda treba upoštevati tudi plazemske koncentracije, ki pa jih nismo izmerili.

Glede na namen študije, to je oceniti sposobnost porazdeljevanja učinkovin preko KMP v CŽS, kjer so pomembni velikostni razredi, je taka razširitev meja dopustna. Postavljeno metodo smo uspeli validirati, in sicer glede na parametre točnosti, ponovljivosti, limite kvantifikacije ter območja.

Razvita metoda je podlaga za izvajanje predkliničnih študij. Za nadaljnje raziskovalne faze pa so potrebne optimizacije metode. Priporočajo se predvsem obravnave na večjem številu vzorcev, tako plazemskih kot možganskih, s popolnoma enakimi koraki in usklajeno znotraj kratkega časovnega intervala, da se tako zmanjšajo napake zaradi samega rokovanja z vzorcem in pridobi večja stopnja zanesljivosti.

6. LITERATURA

1. Ribarič Samo: Temelji patološke fiziologije. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za fiziologijo; 2009, 294-297.
2. Alzheimer's disease organisation: www.alz.org/research/science/alzheimers_disease_treatments.asp. Dostopano: 01. 06. 2015.
3. Emeršič A., Pritošek Z. : Nastanek, razvoj in diagnostika Alzheimerjeve bolezni. Farmaceutski Vestnik 2013;64:191–201.
4. Emeršič Andreja, Pirtošek Zvezdan, Štempelj Mateja ŠB: Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni. Farm Vestn. 2013;64: 202–207.
5. Bon J., Kotnik B., Bresjanec M., Repovš G., Pregelj P., Dobnik B., Pirtošek Z.: Stroški možganskih bolezni v Sloveniji. Zdravniški vestnik 2013;82:164–175.
6. Rang H. P. , Dale M. M. , Ritter J. M. , Flower R. J. HG: Pharmacology, 2012, 110-113, 168-173, 481-485.
7. Craig LA, Hong NS, McDonald RJ: Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 2011;35: 1397-1409.
8. Scarpini E, Schelterns P, Feldman H: Treatment of Alzheimer's disease; current status and new perspectives. The Lancet Neurology 2003; 2:539–547.
9. Centralna baza zdravil. Dostopno na: [http://www.cbz.si/zzs/pao/bazazdr2.nsf/Search/\\$searchForm!SearchView&Seq=1](http://www.cbz.si/zzs/pao/bazazdr2.nsf/Search/$searchForm!SearchView&Seq=1). Dostopano: 02. 06. 2015.
10. Standridge John B: Pharmacotherapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease. Clinical Therapeutics 2004;26:615–630.
11. Farlow MR, Cummings JL. Effective pharmacologic management of Alzheimer's disease. The American Journal of Medicine 2007;120:388–397.
12. Goh C, Aw C, Lee J H, Chen C, Browne E: Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of cholinesterase inhibitors donepezil, tacrine, and galantamine in aged and young lister hooded rats. Drug Metabolism and Disposition. 2011;39:402–411.

13. Bond M, Rogers G, Peters J, Anderson R, Hoyle M, Miners a, et al. The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of Technology Appraisal No. 111): a systematic review and economic model. *Health Technology Assessment*. 2012;16:1–142.
14. Chen Y, Liu L.: Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:640–665.
15. Abbott N J: Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discovery Today Technologies*. 2004;1:407–416.
16. Daneman R, Prat A: The Blood – Brain Barrier. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2015;7: 1–24.
17. Banks William: Drug delivery to the brain in Alzheimer's disease: Consideration of the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Review*. 2012;64:629–639.
18. Bowman G, Kaye J, Moore M, Waichunas D, Carlson N, Quinn J: Blood–brain barrier impairment in Alzheimer disease. *Neurology*. 2007;68:1809–1814.
19. Nightingale C H, Carver P: Basic principles of pharmacokinetics. *Clinics in Laboratory Medicine*. 1987;7:267–278.
20. Shargel Leon, Wu-Pong Susanna YA: *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*, McGraw-Hill Education, USA. 2012: 1-12,212, 361-389.
21. Jann M W, Shirley K L, Small G W: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*. 2002;41:719–739.
22. Clark David: Computational Prediction of Blood-brain Barrier Permeation. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. 2005;40:403–415.
23. Norinder U, Haeberlein M: Computational approaches to the prediction of the blood – brain distribution. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54:291–313.
24. Lipinski Cristopher A.: Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today Technologies*. 2004;1:337–341.
25. Direktiva 2010/63/EU evropskega parlamenta in sveta. Uradni list Evropske unije. 22.10.2010;33–79. Dostopno na: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX:32010L0063>. Dostopano: 01.10.2015.

