

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

Нађа М. Костић

**БИОАНАЛИТИКА АНТИЕПИЛЕПТИКА
ЦВИТЕРЈОНСКЕ СТРУКТУРЕ
НАКОН ДЕРИВАТИЗАЦИЈЕ
n-АЛКИЛХЛОРОФОРМАТИМА ПРИМЕНОМ
ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ
С МАСЕНОМ ДЕТЕКЦИЈОМ**

докторска дисертација

Београд, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Nađa M. Kostić

**BIOANALYSIS OF ZWITTERIONIC
ANTIEPILEPTICS DERIVATIZED
WITH *n*-ALKYL CHLOROFORMATES
BY APPLYING
LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH
MASS SPECTROMETRY DETECTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Универзитет у Београду

Фармацеутски факултет

Др Анђелија Маленовић, ванредни професор, ментор

Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Катедра за аналитику лекова

Др Небојша Јовић, редовни професор, ментор

Универзитет у Београду – Медицински факултет

Клиника за неурологију и психијатрију за децу и омладину

Др Јанис Дотсикас, доцент, члан комисије

Универзитет у Атини – Фармацеутски факултет

Катедра за фармацеутску анализу

Датум одбране

Београд, _____

Докторска дисертација урађена је на Катедри за аналитику лекова Фармацеутског факултета Универзитета у Београду и представља део истраживања у оквиру научноистраживачког пројекта број 172052 (руководилац: проф. др Мирјана Меденица – Фармацеутски факултет у Београду) који је финансирало Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

*Ми не знамо колико снаге и какве све могућности
крије у себи свако живо створење; и не слутимо шта све умемо.
Будемо и прођемо, а не знамо шта смо све могли бити и учинити.
То се открива само у великим тренуцима.*

Иво Андрић

За сву помоћ приликом израде и обликовања докторске дисертације захваљујем се својим менторима, професорки Анђелији Маленовић и професору Небојши Јовићу.

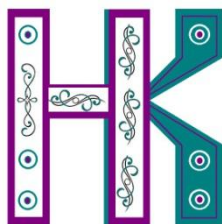
Мом драгом пријатељу, професору Јанису Дотсикасу, желим да се захвалим на великом стрпљењу, идејама и безрезервној и несебичној подршци током свих протеклих година.

Професорима Мирјани Меденици и Дарку Ивановићу захваљујем на успешној сарадњи и прилици да будем део њиховог одабраног научноистраживачког тима.

Такође, желим да се захвалим и Силвију Кечкешу за велику техничку помоћ приликом рада на инструменту и за огромни професионални ентузијазам који је допринео стицању и ширењу мојих знања о масеној спектроскопији.

Колегама са Катедре за аналитику лекова и запосленима у Клиници за неурологију и психијатрију за децу и омладину захваљујем на пријатној и конструктивној радној атмосфери.

Највећу захвалност дугујем својој мајци чија је неизмерна љубав уткана у све моје успехе.



Наслов дисертације

Биоаналитика антиепилептика цвистерјонске структуре након дериватизације *n*-алкилхлороформатима применом течне хроматографије с масеном детекцијом

Резиме

Циљ ове докторске дисертације био је да се коришћењем савремене методологије која укључује дериватизацију анализата, оптимизацију вредности параметара масеног спектрометра и вредности параметара методе течне хроматографије, развију осетљиве биоаналитичке методе намењене за анализу цвистерјонских антиепилептика у узорцима плазме и крви, прикупљених у облику осушених капи матрикса.

У првом делу докторске дисертације испитан је утицај различитих комбинација парова *n*-алкилхлороформат/*n*-алкохол као реаганаса за дериватизацију одабраних цвистерјонских антиепилептика у систему течна хроматографија–електроспреј јонизација–тандем масена спектрометрија. Приликом избора најпогоднијег реагенса за дериватизацију разматрани су следећи критеријуми: сигнал дериватизованог анализата, лимит детекције, ретенционо време, а испитан је и утицај органског растварача коришћеног за екстракцију синтетисаног деривата, као и принос споредне реакције. На основу добијених резултата, за даља истраживања одабран је дериватизациони сет *n*-пропилхлороформат/*n*-пропанол.

Након тога, приказано је систематично унапређење подешавања параметара масеног спектрометра, као и параметара методе течне хроматографије, применом тзв. *one-factor-at-a-time* приступа, као и Бокс-Бенкен експерименталног дизајна. Сprovedено је детаљно испитивање фактора са потенцијалним утицајем на сигнал, извођењем више оптимизационих процедура, а на крају сваког корака одабране су оптималне вредности одговарајућих параметара и процењено постигнуто унапређење. Стратегија оптимизације обухватала је поређење сигнала и односа сигнал-шум за хроматограме добијене праћењем једне, односно две SRM транзиције по аналиту, затим процену утицаја ширине скенирања и времена скенирања, као и подешавање положаја капиларе који дефинише геометрију јонског извора. Такође су идентификовани параметри јонског извора са значајним

утицајем на MS одговор дериватизованих антиепилептика, а затим су њихове вредности оптимизоване. Оптимизација параметара као што су температура трансфер капиларе, притисак носећег гаса и притисак помоћног гаса, као и оптимизација параметара методе течне хроматографије (садржај ацетонитрила у мобилној фази, садржај мравље киселине у воденој фази и брзина протока мобилне фазе) изведена је применом Бокс-Бенкен експерименталног дизајна. За процену утицаја испитиваних параметара и за дефинисање оптималних услова коришћени су методологија површине одговора и Дерингера функција пожељних одговора. На нивоу колизионе ћелије испитани су колизиони притисак и колизионе енергије, а последњи испитивани параметар било је временско сегментирање хроматограма и поређење односа сигнал-шум за сегментирану и несегментирану методу. Резултат овог обимног и систематичног поступка било је постизање значајног повећања MS сигнала, чиме су омогућени развој и валидација веома осетљивих биоаналитичких метода за одређивање одабраних антиепилептика у биолошком материјалу. На крају овог дела истраживања, парцијално је валидирана метода за одређивање цвистерјонских антиепилептика из плазме, проценом селективности, линеарности, тачности и прецизности, као и матрикс ефекта.

Наредни део докторске дисертације приказује валидацију методе за одређивање вигабатрина из осушених капи плазме, испитивањем селективности, линеарности, тачности и прецизности, појаве сигнала анализата заосталог из претходно анализираних узорка, приноса екстракције и матрикс ефекта, стабилности, реанализе узорака и тестирањем разблажења. Детаљно је објашњен избор одговарајућег тежинског фактора приликом испитивања линеарности и његов значај за добијање резултата у оквиру дозвољених одступања. На крају, метода је примењена за анализу 12 узорака добијених од пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду.

Последњи део докторске дисертације односи се на валидацију метода за одређивање прегабалина из осушених капи крви и осушених капи плазме. Развој оваквих метода, којима се може проценити однос концентрација лека у оба матрикса, први је корак у потенцијалној замени плазме као стандардног

биоаналитичког матрикса осушеним капима крви. За обе методе тестирани су следећи валидациони параметри: селективност, линеарност, тачност и прецизност, појава сигнала анализата заосталог из претходно анализираних узорка, принос екстракције и матрикс ефекат, стабилност, реанализа узорка, тест разблажења и хомогеност осушених капи. Обе методе примењене су за анализу 12 узорка добијених од пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду, а добијени резултати приказују први покушај да се корелишу нивои прегабалина у осушеним капима крви и осушеним капима плазме. За превазилажење ефекта хематокрита, као главног аналитичког изазова приликом анализе осушених капи крви, предложено је множење првобитно добијених вредности корекционим фактором. Однос концентрације прегабалина између крви и плазме указао је на делимичну дистрибуцију прегабалина у еритроцитима. Компаративност резултата добијених два метода потврђена је коришћењем Бланд-Алтман теста.

Кључне речи

вигабатрин, прегабалин, габапентин, масена спектрометрија, осушене капи крви, осушене капи плазме, дериватизација, хлороформати, експериментални дизајн

Научна област

Фармацеутска хемија

Ужа научна област

Аналитика лекова

УДК број

615.213:543:544:616-092.6(043.3)

Title

Bioanalysis of zwitterionic antiepileptics derivatized with *n*-alkyl chloroformates by applying liquid chromatography with mass spectrometric detection

Summary

The goal of this doctoral dissertation was the development of sensitive bioanalytical methods for the analysis of zwitterionic antiepileptic drugs in samples collected in the form of dried plasma and dried blood spots, by using means of analyte derivatization, optimization of mass spectrometry, as well as liquid chromatography parameters.

In the first part of the doctoral thesis, different combinations of *n*-alkyl chloroformate/*n*-alcohol were examined, as reagents used for the derivatization of selected zwitterionic antiepileptic drugs, in a liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry system. The selection of the most suitable combination for derivatization was based on the following criteria: signal intensity of derivatized analyte, limit of detection, retention time, while the influence of organic solvent used for the extraction of derivatives, and the yield of side reaction, were estimated as well. According to the obtained results, the derivatization set composed of *n*-propyl chloroformate/*n*-propanol was selected for the further study.

