

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Vývoj a validácia metódy pre terapeutické stanovenie
vybraných antiepileptík metódou LC/MS**

Diplomová práca

Autor: Michal Matejka

Študijný program: Chemie

Študijný odbor: Analytická chemie

Forma štúdia: Prezenčná

Vedúci práce: doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Olomouc 2024

PALACKY UNIVERSITY OLOMOUC

Faculty of Science

Department of Analytical Chemistry



**Development and validation of a LC/MS method for
therapeutic determination of selected antiepileptic drugs**

Diploma Thesis

Author: Michal Matejka

Study program: Chemistry

Major: Analytical Chemistry

Form of study: Daily

Supervisor doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Olomouc 2024

Bibliografická identifikácia

Autor: Michal Matejka

Názov práce: Vývoj a validácia metódy pre terapeutické stanovenie vybraných antiepileptík metódou LC/MS

Typ práce: Diplomová

Pracovisko: Katedra analytické chemie

Vedúci práce: doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Abstrakt: Diplomová práca sa venuje problematike vývoja a validácie metódy pomocou kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou pre stanovenie ôsmich antiepileptických liečiv z ľudského krvného séra. Epilepsia je neurologické ochorenie, ktorým trpí 8-9 osôb na 1000 ľudí. Táto diplomová práca sa venuje konkrétne antiepileptikám ako sú: levetiracetam, gabapentín, brivaracetam, zonisamid, primidón, lakosamid, lamotrigín a perampanel. Monitorovanie liekových hladín antiepileptík je dôležité v klinickej praxi za účelom dosiahnutia bezpečného a účinného liečebného režimu aj cez variabilitu farmakokinetických parametrov medzi rôznymi jedincami. Toto monitorovanie je často vykonávané technikou LC/MS. Bola vyvinutá a validovaná LC-MS/MS metóda, ktorou je možné stanoviť spomínané antiepileptiká z ľudského krvného séra. Ako interný štandard bol použitý kofeín. Metóda bola overená analýzou spikovaných modelových vzoriek v negatívnom krvnom séru. Pri fragmentačných spektrách MS^2 (MS^3) boli navrhnuté aj štruktúry patriace daným fragmentom jednotlivých liečiv. Táto metóda môže byť použitá aj vo forenznej praxi, preto je v diplomovej práci venovaná pozornosť aj tejto oblasti.

Kľúčové slová: kvapalinová chromatografia, hmotnostná spektrometria, antiepileptiká, terapeutické monitorovanie liečiv, forezná chémia, krvné sérum, validácia

Počet strán: 71

Jazyk: slovenský

Bibliographical Identification

- Author:** Michal Matejka
- Topic:** Development and validation of a LC/MS method for therapeutic determination of selected antiepileptic drugs
- Type of thesis:** Diploma
- Department:** Department of Analytical Chemistry
- Supervisor:** doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.
- The year of presentation:** 2024

Abstract: The diploma thesis deals with the development and validation of a method using liquid chromatography in conjunction with mass spectrometry for the determination of eight antiepileptic drugs from human blood serum. Epilepsy is a neurological disease that affects 8-9 individuals per 1000 people. This diploma thesis deals specifically with antiepileptics such as: levetiracetam, gabapentine, brivaracetam, zonisamide, primidone, lacosamide, lamotrigine and perampanel. Therapeutic drug monitoring of antiepileptics is important in clinical practise in order to achieve safe and efficient treatment for all patients despite the variability of pharmacokinetic parameters among individuals. A LC-MS/MS method was developed and validated, by which it is possible to determine the mentioned antiepileptics from human blood serum. Caffeine was used as an internal standard. The method was verified by analyzing spiked model samples in negative blood serum. In MS² (MS³) fragmentation spectra, structures belonging to given fragments of drugs were also proposed. The method can also be used in forensic practise, which is why the diploma thesis also pays attention to this area.

Key words: liquid chromatography, mass spectrometry, antiepileptics, therapeutic drug monitoring, forensic chemistry, blood serum, validation

Number of pages: 71

Language: Slovak

Čestne prehlasujem, že som túto diplomovú prácu s názvom: „Vývoj a validácia metódy pre terapeutické stanovenie vybraných antiepileptík metódou LC/MS“ vypracoval samostatne pod vedením doc. RNDr. Petra Fryčáka, Ph.D. s použitím odbornej literatúry a ďalších zdrojov, ktoré sú uvedené v zozname použitej literatúry.

V Olomouci dňa

.....

Michal Matejka

Pod'akovanie:

Týmto by som sa chcel poďakovať doc. RNDr. Petrovi Fryčákovi, PhD. za cenné rady, odbornú pomoc a čas strávený pri riešení problematiky diplomovej práce. Ďalej by som sa chcel poďakovať Mgr. Oleksandrovi Prystopiukovi za pomoc pri riešení technických problémov v laboratóriu. Chcel by som sa poďakovať celej Katedre analytické chemie. Veľká vďaka patrí aj mojej rodine a priateľke, ktorí ma podporovali počas celého štúdia.

Táto diplomová práca bola finančne podporená Interní grantovou agentúrou UP v rámci projektov IGA_PrF_2022_023 a IGA_PrF_2023_027.

Obsah:

Úvod	9
Teoretická časť	10
1. Epilepsia	10
1.1. Antiepileptiká.....	10
1.2. Mechanizmus účinku antiepileptík.....	11
2. Charakteristika vybraných antiepileptík	13
a) Brivaracetam.....	13
b) Gabapentín.....	14
c) Lamotrigín.....	15
d) Levetiracetam	16
e) Zonisamid.....	17
f) Lakosamid.....	18
g) Perampanel	19
h) Primidón.....	21
3. Forezná chémia	22
3.1 Využitie techniky kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou vo forenzno-klinickej praxi	23
3.2 Terapeutické monitorovanie liekových hladín metódou LC-MS/MS	23
3.3 Terapeutické monitorovanie antiepileptických liečiv v klinickej praxi.....	24
4. Odber a spracovanie biologických vzoriek krvi vo forenznej a klinickej praxi	26
4.1 Krv a krvné sérum.....	26
a) Srdcová krv.....	26
b) Krvné zrazeniny zo subdurálnych, subarachnoidných alebo epidurálnych priestorov	27
c) Krv z hrudnej alebo brušnej dutiny	27
4.2 Ústne tekutiny (sliny)	27
4.3 Moč	28
5. Postodberové spracovanie biologických vzoriek	28
a) Extrakcia tuhú fázou (Solid phase extraction)	28
b) Extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina.....	29
5.1 Moderné separačné techniky na úpravu biologických matric.....	29
a) Extrakcia rozpúšťadlom za pomoci ultrazvuku (Ultrasound-assisted extraction)	29
b) Extrakcia rozpúšťadlom za pomoci mikrovlnných vln (Microwave-assisted solvent extraction).....	30
6. Vývoj a validácia metódy LC/MS (MS)	31
6.1 Vývoj metódy LC/MS (MS).....	31
6.2 Validačné parametre.....	32

a) Presnosť.....	32
b) Precíznosť.....	32
c) Linearita.....	32
d) Limit detekcie LOD.....	33
e) Limit kvantifikácie LOQ.....	33
Experimentálna časť.....	34
1.Ciele práce.....	34
2. Prístroje.....	34
4. Štandardy.....	35
5. Reálne vzorky.....	35
6.Optimalizácia parametrov hmotnostnej spektrometrie.....	35
7. Testovanie a výber vhodnej kolóny a mobilnej fázy pre chromatografickú separáciu.....	38
7.Parametre finálnej analýzy.....	44
10. Výsledky a diskusia.....	47
10.1. Kalibrácia.....	47
10.2 Limit detekcie.....	51
10.3 Opakovateľnosť a medziľahlá precíznosť.....	52
10.4 Pravdivosť.....	53
10.5 Fragmentačné spektrá antiepileptík.....	55
Záver:.....	60
Referencie:.....	62

Úvod

Epilepsia je neurologické ochorenie, prejavujúce sa krčovitými záchvatmi, ktoré vznikajú nadmernou aktivitou iónových kanálikov v neurónoch v oblasti mozgu. Antiepileptiká sú látky, ktoré pomáhajú tmiť excitačnú aktivitu neurónov ovplyvnením vodivosti vzruchu iónových kanálikov alebo naviazaním na glutamátové alebo GABA receptory. Pacienti, ktorí sa liečia na epilepsiu musia užívať dané antiepileptiká podľa miery ich ochorenia.

Aby lekári mohli nasadiť správnu liečbu, ktorá sa týka aj správne podanej terapeutickej dávky s minimom vedľajších účinkov, a aby sa pacient nepredávkoval je nutné liečivá pravidelne monitorovať v organizme pacienta. Ide o terapeutické monitorovanie liekových hladín, ktoré sa v praxi často vykonáva inštrumentálnou technikou kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou. Pomocou tejto metódy je možné analyzovať radu rôznych látok vrátane liečiv z rôznych biologických materiálov s použitím malého množstva vzorky, ktorá pred samotnou analýzou musí byť správne odobraná a vhodne upravená. Metóda kvapalinovej chromatografie s hmotnostne spektrometrickou detekciou je okrem univerzálnosti aj veľmi citlivá metóda, ktorá dokáže detekovať analyt vo veľmi nízkych koncentráciách. Na to aby bola takáto metóda použiteľná v praxi, musí byť overené jej správne fungovanie a správnosť merania. Tieto požiadavky vyjadrujú validačné parametre v procese validácie.

Táto diplomová práca základne popisuje vyššie spomínanú problematiku v jej teoretickej časti. Cieľom tejto diplomovej práce bolo vyvinúť a validovať účinnú metódu pre stanovenie ôsmich antiepileptických liečiv z krvného séra a to: levetiracetam, gabapentín, brivaracetam, zonisamid, primidón, lakosamid, lamotrigín a perampanel. Ako vnútorný štandard bol použitý kofeín. Podarilo sa vyvinúť a validovať účinnú metódu pre stanovenie týchto ôsmich látok z krvného séra. Pre lepšiu špecifitu boli analyty merané prostredníctvom tandemovej hmotnostnej spektrometrie.

Teoretická časť

1. Epilepsia

Epilepsia je ochorenie neurologického typu, ktoré sa prejavuje rôznymi príznakmi. Výskyt tohto ochorenia postihuje približne 8-9 osôb na 1000 ľudí.¹ Epileptické ochorenie sa u pacientov prejavuje záchvatmi, ktoré možno rozdeliť:

- a) Fokálne-záchvat vzniká v lokalizovanom ložisku v mozgu, môže prebiehať so stratou, ale aj bez straty vedomia
- b) Generalizované- záchvat vzniká v celej oblasti mozgu, vždy prebieha s poruchou vedomia
- c) Kombinované neznámeho typu

Pôvod epilepsie je rôzny, môže vznikáť po mozgovej príhode/traume, môže byť geneticky predurčený, spôsobený metabolizmom alebo infekčným ochorením, ale aj neznámym pôvodom.²

1.1. Antiepileptiká

Sú liečivá obsahujúce chemickú látku, ktorá potláča prejavy ochorenia. Mechanizmus účinku spočíva v potlačení excitability neurónov, ovplyvňovaním sodných, draselných alebo vápenatých kanálikov alebo naviazaním na GABAergné a glutamátové receptory, a synaptické proteíny.

Delenie antiepileptík na základe mechanizmu účinku:

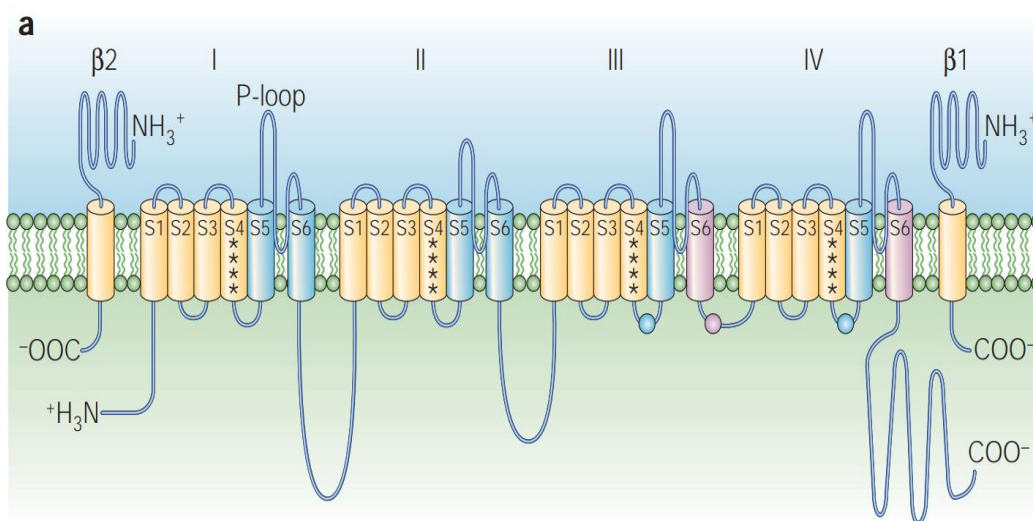
1. Úzkospektrálne antiepileptiká (ovplyvňujú len vybraný neurónový kanál alebo receptor):
 - a) Na⁺ kanáliky- karbamazepín, **lakosamid**, **primidón**
 - b) Ca²⁺ kanáliky- **gabapentín**, pregabalín
 - c) GABA receptory- fenobarbital, vigabatrín, klobazam
 - d) AMPA receptory- **perampanel**
 - e) Väzba na synaptické proteíny (SVA2)- **levetiracetam**, **brivaracetam**
2. Širokospektrálne antiepileptiká (ovplyvňujú viac nervových kanálov alebo receptorov): valproát, **lamotrigín**, **zonisamid**, topiramát.^{1,3}
(pozn. tučne zvýraznené chemické látky sú predmetom skúmania problematiky tejto diplomovej práce.)

1.2. Mechanizmus účinku antiepileptík

1.2.1 Napät'ovo riadené sodíkové kanáliky

Sú zodpovedné za stúpajúcu neurologickú aktivitu na základe potenciálu. Pri depolarizácii neurónov, proteín nachádzajúci sa v sodíkových kanálikoch zachytí napät'ový impulz a zareaguje naň zmenou konformácie. Kanál sa v dôsledku toho premení z nevodivého na vodivý, čo umožňuje tok Na^+ iónov a tým spôsobuje vyššiu nervovú aktivitu. V mozgových sodíkových kanálikoch tak vzniká cyklus kedy sa striedajú pokojové a otvorené stavy kanálikov, čo spôsobuje vysokofrekvenčné sledy potenciálov, ktoré vyvolávajú epileptické záchvaty.

Antiepileptiká ako fenytoín, lakosamid alebo karbamazepín sú schopné blokovať Na^+ kanáliky niekoľkými možnými spôsobmi. Najbežnejší spôsob inaktívácie kanálikov je takzvaný „dominantný“ proces inaktívácie, ktorý je založený na naviazaní aminokyselinových zvyškov medzi 3. a 4. doménu a podjednotky sodíkového kanála (obrázok 1). Tento proces prebieha v rádoch niekoľkých milisekúnd. Súbežne môže prebiehať dodatočný proces nazývaný „pomalá inaktívacia“, ktorý je založený na depolarizácii neurónov a prebieha v rádoch niekoľkých sekúnd.⁴



Obrázok 1: Primárna štruktúra podjednotiek a domén napät'ových sodíkových kanálikov zložená zo 4 segmentov ohraničená β jednotkami. Štruktúry v tvare valcov predstavujú membránové segmenty α-helixového typu. Segmenty S4 sú „napät'ové detektory“, α-helixy modrého sfarbenia sú pórovité oblasti v membráne, α-helixy ružového sfarbenia sú miesta, kde sa naväzuje dané antiepileptikum.⁴

1.2.2 Napät'ovo riadené vápenaté kanáliky

Sú multijednotkové, proteínové komplexy, ktoré na základe depolarizácie membrány umožňujú prechod iónov do presynaptických nervových zakončení. Vápenaté kanáliky možno rozdeliť na vysokonapät'ové (HVA) alebo nízkonapät'ové (LVA).

Vysokonapät'ové vápenaté kanáliky ovplyvňujú uvoľňovanie neurotransmiterov, ich blokádou sa ich uvoľňovanie inhibuje. Kanáliky tvorí proteín označujúci sa ako $\alpha 1$, ktorý tvoria dve hlavné pomocné podjednotky $\alpha 2\delta-1$ a $\alpha 2\delta-2$, ktoré majú vysokú afinitu na gabapentín.⁴

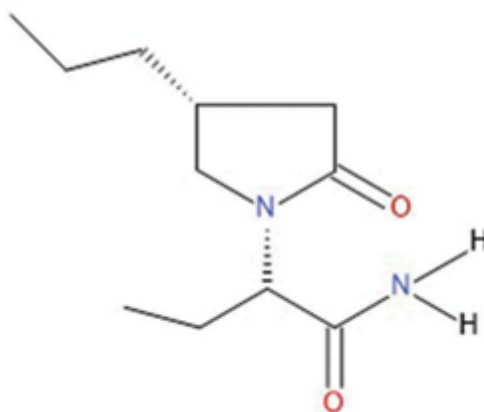
Nízkonapät'ové kanáliky v neurónoch prepúšťajú vápenaté ióny cez membránu, ktoré prekračujú spodné prahové hodnoty, čím sa spôsobí zvýšená aktivita potenciálov v neurónoch talamu, tento jav sa nazýva „burst firing“. Prechod Ca^{2+} iónov cez nízkonapät'ové kanáliky typu T môžu taktiež ovplyvniť bunkové procesy.⁵

2. Charakteristika vybraných antiepileptík

a) Brivaracetam

Inak aj ako (2S)-2-((4R)-2-oxo-4propylpyrolidín-1-yl)butánamid. Jadro štruktúry molekuly tvorí pyrolidín-2-acetamid. Substituent α -etyl na acetamidovej časti molekuly zabezpečuje väzbu na synaptický vezikulový proteín SV2A (ďalej len SV2A), proteín znižujúci uvoľňovanie excitačných neurotransmiterov. Táto väzba je kľúčová pre aktiváciu antiepileptika. Zaujímavosťou je, že S enantiomér v chirálnom centre v spojení pyrolidínového kruhu a butánamidu sa viaže na SV2A 3000-krát účinnejšie ako R enantiomér. Molekula má ešte jedno chirálne centrum, ktoré však pre farmakologickú aktivitu nepredstavuje zásadný význam.

Brivaracetam sa podáva vo forme filmom potiahnutých tabliet s 10, 25, 50, 75 a 100 mg účinnej látky alebo vo forme perorálneho roztoku o koncentrácii 10 mg/ml. Brivaracetam sa pacientom môže podať aj intravenózne. Kinetika brivaracetamu má lineárny priebeh, ideálne sa liečivo absorbuje z gastrointestinálneho traktu, ale však absorpcia môže byť obmedzená požitím jedla s vysokým podielom tuku. Brivaracetam sa rýchlo transportuje z krvi do mozgových buniek vďaka svojej vysokej lipofilicite. Transport prebieha na základe pasívnej difúzie, $\text{LogD}=1,4$. Okolo 17,5 % lieku sa viaže na plazmatické proteíny. Distribučný objem (ďalej V_D) činí 0,6 l/kg. Štúdie na zdravých ľuďoch ukazujú, že biologický polčas brivaracetamu je v medziach 8 až 9,5 hodín. Clearance brivaracetamu po niekoľkonásobných terapeutických dávkach je 3,49 l/h u osoby s hmotnosťou 70 kg. Brivaracetam sa môže podávať pacientom s poruchou obličiek, ale pacientom s ťažkou poruchou pečene sa dávka musí znížiť o 33 %.⁶



Obrázok 2: Chemická štruktúra brivaracetamu⁶

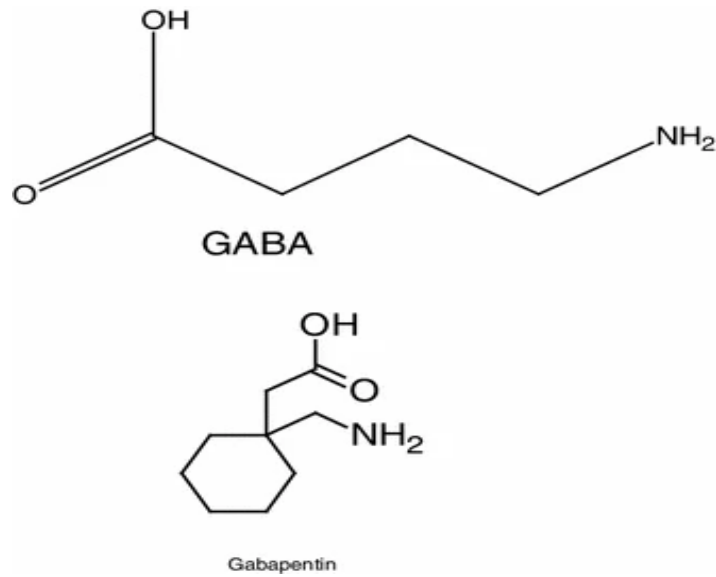
b) Gabapentín

Je štruktúrny analóg kyseliny γ -amino butánovej (GABA), ktorý bol schválený na doplnkovú liečbu pacientov starších ako 12 rokov, ktorí trpeli epileptickými záchvatmi. V súčasnej dobe sa používa aj pri liečbe neuropatickej bolesti, ktorá vzniká podráždením alebo poškodením nervu, väčšinou pri diabetickej neuropatii, pri postherpetickej neuralgii alebo pri ochoreniach, ako rakovina alebo leukémia. Pri neuropatickej bolesti dôjde k poraneniu nervu, dôsledkom čoho je jeho zníženie prahu citlivosti (alodýnia) alebo jeho zvýšenie (hyperalgézia). Dôsledkom molekulárnych zmien v centrálnej nervovej sústave dochádza k bolesti neporanených periférnych nervov. Pacientom, ktorí prekonali ochorenie Herpes zoster, môže táto bolesť pretrvávajúť v období 4 týždňov, u niektorých bolesť pretrváva dlhšie. Na liečbu neuropatickej bolesti sa okrem gabapentínu a pregabalínu, najskôr siaha po tricyklických antidepresívach (TCA), duálnych inhibítoroch spätného vychytávania serotonínu a norepinefrínu alebo po lidokaíne. V ťažších štádiách môžu pomôcť opioidné analgetiká a tramadol.

Vďaka skutočnosti, že dokáže zmierniť až odstrániť neuropatické bolesti sa gabapentín stal dostupnejším, pôvodne sa podával až pri ťažších štádiách spolu s TCA.

Gabapentín má relatívne bezpečný profil v súvislosti s interakciami s inými látkami. Klinické štúdie zistili, že negatívne neovplyvňuje pečňové enzýmy, vďaka čomu sa používa ako látka prvej línie. Štúdia (Selph et al.2011)⁵⁵ preukázala výrazný pokles bolesti aj u pacientov s mechanickým poraním miechy.