26. Pardridge William M: Log (BB), PS products and in silico models of drug brain. *Drug Discovery Today*. 2004;6446:392–393.
27. Lemke Thomas L., William David A., Roche Victoria F. ZSW: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolter Kluwer business, USA, 2008:234-243, 276-279.
28. Guideline on bioanalytical method validation. EMA Guideline. 2012;44, Julij 2011.
29. European medicine agency. <http://www.ema.europa.eu>. Dostopano: 10.06.2015.
30. Food and Drug Administration (FDA). <http://www.fda.gov>. Dostopano: 10.06.2015.
31. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Maj 2001.
32. Steen Honore Hansen, Stig Pedersen-Bjergaard KER. Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis. 1. izdaja. John Willey&Sons Ltd.; 2012:141-161, 273-298.
33. Geerts H, Guillaumat P O, Grantham C, Bode W, Anciaux K, Sachak S. Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamine and donepezil in rats, mice, and rabbits. *Brain Research*. 2005;1033:186–193.
34. Pilli N R, Inamadugu J K, Kondreddy N, Karra V K, Damaramadugu R, Rao J V L N: A rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of donepezil and its active metabolite, 6-o-desmethyl donepezil in human plasma and its pharmacokinetic application. *Biomedical Chromatography*. 2011;25:943–951.
35. Validation of Chromatographic Methods. FDA Guidance for Industry. 1994;30, November, 1994.
36. Snape M F, Misra A, Murray T K, De Souza R J, Williams J L., Cross J: A comparative study in rats of the in vitro and in vivo pharmacology of the acetylcholinesterase inhibitors tacrine, donepezil and NXX-066. *Neuropharmacology*. 1999;38:181–193.
37. Phenomex. Brošura proizvajalca Phenomex - kartuša Strata XC.
38. Varian. Brošura proizvajalca Varian - kartuša Bond ElutPlexa PCX.
39. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M.:A strategy for validation of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedecel Analysis*. 1996;14:375–388.

40. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M.: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*. 2003;75:3019–3030.
41. Tičar Erik: Razvoj in validacija metode za določevanje remifentanila v krvnih madežih popkovnične krvi. Univerza v Ljubljani; 2013. Dostopno na: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2013/Ticar_Erik_dipl_nal_2013.pdf.
Dostopano: 31.05.2015.
42. Benedik Marjeta: Določitev permeabilnosti lastnosti novih zaviralcev holinesteraz na ileumu podgane in vitro. Univerza v Ljubljani; 2013. Dostopno na: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/diplome/2013/Benedik_Marjeta_dipl_nal_2013.pdf.
Dostopano: 03. 06. 2015.
43. Vieira-Brock P L, Miller E I, Nielsen S M, Fleckenstein A E, Wilkins D G. Simultaneous quantification of nicotine and metabolites in rat brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science*. 2011;879:3465–3474.
44. Holm K M D, Linnet K: Chiral analysis of methadone and its main metabolite, EDDP, in postmortem brain and blood by automated SPE and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 2012;36:487–496.
45. Yue H, Borenstein M R, Jansen S., Raffa R B: Liquid chromatography-mass spectrometric analysis of buprenorphine and its N-dealkylated metabolite norbuprenorphine in rat brain tissue and plasma. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005;52:314–322