Thereafter, the systematic improvement of mass spectrometry and liquid chromatography parameters settings was presented by applying a so-called one-factor-at-a-time approach and Box-Behnken experimental design. A detailed investigation of factors with potential influence on signal was carried out by applying several optimization procedures, and in the end of each step optimal values were defined, while the improvement per stage was evaluated. Optimization strategy included comparison of signal and signal-to-noise ratio for chromatograms obtained by monitoring one and two SRM transitions per analyte, the estimation of scan width and scan time influence, as well as adjustment of probe mount position which defines ion source geometry. Further on, the parameters of ion source with significant impact on MS response of derivatized antiepileptics were identified, followed by their subsequent optimization. Optimization of parameters such as capillary temperature, sheath gas pressure and auxiliary gas pressure, as well as the optimization of liquid chromatography parameters (content of

acetonitrile in mobile phase, content of formic acid in water phase and flow rate) was performed by applying Box-Behnken experimental design. Response Surface Methodology and Deringer's desirability function were used for the evaluation of examined parameters influence and the setting of optimal condition. Regarding collision cell factors, collision pressure and collision energies were tested. Finally, time segmented approach was applied in order to compare signal-to-noise ratio for segmented and non-segmented method. The result of this extensive and systematic approach was the achievement of significant increment in MS signal, which enables development and validation of very sensitive bioanalytical methods for the determination of selected antiepileptic drugs in biological materials. In the end of this part of research, a method for the determination of zwitterionic antiepileptics in plasma was partially validated by testing selectivity, linearity, accuracy and precision, as well as matrix effect.

The next part of the doctoral dissertation presents the validation of a method for the determination of vigabatrin in dried plasma spots. The following validation parameters were tested: selectivity, linearity, accuracy, precision, carry-over, extraction yield, matrix effect, stability, incurred sample reanalysis and dilution testing. The selection of the appropriate weighting factor during linearity testing and its importance for obtaining results within acceptance limits is explained in detail. Finally, the method was applied to the analysis of 12 samples obtained from patients of Clinic of Neurology and Psychiatry for Children and Youth in Belgrade.

The last part of the doctoral thesis covers the validation of the methods for the determination of pregabalin in dried blood spots and dried plasma spots. The development of such methods enables the estimation of the drug concentration ratio for both matrices and presents the first step in potential replacement of plasma as a standard bioanalytical matrix by dried blood spots. The following validation parameters were tested for both methods: selectivity, linearity, accuracy, precision, carry-over, extraction yield, matrix effect, stability, incurred sample reanalysis, dilution test and homogeneity of dried spots. Both methods were applied to analyze 12 samples obtained from patients of Clinic of Neurology and Psychiatry for Children and Youth in Belgrade, and the obtained results present the first attempt to correlate pregabalin levels in blood and

plasma. In order to overcome hematocrit effect, as the main analytical challenge during dried blood spot analysis, the multiplication of the originally obtained values with a correction factor is proposed. The blood to plasma ratio of pregabalin concentrations indicated a partial distribution of pregabalin into erythrocytes. Correlation of the results obtained by the two validated methods was conducted by Bland-Altman plot.

Keywords

vigabatrin, pregabalin, gabapentin, mass spectrometry, dried blood spots, dried plasma spots, derivatization, chloroformates, experimental design

Scientific area

Pharmaceutical chemistry

Special topics

Drug analysis

UDK number

615.213:543:544:616-092.6(043.3)

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. АНАЛИЗА ЛЕКОВА У УЗОРЦИМА БИОЛОШКОГ МАТЕРИЈАЛА.....	1
1.1.1. ПРИКУПЉАЊЕ И СКЛАДИШТЕЊЕ УЗОРАКА БИОШКОГ МАТЕРИЈАЛА.....	1
1.1.2. ПРИПРЕМА УЗОРАКА БИОШКОГ МАТЕРИЈАЛА.....	4
1.1.2.1. Припрема осушених капи матрикса.....	5
1.1.2.2. Предности и недостаци осушених капи матрикса.....	6
1.1.2.3. Главни изазови приликом коришћења осушених капи крви.....	7
1.1.2.4. Неважеће картице.....	9
1.2. ЕПИЛЕПСИЈА.....	10
1.2.1. ПРИРОДА ЕПИЛЕПСИЈЕ.....	13
1.2.2. КЛАСИФИКАЦИЈА ЕПИЛЕПТИЧКИХ НАПАДА.....	13
1.2.3. НЕУРОПАТСКИ БОЛ.....	15
1.2.4. МЕХАНИЗАМ ДЕЈСТВА АНТИЕПИЛЕПТИКА.....	16
1.2.5. АНТИЕПИЛЕПТИЦИ ЦВИТЕРЈОНСКЕ СТРУКТУРЕ.....	17
1.2.5.1. Вигабатрин.....	18
1.2.5.2. Прегабалин.....	19
1.2.5.3. Габапентин.....	20
1.3. МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА.....	21
1.3.1. ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА–МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА.....	23
1.3.2. ЈОНИЗАЦИЈА.....	24
1.3.2.1. Електроспреј јонизација.....	28
1.3.3. АНАЛИЗАТОРИ.....	33
1.3.3.1. Квадруполи и троструки квадруполи.....	37
1.3.4. ДЕТЕКТОРИ.....	44
1.4. ДЕРИВАТИЗАЦИЈА АНАЛИТА.....	47
1.4.1. ДЕРИВАТИЗАЦИЈА У ТЕЧНОЈ ХРОМАТОГРАФИЈИ–МАСЕНОЈ СПЕКТРОМЕТРИЈИ.....	48

1.4.1.1. Дериватизација карбоксилне функционалне групе.....	51
1.4.1.2. Дериватизација аминокиселинских функционалних група.....	51
1.4.2. АЛКИЛХЛОРОФОРМАТИ КАО РЕАГЕНСИ ЗА ДЕРИВАТИЗАЦИЈУ.....	52
1.4.2.1. Истовремена дериватизација аминокиселинских и карбоксилних група.....	54
1.5. АНАЛИТИКА ЦВИТЕРЈОНСКИХ АНТИЕПИЛЕПТИКА.....	56
1.5.1. ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКЕ ОСОБИНЕ ЦВИТЕРЈОНСКИХ АНТИЕПИЛЕПТИКА.....	56
1.5.2. АНАЛИТИКА ВИГАБАТРИНА.....	56
1.5.3. АНАЛИТИКА ПРЕГАБАЛИНА.....	58
1.5.4. АНАЛИТИКА ГАБАПЕНТИНА.....	62
1.5.5. ИСТОВРЕМЕНА АНАЛИЗА ЦВИТЕРЈОНСКИХ АНТИЕПИЛЕПТИКА.....	67
2. ЦИЉ РАДА.....	69
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....	70
3.1. АПАРАТИ.....	70
3.1.1. СОФТВЕРСКИ ПАКЕТИ.....	71
3.2. ЛАБОРАТОРИЈСКИ ПРИБОР.....	71
3.3. РЕАГЕНСИ.....	71
3.4. СТАНДАРДНЕ СУПСТАНЦЕ.....	72
3.5. ХУМАНА ПЛАЗМА И КРВ.....	73
3.6. УЗОРЦИ ПАЦИЈЕНАТА.....	73
3.7. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА РЕАГЕНАСА ЗА ДЕРИВАТИЗАЦИЈУ.....	73
3.7.1. ПРИПРЕМА РАСТВОРА.....	73
3.7.2. ПРИПРЕМА РАСТВОРА НАТРИЈУМ-ХИДРОКСИДА.....	73
3.7.3. ПРИПРЕМА РАСТВОРА АЛКОХОЛА.....	74
3.7.4. ПРИПРЕМА РАСТВОРА АЛКИЛХЛОРОФОРМАТА.....	74
3.7.5. ПРОТОКОЛ ДЕРИВАТИЗАЦИЈЕ.....	74
3.7.6. ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ.....	75
3.7.7. УСЛОВИ ТАНДЕМ МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА.....	75

3.8. ОПТИМИЗАЦИЈА ПАРАМЕТАРА МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА И МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ.....	76
3.8.1. ПРИПРЕМА РАСТВОРА.....	76
3.8.2. ПРОТОКОЛ ДЕРИВАТИЗАЦИЈЕ.....	76
3.8.3. ПОЧЕТНИ ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ.....	76
3.8.4. СТРАТЕГИЈА СИСТЕМАТИЧНОГ УНАПРЕЂЕЊА ОДГОВОРА АНАЛИТА.....	77
3.9. ПАРЦИЈАЛНА ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ЦВИТЕРЈОНСКИХ АНТИЕПИЛЕПТИКА ИЗ ТЕЧНИХ УЗОРАКА ПЛАЗМЕ.....	82
3.9.1. ПРИПРЕМА РАСТВОРА, КАЛИБРАЦИОНИХ СТАНДАРДА И УЗОРАКА ЗА ПРОВЕРУ КВАЛИТЕТА И ВАЛИДАЦИЈУ МЕТОДЕ.....	82
3.9.2. ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ.....	83
3.9.3. УСЛОВИ ТАНДЕМ МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА.....	83
3.10. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ВИГАБАТРИНА ИЗ ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ.....	84
3.10.1. ПРИПРЕМА РАСТВОРА, КАЛИБРАЦИОНИХ СТАНДАРДА И УЗОРАКА ЗА ПРОВЕРУ КВАЛИТЕТА И ВАЛИДАЦИЈУ МЕТОДЕ.....	84
3.10.2. ПРИПРЕМА ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ.....	84
3.10.3. УЗОРЦИ ПАЦИЈЕНАТА.....	85
3.10.4. ЕКСТРАКЦИЈА DPS И ПРОЦЕДУРА ДЕРИВАТИЗАЦИЈЕ.....	85
3.10.5. ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ.....	86
3.10.6. УСЛОВИ ТАНДЕМ МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА.....	86
3.10.7. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ.....	87
3.10.7.1. Селективност.....	87
3.10.7.2. Калибрациона крива.....	87
3.10.7.3. Тачност и прецизност.....	87
3.10.7.4. Појава сигнала анализата заосталог из претходно анализираних узорка.....	87
3.10.7.5. Принос екстракције.....	88
3.10.7.6. Матрикс ефекат.....	88
3.10.7.7. Стабилност.....	88