Mechanizmus účinku spočíva v tom, že sa gabapentín viaže na $\alpha 2\delta$ -1 pomocnú podjednotku napät'ovo riadeného Ca^{2+} kanálka vo vnútri periférneho neurónu a inhibuje napät'ové vzruchy vo vnútri kanála, čím sa zníži nervová aktivita. Maximálna koncentrácia v plazme nastane po 2-3 hodinách po podaní jednotnej dávky, V_D predstavuje 0,9 l/kg. Maximálna denná dávka pre dospelých pacientov predstavuje 2400 mg. Terapeutická koncentrácia v sére by mala predstavovať 12-60 $\mu\text{mol/l}$.⁷



Obrázok 3: Chemická štruktúra GABA a gabapentínu⁷

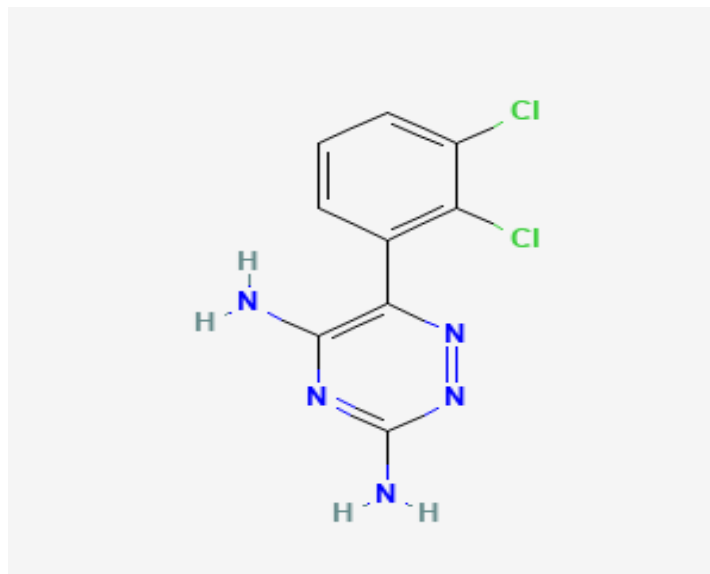
c) Lamotrigín

Antiepileptikum so systematickým názvom (3,5-diamino-6-(2,3-dichlórofenyl)-1,2,4-triazín), ktoré má široké uplatnenie pri liečbe pacientov na rôzne štádiá ochorenia a je licencované na monoterapeutické použitie.

Mechanizmus účinku spočíva v inhibovaní napäťovo riadených sodných a čiastočne aj vápenatých kanálikov, čoho dôsledkom je prevencia uvoľnenia glutamátu v excitovanej forme, ktorý spôsobuje zvýšenú nervovú aktivitu. Lamotrigín sa do organizmu dostáva cez gastrointestinálnu sústavu ($T_{MAX}=1-3$ hod.). Absorpcia závisí na podanej dávke, ale aj na základe prijatého jedla. Látka je vo veľkej miere ovplyvňovaná pečňovými AED enzýmami. Koncentrácia v plazme rastie lineárne na základe podanej dávky. Okolo 55 % látky sa viaže na plazmatické proteíny a V_D predstavuje 1,2 l/kg. Biologický polčas lamotrigínu je 15-35 hodín, závisí od pacienta, k úplnej očiste organizmu od lamotrigínu dochádza asi po 60 hodinách .

Lamotrigín významne interaguje s inými liečivami z dôvodu, že jeho metabolizmus výrazne ovplyvňujú pečňové enzýmy a inhibuje ho valproát sodný, s ktorým je potrebné lamotrigín podávať v menších dávkach, lebo pacientom môže hroziť alergická reakcia. Bolo zistené, že lamotrigín podaný so sertralínom ho inhibuje glukuronidáciou a zvyšuje sa jeho koncentrácia v krvi. S podaním acetaminofénu a rifampicínu sa zas koncentrácia

lamotrigínu zrýchlila. Štúdia (Morris et.al)⁵⁶ zistila, že optimálne rozmedzie koncentrácie lamotrigínu v sére by malo byť 12-55 $\mu\text{mol/l}$.⁸

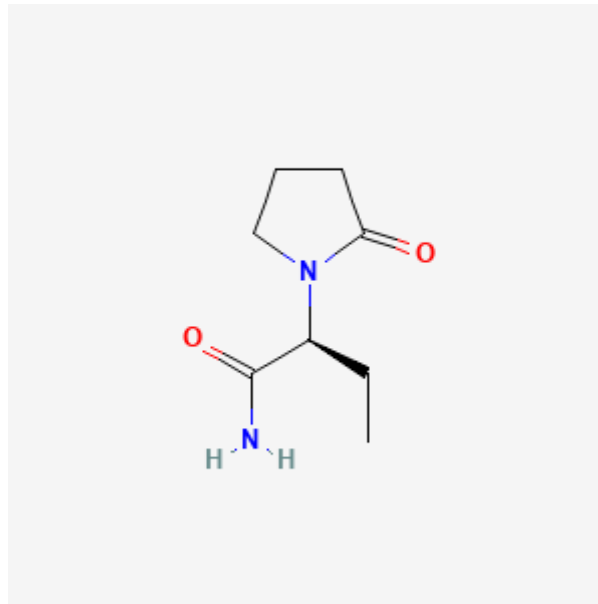


Obrázok 4: Chemická štruktúra lamotrigínu⁹

d) Levetiracetam

Antiepileptikum pod substitučným názvom ((S)- α -etyl-2-oxo-pyrolidínacetamid), ktoré je používané na podpornú liečbu čiastočných epileptických záchvatov prevažne u dospelých, ale v určitých prípadoch aj u detí.

Mechanizmus účinku levetiracetamu nie je jasný, pravdepodobne spočíva v interakcii na špecifické miesto v oblasti mozgu s chirálnym centrom molekuly. Podáva sa perorálne, pričom sa rýchlo absorbuje do krvného riečišťa ($T_{\text{MAX}}=1$ hod.). Koncentrácia levetiracetamu v plazme sa zvyšuje lineárne s podanou dávkou a neinteraguje s plazmovými proteínmi. V_D predstavuje 0,5- 0,7 l/kg. Metabolizuje sa na farmakologicky neaktívne metabolity, ktoré sa vylučujú močom cez obličky. Clearance predstavuje 6-8 hodín u dospelých, 10-11 hodín u starších ľudí. U ľudí s poškodenými obličkami sa môže jednať aj o dlhšiu dobu. Denná dávka predstavuje 500 mg levetiracetamu 2x denne. Má dobrý terapeutický index a minimum vedľajších účinkov.⁸



Obrázok 5: Chemická štruktúra levetiracetamu¹⁰

e) Zonisamid

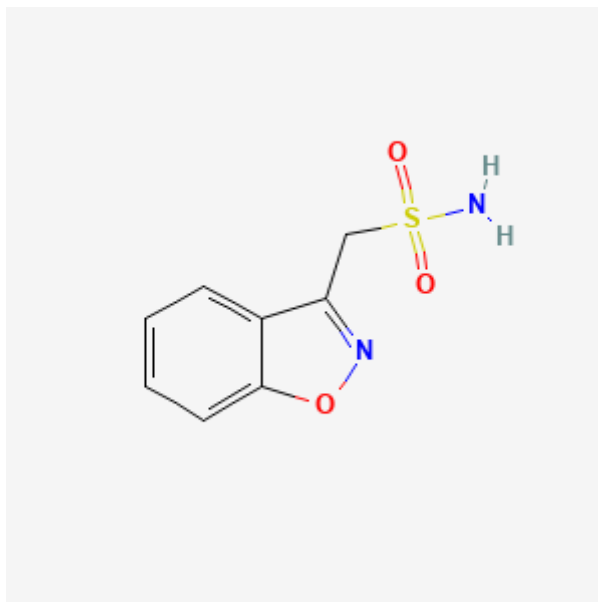
Antiepileptikum pod názvom (1,2 benzyoxazol-3-metánsulfónamid) je schválený na liečbu čiastočných epileptických záchvatov.

Mechanizmus účinku spočíva v blokovaní Na^+ napätovo citlivých kanálikov, ktoré spôsobujú zvýšenú nervovú aktivitu, tzv. „neuronal firing“. Čiastočne blokujú aj Ca^{2+} napätovo riadené kanáliky typu T. Môže redukovať aktivitu dopamínových a serotogénnych neurotransmitterov, a čiastočne chráni pred poškodením nervových buniek. Neinteraguje s GABA.

Podáva sa peronálne vo forme tabliet ($T_{\text{MAX}} = 2-6$ hod.), absorbuje sa kompletne 40-60 % lieku môže interagovať s proteínmi nachádzajúcich sa v erythrocytoch, má vysokú afinitu na karboanhydrázu. V_D predstavuje 1,5 l/kg. Koncentrácia v sére je lineárna s podávanou dávkou. Denná dávka predstavuje 10-15 mg/kg. Metabolizuje sa pomocou acetylácie a následnou konjugáciou s kyselinou glukurónovou. Clearance predstavuje 0,015-0,019 l/h/kg. U pacientov s monoterapeutickou liečbou je biologický polčas od 50-70 hodín.

Zonisamid neinhibuje pečenný enzým CYP450, čím nepoškodzuje pečeň. Môžu sa vyskytnúť interakcie s inými antiepileptickými liečivami ako je napríklad karbamazepín,

ktorého metabolitom je karbamazepín-10,11-epoxid, ktorý interaguje so sérovými proteínmi, čo môže byť dôvod vzniku vedľajších účinkov pri ich súbežnom podaní.⁸

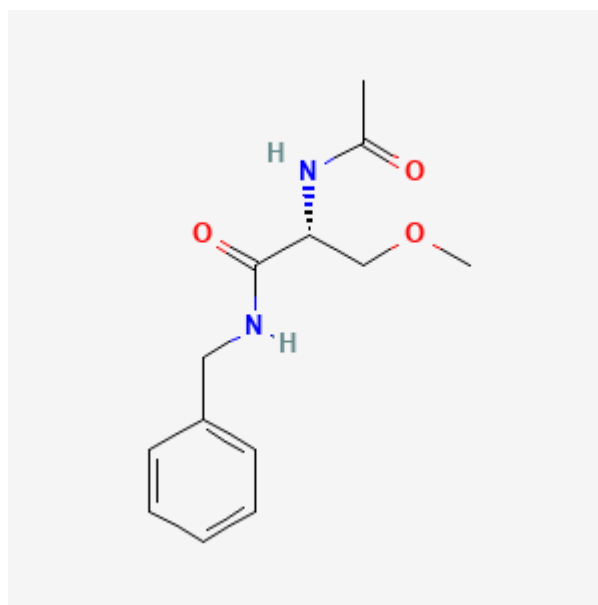


Obrázok 6: Chemická štruktúra zonisamidu¹¹

f) Lakosamid

Látka so substitučným názvom (R-2-acetamido-N-benzyl-3-metoxypriónamid), ktorá pôsobí ako liek proti epileptickým kŕčom. Mechanizmus účinku spočíva v inhibovaní aktivity sodíkovo napät'ových kanálikov. Oproti antiepileptikám ako fenytoín alebo lamotrigín, ktoré inaktivujú tieto kanáliky pomerne rýchlo a nárazovo, lakosamid ich inaktivuje pomaly, čím znižujú patopsychologickú nervovú aktivitu.

Lakosamid je podávaný peronálne vo forme tabliet a je absorbovaná celá dávka. Optimálna denná dávka predstavuje od 200 do 600 mg. Po peronálnom podaní C_{MAX} v krvnej plazme je dosiahnuté po 1-4 hodinách po podaní. Má minimálnu väzbovosť na plazmatické proteíny (<15%). Biologický polčas látky predstavuje okolo 13 hodín. Lakosamid a jeho hlavné metabolity sú eliminované obličkami. Je preukázané, že sa lakosamid minimálne viaže na sérové proteíny, a že neinteraguje s inými liečivami ako karbamazepín, digoxín a pod. Taktiež sa nepreukázal inhibičný vplyv na izoenzým CYP450.¹²



Obrázok 7: Chemická štruktúra lakosamidu¹³

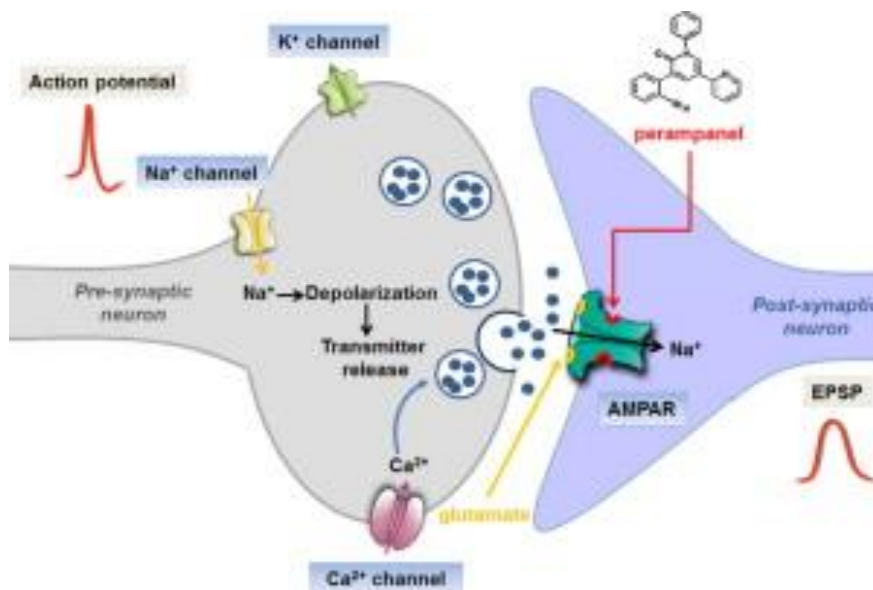
g) Perampanel

Perampanel alebo (2-(2-oxo-1-fenyl-5-pyridín-2-yl-1,2-dihydropyridín-3-yl)benzónitril), ktorý patrí medzi antiepileptiká, ktoré nemajú chirálne centrum.

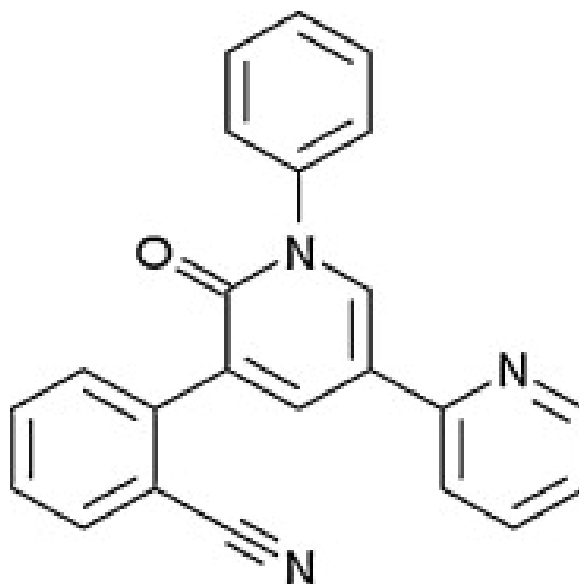
Mechanizmus účinku spočíva, že sa látka viaže prostredníctvom glutamátového receptora α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-izooxazolpropiónovej kyseliny (AMPA). Podľa štúdie, ktorá sa zaoberala účinkom perampanelu na AMPA, ktorá sa vykonala na nervových bunkách potkanov a následným vyhodnotením zmien koncentrácie vápnika vo vnútri bunky sa zistilo, že v prítomnosti perampanelu sa inhibovalo zvýšenie vnútrobunecného vápnika. Výsledky potvrdili, že perampanel pôsobí ako nekompetitívny antagonist receptoru AMPA s vysokou selektivitou pre glutamátový receptor, kde inhibuje excitačnú neurotransmisiu.

Perampanel sa podáva perorálne vo forme tabliet, absorbuje sa rýchlo a kompletne. C_{MAX} v plazme je dosiahnutá po 1 hodine po podaní. Denná dávka predstavuje 12 mg pre dospelých pacientov. Na sérové proteíny sa viaže 95 % liečiva. Perampanel sa metabolizuje primárnou oxidáciou pomocou enzýmu CYP3A nasledovaná

glukuronidáciou. Clearance pre dospelých pacientov činí 0,730 l/h u mužov a 0,605 l/h u žien.¹⁴



Obrázok 8: Grafické znázornenie mechanizmu účinku perampanelu¹⁴



Obrázok 9: Chemická štruktúra perampanelu¹⁴

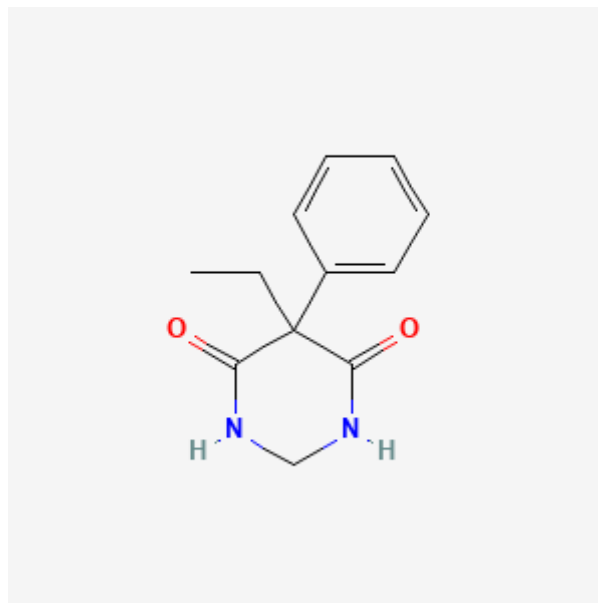
h) Primidón

Látka so substitučným názvom (5-etyl -5 fenyl-1,3-diazinan-4,6-dión), ktorá sa spolu s propanololom používa na liečbu esenciálneho tremoru, ktorý sa väčšinou vyskytuje u jednotlivcov nad 65 rokov. Ochorenie väčšinou postihuje horné končatiny, ale aj hlavu, hlas a zriedkavo aj dolné končatiny.¹⁵

Nevýhoda pri liečbe primidónom je, že môže nastať výskyt akútnych vedľajších účinkov ako napríklad zvracanie, ataxia a pod. Takýmto účinkom je možné sa vyvarovať a to znížením dennej dávky. Primidón sa podáva perorálne vo forme tabliet, rýchlo sa absorbuje a vďaka vysokej lipofilicite dobre preniká do mozgu.

Primidón sa metabolizuje na dva metabolity a to : fenyletylmalonamid a fenobarbital, ktorý má významne tremorolytické účinky pri liečbe esenciálneho tremoru. Štúdie ukázali, že látka nemá vplyv na postsynaptické GABA a glutamátové receptory, a neinteraguje [³⁵S]- t-butylbicyklofosforotionát, ligand, ktorý sa viaže na pikrotoxín na Cl⁻ kanálikoch.

Primidón vo veľkej miere inhibuje aj napätovo riadené Na⁺ kanáliky a čiastočne aj Ca²⁺ kanáliky, čím znižuje vysokú nervovú aktivitu v mozgových centrách, pomáha pri liečbe epilepsie.¹⁶



Obrázok 10: Chemická štruktúra primidónu¹⁷

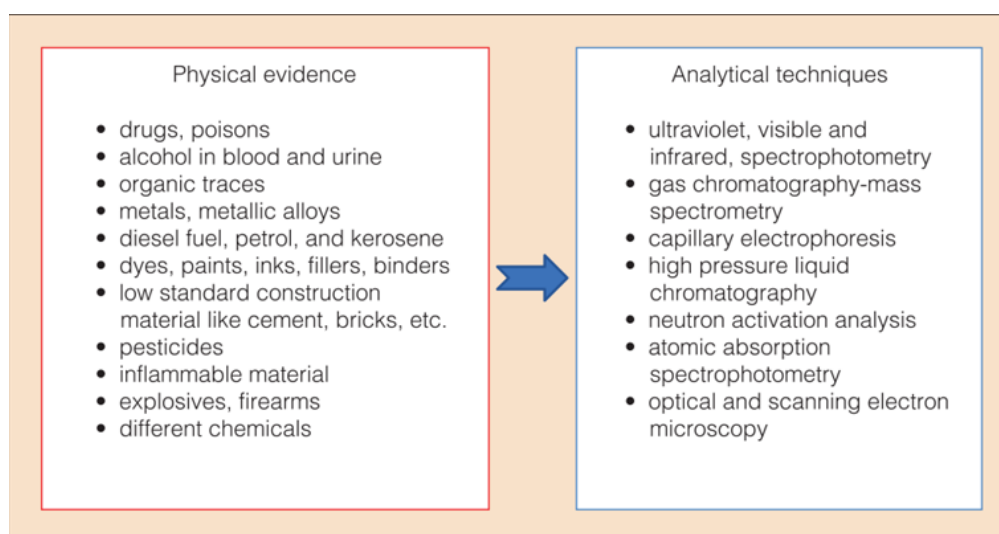
3. Forezná chémia

Forezná chémia je zásadnou a neoddeliteľnou súčasťou foreznej vedy, ktorá aplikuje vedecké poznatky a využíva analytické techniky a postupy v oblasti kriminálneho právneho systému. Počiatky foreznej chémie historicky siahajú do roku 1752, kde bol uskutočnený prvý chemický test na jed za účelom objasnenia trestného činu otravy arzenikom.³⁰ „Cieľom foreznej vedy je poskytnúť všetkým účastníkom, ktorí sú zakomponovaní do vyšetrovania v danom trestnoprávnom procese, nástroje na efektívne vyšetrovanie a získavanie kvalitnejších stôp, ktoré môžu pomôcť obviniť alebo zbaviť viny podozrivé osoby.

Pri riešení trestných činov sú používané poznatky z vedných odborov ako je psychológia, psychiatria, entomológia, antropológia, toxikológia. Taktiež sú pri vyšetrovaní často používané poznatky z chémie, biológie, botaniky, balistiky, genetiky a pod.³⁵

V súčasnej dobe forezní chemici pracujú so širokou škálou vzoriek z miesta činu. Môže sa jednať: od úlomkov farby laku automobilu pri dopravnej nehode až po nábojnice, prípadne ich reziduá alebo úlomky výbušnín pri spáchaní závažného trestného činu, ako je vražda, vlámanie, krádež, teroristický útok a i. Medzi vzorkami sa často vyskytujú aj organické látky ako drogy a jedy či biologické látky ako telové tekutiny (krv, moč, vlasy a pod.).

Pri analýze spomínaných látok sa vo foreznej praxi používa niekoľko analytických metód, na ktoré sa kladú nároky aby dané analýzy boli preukázateľné a spoľahlivé, a aby výsledky analýz mohli byť plnohodnotne použité ako dôkazy pri súdnych procesoch pri objasňovaní trestných činov.³⁰



Obrázok 11: Najčastejšie vzorky nájdené na mieste činu a k nim najbežnejšie používané analytické metódy³⁰

3.1 Využitie techniky kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou vo forenznoklinickej praxi

Inštrumentálna metóda kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometrickou detekciou (ďalej ako LC-MS) je jedna z najpoužívanějších analytických metód v rôznych oblastiach chemického priemyslu. Napríklad vo farmaceutickom priemysle je metóda kvapalinovej chromatografie často používaná pri vývoji nových liečiv, ktorá poskytuje výbornú separáciu zložiek analytu na chromatografickej kolóne a dobrú špecifitu a selektivitu, ktorá závisí od zvoleného detektoru. Pre lepšiu selektivitu sa ako detektor často používa metóda hmotnostnej spektrometrie, prípadne tandemovej hmotnostnej spektrometrie. Ďalšou výhodou tejto inštrumentálnej metódy je možnosť analýzy rady vzoriek, od priemyselných látok ako sú farby, laky až po biologické vzorky.