PRILOGA 1

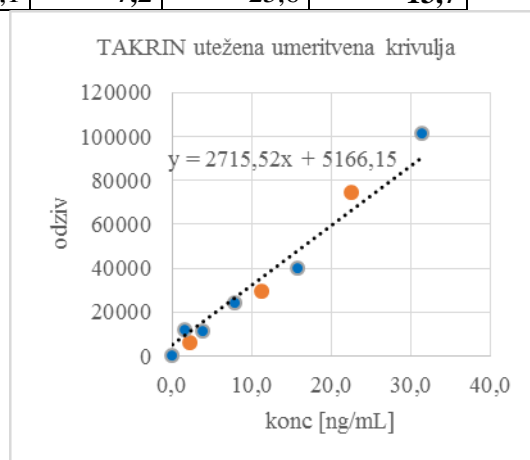
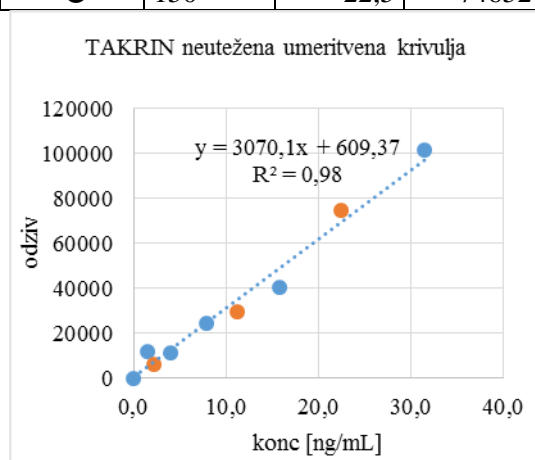
MOŽGANSKI VZORCI

Tabele prikazujejo podatke za kalibracijske vzorce za umeritveno krivuljo in kontrolne vzorce v možganskih vzorcih. (V: volumen dodane delovne raztopine preiskovanih spojin, c nom: nominalna koncentracija, y: odziv na UHPLC-MS/MS, c but: preračunana koncentracija brez uteževanja, RN but: relativna napaka brez uteževanja, c ut: preračunana koncentracija z uteževanjem, RN ut: relativna napaka z uteževanjem).

Grafi predstavljajo točke umeritvene krivulje (modre točke) in kontrolnih vzorcev QC (oranžne točke).

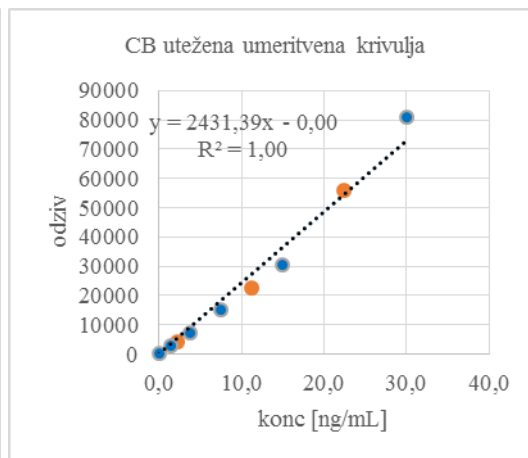
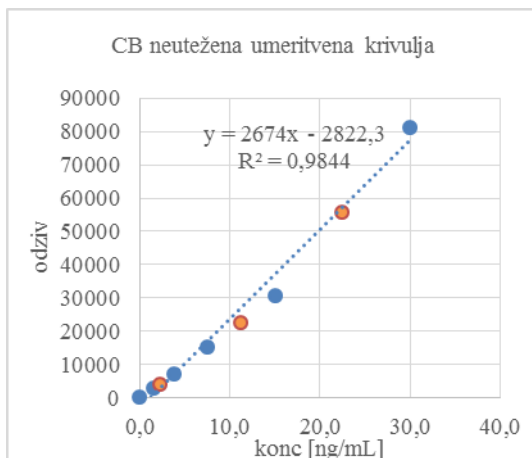
1. TAKRIN

V [μ L]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	utež(1/x ²)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
0	0	204		0			
10	1,5	11902	0,406	3,5	133,5	3,6	128,4
25	3,8	11500	0,064	3,3	-9,9	3,5	-12,1
50	7,9	24292	0,016	7,3	-2,0	7,8	-1,0
100	15,8	40345	0,004	12,2	-17,8	14,2	-9,6
200	30,0	101579	0,001	31	4,4	33,8	7,2
	but	ut					
Naklon (k)	3070,15	2715,52					
Odsek na osi y (n)	609,37	5166,15					
R2	0,978	0,956					
QC VZORCI	V [μ L]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
	15	2,3	6254	1,8	-18,3	0,4	-82,2
	75	11,3	29367	9,4	-16,7	8,9	-20,8
	150	22,5	74652	24,1	7,2	25,6	13,7