3.10.7.8. Реанализа узорака.....	89
3.10.7.9. Тест разблажења.....	89
3.11. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ПРЕГАБАЛИНА ИЗ ОСУШЕНИХ КАПИ КРВИ И ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ.....	90
3.11.1. ПРИПРЕМА РАСТВОРА, КАЛИБРАЦИОНИХ СТАНДАРДА И УЗОРАКА ЗА ПРОВЕРУ КВАЛИТЕТА И ВАЛИДАЦИЈУ МЕТОДЕ.....	90
3.11.2. ПРИПРЕМА ОСУШЕНИХ КАПИ КРВИ И ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ.....	91
3.11.3. УЗОРЦИ ПАЦИЈЕНАТА.....	91
3.11.4. ЕКСТРАКЦИЈА DBS/DPS И ПРОЦЕДУРА ДЕРИВАТИЗАЦИЈЕ.....	92
3.11.5. ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ.....	92
3.11.6. УСЛОВИ ТАНДЕМ МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА.....	93
3.11.7. ПРИПРЕМА УЗОРАКА КРВИ РАЗЛИЧИТИХ ХЕМАТОКРИТА.....	93
3.11.8. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ.....	94
3.11.8.1. Селективност.....	94
3.11.8.2. Калибрациона крива.....	94
3.11.8.3. Тачност и прецизност.....	94
3.11.8.4. Појава сигнала анализата заосталог из претходно анализираних узорка.....	95
3.11.8.5. Принос екстракције.....	95
3.11.8.6. Матрикс ефекат.....	95
3.11.8.7. Стабилност.....	96
3.11.8.8. Реанализа узорака.....	97
3.11.8.9. Тест разблажења.....	97
3.11.8.10. Хомогеност осушених капи.....	97
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	98
4.1. ИЗБОР ОДГОВАРАЈУЋЕГ РЕАГЕНСА ЗА ДЕРИВАТИЗАЦИЈУ.....	98
4.1.1. ЕФЕКТИ РЕАКЦИЈЕ ДЕРИВАТИЗАЦИЈЕ НА РЕТЕНЦИОНО ВРЕМЕ.....	99
4.1.2. MS/MS СИГНАЛ ДЕРИВАТА.....	104
4.1.3. УТИЦАЈ ОРГАНСКОГ РАСТВОРАЧА НА MS/MS СИГНАЛ.....	108

4.1.4.	ЛИМИТИ ДЕТЕКЦИЈЕ И КОРЕЛАЦИЈА СА ПОВРШИНАМА.....	109
4.1.5.	ИСПИТИВАЊЕ ЈОНСКЕ СУПРЕСИЈЕ.....	111
4.1.6.	ИСПИТИВАЊЕ ПРИНОСА СПОРЕДНЕ РЕАКЦИЈЕ.....	113
4.1.7.	ЗНАЧАЈ ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА ЗА БИОАНАЛИТИЧКА ИСТРАЖИВАЊА.....	115
4.2.	ОПТИМИЗАЦИЈА ПАРАМЕТАРА МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА И МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ.....	116
4.2.1.	ПРЕЛИМИНАРНИ ЕКСПЕРИМЕНТИ.....	118
4.2.2.	ОПТИМИЗАЦИЈА ПАРАМЕТАРА ЈОНСКОГ ИЗВОРА.....	123
4.2.3.	ОПТИМИЗАЦИЈА ПАРАМЕТАРА КОЛИЗИОНЕ ЋЕЛИЈЕ.....	136
4.2.4.	ОПТИМИЗАЦИЈА ПАРАМЕТАРА МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ПРИМЕНОМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ ДИЗАЈНА.....	137
4.2.5.	ПРОЦЕНА УНАПРЕЂЕЊА СИГНАЛА ПОСЛЕ СВАКЕ ФАЗЕ ОПТИМИЗАЦИЈЕ.....	146
4.2.6.	ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ВРЕМЕНСКОГ СЕГМЕНТИРАЊА.....	147
4.2.7.	ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ.....	149
4.3.	ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ВИГАБАТРИНА ИЗ ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ.....	150
4.3.1.	РЕЗУЛТАТИ ВАЛИДАЦИЈЕ.....	151
4.3.1.1.	Селективност.....	151
4.3.1.2.	Калибрациона крива.....	152
4.3.1.3.	Тачност и прецизност.....	158
4.3.1.4.	Појава сигнала аналита заосталог из претходно анализираног узорка.....	160
4.3.1.5.	Принос екстракције.....	160
4.3.1.6.	Матрикс ефекат.....	160
4.3.1.7.	Стабилност.....	161
4.3.1.8.	Реанализа узорака.....	162
4.3.1.9.	Тест разблажења.....	162
4.3.1.10.	Примена методе за анализу узорака сакупљених од пацијената....	163

4.4. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ПРЕГАБАЛИНА ИЗ ОСУШЕНИХ КАПИ КРВИ И ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ.....	165
4.4.1. РЕЗУЛТАТИ ВАЛИДАЦИЈЕ.....	167
4.4.1.1. Селективност.....	167
4.4.1.2. Калибрациона крива.....	167
4.4.1.3. Тачност и прецизност.....	170
4.4.1.4. Појава сигнала анализата заосталог из претходно анализираних узорка.....	170
4.4.1.5. Принос екстракције.....	171
4.4.1.6. Матрикс ефекат.....	172
4.4.1.7. Стабилност.....	173
4.4.1.8. Реанализа узорка.....	174
4.4.1.9. Тест разблажења.....	174
4.4.1.10. Хомогеност осушених капи.....	174
4.4.1.11. Примена методе за анализу узорка сакупљених од пацијената....	175
5. ЗАКЉУЧАК.....	179
6. ЛИТЕРАТУРА.....	182

1. УВОД

1.1. АНАЛИЗА ЛЕКОВА У УЗОРЦИМА БИОЛОШКОГ МАТЕРИЈАЛА

Постављање процедура и метода за анализу активних фармацеутских супстанци и њихових метаболита у узорцима биолошког материјала саставни је део савремене аналитике лекова, а представља и својеврстан научни изазов. Развој нових биоаналитичких метода је значајан, али истовремено и веома комплексан процес. Поред постављања одговарајуће аналитичке методе, неопходно је изабрати погодан матрикс, одредити се за начин прикупљања узорака, начин њиховог транспорта и складиштења. Поред поменутих процеса, на карактеристике предложене методе даље утичу поступак екстракције анализата из сложеног биолошког матрикса, као и критеријуми који су дефинисани за обраду података. Примени методе за анализу непознатих узорака претходи поступак валидације, како би се потврдила њена поузданост и тачност.

1.1.1. ПРИКУПЉАЊЕ И СКЛАДИШТЕЊЕ УЗОРАКА БИОЛОШКОГ МАТЕРИЈАЛА

Анализа узорака биолошког материјала започиње њиховим правилним прикупљањем. Начин прикупљања узорака, руковање узорцима и њихово складиштење, процеси су који хронолошки претходе самој анализи, али су од суштинског значаја за добијање валидних резултата. Да би се правилно спровели, неопходно је познавати хемијске карактеристике анализата и природу материјала (крв, плазма/серум, урин, салива, цереброспинална течност, ткива, итд) из кога се врши испитивање. Потенцијални проблеми који се могу јавити због неадекватног извођења неког од поменутих процеса узроковани су различитим утицајима, који се генерално могу поделити на физичке и хемијске [1].

Када је реч о физичким факторима, најпре је потребно правилно одабрати посуде за прикупљање узорака, имајући у виду потенцијалну адсорпцију анализата на стакло или пластику, ломљивост стакла током транспорта, као и утицај премале или превелике запремине саме посуде. Прикупљање узорка у суд неадекватне запремине директно се одражава на хомогеност узорка, али може

бити одговорно и за његово испаравање. Температура на којој се узорци складиште такође представља значајан физички фактор. Уколико је превисока, постоји могућност формирања фибринских угрушака у плазми чиме она постаје проблематична за пипетирање. Чак и једноставне ситнице, попут означавања узорака могу бити узрок проблема, уколико ознаке постану нечитљиве или спадну током процеса замрзавања или отапања.

Стабилност анализата најзначајнији је хемијски фактор који утиче на прикупљање узорака. Фотосензитивне узорке неопходно је заштитити од светлости. Уколико се као биолошки материјал користи крв, потребно је зауставити ензимске процесе како би се омогућила тачна квантификација лека, али и његових метаболита. Такође треба имати у виду и утицај рН вредности узорка на потенцијалну деградацију анализата. Важност обезбеђења стабилности током прикупљања и руковања узорцима истакнута је у смерницама за валидацију биоаналитичких метода, прописаним од стране Америчке Агенције за храну и лекове (енг. *Food and Drug Administration*, FDA) [2] и Европске Агенције за лекове (енг. *European Medicines Agency*, EMA) [3]. Уколико се током валидације методе уочи нестабилност било ког типа, предузимају се одговарајуће превентивне мере.

Генерално, приликом прикупљања узорака биолошког материјала, кључно је сакупити их брзо, складиштити на одговарајућој температури, извршити стабилизацију нестабилних анализата у матриксу и обезбедити њихово правилно обележавање.

За разлику од традиционалних метода прикупљања течних узорака крви, плазме, серума и урина, појавом тзв. Гатри картица (енг. *Guthrie Cards*) омогућено је сакупљање узорака у облику осушене капи матрикса. Овај приступ представља алтернативни начин прикупљања узорака, који се све више прихвата као потенцијално супериоран, због низа предности везаних за само узорковање, али и руковање узорцима након сакупљања.