V oblasti toxikológie je táto metóda vo veľkej miere používaná pre terapeutické monitorovanie hladín liekov (TDM-therapeutic drug monitoring), aby sa prípadne vyšlo príčiny toxickým hladinám v organizme pacienta čo by mohlo spôsobiť predávkovanie a následnú smrť.³¹

Väčšina toxikologických analýz metódou LC-MS(/MS) je založená na sledovaní určitého počtu analytov v režime monitorovania vybraných iónov (SIM- selected-ion monitoring) alebo v móde monitorovania viacerých reakcií (MRM-multiple reaction monitoring). Jedna z najúčinnějších stratégií je analýza v móde MRM s kombináciou skenovania produktových iónov, ktorých hmotnostné spektrum sa môže porovnať s databázou hmotnostných spektier pri identifikácii neznámej látky.³⁶

3.2 Terapeutické monitorovanie liekových hladín metódou LC-MS/MS

Terapeutické monitorovanie liekových hladín je v klinickej a forenznjej praxi dôležitý proces, ktorý pomáha pomocou merania na danej technike optimalizovať terapeutickú dávku daného liečiva pre pacienta tak, aby bola aktívna látka podaná čo najefektívnejšie s minimom vedľajších účinkov.³² TDM je v praxi používaný hlavne pri liečbe antibiotikami, antivirotikami, antiepileptikami, psychotropnými látkami alebo cytostatikami.³⁴

V minulosti boli niekoľko rokov na terapeutické monitorovanie liekových hladín používané metódy založené na imunotestoch, ktorých hlavná nevýhoda bola nedostatočná špecifita pri látkach, ktoré mali podobný štruktúrny charakter alebo bol prítomný výskyt matrixových

efektov. V porovnaní metóda LC-MS/MS, dokáže ponúknuť významnú selektivitu a špecifitu pri analýzach a nie je potrebné, aby analyty obsahovali v svojej štruktúre chromofor alebo fluorofor ako v už spomínaných imunotestoch.³² Ďalšími výhodami metódy LC-MS/MS sú široký koncentračný rozsah a malá spotreba vzorky.³³ Silnou stránkou metódy LC-MS/MS je možnosť analyzovať viac ako 15-20 liekov v jednej analýze čo umožňuje veľmi rýchle stanovenia.

Ako reálne vzorky pri TDM technikou LC-MS/MS sa väčšinou používa krv pacientov alebo krvné sérum, ale je možné stanoviť liečivá aj z iných biologických vzoriek ako sú sliny, moč, extrakty z buniek alebo tkanív.³⁴

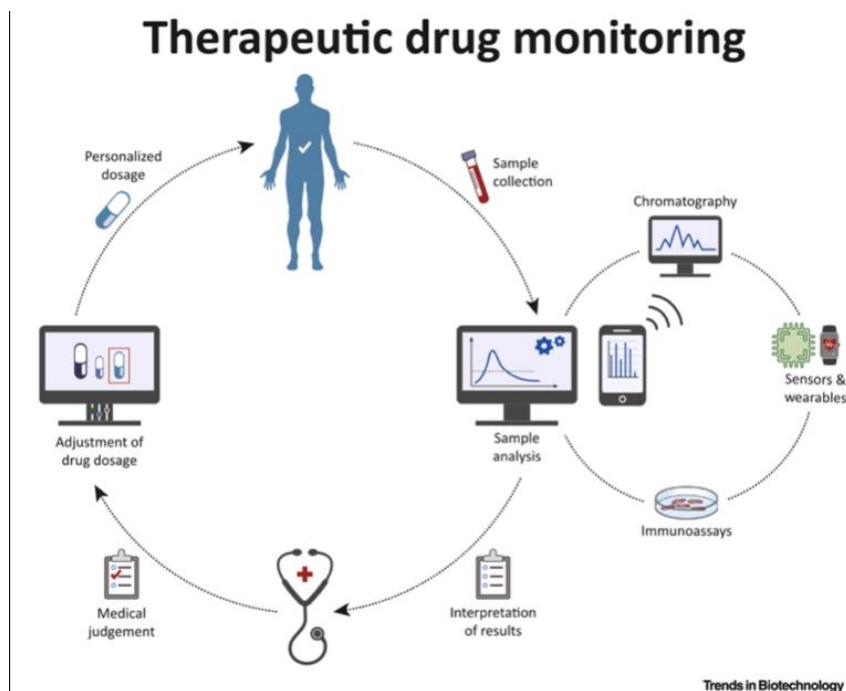
Kvantifikácia liečiv zo vzorky moču nemusí byť dostatočne vypovedajúca ako kvantifikácia zo vzorky krvi. Výsledky analýzy môžu byť skreslené mierou hydratácie organizmu pacienta a významnú úlohu zohráva aj pH moču. Ďalšou nevýhodou kvantifikácie liekov zo vzorky moču je, že koncentrácia sledovaného analytu už nemusí zodpovedať koncentrácii, pri ktorej mohlo dôjsť k predávkovaniu pacienta, z dôvodu vylúčenia danej látky z tela pred samotným odberom biologickej vzorky.³⁶

3.3 Terapeutické monitorovanie antiepileptických liečiv v klinickej praxi

Hlavným cieľom TDM antiepileptík je získanie znalosti koncentračného rozsahu látky vyskytujúcej sa v organizme pacienta pri podaní terapeutической dávky, ktorý následne slúži ako referenčný rozsah koncentrácií týchto liečiv pri laboratórnom stanovení alebo pri nasadení liečby.⁴³ Tým, že sa niektoré epileptické záchvaty vyskytujú nepravidelne, s dlhými časovými úsekmi medzi epizódami, je potrebné monitorovať liečbu pacienta v dlhodobom časovom úseku.⁴⁴ Ďalším dôvodom TDM je, že u niektorých pacientov môžu byť jednotlivé dávky antiepileptík efektívne až na rozhraní minimálnej toxickej dávky, preto je dôležité priebežne monitorovať zodpovedajúcu koncentráciu liekov v biologických vzorkách, najčastejšie v krvnom sére pacienta (SDC-serum drug concentration).⁴³ Niektoré antiepileptiká majú veľmi nepriaznivé vedľajšie účinky, ktoré môžu spôsobiť záchvaty, ktoré sú ťažko odlíšiteľné od záchvatov, ktoré boli vyvolané neurologickou poruchou.⁴⁴

Odber a analýza krvného séra tesne po epileptickom záchvate, ktorý bol spôsobený podaním nevhodnej dávky liečiva alebo vznikol v dôsledku interakcií s inými liekmi, dokáže poskytnúť informácie o presnej príčine záchvatu, čo je tiež jedným z dôvodom, prečo sa TDM vykonáva.⁴³ Často sa TDM vykonával na antiepileptikách, ktoré boli na americkom

a európskom trhu už niekoľko desaťročí, tzv. antiepileptiká 1.generácie. Týmito látkami boli napríklad, fenobarbital, primidón, karbamazepín, kyselina valproová a i. Spomenuté antiepileptické liečivá patriace do 1.generácie majú úzke terapeutické rozsahy a významnú interindividuálnu farmakokinetickú variabilitu.⁴⁴



Obrázok 12: Grafické znázornenie procesu TDM, kde sa pomocou analytických metód ako sú chromatografia alebo imunoanalytika monitoruje podaná dávka liečiva u pacienta a na základe výsledkov optimalizácia liečby.⁴⁵

4. Odber a spracovanie biologických vzoriek krvi vo forenznej a klinickej praxi

Odber a spracovanie biologických vzoriek u pacientov je dôležitou súčasťou preanalytického procesu. Tento proces sa môže líšiť na základe typu biologickej vzorky a analytickej metódy, ktorú plánujeme použiť na analýzu. Pri odbere a spracovaní biologických vzoriek musíme používať overené postupy a pomôcky (sterilné a jednorázové odberové nádoby, tampóny a pod.) a je nutné celý tento proces dokumentovať. Možnými biologickými vzorkami môže byť: krv, plazma, sérum, ústne tekutiny, moč, materské mlieko, vlas, tkanivá orgánov, mužské alebo ženské pohlavné bunky a i.²⁰

4.1 Krv a krvné sérum

Krv je považovaná za najdôležitejšiu biologickú vzorku v odvetví toxikológie. Pri interpretácii analytických výsledkov, kedy bola krv analyzovaná na prítomnosť drog alebo liečiv, je možné pre správnu interpretáciu porovnať databázy, ktoré sú na túto biologickú maticu najrozsiahlejšie zo všetkých vzoriek.

Pri odbere krvi sa vo všetkých prípadoch používa sterilná injekčná ihla a injekčná striekačka. Pri odbere krvi post mortem je dôležité, v ktorej časti ľudského tela urobíme odber, pretože sa koncentrácie sledovaného liečiva alebo drogy môžu v jednotlivých tkanivách a orgánoch líšiť, z dôvodu nedostatočnej distribúcie v jednotlivých tkanivách. Preto sa vzorky krvi odoberajú z viacerých miest a to najčastejšie z femorálnej žily (periférne vzorky) a z ľavej, a pravej komory srdca (centrálne vzorky). Podľa výskumov vo všeobecnosti platí, že krv odoberaná z femorálnej žily je často spoľahlivejším ukazovateľom koncentrácie liečiva v post mortem štádiu.²¹

V klinicko-forenznej praxi je v post-mortem štádiu odoberaných niekoľko typov krvnej vzorky:

a) Srdcová krv

Krv zo srdca je odoberaná pri každom odbere biologického materiálu z tela človeka. Krv je odoberaná z pravej srdcovej komory o objeme 30 ml do plastovej uzatvárateľnej nádoby s popisným štítkom. Vzorka krvi odoberaná zo srdca je vhodná predovšetkým na kvalitatívnu alebo skriningovú analýzu xenobiotík. Kvantitatívna analýza je tiež možná, ale nemusí byť presná z dôvodu zvýšenia koncentrácií xenobiotík vo vzorke z dôvodu post-mortem redistribúcie alebo iných procesov.

b) Krvné zrazeniny zo subdurálnych, subarachnoidných alebo epidurálnych priestorov

Je odoberaných 30 ml do plastovej uzatvárateľnej nádoby s popisným štítkom. Krvné zrazeniny sú odoberané od obeti v prípadoch spojených s traumou alebo obetí, ktoré boli postihnuté popáleninami, a dokážu reflektovať presnejšiu koncentráciu xenobiotík v organizme predtým ako vznikne poranenie (v tomto prípade hematóm). Vzorka je vhodná pre kvalitatívnu analýzu.

c) Krv z hrudnej alebo brušnej dutiny

Je odoberaných 30 ml do plastovej uzatvárateľnej nádoby s popisným štítkom. Je odoberaná v prípadoch v spojitosti s traumou alebo v prípadoch kedy nie je možné získať žiadnu inú nekontaminovanú vzorku krvi. Vzorka je najvhodnejšia pre kvalitatívnu analýzu.²²

4.2 Ústne tekutiny (sliny)

Sú biologické vzorky, ktoré sú produkované v ústnej dutine tromi hlavnými slinnými žľazami a to príušnou, submandibulárnou a sublingválou žľazou. V porovnaní s krvou obsahujú sliny menej interferujúcich látok a obsahujú asi len 0,3 % proteínov. Odber ústnych tekutín je menej invazívny ako odber krvnej vzorky. Ústne tekutiny sú väčšinou používané na skriningové testy pre potvrdenie prítomnosti drog ako sú napríklad amfetamíny alebo kodeín.

Na odber ústnych tekutín sú používané komerčné odberové zariadenia, kde sa odber tekutín vykonáva pomocou tampónu, ktorý sa následne vloží do nádoby obsahujúcej extrakčný pufor, ktorý umožňuje vytvoriť matricu, ktorá je vhodnejšia na analýzu. Produkciu slín môže stimulovať žuvačka alebo kyselina citrónová, ktorá však môže meniť pH prostredie v ústach a následne aj sledovanej koncentrácii látky, a tým môže ovplyvniť analýzu.

Podľa štúdie (Crouch 2005; Drummer, 2006; Drummer et al., 2007)^{50,51,52} môže byť koncentrácia drogy rovnaká ako v krvi alebo v krvnej plazme. Koncentrácia drogy v ústnych tekutinách je ovplyvnená faktormi ako je lipofilita drogy, väzbovosť na proteíny, pKa látky a pod.⁴⁶

4.3 Moč

Je biologická vzorka, ktorá sa používa pri determinácii koncentrácie drog alebo ich metabolitov v tele pacienta. Najčastejšie sa z moču stanovujú amfetamíny, kanabinoidy, heroín a kokaín. Koncentrácia drogy vo vzorke moču môže byť rovnaká alebo aj vyššia ako je koncentrácia v krvi alebo v krvnej plazme. V moči je prítomných veľa interferujúcich látok ako sú proteíny, soli, ktoré môžu negatívne ovplyvniť výslednú koncentráciu drogy. Koncentráciu drogy môže ovplyvniť aj faktor ako denný príjem tekutín pacienta.⁴⁷

5. Postodberové spracovanie biologických vzoriek

Pri analýze liečiv v biologických vzorkách pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (ďalej HPLC), je potrebné biologické vzorky vhodne upraviť. Úprava biologických vzoriek umožňuje zakoncentrovanie analytu, čo umožní lepšie a kvalitnejšie analýzy, a odstránenie nežiadúcich látok obsiahnutých v biologickej matrici (soli, proteíny...), ktoré by mohli interferovať a negatívne ovplyvňovať výsledky analýzy. Úprava a prečistenie vzorky, predlžuje životnosť analytickej kolóny, tým že sa z nej odstránia látky, ktoré by kolónu ničili. Existuje rada postupov a metód na úpravu biologických vzoriek krvi.²³ V histórii, ale aj v súčasnosti sa najčastejšie používali na úpravu vzoriek pre použitie v HPLC techniky ako extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina a extrakcia tuhou fázou.

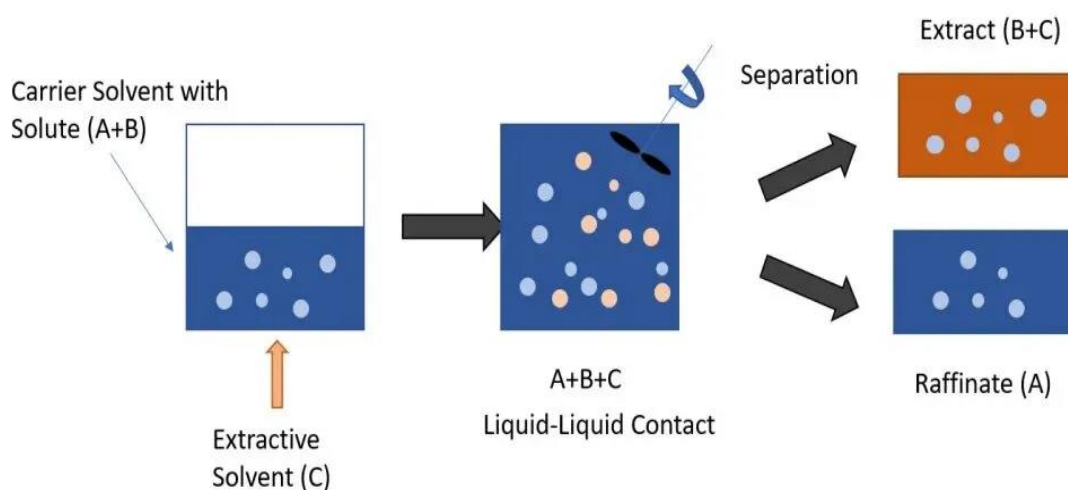
a) Extrakcia tuhou fázou (Solid phase extraction)

Je jednoduchá extrakčná metóda, ktorou je možné oddeliť analyt od interferentov ako sú proteíny, soli a iné nečistoty. Inštrumentácia spočíva v tom, že pevná reverzná fáza vo vnútri SPE kolónky je tvorená alkylovým reťazcom, najčastejšie C18 (C8). Ako mobilná fáza sa používajú rozpúšťadlá s malou elučnou silou, keď chceme z kolónky vymyť všetky interferenty, ktoré by mohli rušiť analýzu, poprípade ničiť LC kolónu (životnosť kolóny). V prvom kroku je nutné kolónku kondicionovať, aby bola pripravená na aplikáciu vzorky. V druhom kroku je aplikovaná vzorka, ktorá sa absorbuje na stacionárnu fázou kolónky. Následne je použité rozpúšťadlo s malou elučnou silou na vymytie všetkých interferentov z kolónky, proces je opakovaný niekoľkokrát. Následne je použité rozpúšťadlo s veľkou

elučnou silou, ktoré eluuje cieľový analyt. Tento proces úpravy vzorky vo veľkej miere zvyšuje výťažnosť metódy.¹⁹

b) Extrakcia v systéme kvapalina-kvapalina

Je účinná extrakčná analytická technika, ktorá je založená na rôznej distribúcii jednotlivých komponentov analytu medzi dvomi kvapalnými fázami. Distribúcia komponentov závisí na ich vlastnostiach a množstve celkovej vzorky. Proces extrakcie je znázornený na obrázku 13. Zložka, z ktorej je extrahovaný daný komponent je označený ako A. Rozpúšťadlo, v ktorej sa rozpúšťa vzorka je označená ako C a komponent, ktorý je analyzovaný ako B. Táto metóda sa aplikuje na vzorky, ktoré sú tepelne labilné a nie je možné ich sparovať pomocou destilácie (metabolity, liečivá, drogy...)²⁴



Obrázok 13: Schéma extrakcie systému kvapalina-kvapalina²⁵

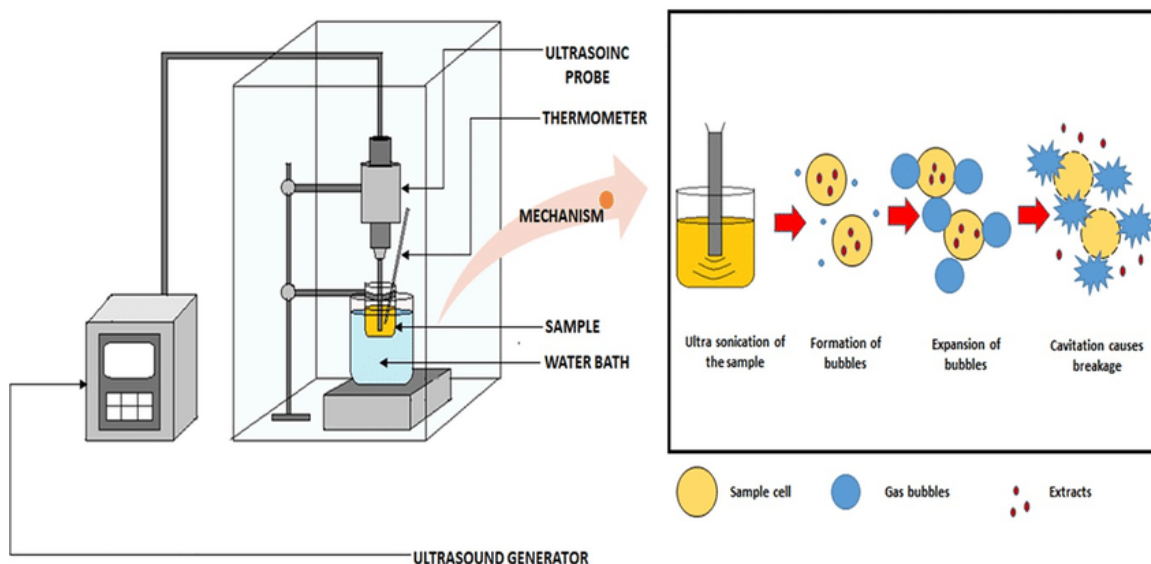
5.1 Moderné separačné techniky na úpravu biologických matric

V súčasnosti sa vedecké inštitúcie zameriavajú na separačné techniky, ktoré budú lacné, efektívne a budú ekologickejšie pre životné prostredie, tzv. Green extraction techniques.

a) Extrakcia rozpúšťadlom za pomoci ultrazvuku (Ultrasound-assisted extraction)

Je inovatívna extrakčná technika, ktorá sa používa na separáciu analytov rôzneho typu vrátane biologických matric, kde pomáha odstrániť nežiadúce matričné efekty. Táto metóda patrí k finančne nenáročným a je šetrná k životnému prostrediu.²⁶ Princípom metódy je

vznik mechanickej energie (>20 kHz), ktorá vzniká pri ultrazvuku. Táto energia vytvára malé vzduchové bublinky rozpúšťadla, ktoré spolu s vysokou teplotou (okolo 4700 °C) a vysokým tlakom (101 MPa) spôsobia implóziu buniek a umožnia extrahovať intracelulárny obsah. Ako rozpúšťadla sa používajú etanol, acetón, voda a i.²⁷



Obrázok 14: Schéma extrakcie pomocou ultrazvuku²⁸

b) Extrakcia rozpúšťadlom za pomoci mikrovlnných vln (Microwave-assisted solvent extraction)

Používanie mikrovlnných rádiových vln sa datuje už k obdobiu druhej svetovej vojny, kde boli použité v radarových a komunikačných systémoch. V 70. rokoch 20. storočia bolo mikrovlnné žiarenie prvýkrát použité ako zdroj ohrevu. Prvá zmienka o extrakcii rozpúšťadlom za pomoci mikrovlnných vln bola spomenutá v článku (Ganzler et al., 1986a, Ganzler and Salgó, 1987^{53,54}).

Použitie mikrovln v procese extrakcie má veľký vplyv na rozrušovanie slabých vodíkových väzieb medzi atómami, ktoré sú spôsobené dipólovými rotáciami molekúl. Migráciou rozpustených iónov sa zvyšuje penetrácia rozpúšťadla v matrici, čo spôsobuje solvataciu analytu. V roztoku sa vyskytujú iónové prúdy indukované elektrickým poľom. V prípade elektrickej odolnosti média dochádza k treniu a Joulovým efektom sa uvoľňuje teplo. Tento jav závisí na množstve iónov v roztoku. Ako extrakčné rozpúšťadlá sa používajú látky v širokom rozsahu polarít od heptánu až po vodu. Metóda sa používa na extrakciu prírodných produktov ako esenciálnych olejov a pod. Z hľadiska forennej chémie je táto

technika vhodná na úpravu biologických vzoriek pred analýzou prítomnosti drog v daných vzorkách.²⁹

6. Vývoj a validácia metódy LC/MS (MS)

Metóda kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou alebo tandemovou hmotnostnou spektrometriou nadobudla v posledných desaťročiach významnú úlohu pri analýzach vzoriek v klinických, ale aj forenzných odvetviach, prevažne v toxikologickej analýze. Aby sme pri analýze neznámych biologických vzoriek mali istotu, že metóda funguje správne a výsledky sú presné, aby sme prípadné klinické a toxikologické nálezy interpretovali správne, je potrebné pred analýzou reálnych vzoriek metódu validovať.

6.1 Vývoj metódy LC/MS (MS)

Pred tým ako budeme chcieť metódu validovať, je potrebné ju vyvinúť. Vývoj analytických metód je nutné vykonávať v režime GLP (Good Laboratory Practise), to znamená, že sa musia používať certifikované referenčné materiály, pomôcky a prístroje, laboratórium musí byť akreditované.

V procese vývoja metódy zisťujeme, aké sú najlepšie vhodné podmienky pre čo najpresnejšiu analýzu cieľového analytu. Proces vývoja metódy zahŕňa štúdium vedeckej literatúry, kde získame základné informácie o fyzikálnych a chemických vlastnostiach analytu. Ak sa jedná o liečivo alebo drogu, je potrebné vedieť jej farmakokinetický profil, väzbovosť na plazmatické proteíny, štruktúru a pod. Jeden z najdôležitejších parametrov pri vývoji metódy a jej validácii je vhodná úprava vzorky, na ktorej vo veľkej miere závisia výsledky analýzy. Na základe vlastností biologickej vzorky poznáme niekoľko postupov úpravy vzorky.