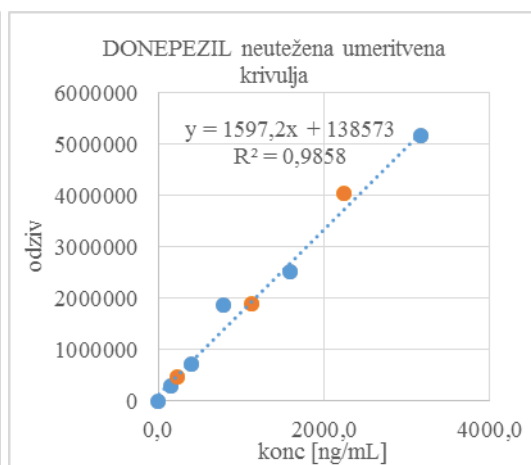
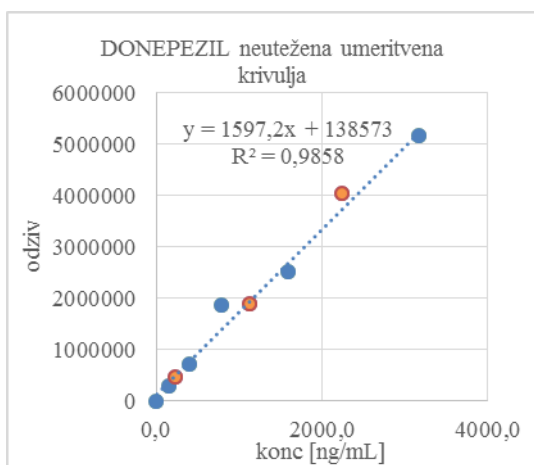
2. CB

V [μ L]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	utež($1/x^2$)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
0	0	111		0		0	
10	1,5	2901	0,444	2,1	42,7	1,2	-20,5
25	3,8	7419	0,071	3,9	2,2	3,1	-18,6
50	7,5	15316	0,018	6,8	-9,6	6,3	-16,0
100	15,0	30668	0,004	12,5	-16,5	12,6	-15,9
200	30,0	81074	0,001	31,4	4,6	33,3	11,1
	but	ut					
Naklon (k)	2674,0	2431,4					
Odsek na osi y (n)	-2822,2	0					
R2	0,984	0,971					
QC VZORCI	V [μ L]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
	15	2,3	4169	2,6	16,2	1,7	-23,8
	75	11,3	22542	9,5	-15,7	9,3	-17,6
	150	22,5	55927	21,9	-2,0	23,0	2,2



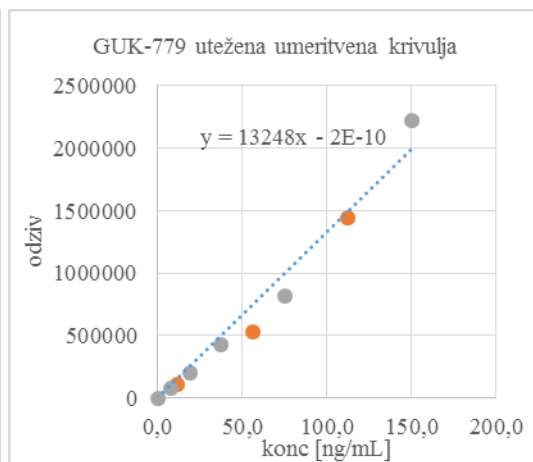
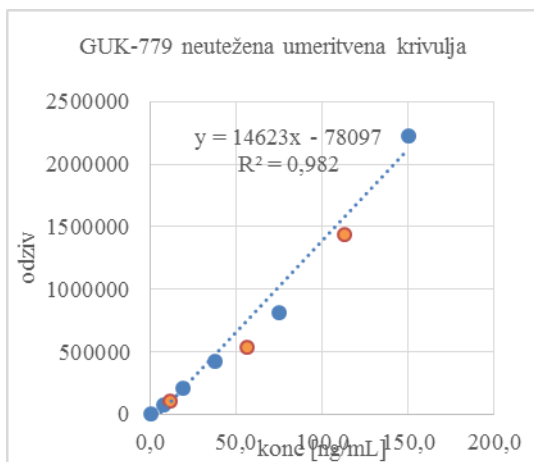
3. DONEPEZIL