Употреба Гатри картица у биоаналитици датира из 1963. године када је амерички доктор Роберт Гатри (*Robert Guthrie*), по коме су картице и добиле име, искористио осушену кап крви добијену из пете или прста новорођенчета за

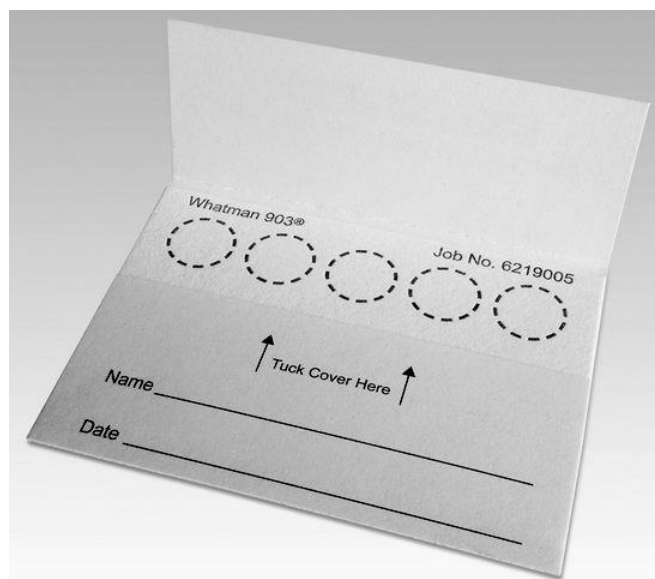
одређивање аминокиселине фенилаланина и дијагностификовање фенилкетонурије. Анализа се заснивала на праћењу раста бактерија соја *Bacillus subtilis* који је стимулисан повећаним концентрацијама ове аминокиселине, присутним у крви и урину оболелих од фенилкетонурије [4].

Деведесетих година XX века, развојем PCR (енг. *Polymerase Chain Reaction*), ELISA (енг. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), RIA (енг. *Radioimmunoassay*) и других имуно-хроматографских техника, започела је ера метаболичког скрининга новорођенчади на бројне урођене поремећаје [5]. С обзиром на квалитативан карактер овакве анализе, запремина узорка нанетог на картицу није била суштински важна.

Квантитативна анализа овако прикупљених узорака омогућена је развојем течне хроматографије, али је концентрација анализата присутног у узорку била ограничавајући фактор, због недовољне осетљивости постојећих UV детектора, односно флуоресцентних детектора. Развојем масене спектрометрије, о којој ће више речи бити касније, и детектора типа троструког квадруполоа, осетљивост је значајно унапређена, чиме је омогућена квантификација анализата присутних у концентрацијама реда величине ng/mL.

Данас на тржишту постоје картице различитих произвођача. Најпознатије су *Whatman 903*[®], које се користе за неонатални скрининг, а произведене су од чистих памучних влакана (слика 1). Поред њих, доступне су још и *FTA DMPK* (*Drug Metabolism and Pharmacokinetics*) тип А, В и С, које се користе за фармакокинетичка и токсикокинетичка испитивања, као и *FTA Elute Cards*, намењене за прикупљање и пречишћавање ДНК (*GE Healthcare*, Бакингемшир, Енглеска). Америчка Агенција за храну и лекове сврстава Гатри картице појединих произвођача у класу II медицинских средстава, а усаглашене су и са директивом Европске Уније и класификоване као *in vitro* дијагностичка медицинска средства. Производња картица је у сагласности са смерницама Добре произвођачке праксе (енг. *Good Manufacturing Practice*, GMP), уз стриктну контролу квалитета како би се обезбедио хомогени састав, уједначена дебљина, одговарајућа адсорптивност и задовољавајући степен чистоће. Картице могу бити хемијски третиране како би се лизирале ћелије, извршила денатурација протеина,

инактивирали ензими и спречио раст бактерија и других микроорганизама након наношења узорка, чиме се доприноси безбедности [6].



Слика 1. Гатри картице. Кругови означени испрекиданим линијама представљају места за наношење узорка

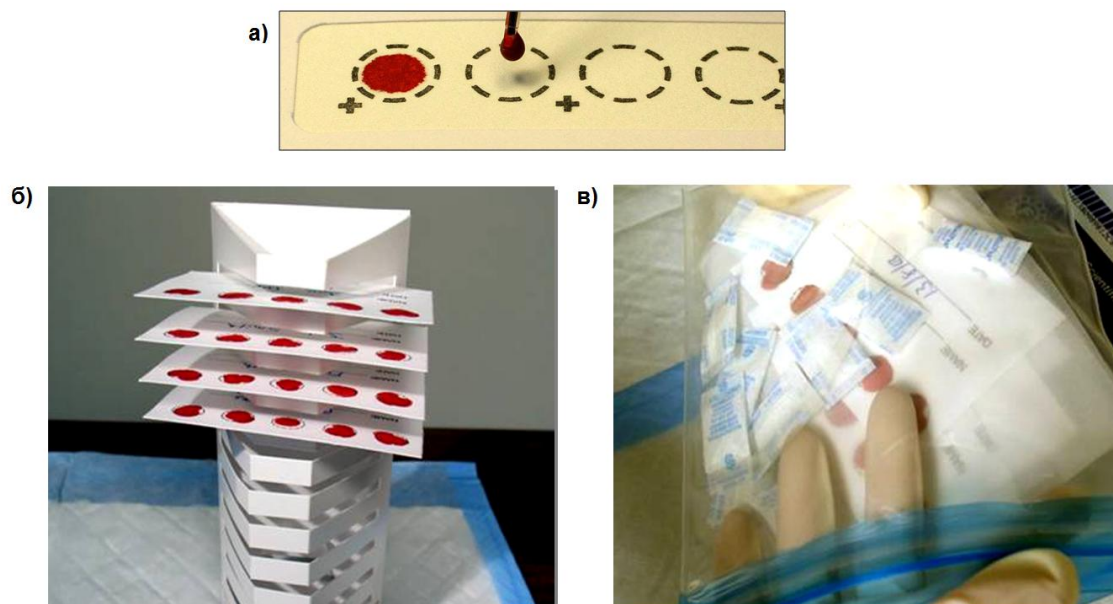
Figure 1. Guthrie cards. Circles marked with dashed lines present places for the sample application

1.1.2. ПРИПРЕМА УЗОРАКА БИЛОШКОГ МАТЕРИЈАЛА

Припрема узорака је корак у коме аналитичар, кроз руковање узорцима, остварује директан утицај на квантитативну анализу. С обзиром да су савремени инструменти дизајнирани тако да се током рада њихово правилно функционисање континуирано прати и грешке пријављују, припрема узорака, уколико није аутоматизована, постаје главни извор варирања добијених лабораторијских резултата. Припрема узорака биолошког материјала сложен је вишестепени процес који најчешће обухвата екстракцију, уконцентрисавање и пречишћавање узорка, преношење анализата у одговарајући растварач, а по потреби и његову хемијску модификацију. Посматрано из перспективе биоаналитичара, припрема узорака треба да буде: једноставна, брза, прецизна, исплатива, да се изводи из минималне количине биолошког материјала и коришћењем минималне количине растварача [7, 8].

1.1.2.1. Припрема осушених капи матрикса

Приликом коришћења Гатри картица користи се изузетно мала запремина узорка, што истовремено представља и њихову предност и ограничавајући фактор. Иницијално се на картицу, на специјално место предвиђено за то, најчешће наноси 40 μL до 50 μL узорка. Картице се суше, постављене у хоризонтални положај, заштићене од светлости и влаге, најчешће на собној температури или у струји азота, под контролисаним условима влажности ваздуха. Затим се пакују у кесе које садрже средство за уклањање влаге и до анализе складиште на собној температури или у фрижидеру (слика 2).



Слика 2. а) наношење узорака на Гатри картице, б) сушење и в) складиштење

Figure 2. a) sample application onto Gathrie cards, б) drying and в) storage

Узорак осушене капи матрикса најчешће се припрема тако што се непосредно пред анализу са картице вади диск, ручно или аутоматски. Интерни стандард може се додати на неколико начина и то: а) на саму картицу, пре наношења узорка, б) у узорак, непосредно пре формирања осушене капи, в) на већ осушену кап узорка, г) у извађен диск, тако да се екстракција анализата врши раствором интерног стандарда или д) на посебну картицу, тако да се у раствор за екстракцију додају два диска, један са анализатом и други са интерним стандардом [9].

1.1.2.2. Предности и недостаци осушених капи матрикса

Алтернативне технике прикупљања узорака у облику осушене капи имају низ предности у односу на традиционалне течне узорке. То се пре свега односи на лако узорковање, изводљиво од стране неболничког особља, па често чак и од пацијента лично, нарочито за потребе квалитативне анализе. Уколико се прикупља крв из прста, техника је минимално инвазивна, а запремина узорка је значајно редукована у односу на класичне течне узорке. Ово је посебно значајно код педијатријске популације, али и током претклиничких испитивања на животињама, чиме се поштује тзв. правило 3R (енг. *Reduce, Refine and Replace*). У случају коришћења осушених капи крви (енг. *Dried Blood Spots, DBS*) нема потребе за додатком антикоагуланса и центрифугирањем [10, 11]. Иако је припрема осушених капи плазме (енг. *Dried Plasma Spots, DPS*) нешто компликованија, имајући у виду неопходност центрифугирања, коришћење плазме као осушеног матрикса има своје предности јер нема тзв. ефекта хематокрита, а фармакокинетички подаци се најчешће односе на плазму.