Na základe dôležitosti validovať metódy v každom odvetví analytickej chémie, niekoľko medzinárodných organizácií vytvorilo manuál pre správnu validáciu metódy LC/MS (MS). Najznámejšie dva dokumenty schválené Európskou úniou, USA a Japonskom vydala v rokoch 1994 a 1996 organizácia International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Pri aplikovaní validačných parametrov možno vychádzať z definície „International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)“.¹⁸

6.2 Validačné parametre

Vo forenznej alebo klinickej analýze sa metóda LC/MS (MS) najčastejšie používa pri analýze drog, jedov alebo ich metabolitov. Preto je potrebné aby metóda splňovala validačné parametre, aby analýza spomínaných typov látok bola jednoznačná. Tieto parametre sú: selektivita (špecifita), linearita, stabilita, presnosť, precíznosť (opakovateľnosť, medziľahlá precíznosť) a spodný limit kvantifikácie (LLOQ). Môžu sa validovať aj parametre ako robustnosť, limit detekcie (LOD).¹⁸

a) Presnosť

Presnosť je validačný parameter definovaný ako miera zhody medzi experimentálne nameranou hodnotou získanou opakovanými meraniami a správnu referenčnou hodnotou. Stanovenie tohto parametru je dôležitou podstatou pri validácii každej analytickej metódy z dôvodu odhadnutia, ako systematické chyby ovplyvňujú danú metódu.³⁷ Väčšinou sa vyjadruje ako odchýlka v percentách od referenčnej hodnoty.³⁸

b) Precíznosť

Precíznosť je definovaná ako tesnosť zhody v sérii meraní tej istej vzorky za určité časové obdobie. Väčšinou sa precíznosť meria na 3 úrovniach a to: opakovateľnosť, čo je parameter kedy je precíznosť meraná v krátkom časovom intervale v rovnako nastavených analytických podmienkach, medziľahlá precíznosť, ktorá je definovaná ako precíznosť meraná v rôznych laboratórnych podmienkach (dlhší časový úsek, iný operátor, iný prístroj) a reprodukovateľnosť, ktorá je definovaná ako schopnosť novo vyvinutej metódy byť použitá v inom laboratóriu. Precíznosť je vyjadrovaná ako absolútna alebo relatívna smerodajná odchýlka v percentách.³⁸

c) Linearita

Linearita analytickej metódy je definovaná ako závislosť medzi minimálne dvomi nameranými hodnotami. Môže byť definovaná aj ako schopnosť metódy poskytnúť odozvu signálu úmernému koncentrácii analytu vo vzorke. Linearita by mala pozostávať aspoň z piatich kalibračných bodov, získaných z blanku a kalibračných štandardov daného analytu.³⁹ Tesnosť závislosti dvoch náhodných premenných je definovaná korelačným koeficientom R^2 .⁴⁰

d) Limit detekcie LOD

Je validačný parameter, ktorý definuje najmenšie detekovateľné množstvo analytu vo vzorke. Podľa Medzinárodnej organizácie pre štandardizáciu (ISO) je LOD definovaný ako množstvo alebo koncentrácia analytu vo vzorke, ktoré je väčšie ako v slepej vzorke, a je jasne odlišený od šumu a mal by sa od šumu líšiť minimálne 3x.⁴¹ Rovnica pre výpočet LOD (1).⁴²

e) Limit kvantifikácie LOQ

Existuje spodný limit kvantifikácie LLOQ, ktorý je definovaný ako najmenšie množstvo analytu vo vzorke, ktoré je možné s dostatočnou presnosťou a precíznosťou kvantifikovať. Druhým častým kritériom LLOQ je pomer signálu ku šumu, ktorý musí byť rovný alebo väčší ako hodnota 10. Horný limit kvantifikácie ULOQ, definuje najväčšie detekovateľné množstvo analytu vo vzorke s dostatočnou presnosťou a precíznosťou.³⁸ Rovnica pre výpočet LOQ (2).⁴²

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot h}{m} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot h}{m} \quad (2)$$

h-výška šumu, m-smernica kalibračnej priamky

Experimentálna časť

1.Ciele práce

Ciele tejto diplomovej práce boli nasledovné:

- optimalizovať podmienky pre chromatografickú separáciu štandardov antiepileptík levetiracetamu, gabapentínu, brivaracetamu, zonisamidu, primidónu, lakosamidu, lamotrigínu a perampanelu
- optimalizovať podmienky pre detekciu štandardov antiepileptík hmotnostnou spektrometriou
- overiť vyvinutú metódu na kvantifikácii antiepileptík v modelových vzorkách krvi

2. Prístroje

- Kvapalinový chromatograf: UltiMate 3000 System (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA)
- Hmotnostný spektrometer: LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA)
- Chromatografická kolóna: ACCLAIM™ RSLC 120 C18 20A, 2,1x100 mm (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA)
- Centrifúga Hettich Mikro 120 (Hettich Instruments, Tuttlingen, Nemecko)
- Minitrepačka TTS 2 (The Yellow line, Maryland, USA)
- Ultrazvuková čistička S 40 H (Elma-ultrasonic, Ruiselede, Belgicko)
- Automatické pipety (Gilson, Wisconsin, USA) a (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Spracovanie dát: Thermo Xcalibur 4.2 (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA), Microsoft Word 365, Microsoft Excel 365 (Microsoft, Washington, USA), ChemSketch (ACD/Labs Toronto, Canada), Inkscape

3.Chemikálie

- Acetonitril, čistota HPLC (VWM Chemicals, New York, USA)
- Metanol, čistota HPLC (VWM Chemicals, New York, USA)
- Deionizovaná voda (Direct-Q UV Millipore, Massachusetts, USA)
- Octan amónny, čistota HPLC (Fischer Chemical, Pennsylvania, USA)
- Kyselina mravčia čistota HPLC (VWM Chemicals, New York, USA)
- Bezvodý štandard kofeínu čistota HPLC (VWM Chemicals, New York, USA)

4. Štandardy

Štandardy antiepileptík o koncentráciách 1 mg/ml a 0,5 mg/ml riedené v metanole boli získané z „Ústavu soudního lékařství a medicinského práva vo Fakultní nemocnici Olomouc“.

5. Reálne vzorky

Reálne modelové vzorky boli pripravené spikovaním jednotlivých štandardov antiepileptík na ľudské negatívne krvné sérum.

Látka	MH+ (m/z)	Fragmentový ión (MS ²) m/z	Fragmentový ión (MS ³) m/z
Gabapentín	172	154	137
Levetiracetam	171	154	126
Brivaracetam	213	196	x
Zonisamid	213	132	x
Primidón	219	178	x
Lacosamid	251	108	x
Lamotrigín	256	220	x
Perampanel	350	247	x
Kofeín IŠ	195	138	x

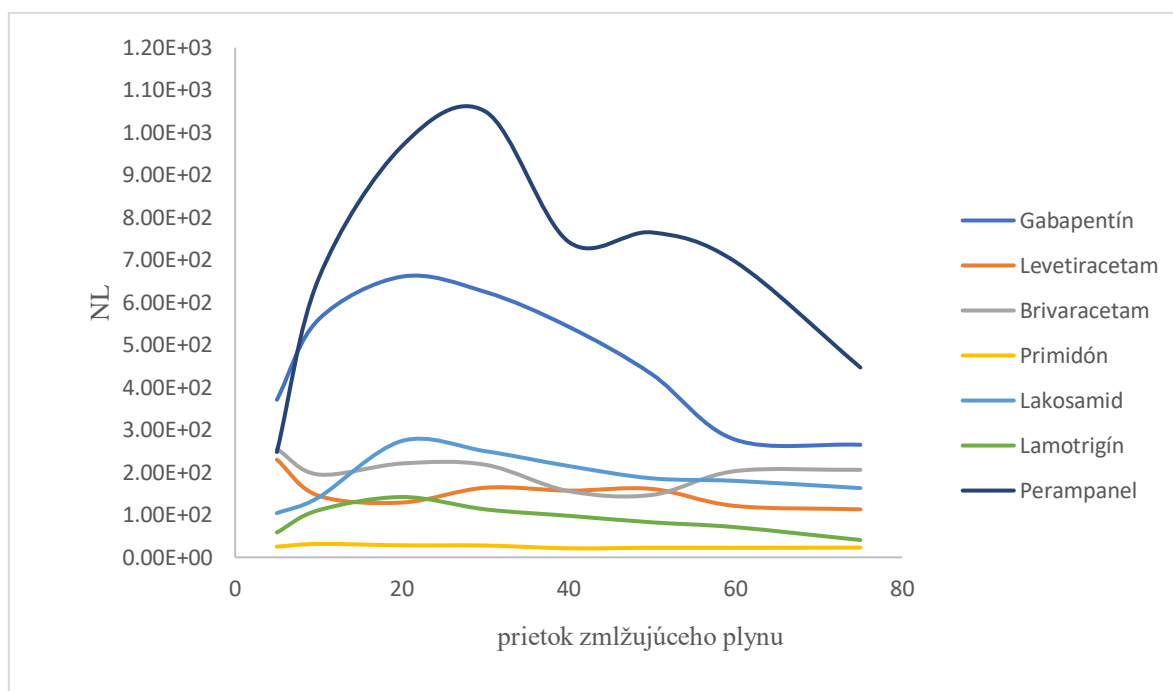
Tabuľka 1: Základné molekulové ióny vybraných antiepileptík a IŠ kofeínu a k nim vybrané najintenzívnejšie fragmentové ióny MS² (MS³)

Hodnoty m/z najintenzívnejších fragmentov jednotlivých štandardov antiepileptík boli získané tak, že boli všetky látky fragmentované pomocou MS² a následne z fragmentačného spektra boli vybrané najintenzívnejšie ióny daných látok, s ktorými sa ďalej pracovalo. U štandardu gabapentín a levetiracetam bolo potrebné látky fragmentovať pomocou MS³ z dôvodu rovnakej hodnoty m/z fragmentov z MS².

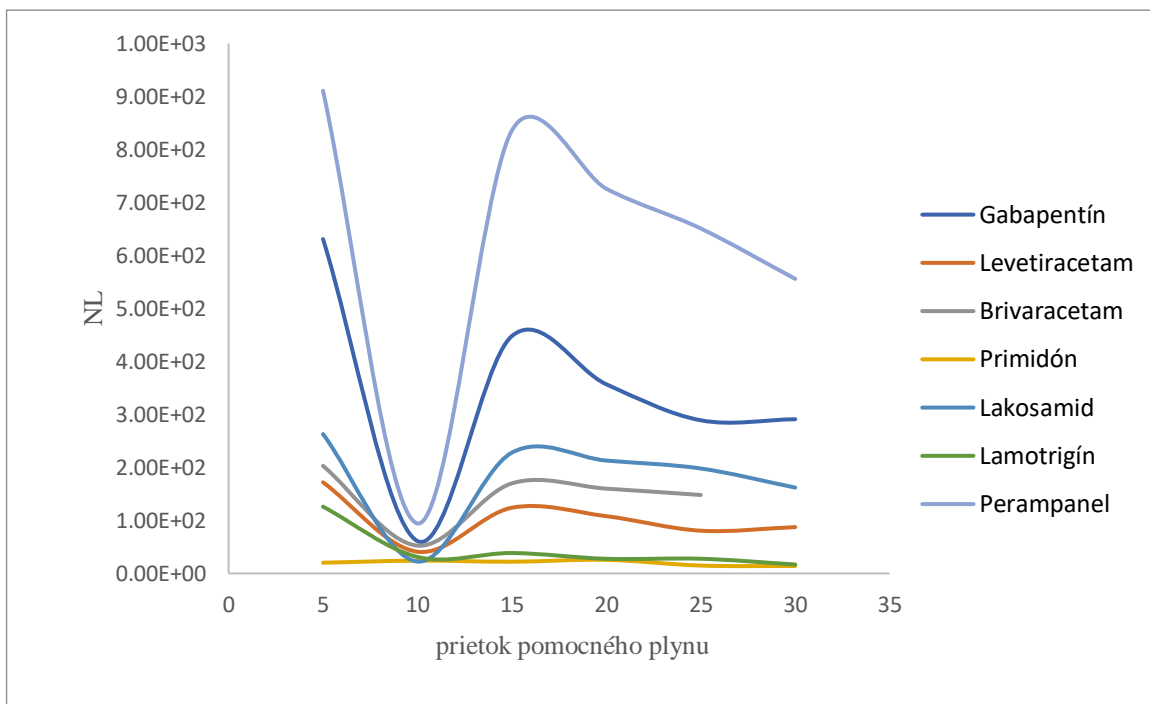
6. Optimalizácia parametrov hmotnostnej spektrometrie

Táto časť vývoja metódy bola zameraná na ladenie prietokov zmlžujúceho, pomocného a protichodného plynu a na vhodnú teplotu sprejovacej kapiláry. Bola vytvorená grafická závislosť intenzity fragmentového iónu (MS²) pre každý analyt, podľa tabuľky 1, na základe prietoku spomínaných plynov alebo na teplote sprejovacej kapiláry. Grafické závislosti sú znázornené v grafoch 1 až 4.

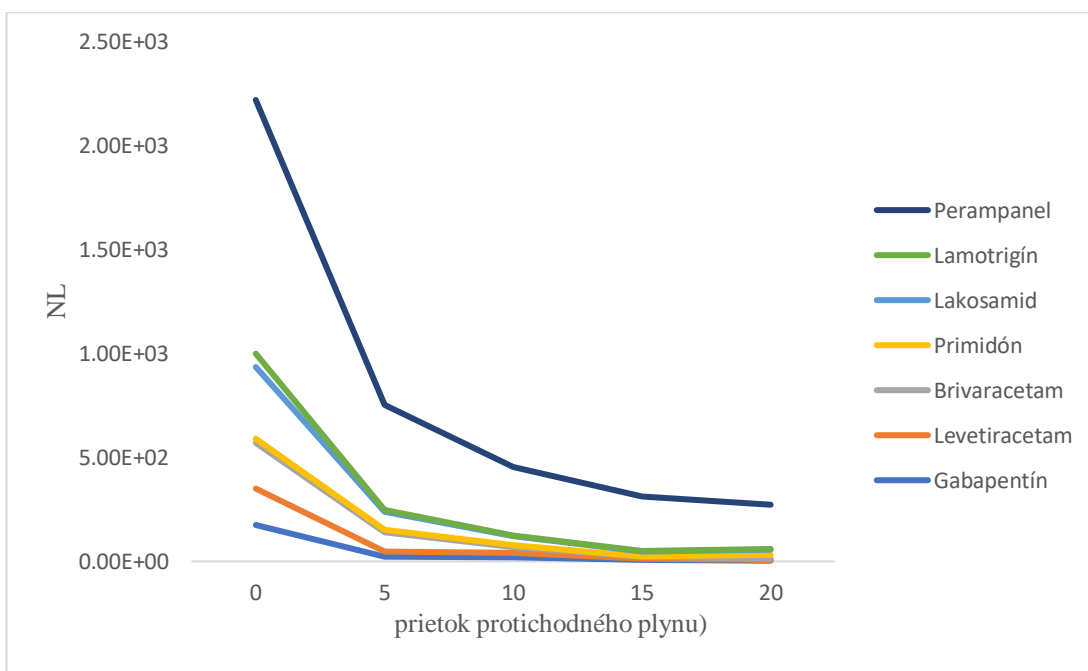
Na optimalizáciu MS parametrov bol použitý zmesný štandard antiepileptík o celkovej koncentrácii 1 µg/ml, riedený metanolom. Štandard bol nastreknutý priamo do hmotnostného spektrometra pomocou striekačky HAMILTON o objeme 500 µl s prietokom 10 µl/min. Prietok na kvapalinovom chromatografe bol nastavený na 0,4 ml/min. Mobilná fáza mala zloženie: A:5% acetonitril v H₂O s 0,1% HCOOH, B:acetonitril s 0,1% HCOOH. Štandard nastreknutý pomocou injekčnej striekačky sa zmiešaval s mobilnou fázou v T-spojke.



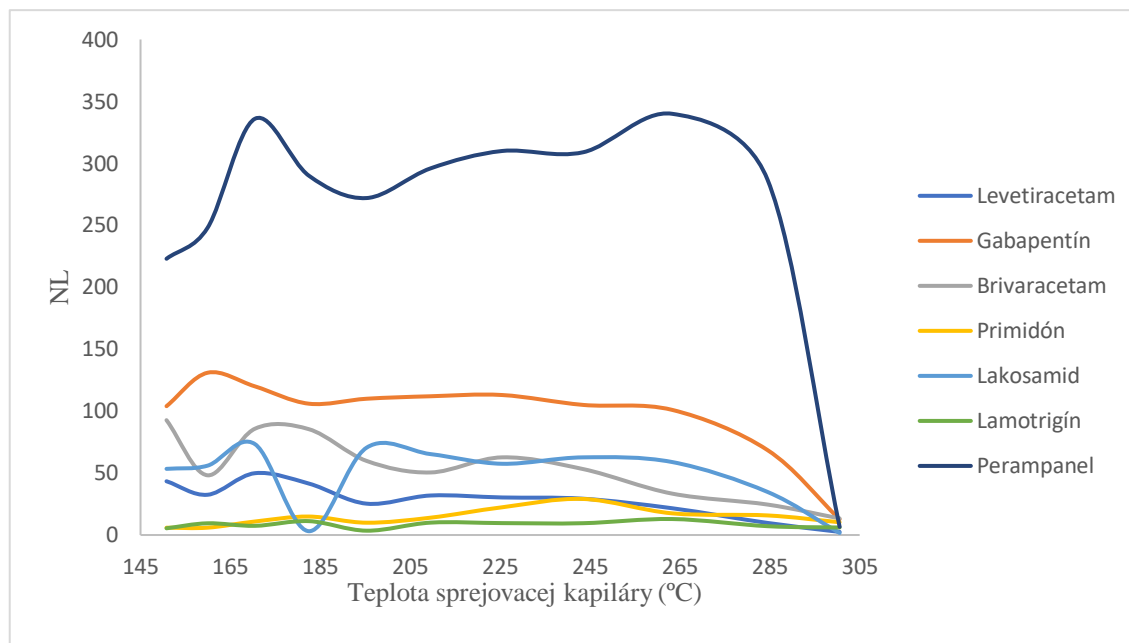
Graf 1: Závislosť intenzity fragmentových iónov analytov na základe prietoku zmlžujúceho plynu (SG)



Graf 2: Závislosť intenzity fragmentových iónov analytov na základe prietoku pomocného plynu (AG)



Graf 3: Závislosť intenzity fragmentových iónov analytov na základe prietoku protichodného plynu (SWG)



Graf 4: Závislosť intenzity fragmentových iónov analytov na základe teploty sprejovacej kapiláry

Prietok SG	60
Prietok AG	5
Prietok SWG	0
Teplota sprejovacej kapiláry (°C)	175

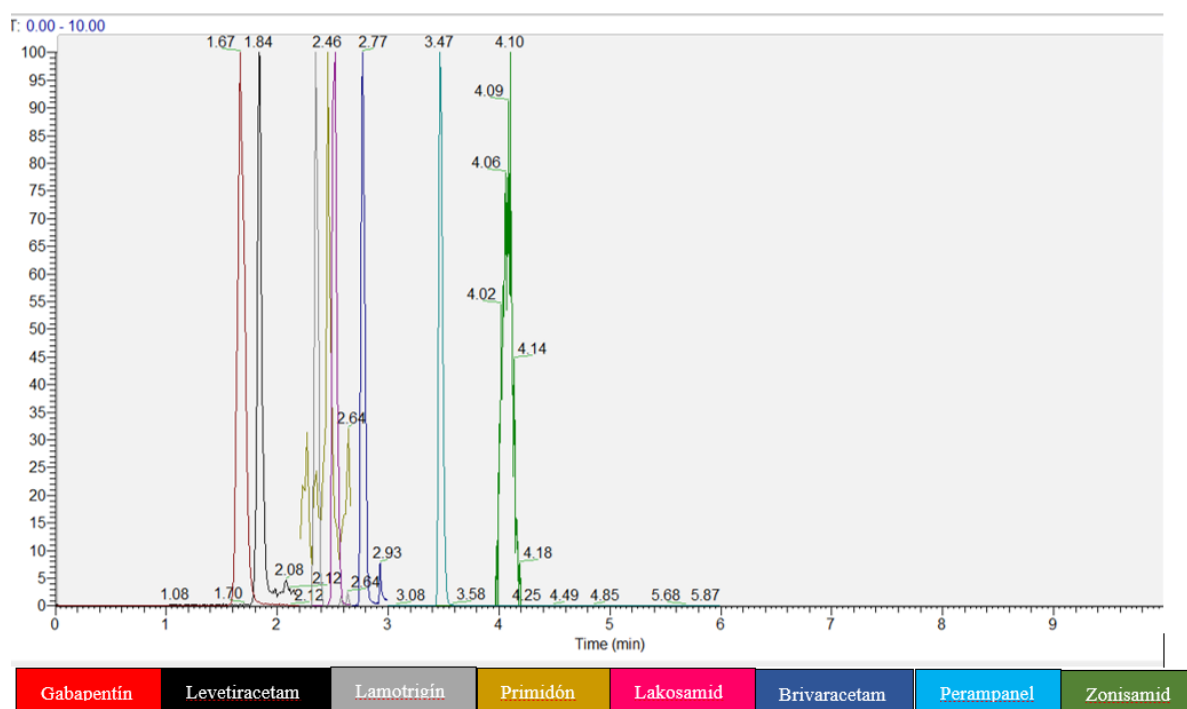
Tabuľka 2: Vybrané najvhodnejšie parametre na MS detekciu antiepileptík

(pozn.: prietok zmlžujúceho plynu bol následne nastavený na hodnotu 60 z dôvodu tvorby kvapiek v ionizačnom zdroji)

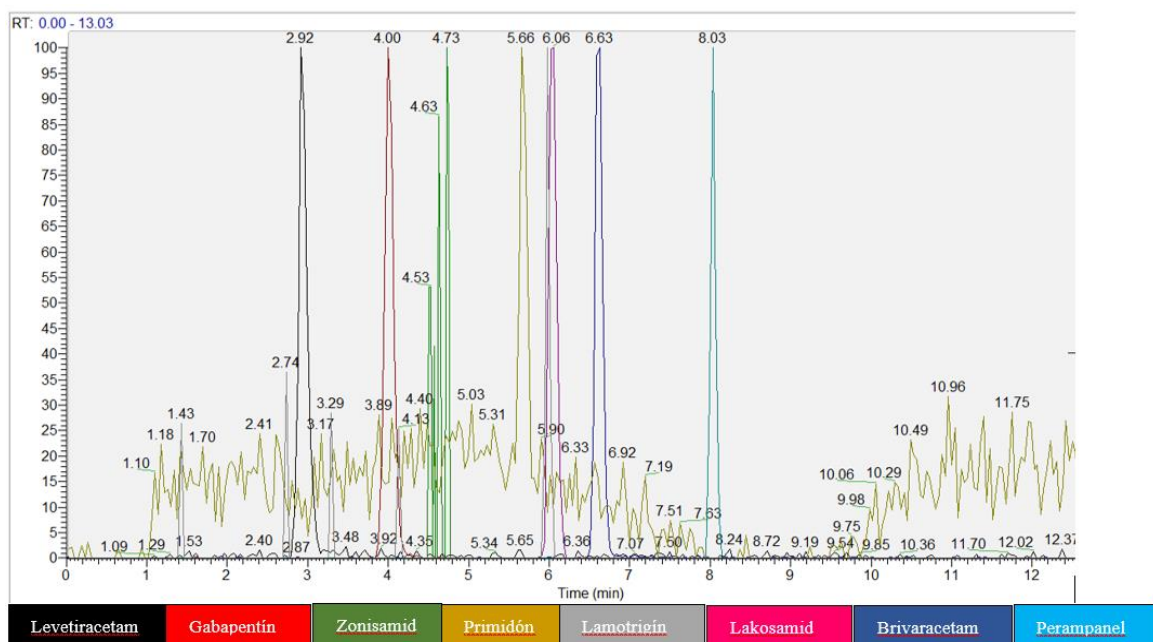
7. Testovanie a výber vhodnej kolóny a mobilnej fázy pre chromatografickú separáciu