V [μ L]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	utež(1/x ²)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
0	0	2443					
10	158,4	297099	3,99E-05	99,3	-37,3	163,4	3,2
25	396	721575	6,38E-06	365	-7,8	396,9	0,2
50	792	1861177	1,59E-06	1078,5	36,2	1023,7	29,3
100	1584	2520363	3,99E-07	1491,3	-5,9	1386,3	-12,5
200	3168	5168983	9,96E-07	3149,6	-0,6	2843,1	-10,3
	but	ut					
Naklon (k)	1597,2	1818,1					
Odsek na osi y (n)	138572	0					
R2	0,984	0,9723					
QC VZORCI	V [μL]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
	15	224,8	461808	202,4	-10	254,0	13,0
	75	1123,9	1885736	1093,9	-2,7	1037,2	-7,7
	150	2247,8	4053002	2450,8	9	2229,3	-0,8



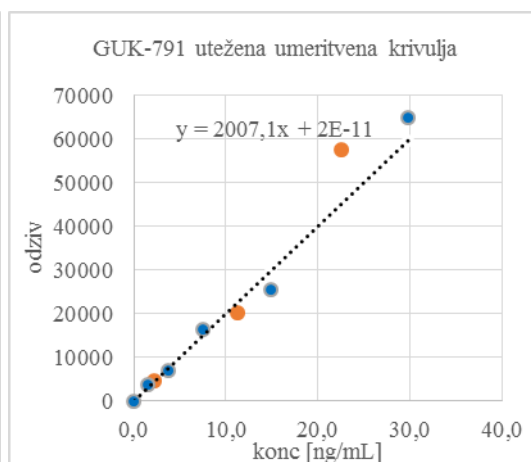
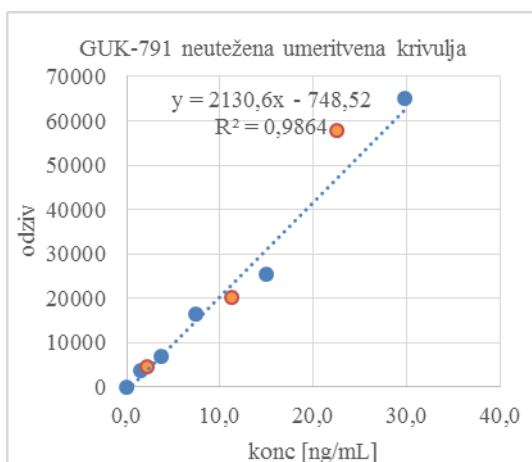
4. GUK-779

V [μ L]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	utež(1/x ²)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
0	0	400					
10	7,5	78095	5,73E-05	10,7	42,4	5,9	-21,4
25	18,8	207550	9,17E-06	19,5	4,2	15,7	-16,4
50	37,5	428053	2,29E-06	34,6	-7,7	32,3	-13,8
100	75	816481	5,73E-07	61,2	-18,4	61,6	-17,8
200	150	5168983	1,43E-07	157,4	4,9	167,8	11,9
	but	ut					
Naklon (k)	14652,2	13247,9					
Odsek na osi y (n)	-78097,4	0					
R2	0,982	0,966					
QC VZORCI	V [μ L]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
	15	11,2	110186	12,9	14,5	8,3	-26,1
	75	56,1	530687	41,5	-26	40,1	-28,8
	150	112,3	1440980	103,7	-7,7	108,8	-3,3