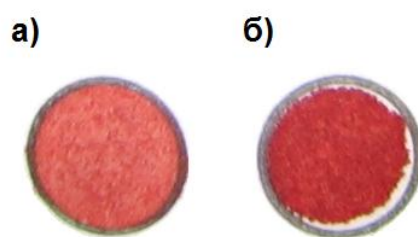
Ефекат стабилизације узорака прикупљених на овај начин веома је значајан. Сматра се да су осушене капи узорака барем подједнако стабилне као и течни узорци, а у неким случајевма, стабилност анализата је чак и повећана [12]. Осушене капи узорака погодне се складиште, заузимајући значајно мање простора, а транспорт је олакшан јер нема потребе за сувим ледом. Ова техника показала се као изузетно економична, постоји могућност аутоматизације процеса припреме узорака, а свакако треба истаћи повећану безбедност приликом анализе

антивиروتика и антибиотика, с обзиром да се сушењем инаktivира већина патогених микроорганизама [13–15].

Поред бројних, већ наведених предности оваквог начина прикупљања узоракa, осушене капи имају и извесна ограничења. Коришћење мале запремине узорка истовремено је и ограничавајући фактор јер захтева одговарајућу припрему узорка и примену осетљивих инструменталних метода. Приликом валидације методе, неопходно је извести проверу додатних параметара, као што су запремина узорка нанетог на картицу, место са кога се вади диск и, у случају коришћења осушених капи крви, ефекат хематокрита. Приликом анализе *postmortem* узоракa, могу се јавити варирања у резултатима с обзиром на различито ширење хемолизоване крви. Одабир одговарајућег интерног стандарда, као и начин његовог додавања у анализирани узорак такође треба размотрити.

1.1.2.3. Главни изазови приликом коришћења осушених капи крви

Коришћење осушених капи крви дефинитивно је најкомфорнији начин прикупљања узоракa, али се аналитичар истовремено суочава са највећим изазовима. Главни проблем који приликом квантитативне анализе треба превазићи свакако је ефекат хематокрита [16]. Хематокрит представља запремину еритроцита у укупној запремини крви и има вредност од 41% до 51% за мушкарце, односно од 37% до 47% за жене [17]. Ефекат хематокрита одражава се на квантитативну анализу због различитог ширења крви са вишим и нижим вредностима овог параметра. Као што се може видети на слици 3, за две осушене капи крви хематокрита 20% и 60%, поред евидентне разлике у боји, кап више вредности хематокрита заузима и значајно мању површину, па се приликом вађења диска и анализе оваквог узорка суштински узима већа запремина, што се одражава на квантитативну анализу.



Слика 3. Две осушене капи крви исте нанете запремине, а различитих вредности хематокрита: а) 20% и б) 60%

Figure 3. Two dried blood spots of the same applied volume and with different hematocrits: а) 20% and б) 60%

У литератури су описане бројне стратегије којима се ефекат хематокрита превазилази, а једна од њих је анализа целе осушене капи крви, уместо диска [18]. Овакав приступ показује предности јер се време анализе скраћује, с обзиром да нема потребе за перфорирањем картица, такође се смањује могућност контаминације и појаве сигнала анализата из претходно анализираних узорка (енг. *Carry Over*), а за анализу се користи цео узорак познате запремине која је најчешће око 10 μL . С друге стране, да би резултати добијени анализом узорака прикупљених на овај начин били валидни, неопходна је примена тачних и прецизних пипета.

Алтернативно, ефекат хематокрита се може превазићи током валидације методе, припремом калибрационих стандарда са различитим вредностима хематокрита.

Стратегија која је примењена у овом раду базира се на накнадној корекцији измерених вредности анализата, а у односу на индивидуалну вредност хематокрита.

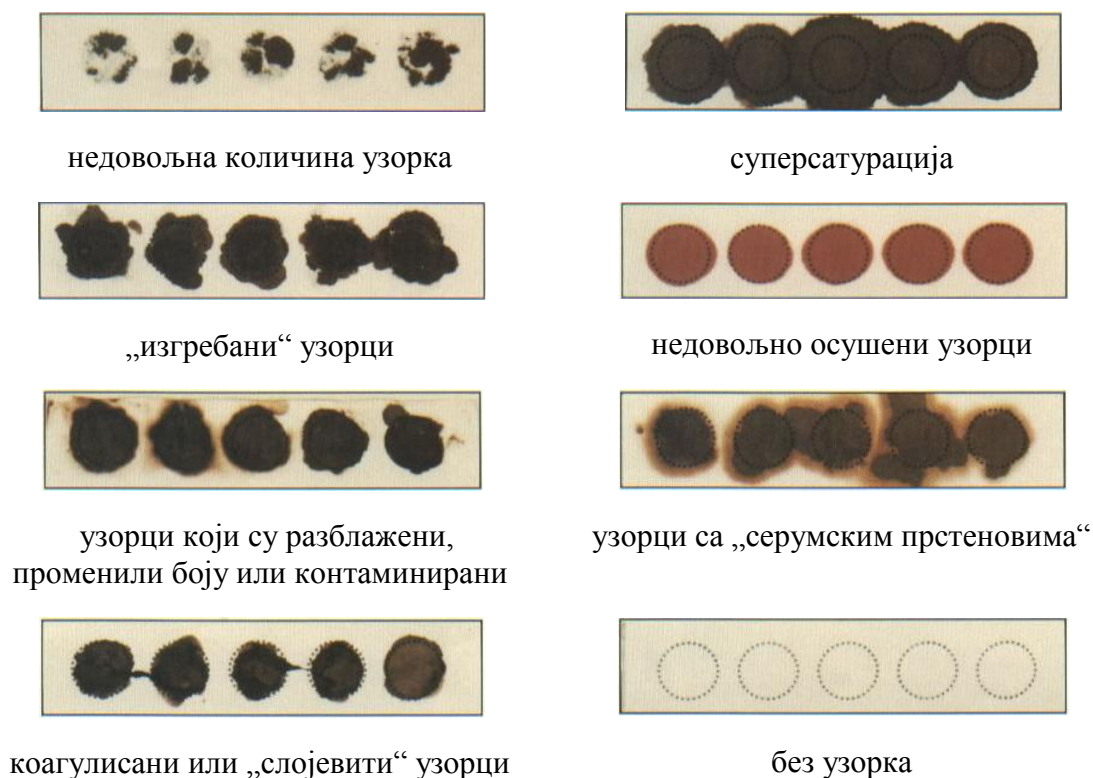
Други изазов са којим се аналитичар сусреће јесте изналажење начина за корелацију добијених вредности анализата у крви са онима у плазми односно серуму, с обзиром да су то референтни биолошки материјали за већину фармацеутских и клиничких лабораторија. Приликом извођења фармакокинетичких студија, основно питање које се поставља јесте да ли осушене

капи крви могу да замене плазму, па је због тога изузетно значајан развој метода за квантификацију анализита у оба матрикса, чиме се пружа увид у однос дистрибуције анализита између крви и плазме. Ово је истовремено и први корак за замену плазме осушеним капима крви у перспективи.

1.1.2.4. Неважеће картице

Без обзира на релативно лако прикупљање узорака у облику осушене капи матрикса, неопходно је строго поштовање смерница, како би се избегло да у лабораторију на анализу буду достављене неважеће картице. Најчешћи извори грешке односе се на: недовољну или превелику количину нанетог узорка, механичка оштећења картице (уколико се приликом наношења узорка додирује површина филтер папира), недовољно трајање процеса сушења, разблаживање узорака, промену њихове боје или контаминацију, појаву серумских прстенова око осушених капи крви, коагулацију осушених капи крви или вишеструко наношење на исто место.

У оваквим случајевима, анализа није изводљива, или резултати који су добијени нису валидни и захтевају достављање нових узорака. Неважеће картице осушених капи крви приказане су на слици 4.



Слика 4. Неважеће картице осушених капи крви

Figure 4. Invalid dried blood spots cards

1.2. ЕПИЛЕПСИЈА

Епилепсија је најчешћа озбиљна неуролошка болест, која је убиквитарна и јавља се у свим животним добима. Сматра се да око 65 милиона људи у свету болује од епилепсије. Сваке године дијагностикује се бар 2,5 милиона нових случајева. Подаци о преваленцији, тј. укупном броју болесника у једној популацији, за већину земаља крећу се у распону од 5 до 10 случајева на хиљаду особа, што значи да готово свака стота особа болује од епилепсије! Према истраживањима спроведеним у Северној Америци, учесталост новодијагностификованих случајева епилепсије највећа је код деце млађе од 5 година и код старијих од 65 година.

У развијеном свету, око 40% особа са епилепсијом не добија одговарајуће лечење, а у неразвијеним земљама и земљама у развоју чак више од 80%. Епилепсија носи повећани ризик од настанка нагле, неочекиване смрти

(енг. *Sudden Unexpected Death in Epilepsy*, SUDEP). Сматра се да је епилепсија узрок смрти код око 33 хиљаде особа, само у Европи, сваке године.

Под епилепсијом се подразумева хронично неуролошко обољење које се карактерише спонтаним понављањем епилептичких напада услед повремених, изненадног, ексцесивног и наглог локалног пражњења сиве масе. Епилепсију као хроничну болест карактеришу промене електроенцефалограма (ЕЕГ) које се региструју не само током напада (иктално), већ и ван напада (интериктално). Њихово присуство ван напада указује на склоност да се епилептички напади спонтано понављају. Међутим, одсуство ових промена не искључује клинички постављену дијагнозу епилепсије јер је ЕЕГ код 15% до 50% болесника са епилепсијом нормалан. Због тога се препознавање епилепсије заснива пре свега на клиничким критеријумима.