Pri hľadaní podmienok na vhodnú chromatografickú separáciu boli testované tri rôzne chromatografické kolóny a tri typy mobilných fáz. V prvých analýzach bola použitá chromatografická kolóna Kinetex 2,6 u XB-C18 100A 50x2,10 mm. Pri tomto type kolóny boli použité 3 rôzne mobilné fázy na kanáli A, a to 2% acetonitril (ďalej ACN) s 0,1 % kyselinou mravčou (ďalej HCOOH); 2% ACN s 0,5% HCOOH a 10 mM octan amónny

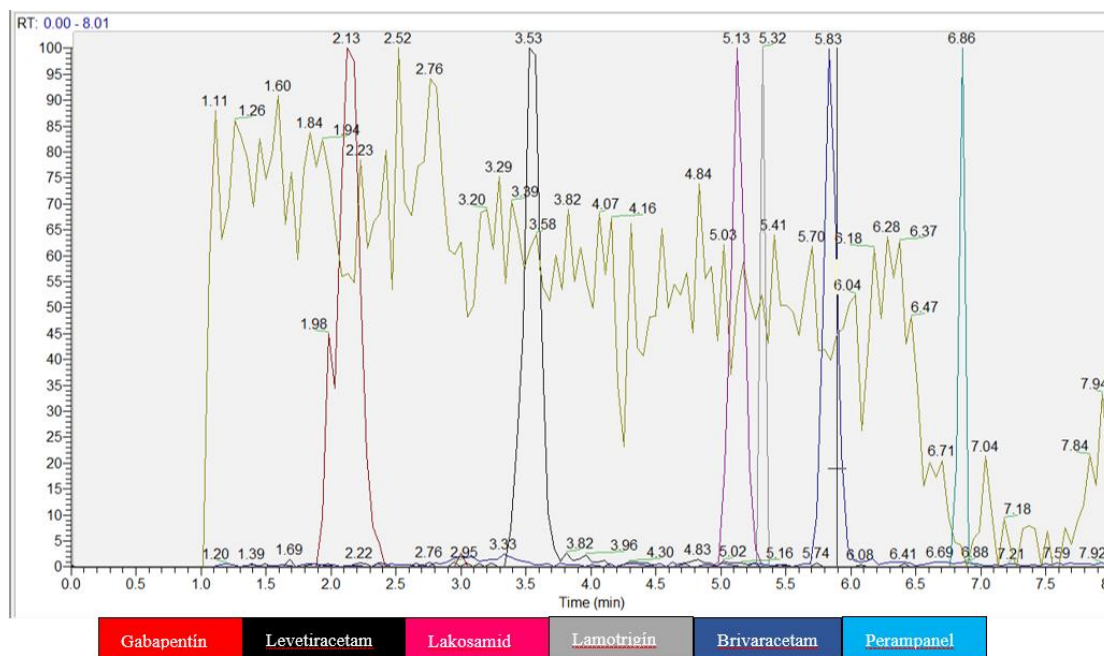
s 2% ACN (vid' obrázky 15-17). Ďalej bola použitá kolóna Kinetex 1,7um F5 100 A 100x2,1mm, kde bola testovaná na kanáli A len jedna mobilná fáza a to 2%ACN s 0,5% HCOOH (vid' obrázok 18). Ako posledná bola testovaná kolóna ACCLAIM™ RSLC 120 C18 20A 2,1x100 mm s tromi rôznymi mobilnými fázami na kanáli A, ktoré boli rovnaké ako u kolóny Kinetex 2,6 u XB-C18 100A 50x2,10 mm (vid' obrázky 19-23). Na túto kolónu boli nastrekované štandardy spikované v metanole a aj v negatívnom krvnom séru, kde bol použitý aj interný štandard kofeínu na rozdiel od predchádzajúcich kolón, kde boli nastrekované štandardy antiepileptík spikované len v metanole.



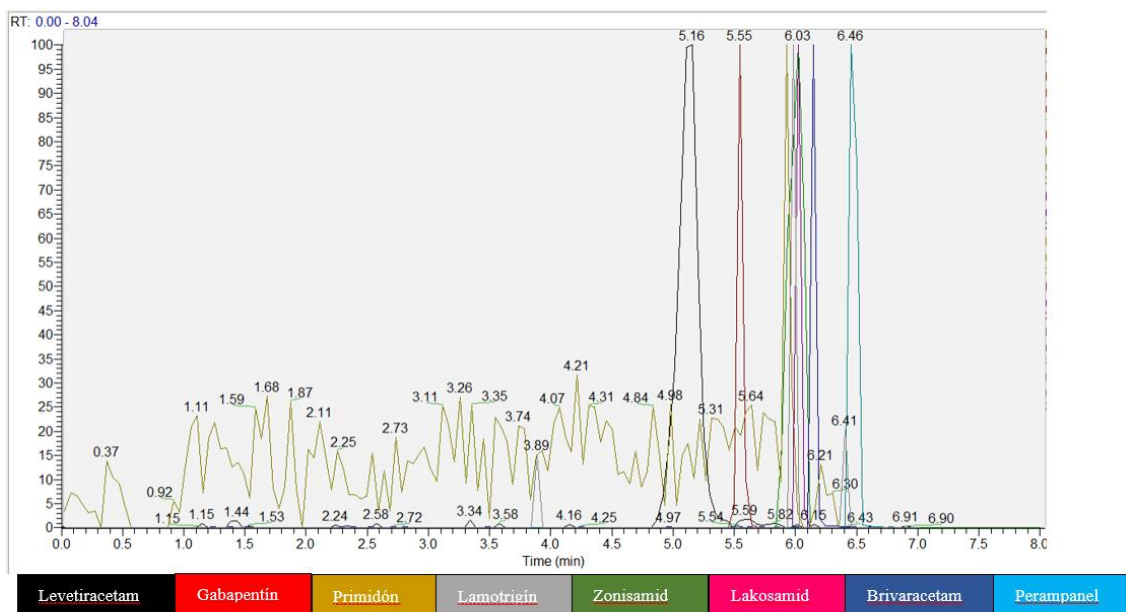
Obrázok 15: Chromatografická separácia zmesi antiepileptík o koncentrácii 300 ng/ml v metanole za použitia chromatografickej kolóny: Kinetex 2,6 u XB-C18 100A 50x2,10 mm a mobilnej fázy: A:2% ACN+0,1% HCOOH , B:ACN+0,1% HCOOH



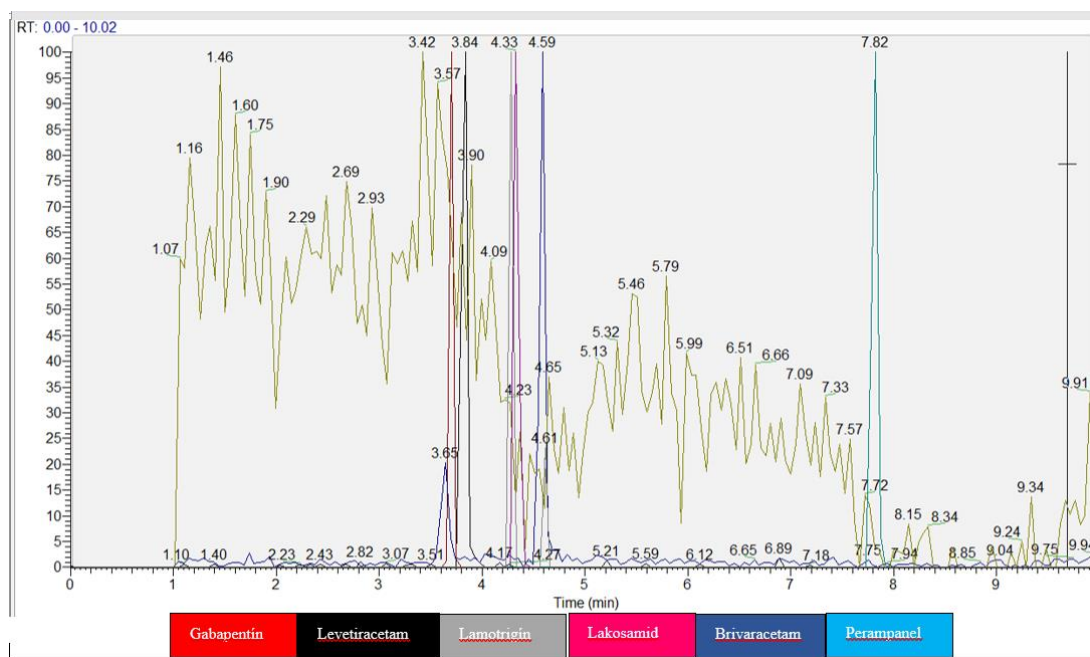
Obrázok 16: Chromatografická separácia zmesi antiepileptík o koncentrácii 500 ng/ml v metanole za použitia chromatografickej kolóny: Kinetex 2,6 u XB-C18 100A 50x2,10 mm a mobilnej fázy: A:2% ACN+0,5% HCOOH, B:ACN+0,1% HCOOH



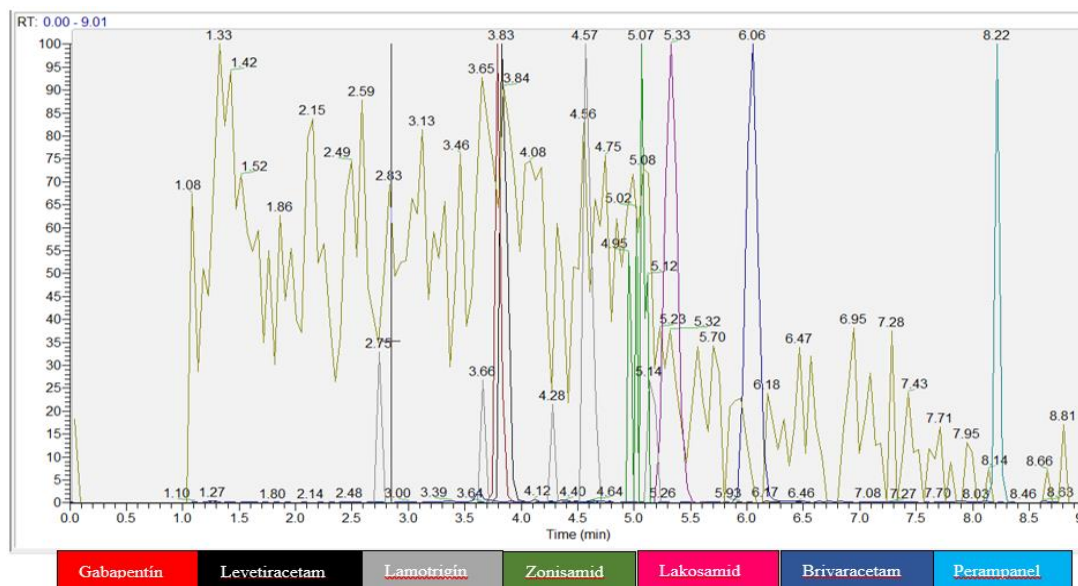
Obrázok 17: Chromatografická separácia zmesi antiepileptík o koncentrácii 500 ng/ml v metanole za použitia chromatografickej kolóny: Kinetex 2,6 u XB-C18 100A 50x2,10 mm a mobilnej fázy: A:10mM octan amónny+2% ACN B:ACN+0,1% HCOOH



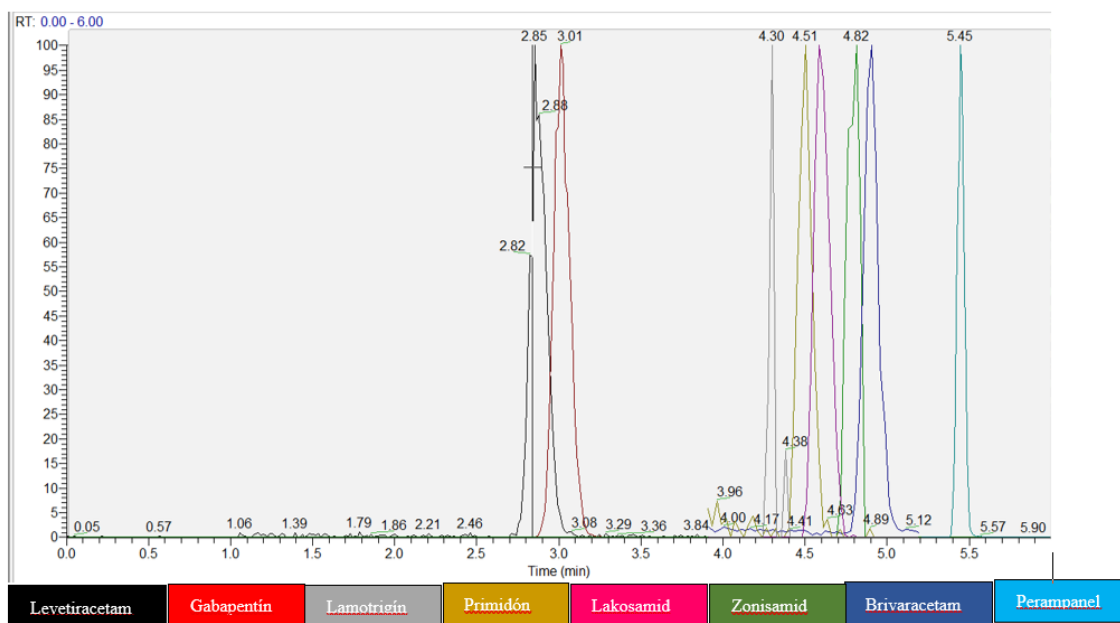
Obrázok 18: Chromatografická separácia zmesi antiepileptík o koncentrácii 500 ng/ml v metanole za použitia chromatografickej kolóny: Kinetex 1,7um F5 100 A 100x2,1mm a mobilnej fázy: A:2% ACN+0,5% HCOOH, B:ACN+0,1% HCOOH



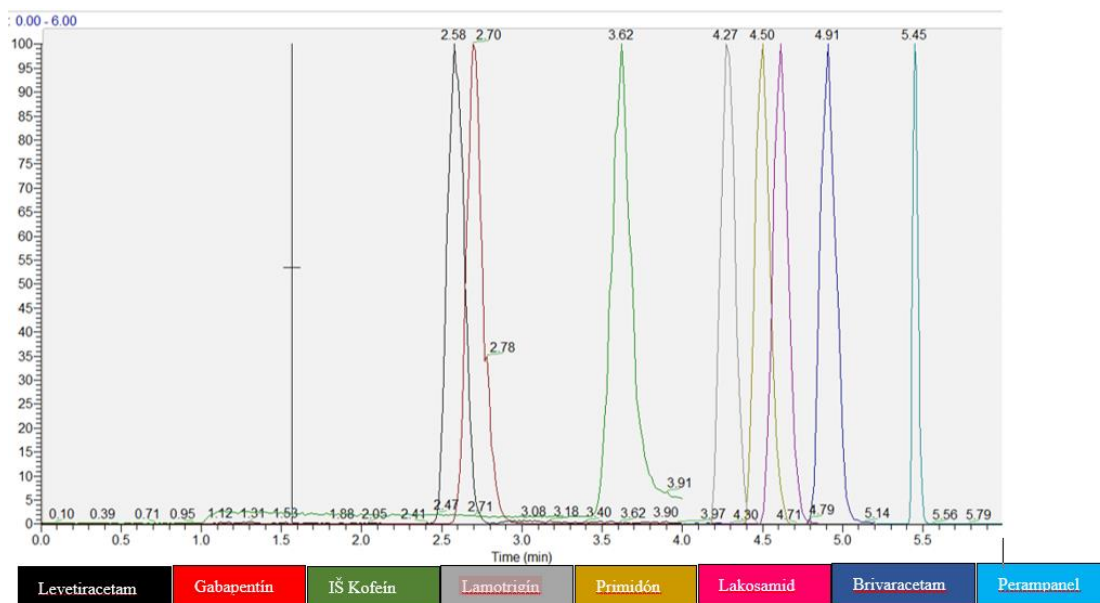
Obrázok 19: Chromatografická separácia zmesi antiepileptík o koncentrácii 500 ng/ml v metanole za použitia chromatografickej kolóny: ACCLAIM™ RSLC 120 C18 20A 2,1x100 mm a mobilnej fázy: A:10mM octan amónny+2% ACN B:ACN+0,1% HCOOH



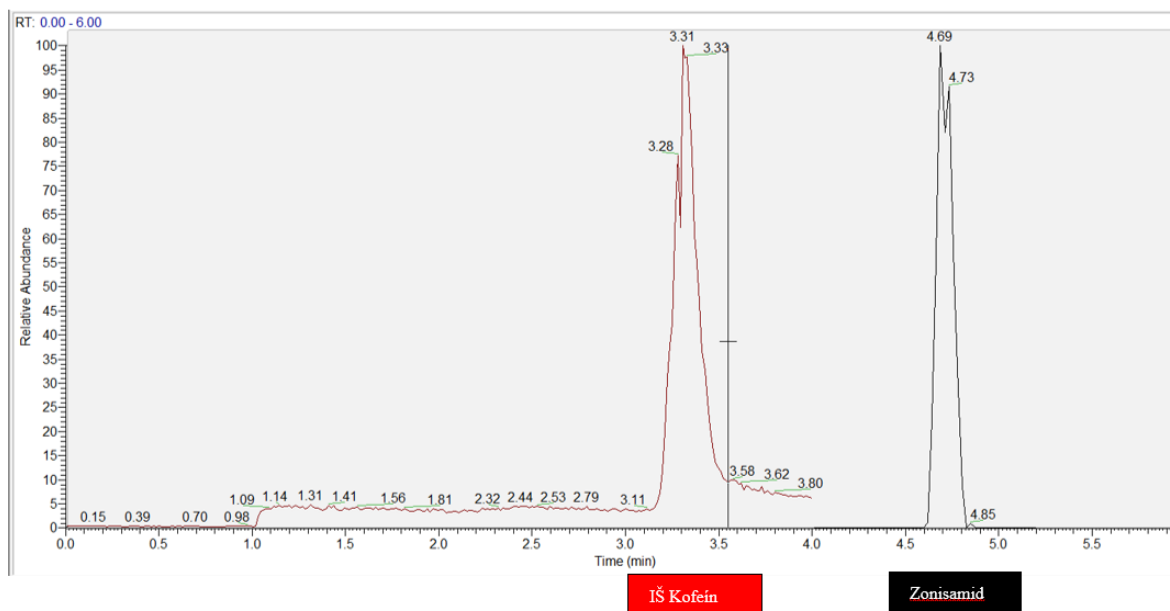
Obrázok 20: Chromatografická separácia zmesi antiepileptík o koncentrácii 500 ng/ml v metanole za použitia chromatografickej kolóny: ACCLAIM™ RSLC 120 C18 20A 2,1x100 mm a mobilnej fázy: MF:2% ACN+0,1% HCOOH, B:ACN+0,1% HCOOH



Obrázok 21: Chromatografická separácia zmesi antiepileptík o koncentrácii 500 ng/ml v metanole za použitia chromatografickej kolóny: ACCLAIM™ RSLC 120 C18 20A 2,1x100 mm a mobilnej fázy: A:2 % ACN+0,5% HCOOH, B:ACN+0,1% HCOOH



Obrázok 22: Chromatografická separácia zmesi antiepileptík o koncentrácii 500 ng/ml a IŠ kofeínu o koncentrácii 10 µg/ml v krvnom sére za použitia chromatografickej kolóny: ACCLAIM™ RSLC 120 C18 20A 2,1x100 mm a mobilnej fázy: A:2 %ACN+0,5%HCOOH, B:ACN+0,1%HCOOH



Obrázok 23: Chromatografická separácia štandardu zonisamidu o koncentrácii 8 µg/ml a IŠ kofeínu o koncentrácii 10 µg/ml v krvnom sére za použitia chromatografickej kolóny: ACCLAIM™ RSLC 120 C18 20A 2,1x100 mm a mobilnej fázy: A:2 %ACN+0,5%HCOOH, B:ACN+0,1%HCOOH

Testovanie chromatografických kolón a mobilných fáz na základe predložených záznamov z rôznych separácií jasne ukazuje, že najvhodnejšou chromatografickou kolónou je ACCLAIM™ RSLC 120 C18 20A 2,1x100 mm. Kolóna Kinetex 1,7um F5 100 A 100x2,1mm je evidentne najmenej vhodnou voľbou z dôvodu nedostatočnej separácie zložiek vzorky a neuspokojivého tvaru jednotlivých signálov. Čo sa týka mobilných fáz, tak najmenej vhodná mobilná fáza na kanáli A bola 10mM octan amónny s 2% ACN, kde za použitia tejto kombinácie možno v chromatograme vidieť veľmi veľký šum a absenciu niektorých signálov štandardov. Čo sa týka mobilnej fázy 2%ACN s 0,1% HCOOH, tak separácia bola omnoho lepšia, ale stále tu možno vidieť vysoký šum. Práve preto bola najvhodnejšou voľbou mobilná fáza s obsahom 2%ACN s 0,5% HCOOH, ktorá bola kyslejšia a v kombinácii s vybranou kolónou bol eliminovaný šum v pozadí a chromatografická separácia bola lepšia.

7. Parametre finálnej analýzy

Chromatografická separácia bola vykonávaná pomocou gradientovej elúcie, kde boli použité 2 mobilné fázy: A: 2 % acetonitril+0,5 % kyseliny mravčej; B: čistý acetonitril+0,5 % kyseliny mravčej. Gradient a zloženie mobilnej fázy v priebehu analýzy možno vidieť v tabuľke 1. Prietok mobilnej fázy bol nastavený na 0,4 ml/min. Analytická kolóna bola termostatovaná na 35° C . Doba analýzy bola 6 minút. Nastreknutý objem vzorky bol 5 µl. Pozorované analyty boli eluované v retenčných časoch: levetiracetam 2,7 min., gabapentín 2,8 min., brivaracetam 4,9 min., zonisamid 4,7 min., primidón 4,5 min., lakosamid 4,6 min., lamotrigín 4,3 min, perampanel 5,45 min. Ako vnútorný štandard bol použitý kofeín, ktorý sa eluoval v retenčnom čase okolo 3,5 min. Retenčné časy jednotlivých analytov a IŠ kofeínu sa pri jednotlivých nástrekoch trochu posúvali, ale vždy bolo z chromatogramu dobre rozpoznateľné o aké látky sa jedná. Vyvinutá metóda bola použitá na analýzu štandardov antiepileptík a aj reálnych vzoriek. Parametre hmotnostného detektoru boli nastavené podľa tabuľky 2. Ionizácia vzorky prebiehala pomocou elektrospreja v kladnom móde a ako hmotnostný analyzátor bola použitá iónová pasca.