5. GUK-791

V [μ L]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	utež(1/x ²)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
0	0	73					
10	1,5	3679	0,45	1,7	15,9	1,8	23,0
25	3,8	6875	0,072	3,2	13,4	3,4	-8,0
50	7,5	16455	0,018	7,7	3,7	8,2	10,0
100	15,0	25524	0,005	12	19,6	12,7	-14,7
200	30,0	65122	0,001	30,6	2,6	32,4	8,9
	but	ut					
Naklon (k)	2130,6	2007,1					
Odsek na osi y (n)	-748,5	0					
R2	0,986	0,980					
QC VZORCI	V [μL]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
	15	2,3	4686	2,6	13,4	2,4	3,8
	75	11,3	20320	9,9	-12,1	10,1	-10,0
	150	22,5	57764	27,5	22,1	28,8	27,9



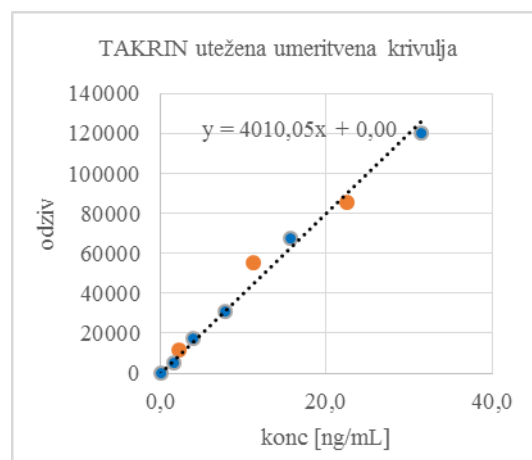
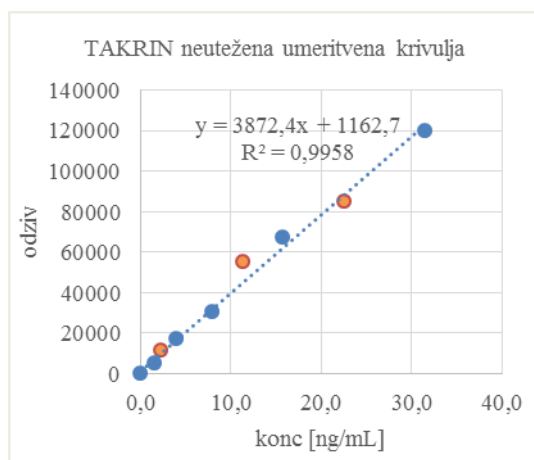
PRILOGA 2: PLAZEMSKI VZORCI

1. TAKRIN

Tabele prikazujejo podatke za kalibracijske vzorce za umeritveno krivuljo in kontrolne vzorce v vzorcih plazme. (V: volumen dodane delovne raztopine preiskovanih spojin, c nom: nominalna koncentracija, y: odziv na UHPLC-MS/MS, c but: preračunana koncentracija brez uteževanja, RN but: relativna napaka brez uteževanja, c ut: preračunana koncentracija z uteževanjem, RN ut: relativna napaka z uteževanjem).

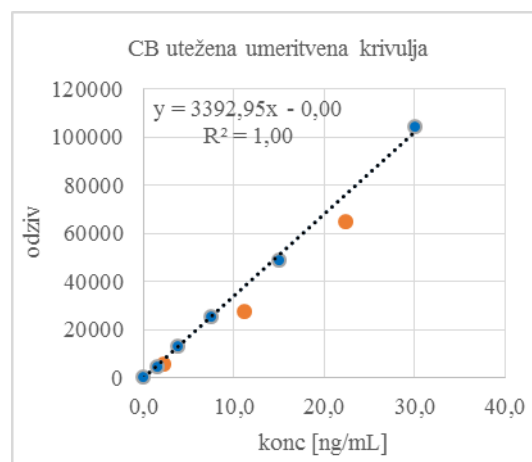
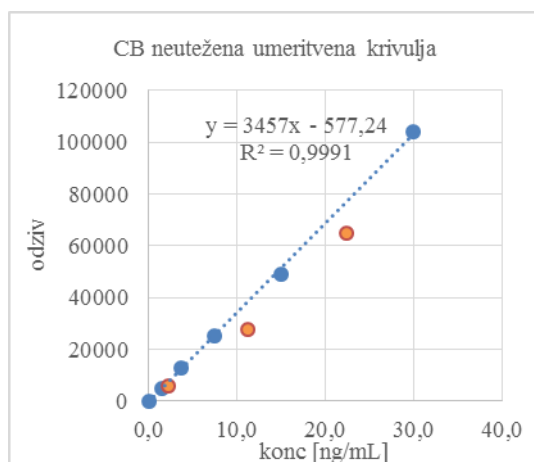
Grafi predstavljajo točke umeritvene krivulje (modre točke) in kontrolnih vzorcev QC (oranžne točke).