Епилепсија је обољење мозга које се карактерише [19]:

1. појавом бар два неизазвана (или рефлексна) напада између којих је временски размак од бар 24 часа,
2. појавом једног неизазваног (или рефлексног) напада уз вероватноћу појаве нових напада код бар 60% пацијената током наредних 10 година,
3. дијагнозом епилептичког синдрома.

Епилепсија се сматра излеченом код деце са неким добно-зависним епилептичким синдромом (тзв. само-укидајуће епилепсије) или код особа које су без напада током 10 година и без антиепилептичке терапије током 5 година.

Етиологија епилепсије је веома важна за процену клиничког тока и одређивање прогнозе. Постоји више предлога да се, приликом класификације, етиологија дефинише као кључни клинички параметар. Према етиологији, епилепсије се могу поделити у четири главне групе [20]:

1. идиопатске епилепсије су, по дефиницији, генетичког порекла или се претпоставља да имају наследну основу. Код болесника са овим типом епилепсије не могу се наћи видљиве структурне промене и оштећења мозга,

2. симптомске епилепсије у вези су са стеченим и/или генетичким узроцима, а праћене су патолошким/анатомским/морфолошким оштећењима и/или клиничким манифестацијама узрочне болести или основне могуће дисфункције. Напади узроковани метаболичким поремећајима, спадају у ову етиолошку категорију,
3. криптогене епилепсије су непознатог узрока, претпостављене, симптомске природе. Оне по заступљености чине 40% епилепсија одраслих особа,
4. посебну групу представљају рефлексне епилепсије код којих је одређени спољни стимулус предоминантан узрок напада, без тешких узрочних неуроанатомских или неуропатолошких промена.

Применом антиепилептичких лекова старије генерације (валпроати, карбамазепин, фенитоин, етосуксимид, фенобарбитон), друге генерације (ламотригин, топирамат, окскарбазепин, зонисамид, леветирацетам и др) и треће генерације (есликарбазепин-ацетат, перампанел, лакозамид, руфинамид, прегабалин и др) код већине болесника, монотерапијом или рационалном политерапијом, постиже се потпуна, стабилна, повољна контрола напада. Бар половина ових особа после стабилне, вишегодишње терминалне ремисије, нема нападе и након обуставе хроничне антиепилептичке терапије. Ипак, не мали број болесника (30% до 40%), упркос примени расположивих антиепилептичких лекова, има неповољну, непотпуну контролу напада и показује фармаколошку резистенцију различите тежине. Код око 5% пацијената, углавном деце са разним епилептичким енцефалопатијама, ова фармакорезистенција је изузетно тешка и онеспособљавајућа. Додатно, употреба антиепилептика повезана је са бројним проблемима који укључују штетне интеракције лекова, идиосинкратске реакције, хепатотоксичност, мијелицитотоксичност, антиепилептицима индуковану тератогеност и др. Неки антиепилептички лекови (фелбамат, ламотригин, валпроати) могу изазвати по живот опасна нежељена дејства.

1.2.1. ПРИРОДА ЕПИЛЕПСИЈЕ

Карактеристична појава код епилепсије је напад, који представља иктусни догађај чија испољавања, јединствена по патофизиолошком механизму и анатомској основи, настају због прекомерне (хиперсинхроне) активности можданих неурона (слично електричној олуји).

Локално поремећено пражњење може се проширити и на друге делове мозга. Симптоми напада крећу се од краткотрајног прекида пажње, до потпуно развијеног напада са губитком свести, снажним конвулзијама, који траје по неколико минута и праћен је низом веома драматичних симптома. Специфични симптоми напада зависе од функције мождане регије која је захваћена. Напади се испољавају као клинички разноврсне, изненадне епизоде поремећених функција моторике, сензибилитета, понашања, перцепције, свести, бројних психичких и когнитивних функција, вегетативних и других регулација. Епилептогени поремећај мождане функције карактерише се тежњом ка хроничним, понављаним нападима. За дијагнозу епилепсије потребна су два или више непровоцираних епилептичких напада. Изоловани или појединачни напад не испуњава ове критеријуме [21, 22].

Дијагноза епилепсије често има већу тежину од неуролошких и телесних болести које су је узроковале. Стигма и дискриминација окружују ове болеснике широм света. Дубока социјална изолација, осећај срама и нелагодности, чести поремећаји психосоцијалног функционисања су веома чести у овој популацији и значајно утичу на квалитет живота. Ниска школска постигнућа, неуспех на професионалном плану и нижи економски ниво, утичу неповољно не само на болеснике са епилепсијом, него и на њихове породице [23].

1.2.2. КЛАСИФИКАЦИЈА ЕПИЛЕПТИЧКИХ НАПАДА

Најшире примењиван класификацијски систем епилептичких напада сачинила је експертска Комисија међународне лиге за борбу против епилепсија (енг. *International League Against Epilepsy, ILAE*) 1964. године [24], који је више пута ревидиран и то 1981. [25], 1989. [26], 2001. [27] и 2006. године [28].

Епилептички напади класификују се на основу почетних знакова и симптома, као и изгледа ЕЕГ у две велике групе, парцијалне (жаришне, фокалне) нападе и генерализоване (системске) нападе. Жаришни напади деле се на просте (ако не долази до губитка свести) или сложене (ако долази до измене или губитка свести).

Сваки напад карактерише абнормални изглед ЕЕГ који показује изненадну, ексцесивну електричну активност у мозгу. Већина тренутно доступних антиепилептика делује тако што сузбија, зауставља или смањује ову електричну активност. Прецизни узроци ових абнормалних промена су још увек непознати, међутим, претпоставља се да постоји место тј. фокус оштећених или абнормалних хиперексцитабилних неурона у мозгу који спонтано генеришу акционе потенцијале.

Код парцијалних напада пражњење почиње локално, и често остаје локализовано. Од захваћеног можданог региона (или више њих) зависе и симптоми који обухватају углавном моторне, сензорне или бихејвиоралне реакције. ЕЕГ пражњење код овог типа епилепсије ограничено је на један кортикални регион или хемисферу.

Генерализовани напади захватају цео мозак, укључујући ретикуларни систем, и зато производе поремећену електричну активност у обе хемисфере. Ови напади карактеришу се моменталним губитком свести. Главни типови генерализованих напада су тонично-клонични (раније *grand mal*), апсансни (раније *petit mal*), миоклонични, тонични, клонични и атонични.

Класификациони систем заснован на електроклиничким параметрима показао је бројне недостатке [25]. Класификација епилепсија и епилептичких синдрома [26] укључила је поделу напада на жаришне и генерализоване, етиолошку поделу епилепсија на идиопатске, симптомске и криптогене. И ова подела је допуњавана и усаглашавана са брзим напредовањем знања о епилепсијама [29]. Лудерс (Lüders) и сарадници преложили су класификацију засновану на семиологији напада, тј. главним клиничким знацима и симптомима. Ова подела напада, сагласна резултатима анализе видео-ЕЕГ иктусних записа

подразумева следеће типове: аура, моторни напади, дискогнитивни (диалептички), аутономни (вегетативни) и посебни напади. Последња група напада односи се на тзв. негативне симптоме (атонички, хипомоторни, астатички, афазички, акинетички, негативни миоклонички) [30].

Нови предлог Класификације епилептичких напада, епилепсија и електроклиничких синдрома ILAE је публиковала 2010. године [31]. Термини генерализовани и жаришни су редефинисани, тако што се брзо, обострано захватање неуронске мреже разликује од пражњења ограниченог на једну хемисферу, регион или зону. Поједностављена је подела генерализованих напада. Жаришни напади су класификовани према клиничким (семиолошким) манифестацијама. Етиолошка подела подразумева генетичке, структурно-метаболичке или епилепсије непознатог узрока. Електроклинички синдроми су прагматично дефинисани и регруписани (нпр. епилептичке енцефалопатије).

И овај предлог Класификације резултат је компромиса. Разврставање епилепсија и епилептичких (електроклиничких) синдрома према изнетим класификацијама израз је систематизације актуелних знања о епилепсијама. Класификација није коначна нити непроменљива, већ је најбољи предлог подложен ревизијама на основу даљег развоја клиничке епилептологије.

1.2.3. НЕУРОПАТСКИ БОЛ

Упркос хетерогености у етиологији и анатомској локацији, неуропатски бол се карактерише хиперексцитабилношћу неурона у оштећеним деловима нерава. Антиконвулзиви попут карбамазепина, окскарбазепина, габапентина и прегабалина одобрени су за терапију бола повезаног са дијабетичном неуропатијом, тригеминеалном неуралгијом, постхерпетичном неуралгијом и другим неуропатским боловима. Габапентин и прегабалин су веома важни у терапији неуропатског бола због изостанка потенцијалних лек-лек интеракција и минималних нежељених ефеката.

1.2.4. МЕХАНИЗАМ ДЕЈСТВА АНТИЕПИЛЕПТИКА

На ћелијском нивоу, постоје три основна механизма антиепилептичког дејства: а) модулација волтажно-зависних јонских канала (натријумових, калцијумових, калијумових), б) потенцирање инхибиторне неуротрансмисије посредоване γ -амино бутерном киселином (енг. *gamma amino butiric acid*, GABA) и в) слабљење екситаторне, посебно глутамат-посредоване, неуротрансмисије у мозгу. Многи антиепилептици, посебно новији, испољавају један или више наведених механизма дејства и стога поседују шири спектар антиепилептичке активности. Деловањем на јонске канале и неуротрансмitere, антиепилептички лекови заустављају, сузбијају или спречавају разне типове напада, али немају антиепилептогено дјество, тј. не могу зауставити процес епилептогенезе. Изузетак можда представља леветирацетам, антиепилептик друге генерације.