Čas analýzy (min.)	MF A (%)	MF B (%)	Prietok MF (ml/min)
0,0	80	20	0,400
1,0	80	20	0,400
2,0	0	100	0,400
2,5	0	100	0,130
3,0	0	100	0,130
4,0	0	100	0,130
5,0	0	100	0,130
5,3	100	0	0,400
6,0	100	0	0,400

Tabuľka 3: Použitý gradient a zloženie mobilnej fázy v čase analýzy

Rýchlosť prúdenia zmžujúceho plynu (Sheath gas arb)	60
Rýchlosť prúdenia pomocného plynu (Aux gas arb)	5
Rýchlosť prúdenia protiprúdového plynu (Sweep gas arb)	0
Sprejovacie napätie (kV)	5
Teplota sprejovaciej kapiláry (°C)	175
Napätie na kapiláre (V)	10
Napätie na iónovej šošovke za sprejovaciou kapilárou (V)	120

Tabuľka 4: Parametre nastavené na hmotnostnom detektore v priebehu analýzy

9. Príprava kalibračných a modelových vzoriek na LC/MS analýzu

Na prípravu kalibračných štandardov boli použité štandardy antiepileptík o koncentrácii 0,1 mg/ml, z ktorých bol pripravený zmesný roztok štandardov antiepileptík obsahujúci analyty: lamotrigín, gabapentín, brivaracetam, primidón, lakosamid, lamotrigín a perampánol o celkovej koncentrácii 10 µg/ml. Následne sa pripravila kalibračná rada riedením zmesného štandardu podľa tabuľky 5. Pre štandard zonisamidu sa musela vytvoriť samostatná kalibračná rada, ktorá bola vytvorená riedením štandardu o koncentrácii 1 mg/ml. Všetky kalibračné roztoky boli riedené metanolom. Kalibračná rada pre štandard zonisamidu je znázornená v tabuľke 6.

Následne bolo rozmrazené negatívne krvné sérum, z ktorého bolo odoberáť 40 µl do eppendorfky. Ďalej bolo do krvného séra spikovaných 10 µl zmesného štandardu (štandardu zonisamidu), 20 µl interného štandardu kofeínu o koncentrácii 200 µg/ml v metanole a 130 µl metanolu. Štandardy boli v krvnom sére riedené 20x. Následne boli vzorky pretrepané 1

minútu na minitrepačke a centrifugované 3 minúty pri rýchlosti 14 000 rpm. Potom bolo odobraných 170 µl supernatantu do insertu autosamplérovej vialky a bol nastreknutý objem 5 µl. Uvedený postup sa použil pri príprave každej koncentračnej hladiny v kalibračnej rade, u modelových vzoriek a u blanku kde bol namiesto štandardu antiepileptík pridaný metanol.

Koncentrácia zmesného štandardu pripraveného v metanole (pred spikovaním) (ng/ml)		Finálna koncentrácia zmesného štandardu v krvnom sére (po spikovaní) (ng/ml)
10 000		500
4000		200
2000		100
1000		50
400		20
MV 1*	2400	120
MV 2*	6000	300

* pripravené modelové vzorky

Tabuľka 5: Kalibračná rada a modelové vzorky zmesného štandardu antiepileptík s koncentraciami pred a po spikovaní na krvné sérum

Koncentrácia štandardu zonisamidu pripraveného v metanole (pred spikovaním) (µg/ml)		Finálna koncentrácia štandardu zonisamidu v krvnom sére (po spikovaní) (µg/ml)
160		8,0
80		4,0
40		2,0
16		0,8
8		0,4
MZ 1*	30	1,5
MZ 2*	120	6,0

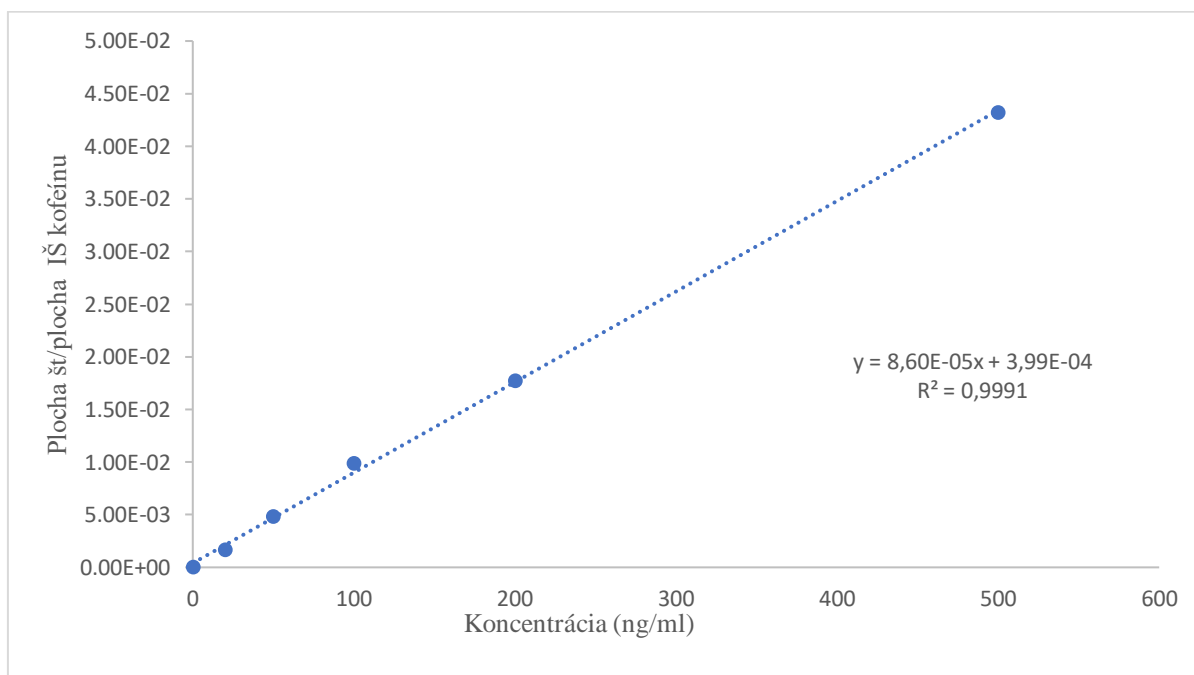
*pripravené modelové vzorky

Tabuľka 6: Kalibračná rada štandardu zonisamidu s koncentraciami pred a po spikovaní na krvné sérum

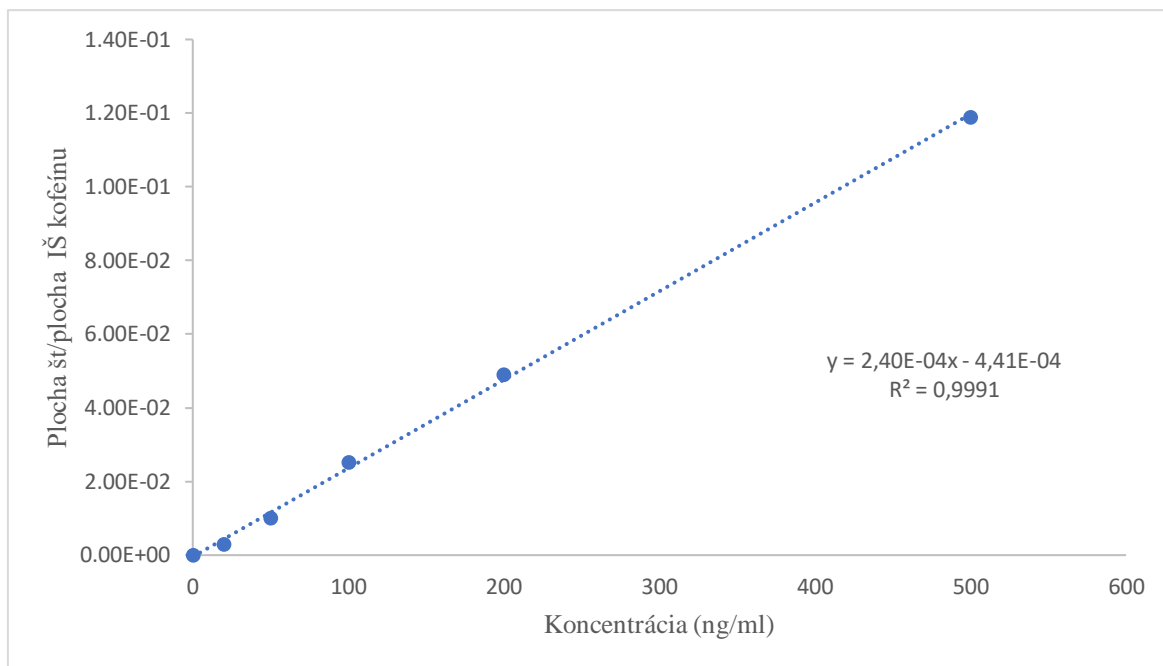
10. Výsledky a diskusia

10.1. Kalibrácia

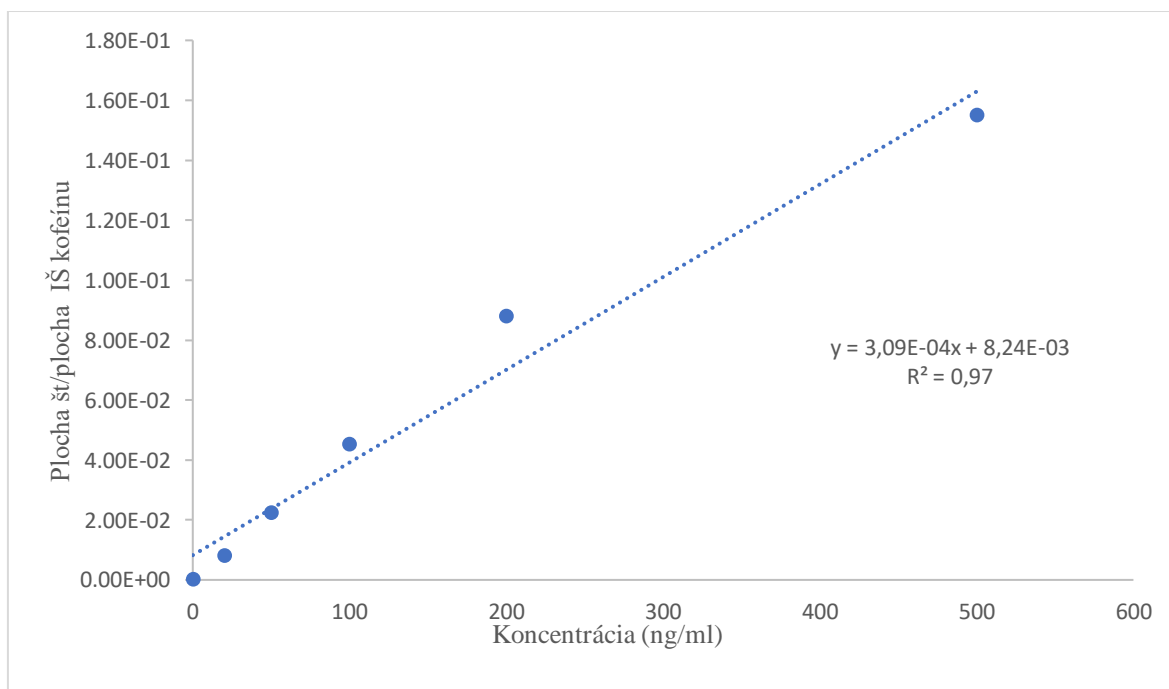
Pre stanovenie kalibračnej závislosti boli premerané koncentračné rady štandardov antiepileptík pripravených podľa tabuliek 4 a 5. Štandardy boli kvantifikované pomocou tandemovej hmotnostnej spektrometrie MS², kde boli sledované najintenzívnejšie fragmentové ióny, ktoré sú zobrazené v tabuľke 1. U štandardov levetiracetam a gabapentín bol urobený sken MS³ z dôvodu rovnakej hodnoty m/z pri skene MS². Každý štandard o danej koncentračnej hladine bol nastreknutý 3x. Kalibračné závislosti pre každú látku sú zobrazené v grafoch 5-12.



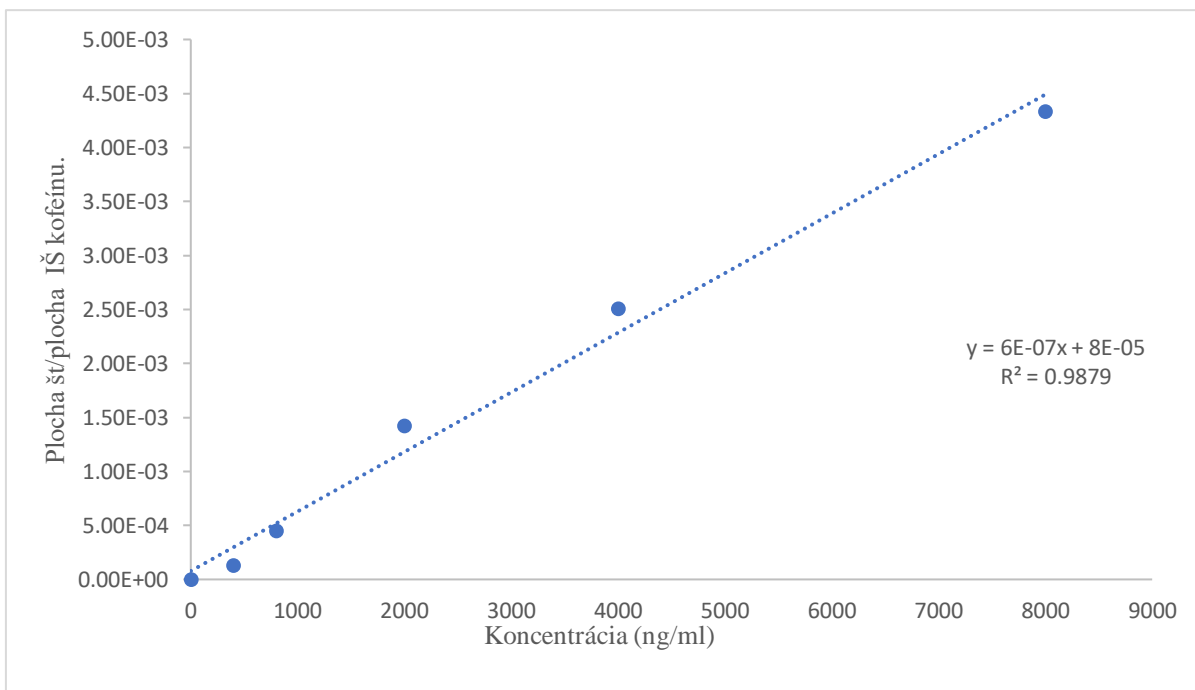
Graf 5: Kalibračná závislosť štandardu levetiracetamu



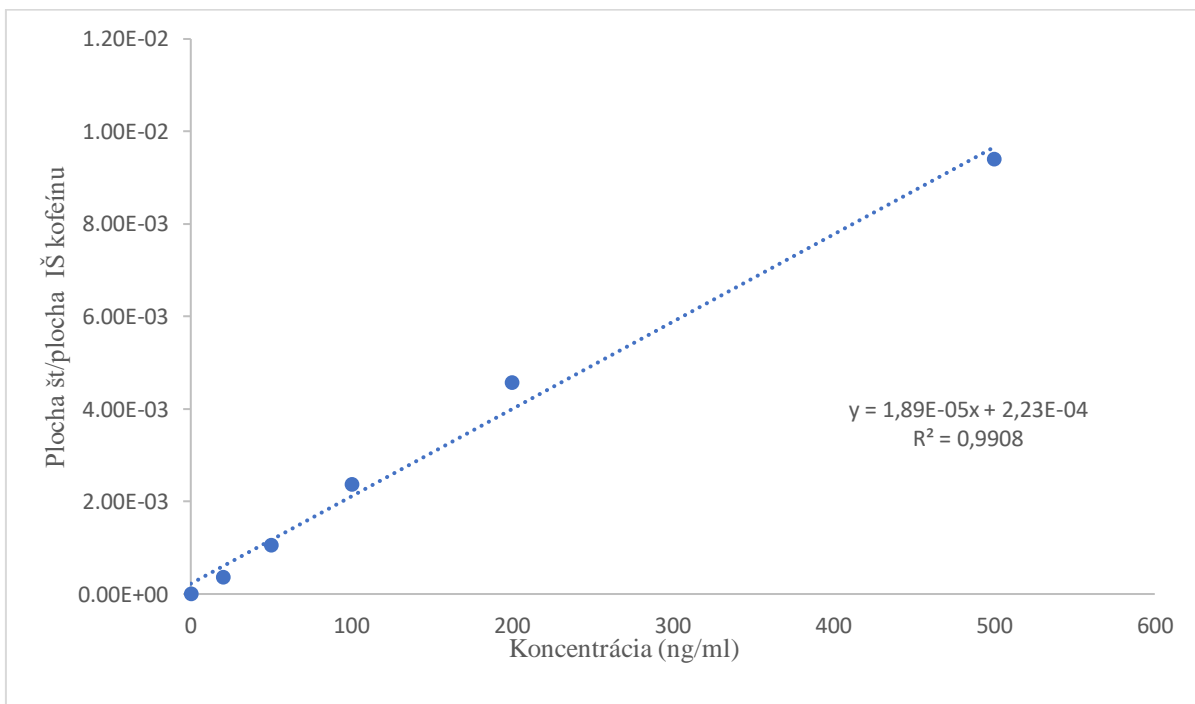
Graf 6: Kalibračná závislosť štandardu gabapentínu



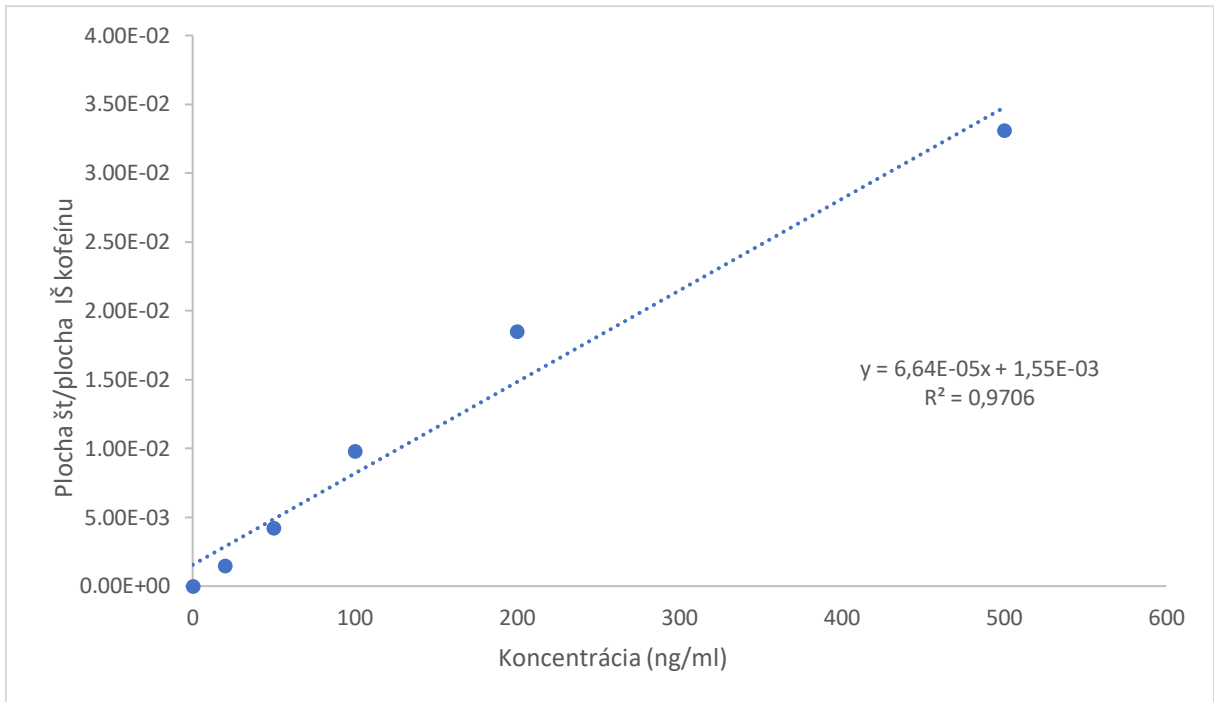
Graf 7: Kalibračná závislosť štandardu brivaracetamu



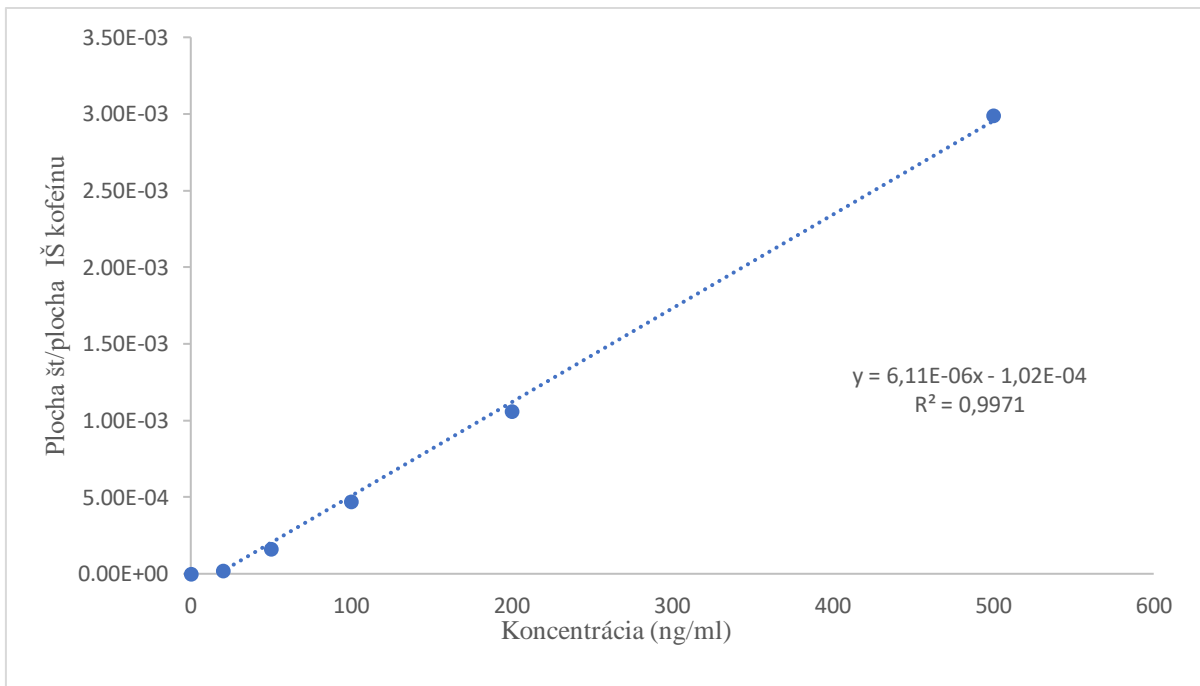
Graf 8: Kalibračná závislosť štandardu zonisamidu



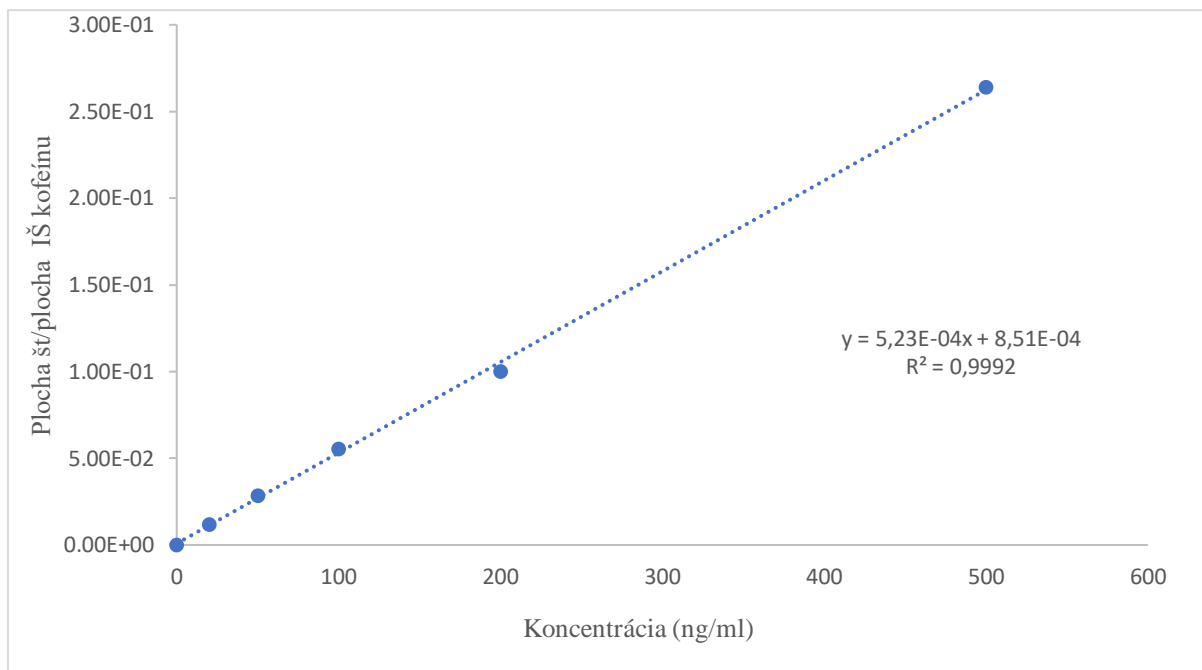
Graf 9: Kalibračná závislosť štandardu primidónu