V [μL]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	utež(1/x ²)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
0	0	33					
10	1,5	5222	0,403	1,0	-33,4	1,3	-17,3
25	3,8	17372	0,064	4,2	6,3	4,3	10,0
50	7,5	30917	0,016	7,7	-2,4	7,7	-2,1
100	15,0	67717	0,004	17,2	9,1	16,9	7,2
200	30,0	120529	0,001	30,8	-2,1	30,1	-4,6
	but	ut					
Naklon (k)	3872,4	4010					
Odsek na osi y (n)	1162,7	0					
R2	0,995	0,994					
QC VZORCI	V [μL]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
	15	2,3	11640	2,7	19,7	2,5	29,0
	75	11,3	55751	14,0	24,6	13,6	23,6
	150	22,5	85763	21,8	-3,1	21,1	-4,9



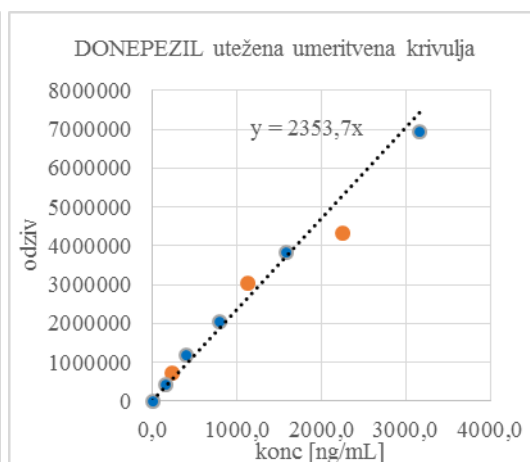
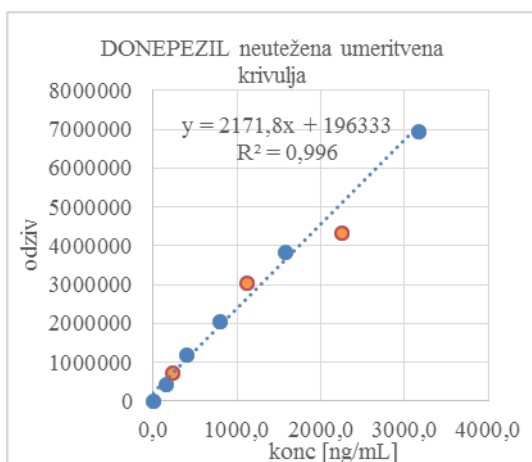
2. CB

V [μL]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	utež(1/x ²)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
0	0	111		0			
10	1,5	2901	0,444	1,5	0,7	1,4	-8,7
25	3,8	7419	0,071	3,9	3,6	3,8	1,0
50	7,5	15316	0,018	7,5	-0,2	7,5	-0,6
100	15,0	30668	0,004	14,4	-4,2	14,5	-3,6
200	30,0	81074	0,001	30,3	1	30,7	2,4
	but	ut					
Naklon (k)	3456,9	3392,9					
Odsek na osi y (n)	-577,2	0					
R2	0,999	0,999					
QC VZORCI	V [μL]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
	15	2,3	5754	1,8	-16,8	1,7	-24,6
	75	11,3	27703	8,2	-27,0	8,2	-27,4
	150	22,5	64734	18,9	-15,7	19,1	-15,2