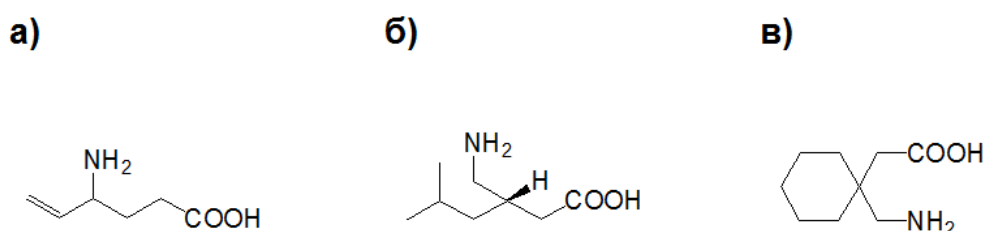
Инактивацијом волтажно-зависних канала, пре свега натријумових, антиепилептици смањују електричну екситабилност чиме блокирају високофреквентно пражњење које се појављује приликом епилептичког напада. Потенцирање трансмисије посредоване GABA одвија се путем дејства на њен метаболизам (инхибиција GABA трансминазе), али и успореним ослобађањем и преузимањем, као и деловањем на GABA_A/бензодиазепински рецептор. Смањена синтеза или пресинаптичко ослобађање глутамата, као и појачано преузимање глутамата су неки од фармаколошких начина смањења глутамат-посредоване неуротрансмисије у мозгу.

Леветирацетам инхибира поновно коришћење синаптичког везикуларног протеина 2A (енг. *Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A*, SV2A), али има и друга дејства, као што је инхибиција волтажно-зависних калцијумових канала [32]. SV2A је трансмембрански протеин, укључен у калцијум-зависну егзоцитозу синаптичких везикула и 2004. године је идентификован као место за које се леветирацетам везује [33]. Иако тачна улога SV2A протеина у развоју епилепсије није јасна, SV2A *knockout* мишеви показују снижење акционог потенцијала зависног од GABA неуротрансмисије и касније развој тешких напада [34].

Два скоро развијена антиепилептичка лека треће генерације имају потпуно нове примарне механизме дејства. То су ретигабин (езогабин) и перампанел. Примарни механизам деловања ретигабина је отварање KCNQ₂ волтажних калијумових канала што резултује снижењем неуронске раздражљивости [35, 36]. Перампанел делује на рецепторе за α -амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазол пропанску киселину (тзв. AMPA рецептори) као селективни некомпетитивни антагониста. AMPA рецептори се углавном налазе на постсинаптичкој мембрани ексцитаторних синапси у мозгу. Они имају место за везивање глутамата и учествују у глутамат-посредованом сигналном систему [37].

1.2.5. АНТИЕПИЛЕПТИЦИ ЦВИТЕРЈОНСКЕ СТРУКТУРЕ

Лекови са антиепилептичком активношћу представљају групу хетерогених супстанци, која се клинички користи како би се обезбедила повољна/потпуна контрола напада код пацијената, деце и одраслих са епилепсијом [38]. Због своје сличне хемијске структуре, вигабатрин, прегабалин и габапентин представљају подгрупу антиепилептика цвистерјонске структуре. Њихове хемијске структуре представљене су на слици 5.



Слика 5. Хемијске структуре цвитерјонских антиепилептика: а) вигабатрин, б) прегабалин и в) габапентин

Figure 5. Chemical structures of zwitterionic antiepileptics: a) vigabatrin, б) pregabalin and в) gabapentin

Сва три антиепилептика могу погоршати или изазвати миоклонус и миоклоничке нападе [39]. Због тога је потребан опрез при доношењу терапијске одлуке.

1.2.5.1. Вигабатрин

Вигабатрин, 4-амино-5-хексенска киселина, је анитепилептик друге генерације, индикуван пре свега као помоћна терапија за пацијенте са (рефректарним) жаришним нападима, али и као монотерапија у педијатријској популацији за лечење симптомских и криптогених инфантилних спазма [40]. Сматра се леком првог избора за терапију Вестовог синдрома, нарочито у случајевима повезаним са туберозном склерозом [41]. За ове индикације примењује се од 1989. године у Европи и Канади, а у Сједињеним Америчким Државама (САД) од 2009. године, где је индикуван за сложене жаришне нападе код одраслих и за инфантилне спазме [42, 43]. Епилептички спазми изазвани фокалном кортикалном дисплазијом и они удружени са дефицитом ензима сукцинил-семиалдехид дехидрогеназе, укључене у GABA катаболизам, такође повољно реагују на примену вигабатрина [44]. Примена вигабатрина удружена је са повећаним ризиком за настанак ретинопатије која доводи до испада и обостраног, трајног сужења видног поља (15% до 30% код деце и 25% до 50% код одраслих) [45, 46]. Ово нежељено дејство први пут је описано 1997. године [43] и одговорно је за ограничену примену овог лека, упркос показаној значајној терапијској делотворности. Вигабатрин је структурни аналог GABA, а за механизам његовог дејства предложена је селективна и иреверзибилна инхибиција GABA трансминазе, ензима одговорног за метаболичку деградацију GABA. Последишно, ниво GABA у централном нервном систему, нарочито у ретини, је повећан [47, 48].

На анималном моделу показано је да вигабатрин доводи до умереног пораста нивоа GABA у мозгу и да инхибира нападе на моделу миша са туберозном склерозом. Штавише, вигабатрин је делом инхибирао активност mTOR путева и пролиферацију глија ћелија код *knockout* мишева *in vivo*, и редуковао активност mTOR путева у култури астроцита *knockout* и контролних мишева. Тиме је претпостављен потенцијално нови механизам деловања антиепилептика преко mTOR путева [49].

Иако се вигабатрин производи као рацемска смеша, само S-(+) енантиомер је активан [40]. Присуство R-(-) вигабатрина не утиче на фармакокинетичке

особине активног енантиомера, пошто је показано да не долази до хиралне инверзије *in vivo* [50]. После примене, концентрација вигабатрина расте у наредних шест до осам сати у чеоним режњевима. Вигабатрин се елиминише путем урина, највећим делом као непромењен лек, па стога нема значајног метаболита који би требало пратити у биолошком материјалу. С друге стране, одређивање нивоа лека је веома значајно, пре свега због дефеката видног поља који су дозно-зависни и представљају најтеже нежељене ефекте примећене током терапије вигабатрином.

1.2.5.2. Превабалин

Превабалин, (S)-3-(аминометил)-5-метилхексанска киселина, је антиепилептик треће генерације, индикован код фокалних напада, али и за терапију бола код дијабетичне неуропатије, постхерпетичне неуралгије, фибромијалгије или неуропатског бола повезаног са повредом кичмене мождине [51]. Користи се за терапију периферног и централног неуропатског бола код одраслих, али и као помоћна и монотерапија за пацијенте, децу и одрасле, са (резистентним) парцијалним нападима, са или без секундарно генерализованих тонично-клоничних напада и за терапију анксиозности [52]. Показана је његова делотворност у лечењу поремећаја спавања и есенцијалног тремора [53]. FDA је одобрила превабалин 2005. године за помоћно лечење жаришних напада код одраслих болесника.

Аналгетичка, антиепилептичка и анксиолитичка активност превабалина приписују се високо афинитетном везивању за $\alpha_2\text{-}\delta$ субјединицу волтажностависних калцијумових канала Q-типа, чиме се ублажује деполаризацијом индуковани улазак калцијума у нервне завршетке. То доводи до смањеног ослобађања различитих неуротрансмitera, као што су глутамат, норадреналин и супстанца P из синапси у нервна ткива [54, 55]. Овај лек делује као агониста мембранских АТР-зависних калцијумових канала [39], али није агониста N-метил-D-аспартат (NMDA) рецептора [56]. Иако је превабалин структурно сличан са

GABA, не везује се за GABA_A или GABA_B рецепторе и не делује на преузимање или деградацију GABA [53].

Апсорпција прегабалина је скоро комплетна (98%) и показује идеалан линеаран фармакокинетички профил. Висока биорасположивост прегабалина може се приписати његовој сличности са есенцијалном аминокиселином, L-леуцином. Не везује се за протеине плазме, минимално се метаболише (< 2%), а његов полу-живот се креће од 5,8 до 6,3 сати. Излучује се примарно путем урина као непромењен лек (око 98%), без значајног метаболита. Такође је показано да S-енантиомер прегабалина има 10 пута већи афинитет за везно место на рецептору [57], док рацемизација до R-енантиомера није примећена код мишева, пацова и мајмуна [51]. Прегабалин не утиче на концентрације у плазми комедикованих антиепилептичких лекова, нити други лекови утичу на концентрацију прегабалина. Не индукује нити инхибира ензимску активност. Не утиче на фармакокинетiku оралних контрацептива [58].

Ефикасност терапије прегабалином у смањењу учесталости напада и појава нежељених ефеката (најчешће вртоглавица, поспаност, атаксија и успореност, затим ангиоедем и хиперсензитивност), дозно су зависни (150 – 600 mg/дан) [55]. Такође је показано да прегабалин може бити средство злоупотребе код пацијената зависних од опиоида [59]. Одређивање концентрације прегабалина у телесним течностима било би због тога корисно не само у склопу терапијског мониторинга, већ и за процену токсичности.