Graf 10: Kalibračná závislosť štandardu lakosamidu



Graf 11: Kalibračná závislosť štandardu lamotrigínu



Graf 12: Kalibračná závislosť štandardu perampanelu

10.2 Limit detekcie

Limity detekcie a limity kvantifikácie boli vypočítané pre každú látku. Do výpočtu boli brané koncentračné hladiny: blank, 20, 50 a 100 ng/ml pre zmes štandardov antiepileptík a koncentračné hladiny: blank, 400, 800 a 2000 ng/ml pre štandard zonisamidu z dôvodu dosiahnutia lepších limitov detekcie a kvantifikácie. Limity boli vypočítané podľa nasledujúcich rovníc, kde σ je smerodatná odchýlka úseku kalibračnej priamky a S je smernica kalibračnej priamky.

$$\text{LOD} = \frac{3x\sigma}{S} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10x\sigma}{S} \quad (2)$$

Látka	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Levetiracetam	2,9	9,9
Gabapentín	6,7	22,3
Brivaracetam	5,3	17,8
Primidón	4,6	15,3
Lacosamid	6,6	21,9
Lamotrigín	11,8	39,2
Perampanel	3,1	10,4
Zonisamid	146,7 (µg/ml)	489,1 (µg/ml)

Tabuľka 7: Limity detekcie a limity kvantifikácie pre jednotlivé štandardy antiepileptík vypočítaných z kalibračnej priamky

10.3 Opakovateľnosť a medziľahlá precíznosť

Opakovateľnosť a medziľahlá precíznosť bola počítaná na dvoch koncentračných hladinách a to na koncentračnej hladine blízkej limitu detekcie, čo bola v prípade zmesného štandardu antiepileptík koncentračná hladina 20 ng/ml a na najvyššej koncentračnej hladine 500 ng/ml. U štandardu zonisamidu boli tieto validačné parametre počítané na koncentračných hladinách 400 a 8000 ng/ml. Opakovateľnosť merania bola vykonaná v priebehu jedného dňa 3x na tom rovnakom prístroji s rovnakými podmienkami. Medziľahlá precíznosť bola meraná 3x v dlhšom časovom úseku. Opakovateľnosť a medziľahlá precíznosť bola počítaná podľa nasledujúceho vzorca.

$$RSD = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}} \quad (3)$$

		OP	MP
Látka	Koncentrácia (ng/ml)	RSD (%)	RSD (%)
Levetiracetam	20	9,7	18,7
	500	1,0	49,8
Gabapentín	20	7,6	1,2
	500	0,9	3,9
Brivaracetam	20	5,8	10,5
	500	16,7	16,0
Zonisamid	400	21,2	32,0
	8000	5,0	9,4
Primidón	20	3,9	9,1
	500	2,6	3,8
Lakosamid	20	11,3	9,3
	500	7,7	13,5
Lamotrigín	20	27,4	14,9
	500	4,1	7,2
Perampanel	20	8,9	2,0
	500	3,6	15,0

Tabuľka 8: Vypočítané hodnoty relatívnej smerodatnej odchýlky pri stanovení opakovateľnosti a medziláhlej precíznosti merania pre každú látku na dvoch koncentračných hladinách

10.4 Pravdivosť

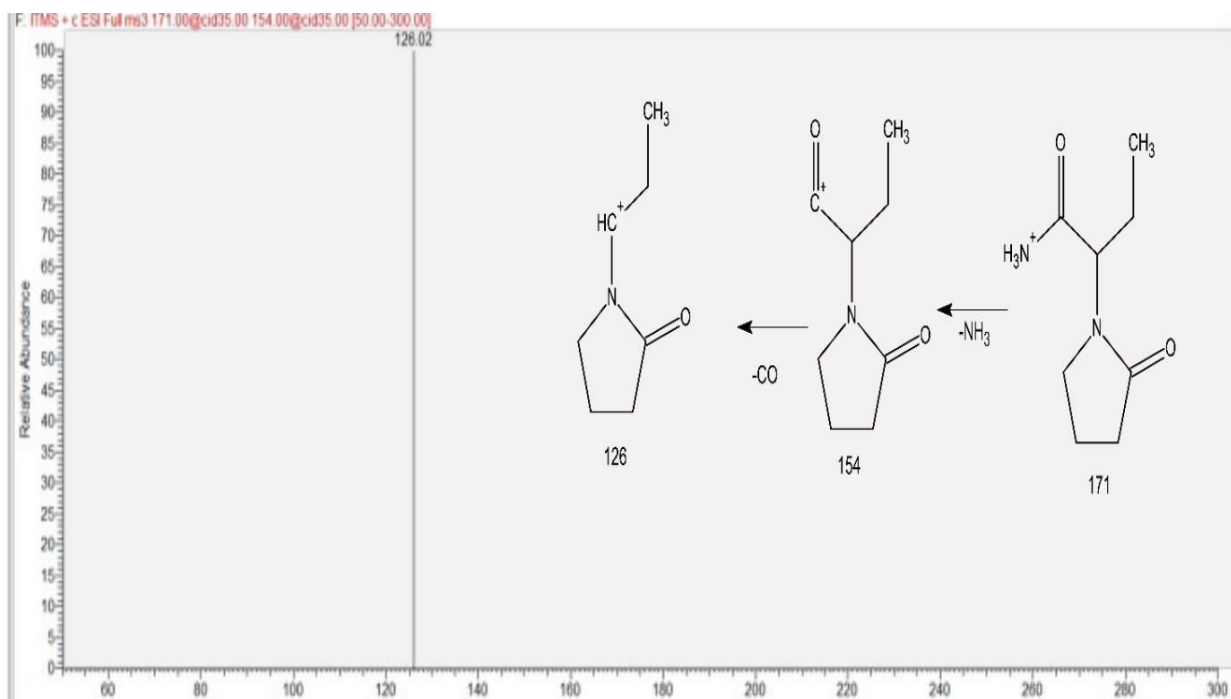
Boli pripravené modelové vzorky zmesi štandardov antiepileptík a štandardu zonisamidu spikované v negatívnom krvnom séru podľa tabuľky 4 a 5. Pri zmesi štandardov antiepileptík boli pripravené štandardy o koncentracii 120 a 300 ng/ml. U štandardu zonisamidu boli pripravené štandardy o koncentracii 1,5 a 6 µg/ml. Do každej modelovej vzorky bol pridaný interný štandard kofeínu, ktorý mal finálnu koncentraciu 10 µg/ml. Každá modelová vzorka bola do systému LC/MS nastreknutá 3x pre lepšiu reprodukovateľnosť. Následne boli zintegrované plochy signálov analytov

a interného štandardu kofeínu, z ktorých bol vypočítaný podiel, ktorý bol použitý pri výpočte koncentrácie štandardu v séru z kalibračnej rovnice. Z údajov bola ďalej vypočítaná relatívna chyba merania pre každú látku (viď tabuľka 8).

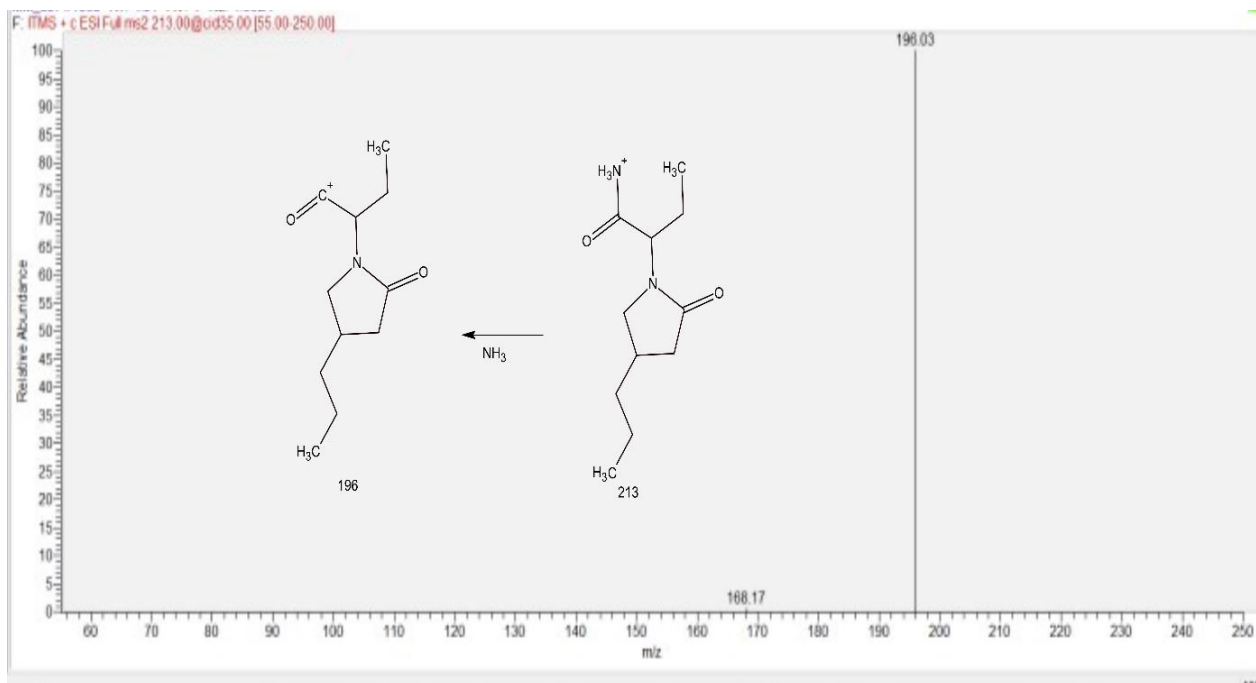
Látka	Spikovaná koncentrácia (ng/ml)	Nameraná koncentrácia (ng/ml)	Relatívna chyba (%)
Levetiracetam	120	97,7	-18,6
	300	326,8	8,9
Gabapentín	120	95,2	-20,7
	300	335,6	11,9
Brivaracetam	120	96,6	-19,5
	300	368,2	22,7
Zonisamid	1500	1900	26,7
	6000	5550	-7,5
Primidón	120	89,3	-25,6
	300	331,6	10,5
Lakosamid	120	76,4	-36,4
	300	324,6	8,2
Lamotrigín	120	88,9	-25,9
	300	293,3	-2,2
Perampanel	120	101,2	-15,6
	300	333,0	11,0

Tabuľka 9: Spikovaná a nameraná koncentrácia antiepileptík v krvnom séru a vypočítaná relatívna chyba ku každému štandardu antiepileptík

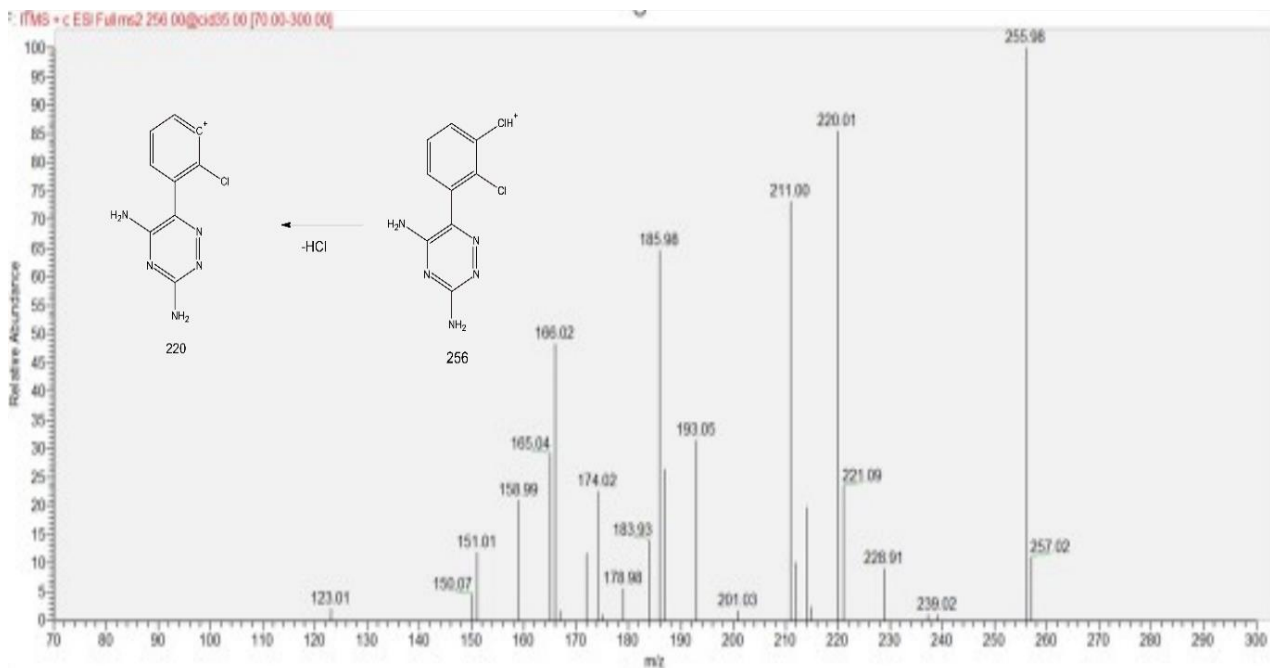
10.5 Fragmentačné spektrá antiepileptík



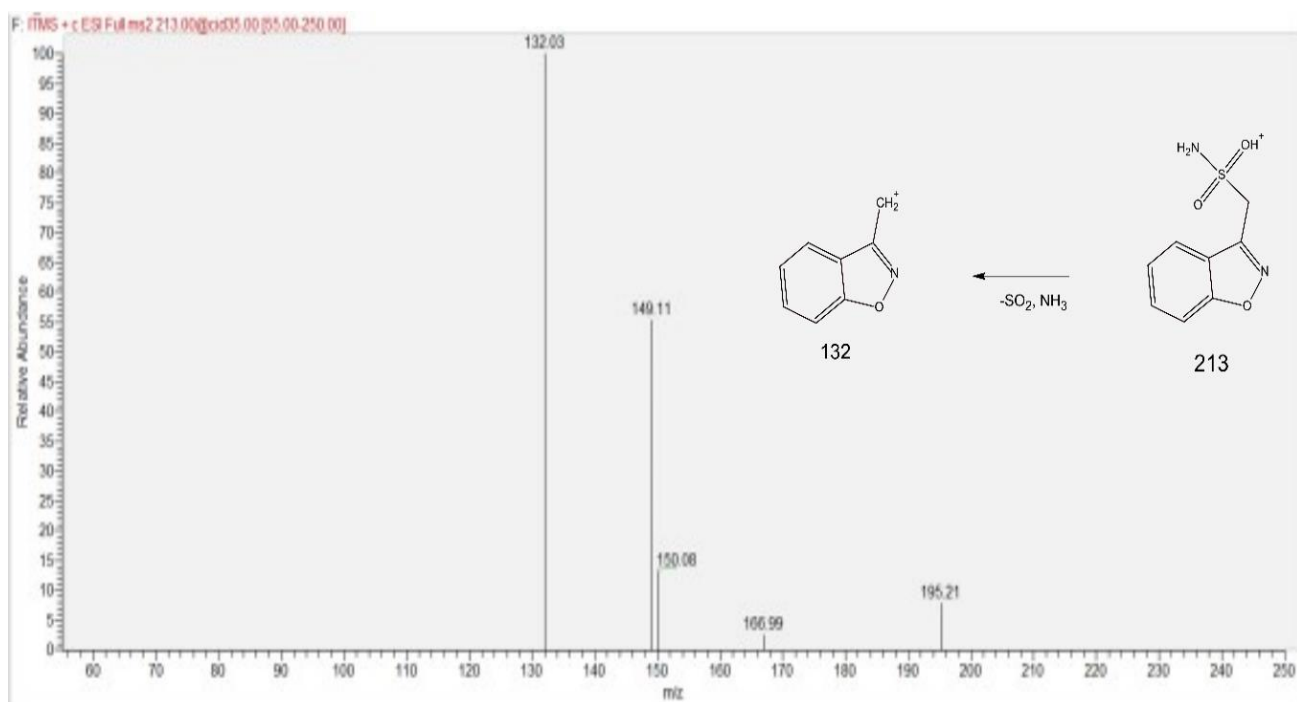
Obrázok 24: Fragmentačné spektrum štandardu levetiracetamu a navrhované štruktúry⁴⁸



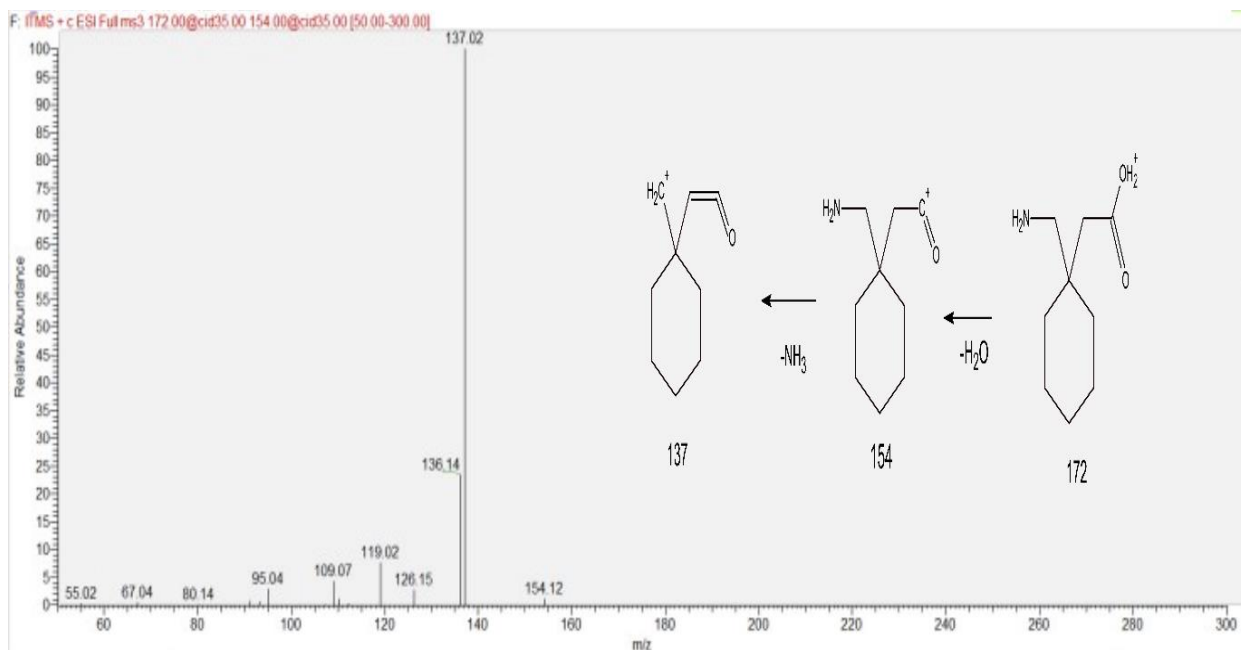
Obrázok 25: Fragmentačné spektrum štandardu brivaracetamu a navrhované štruktúry⁴⁸



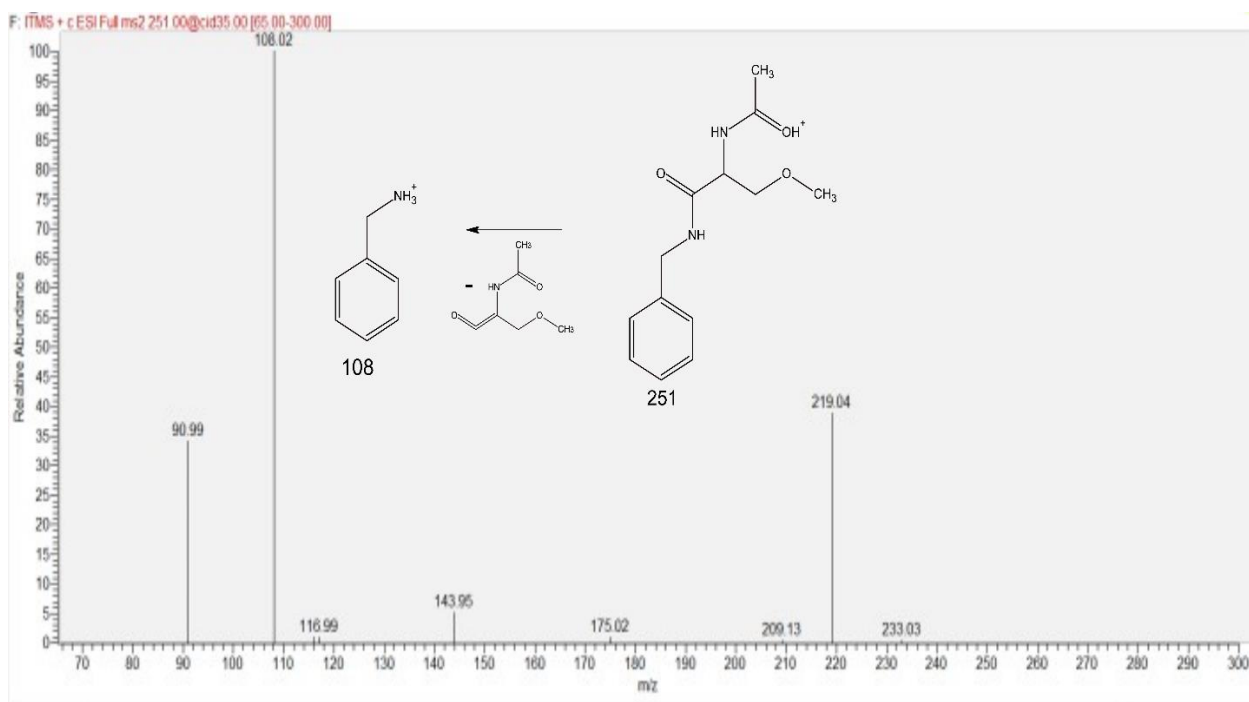
Obrázok 26: Fragmentačné spektrum štandardu lamotrigínu a navrhované štruktúry⁴⁸