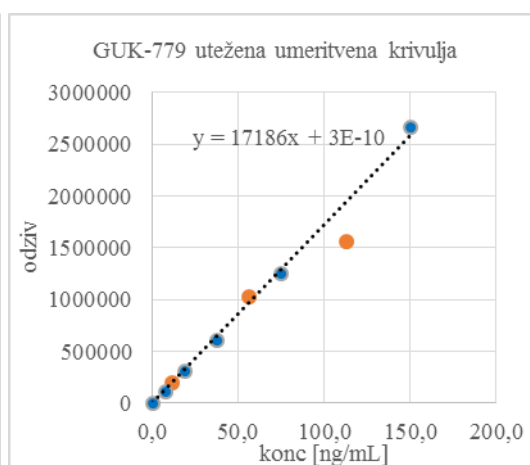
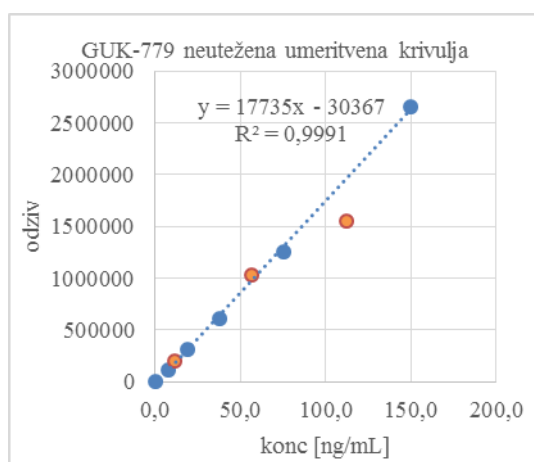
3. DONEPEZIL

V [μL]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	utež(1/x ²)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
0	0	3543					
10	158,4	432266	3,99E-05	100,2	-31,4	183,7	15,9
25	396,0	1171450	6,38E-06	414,3	13,4	497,7	25,7
50	792,0	2045544	1,59E-06	785,7	7,5	869,1	9,7
100	1584,0	3832209	3,99E-07	1544,7	5,7	1628,1	2,8
200	3168,0	6937376	9,96E-07	2864	-2	2947,4	-7,0
	but	ut					
Naklon (k)	2171,8	2353,7					
Odsek na osi y (n)	196333	0					
R2	0,997	0,99					
QC VZORCI	V [μL]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
	15	224,8	714255	238,5	6,1	303,5	35,0
	75	1123,9	3049784	1313,9	16,9	1295,7	15,3
	150	2247,8	4325212	1901,1	-15,4	1837,6	-18,2



4. GUK-779

V [μ L]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	utež(1/x ²)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
0	0	111					
10	7,5	106505	0,133	7,7	2,9	6,2	-17,4
25	18,8	312105	0,053	19,3	3	18,2	-3,1
50	37,5	607852	0,027	35,9	-4	35,4	-5,7
100	75	1254365	0,013	72,4	-3,4	73,0	-2,7
200	150	2657887	0,0067	151,6	1,1	154,7	3,1
	but	ut					
Naklon (k)	17735,2	17185,9					
Odsek na osi y (n)	-30367,3	0					
R2	0,999	0,997					
QC VZORCI	V [μL]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
	15	11,2	199501	13	15,2	11,6	3,6
	75	56,1	1027305	59,6	6,0	59,8	6,6
	150	112,3	1554481	89,4	-20,6	90,5	-19,5



5. GUK-791

V [μ L]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	utež(1/x ²)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
0	0	134		0			
10	1,5	3833	0,444	1,7	10,8	1,2	-18,7
25	3,7	11028	0,071	3,8	2,1	3,5	-6,4
50	7,4	20620	0,018	6,7	-10,5	6,5	-12,5
100	14,9	46924	0,004	14,5	-2,5	14,8	-0,4
200	29,8	99187	0,001	30,2	1,2	31,4	5,2
	but	ut					
Naklon (k)	3344,9	3163,2					
Odsek na osi y (n)	-1691,4	0					
R2	0,998	0,995					
QC VZORCI	V [μL]	c nom [ng/mL]	y(odziv)	c but [ng/mL]	RN but [%]	c ut [ng/mL]	RN ut [%]
	15	2,3	7760	2,8	25,6	2,5	6,7
	75	11,3	39146	12,2	8,5	12,4	9,8
	150	22,5	59356	18,3	-18,9	18,8	-16,4