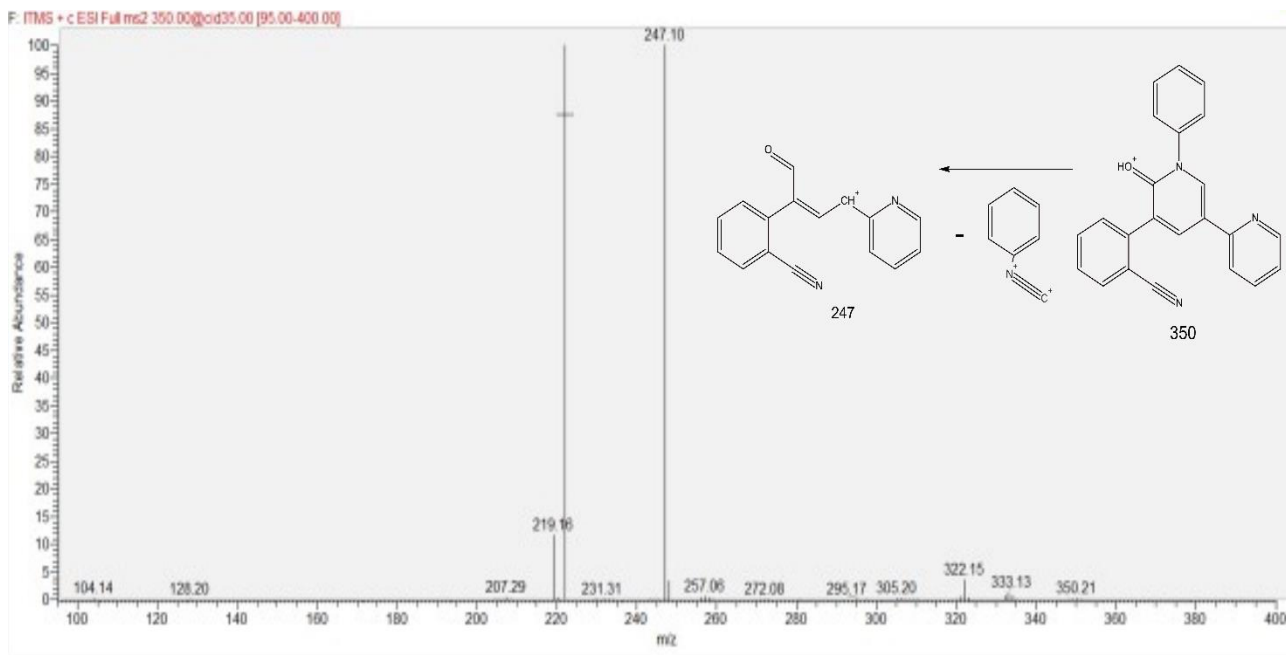
Obrázok 27: Fragmentačné spektrum štandardu zonisamidu a navrhované štruktúry⁴⁸



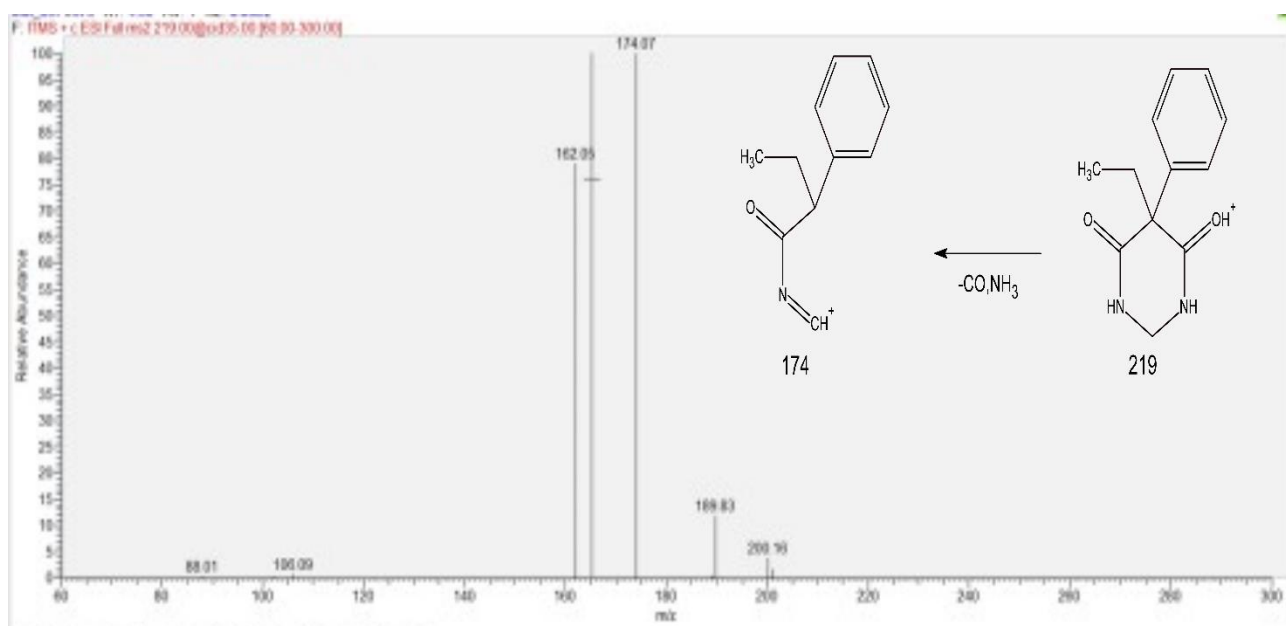
Obrázok 28: Fragmentačné spektrum štandardu gabapentínu a navrhované štruktúry⁴⁸



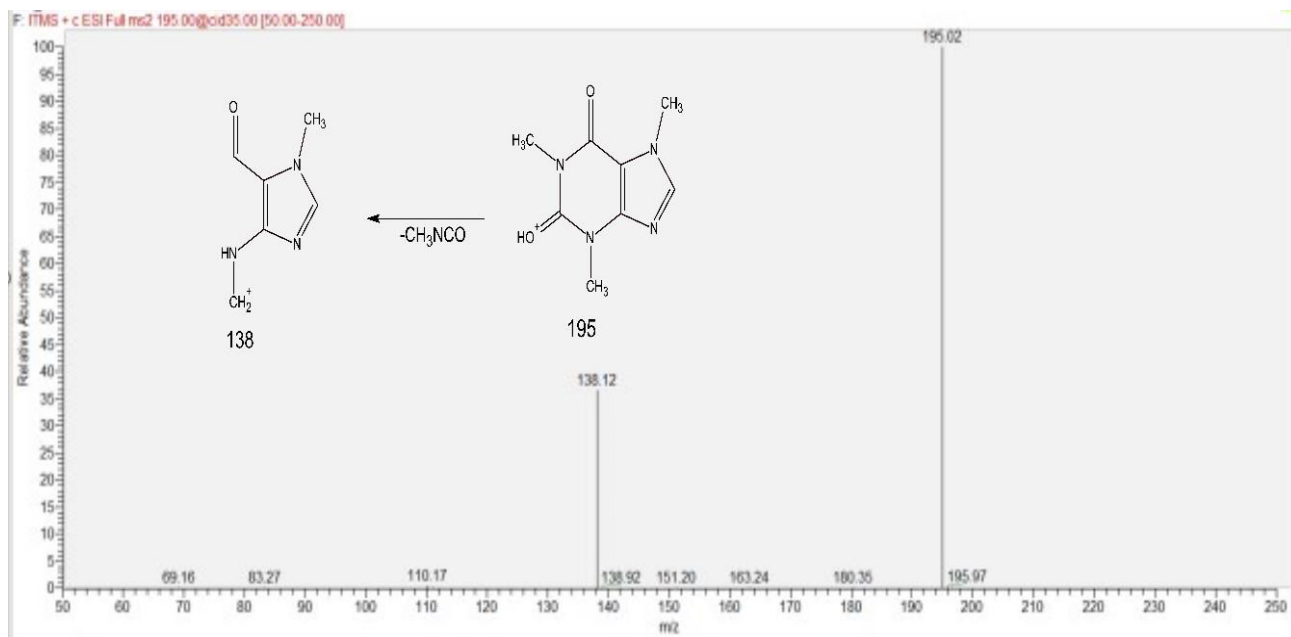
Obrázok 29: Fragmentačné spektrum štandardu lakosamidu a navrhované štruktúry⁴⁸



Obrázok 30: Fragmentačné spektrum štandardu perampanelu a navrhované štruktúry ⁴⁸



Obrázok 31: Fragmentačné spektrum štandardu primidónu a navrhované štruktúry ⁴⁸



Obrázok 32: Fragmentačné spektrum interného štandardu kofeínu a navrhované štruktúry ⁴⁹

Záver:

Cieľom tejto diplomovej práce bolo vyvinúť a validovať účinnú metódu kvapalinovej chromatografie s hmotnostne spektrometrickou detekciou pre stanovenie antiepileptík z ľudského krvného séra. Antiepileptiká sú látky, ktoré sa používajú na liečbu epilepsie, ochorením, ktoré je sprevádzané krčovitými záchvatmi v dôsledku nadmernej neurologickej aktivity v oblasti mozgu. Inštrumentálna metóda kvapalinovej chromatografie v spojení s hmotnostnou spektrometriou sa bežne využíva v klinickej praxi pri terapeutickom monitorovaní liekových hladín u pacientov trpiacich epilepsiou.

Toto monitorovanie sa vykonáva z dôvodu štúdie správania sa liečiva v tele pacienta a sledovaní koncentrácie v krvnom séru z dôvodu, aby bolo možné lepšie upraviť dávku podávaného liečiva pacientovi tak, aby pacient pocíťoval minimum vedľajších účinkov lieku a aby sa nepredávkoval. Boli sledované antiepileptiká: levetiracetam, gabapentín, brivaracetam, primidón, lakosamid, lamotrigín, perampanel a zonisamid, ktorý bol validovaný samostatne.. Metóda bola optimalizovaná na stanovenie týchto 8 antiepileptík z krvného séra.

Štandardy antiepileptík boli v krvnom sére kvantifikované pomocou tandemovej hmotnostnej spektrometrie MS² (u gabapentínu a levetiracetamu MS³). Boli sledované najintenzívnejšie fragmenty podľa tabuľky 1. Obrázky 24-32 znázorňujú fragmentačné spektrá daných antiepileptík a navrhované štruktúry.

Limity detekcie a kvantifikácie boli počítané z regresnej priamky z prvých 3 kalibračných bodov a blanku. U siedmich látok boli dosiahnuté veľmi nízke limity detekcie a kvantifikácie, čo značí, že je možné dobre stanoviť terapeutické koncentrácie antiepileptík. U štandardu zonisamidu sú však hodnoty LOD a LOQ vyššie ako je terapeutická koncentrácia. Hodnoty sú zobrazené v tabuľke 7.

Opakovateľnosť a medziľahlá precíznosť boli merané pomocou kalibračných štandardov používaných pri meraní kalibrácie. Bolo merané a počítané na dvoch koncentračných úrovniach. Jedna koncentračná úroveň bola v okolí limitu detekcie pre jednotlivé látky, u všetkých látok to bola koncentračná hladina 20 ng/ml (zonisamid 400 ng/ml), druhá koncentrácia ktorá bola použitá bola najvyššia pripravená koncentrácia v kalibračnej rade a to 500 ng/ml (zonisamid 8000 ng/ml). V praxi by relatívna smerodatná odchýlka nemala presiahnuť hodnotu 20 %. Toto kritérium je u väčšiny látok splnené čo potvrdzuje, že sa

namerané dáta z krátkodobého a aj dlhodobého hľadiska vo veľkej miere nemenia a metóda meria rovnako. Hodnoty sú znázornené v tabuľke 8.

Pravdivosť metódy bola meraná na pripravených modelových vzorkách spikovaných v negatívnom krvnom sére o koncentráciách štandardov 120 a 300 ng/ml (u zonisamidu 1500 a 6000 ng/ml). Koncentrácie boli počítané z kalibračných rovníc. Pomocou nameraných a teoretických koncentrácií bola vypočítaná relatívna chyba. Metóda je na základe výpočtov relatívnych chýb pravdivá a dobre použiteľná v praxi. Hodnoty sú znázornené v tabuľke 9.

Boli splnené všetky ciele práce, podarilo sa optimalizovať parametre na úrovni kvapalinovej chromatografie a aj na úrovni hmotnostnej detekcie tak, že je možné stanoviť 8 antiepileptických liečiv z krvného séra prakticky z jedného nástreku aj keď štandard zonisamidu musel byť validovaný pri vyšších koncentráciách, čo je dôvod vysokých hodnôt LOD a LOQ. Vyvinutá metóda by bola u väčšiny antiepileptík vhodná pre použitie v klinickej praxi a určite môže poslúžiť pri vývoji efektívnejšej metódy alebo pre stanovenie aj iných antiepileptických liečiv.

Referencie:

1. KUBA, Robert. Antiepileptika a jejich klinické použití v epileptologii. *Praktické lékárenství* [online]. 2010, roč. 10, vol. 6, no. 2, s. 62-66, dostupné také z <https://www.solen.cz/artkey/lek-201002> [0002 Antiepileptika a jejich klinicke pouziti v epileptologii.php](https://www.solen.cz/artkey/lek-201002)>. ISSN 1803-5329.
2. MARUSIČ Petr, Hana OŠLEJŠKOVÁ a Milan BRÁZDIL. Classification of the epileptic seizures and classification of the epilepsies ILAE 2017. *Neurologie pro praxi*. 2018, roč. 1, vol. 19, s. 32-36, ISSN 1213-1814. DOI: [10.36290/neu.2018.075](https://doi.org/10.36290/neu.2018.075).
3. Marusič, P., & Zárubová, J. (2019). Mechanismy účinku antiepileptik a jejich význam v klinické praxi. *Neurologia pre prax*, 20(2), 138 a 140.
4. Rogawski, M. A., & Löscher, W. (2004). *The neurobiology of antiepileptic drugs*. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(7), 553–564. doi:10.1038/nrn1430
5. Perez-Reyes, E. (2003). Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 83(1), 117–161. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2002>
6. Milovanović, J. R., Janković, S. M., Pejčić, A., Milosavljević, M., Opančina, V., Radonjić, V., Protrka, Z., & Kostić, M. (2017). Evaluation of brivaracetam: a new drug to treat epilepsy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(13), 1381–1389. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1359260>
7. Kukkar, A., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2013). Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. *Archives of Pharmacal Research*, 36(3), 237–251. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0057-y>

8. Johannessen, S. I., Battino, D., Berry, D. J., Bialer, M., Krämer, G., Tomson, T., & Patsalos, P. N. (2003). Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Antiepileptic Drugs. *Therapeutic Drug Monitoring*, 25(3). [https://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/2003/06000/Therapeutic Drug Monitoring of the Newer.16.aspx](https://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/2003/06000/Therapeutic_Drug_Monitoring_of_the_Newer.16.aspx)
9. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 3878, Lamotrigine. Retrieved November 9, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lamotrigine>.
10. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5284583, Levetiracetam. Retrieved November 20, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Levetiracetam>.
11. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5734, Zonisamide. Retrieved November 20, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zonisamide>.
12. Doty, P., Rudd, G. D., Stoehr, T., & Thomas, D. (2007). Lacosamide. *Neurotherapeutics*, 4(1), 145–148. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2006.10.002>
13. National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 219078, Lacosamide. Retrieved April 11, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lacosamide>.
14. Franco, V., Crema, F., Iudice, A., Zaccara, G., & Grillo, E. (2013). Novel treatment options for epilepsy: Focus on perampanel. *Pharmacological Research*, 70(1), 35–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.12.006>

15. Castonguay, C.-E., Liao, C., Khayachi, A., Liu, Y., Medeiros, M., Houle, G., Ross, J. P., Dion, P. A., & Rouleau, G. A. (2022). Transcriptomic effects of propranolol and primidone converge on molecular pathways relevant to essential tremor. *Npj Genomic Medicine*, 7(1), 46. <https://doi.org/10.1038/s41525-022-00318-9>

16. Guan, X.-M., & Peroutka, S. J. (1990). Basic Mechanisms of Action of Drugs Used in the Treatment of Essential Tremor. *Clinical Neuropharmacology*, 13(3). https://journals.lww.com/clinicalneuropharm/Fulltext/1990/06000/Basic_Mechanisms_of_Action_of_Drugs_Used_in_the.3.aspx

17. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 4909, Primidone. Retrieved February 20, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Primidone>.

18. Frade, P. D. (2007). Applications of LC-MS in Toxicology. In A. Polletini (Ed.), *Annals of Pharmacotherapy* (Vol. 41, Issue 1). Pharmaceutical Press. <https://doi.org/10.1345/aph.1h574>

19. Patil, R., Bhaskar, R., Ola, M., Pingale, D., & Chalikwar, S. (2019). BIOANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND METHOD VALIDATION IN HUMAN PLASMA BY USING LC MS/MS. *INDO AMERICAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 6(3), 5176–5183. <https://doi.org/10.5281/zenodo.2591534>

20. Vaught, J. B., & Henderson, M. K. (2011). Biological sample collection, processing, storage and information management. IARC Scientific Publications, 163, 23–42.
21. Lappas, N. T., & Lappas, C. M. (2016). Chapter 8 - Analytical Samples (N. T. Lappas & C. M. B. T.-F. T. Lappas (eds.); pp. 113–142). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799967-8.00008-6>
22. Dinis-Oliveira, R. J., Vieira, D. N., & Magalhães, T. (2016). Guidelines for Collection of Biological Samples for Clinical and Forensic Toxicological Analysis. *Forensic Sciences Research*, 1(1), 42–51. <https://doi.org/10.1080/20961790.2016.1271098>
23. McDowall, R. D., Doyle, E., Murkitt, G. S., & Picot, V. S. (1989). Sample preparation for the HPLC analysis of drugs in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 7(9), 1087–1096. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0731-7085\(89\)80047-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0731-7085(89)80047-0)
24. Müller, E., Berger, R., Blass, E., Sluyts, D., & Pfennig, A. (2008). Liquid–Liquid Extraction. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/14356007.b03_06.pub2
25. How Does Liquid Liquid Extraction Work - The Engineer's Perspective. Home - The Engineer's Perspective [online]. Copyright © Copyright 2021 [cit. 22.03.2023]. Dostupné z: <https://www.theengineersperspectives.com/how-does-liquid-liquid-extraction-work/>

26. Rutkowska, M., Namieśnik, J., & Konieczka, P. (2017). Chapter 10 - Ultrasound-Assisted Extraction (F. Pena-Pereira & M. B. T.-T. A. of G. S. in S. P. Tobiszewski (eds.); pp. 301–324). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00010-3>
27. Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
28. Patra, A., S., A., & Pradhan, R. (2021). Application of artificial neural network-genetic algorithm and response surface methodology for optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from cashew apple bagasse. *Journal of Food Process Engineering*, 44. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13828>
29. Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pca.631>
30. Angelini, E. (2021). Forensic Chemistry: Science Serving Justice. *IEEE Instrumentation & Measurement Magazine*, 24(1), 22–29. <https://doi.org/10.1109/MIM.2021.9345603>

31. D'Ovidio, C., Locatelli, M., Perrucci, M., Ciriolo, L., Furton, K. G., Gazioglu, I., Kabir, A., Merone, G. M., de Grazia, U., Ali, I., Catena, A. M., Treglia, M., Marsella, L. T., & Savini, F. (2023). LC-MS/MS Application in Pharmacotoxicological Field: Current State and New Applications. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/molecules28052127>
32. Adaway, J. E., & Keevil, B. G. (2012). Therapeutic drug monitoring and LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 883–884, 33–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.041>
33. Yang, H. S., & Edinboro, L. (2019). *Therapeutic Drug Monitoring of Lacosamide by LC-MS/MS BT - LC-MS in Drug Analysis: Methods and Protocols* (L. J. Langman & C. L. H. Snozek (eds.); pp. 67–73). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8823-5_7
34. Decosterd, L. A., Widmer, N., André, P., Aouri, M., & Buclin, T. (2016). The emerging role of multiplex tandem mass spectrometry analysis for therapeutic drug monitoring and personalized medicine. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 84, 5–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.019>
35. Castillo-Peinado, L. S., & Luque de Castro, M. D. (2017). An overview on forensic analysis devoted to analytical chemists. *Talanta*, 167, 181–192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.087>

36. Maurer, H. H. (2007). Current role of liquid chromatography–mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(7), 1315–1325. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1248-5>
37. Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877(23), 2224–2234. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>
38. Peters, F. T., Drummer, O. H., & Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. *Forensic Science International*, 165(2), 216–224. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>
39. Garcia, P. L., Buffoni, E., Gomes, F. P., & Quero, J. L. V. (2011). *Analytical Method Validation* (I. Akyar (ed.); p. Ch. 1). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/21187>
40. *Validační program pro statistické zpracování analytických dat*. Online. 2011. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm# 3.3.1 Linearita. [cit. 2024-01-16].
41. BOQUÉ, Ricard a Yvan-Vander HEYDEN. *The Limit of Detection* [online]. 2009 [cit. 2024-01-16]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/limit-detection>

42. ŠTOLCOVÁ, Miriam. \textit{Vývoj a základní validace LC – MS metody pro stanovení antiepileptik v biologické matrici odebírané minimálně invazivním způsobem} [online]. Brno, 2023 [cit. 2024-01-16]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/jw9365/>. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Marta Pelcová, Ph.D.
43. Jacob, S., & Nair, A. B. (2016). An Updated Overview on Therapeutic Drug Monitoring of Recent Antiepileptic Drugs. *Drugs in R&D*, 16(4), 303–316. <https://doi.org/10.1007/s40268-016-0148-6>
44. Krasowski, M. D. (2010). Therapeutic Drug Monitoring of the Newer Anti-Epilepsy Medications. In *Pharmaceuticals* (Vol. 3, Issue 6, pp. 1909–1935). <https://doi.org/10.3390/ph3061909>
45. Fang, Z., Zhang, H., Guo, J., & Guo, J. (2024). Overview of therapeutic drug monitoring and clinical practice. *Talanta*, 266, 124996. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124996>
46. Jones, S., McGowan, C., Boyle, S., Ke, Y., Chan, C. H. M., & Hwang, H. (2022). An overview of sample preparation in forensic toxicology. *WIREs Forensic Science*, 4(2), e1436. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wfs2.1436>
47. Vandevenne, M., Vandebussche, H., & Verstraete, A. (2000). Detection Time of Drugs of Abuse in Urine. *Acta Clinica Belgica*, 55(6), 323–333. <https://doi.org/10.1080/17843286.2000.11754319>

48. Niessen, W. M. A. (2020). Interpretation of tandem mass spectra of antiepileptic drugs using accurate-m/z data and m/z-shifts with stable-isotope labeled analogues. *International Journal of Mass Spectrometry*, 456, 116409. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijms.2020.116409>
49. Bianco, G., Abate, S., Labella, C., & Cataldi, T. R. I. (2009). Identification and fragmentation pathways of caffeine metabolites in urine samples via liquid chromatography with positive electrospray ionization coupled to a hybrid quadrupole linear ion trap (LTQ) and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, 23(7), 1065–1074. <https://doi.org/10.1002/rcm.3969>
50. Crouch, D. J. (2005). Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Science International*, 150, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.02.028>
51. Drummer, O. H. (2006). Drug testing in oral fluid. *The Clinical Biochemist Reviews*, 27(3), 147–159.
52. Drummer, O. H. (2007). Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 1495–1503. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1238-7>
53. Ganzler K, Salgo Á A and Valko Á K. 1986a. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. *J Chromatogr* 371:299-306

54. Ganzler K and Salgo A. 1987. Microwave-extraction-a new method superseding traditional Soxhlet extraction. *Z Lebensm Unters Forsch* 184:274-276.
55. Selph, S., Carson, S., Fu, R., Thakurta, S., Low, A., & McDonagh, M. (2011). *Drug Class Review: Neuropathic Pain: Final Update 1 Report*. Oregon Health & Science University, Portland (OR). <http://europepmc.org/abstract/MED/21977547>
56. Morris, R. G. , Black, A. B. , Harris, A. L. , Batty, A. B. & Sallustio, B. C. (1998). Lamotrigine and therapeutic drug monitoring: retrospective survey following the introduction of a routine service. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 46 (6), 547-551