1.2.5.3. Габапентин

Габапентин, [1-(аминометил)циклохексил]сирћетна киселина, индикуван је за терапију постхерпетичне неуралгије код одраслих, али и као помоћна терапија парцијалних напада, са или без секундарне генерализације код пацијената са епилепсијом старијих од 12 година [60]. Такође се користи и као помоћна терапија парцијалних напада у педијатријској популацији старости од 3 до 12 година. Механизам аналгетског дејства габапентина је непознат, али је код животиња

показано да спречава алодинију (болно понашање као одговор на нормално штетан стимулус) и хипералгезију (претеран одговор на болне стимулусе).

Габапентин је мање терапијски делотворан у лечењу жаришних напада у поређењу са другим антиепилептицима. Механизам деловања односи се на високо афинитетно везивање за $\alpha_2\text{-}\delta$ субјединицу волтажно-зависних калцијумових канала [32, 61]. Подноси се веома добро, што се нарочито односи на искуства са применом овог лека у терапији неуропатског бола.

Механизам антиконвулзивног дејства габапентина такође је недовољно познат. Иако је структурно сличан са GABA, не модификује везивање радиолиганда за GABA_A или GABA_B рецепторе, није агониста GABA рецептора и не делује на преузимање или деградацију GABA. Такође, не утиче на преузимање допамина, норадреналина и серотонина. У животињском možданом ткиву потврђено је да се габапентин везује за субјединицу волтажно-зависних калцијумових канала, али остаје да се разјасни значај овог везивања, уколико постоји. Показано је да габапентин делује агонистички на АТР-зависне калијумове канале [62].

Биорасположивост габапентина није дозно-зависна, а мање од 3% лека везано је за протеине плазме. Излучује се урином као непромењен лек.

1.3. МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА

Масени спектрометар је инструмент који мери масу молекула преведених у јоне, тј. мери наелектрисане молекуле и сходно томе представља „софистицирану аналитичку вагу“. Масена спектрометрија као инструментална техника омогућава идентификацију непознатих и квантификацију познатих једињења, као и добијање информација о структури и хемијским особинама анализата.

Током протеклих деценија, масена спектрометрија је претрпела значајна технолошка побољшања и тако постала незаменљива метода у анализи протеина, пептида, угљених-хидрата, DNK, лекова и других биолошки важних молекула.

О значају ове инструменталне технике сведоче и додељене Нобелове награде за изузетне доприносе научника на следећим пољима:

- 1906. године Нобелова награда за физику Џозеф Џон Томсон (Joseph John Thompson): *“In recognition of the great merits of his theoretical and experimental investigations on the conduction of electricity by gases“*,
- 1922. године Нобелова награда за хемију Франсис Вилијам Астон (Francis William Aston): *“For his discovery, by means of his mass spectrograph, of isotopes, in a large number of non-radioactive elements, and for his enunciation of the whole-number rule“*,
- 1989. године Нобелова награда за физику Волфганг Паул (Wolfgang Paul) и Ханс Георг Демелт (Hans Georg Dehmelt): *“For the development of the ion trap technique“*,
- 2002. године Нобелова награда за хемију Џон Бенет Фен (John Bennett Fenn) и Коичи Танака (Koichi Tanaka): *“For the development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules“*.

Масени спектрометар одређује масу молекула мерењем односа масе и наелектрисања тј. m/z вредности насталог јона. Јони се електростатичким силама усмеравају ка масеном анализатору, где се на основу m/z вредности раздвајају и, након тога, детектују. Резултат јонизације молекула, раздвајања јона и њихове детекције, јесте спектар који даје информације о молекулској маси, а некада и о структури. Систем за увођење узорка, јонски извор, масени анализатор и детектор јона јесу основни делови, заједнички за све масене спектрометре [63]. Такође, неопходно је присуство вакуума, као и одговарајућег софтвера за обраду података.

Један од најранијих изазова у масеној спектрометрији представљало је адекватно увођење узорка, са вредности атмосферског притиска (760 Torr) у вакуум ($\sim 10^{-6}$ Torr), при чему вакуум унутар инструмента треба да остане непромењен. Директно уметање и директно ињектовање у јонски извор, два су најчешћа начина увођења узорака. Код директног уметања, узорак се наноси на

сонду или плочу која се затим преко вакуума уводи у јонски извор где се врши јонизација, потпомогнута ласерском десорпцијом из матрикса или директним загревањем. Директно ињектовање изводи се помоћу капиларе, а узорак се налази у гасовитој фази или у облику раствора. На овај начин у масени спектрометар се ефикасно уводе мале количине узорка, без ремећења вакуума, а такође је омогућено и спајање масеног спектрометра са сепарационим техникама као што су гасна и течна хроматографија.

1.3.1. ТЕЧНА ХРОМАТОГРАФИЈА–МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА

Иако се гасна хроматографија–масена спектрометрија (енг. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*, GC–MS) користи још од касних шездесетих година XX века, прошло је неколико деценија до тренутка када је комбинација течне хроматографије и масене спектрометрије (енг. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*, LC–MS) достигла сличан ниво поузданости, репродуктивности и робустности [64]. LC–MS је модерна инструментална техника која омогућава квалитативну и квантитативну анализу различитих једињења, а основна предност у односу на GC–MS је могућност анализирања знатно већег броја супстанци, као што су термолабилне, веома поларне или супстанце велике молекулске масе, типа протеина.

На самом почетку коришћења LC–MS система улога хроматографије била је да обезбеди добијање одговарајућег облика пика и најчешће су примењиване C18 стационарне фазе уз градијентно елуирање. Селективност масене спектрометрије смањила је важност хроматографског раздвајања анализата, осим у неколико специјалних случајева као што су раздвајање енантиомера на хиралним колонама, детекција ендогених биомаркера који имају велики број структурно сличних једињења и анализа изобарних метаболита [64]. Међутим, хроматографско раздвајање анализата од метаболита, ендогених компоненти матрикса и ексципијенаса примењеног фармацеутског облика веома је пожељно, с обзиром да наведене супстанце могу негативно да утичу на квантификацију анализата.

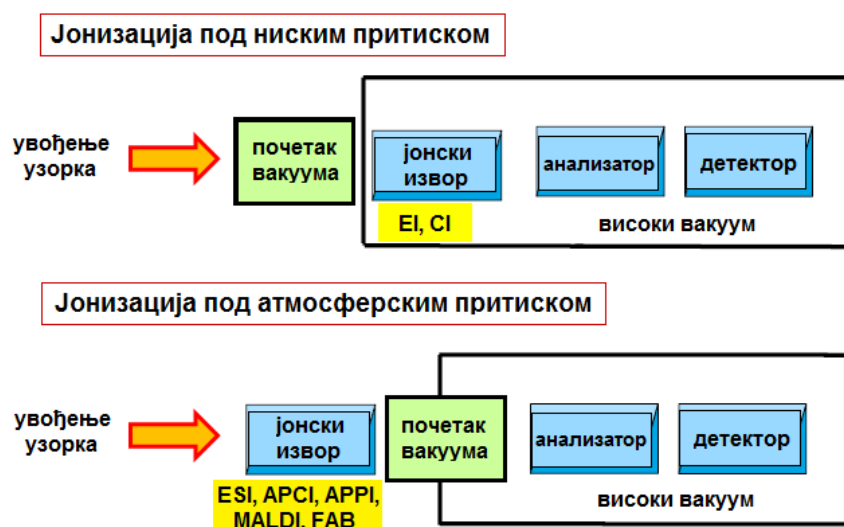
Услови рада течног хроматографа, морају се прилагодити масеном спектрометру. Ово се пре свега односи на састав мобилне фазе и коришћење растварача као што су вода, ацетонитрил, метанол, етанол, пропанол, изопропанол и компатибилних адитива, првенствено мравље и сирћетне киселине, амонијум-формијата и амонијум-ацетата. Приликом коришћења трифлуоросирћетне киселине, триетиламина и тетрахидрофурана треба бити обазрив јер изазивају јонску супресију, док су неиспарљиве соли типа фосфата, површински активне материје, јон-пар реагенси, као и неорганске киселине, адитиви потпуно некомпатибилни са масеним спектрометром. Пожељно је рН вредност мобилне фазе подесити тако да молекули анализата буду јонизовани, а најбоља осетљивост постиже се при брзини протока мањој од 1 mL/min. Након елуирања са стационарне фазе, аналити се преко специфичног интерфејса уводе у масени спектрометар.

1.3.2. ЈОНИЗАЦИЈА

Техника јонизације односи се на механизам којим се од молекула анализата стварају јони, а јонски извор је део инструмента у коме се јонизација дешава. Овај процес може да се изводи под ниским притиском и под атмосферским притиском. Код јонизације под ниским притиском узорак се у гасовитој фази уводи у јонизатор који се налази у пољу високог вакуума. Јонизација под атмосферским притиском подразумева да се уклањање растварача (десолватација) и јонизација дешавају истовремено, а јони се затим уводе у високи вакуум на путу ка анализатору (слика 6).

Процес јонизације зависи од методе јонизације која је примењена. Разлог за то је што се магнитуда енергије пренете аналиту разликује. Када аналит прима енергију, користи је пре свега за превођење из течне у гасовиту фазу. Мали део енергије се користи за повећање кинетичке енергије молекула, а остатак за јонизацију. Енергија насталих јона у корелацији је са њиховом стабилношћу. Јони који поседују велику енергију, показују малу стабилност и кратко „живе“ јер теже да ослобађањем енергије пређу у стабилније јоне. Јонизација при којој се

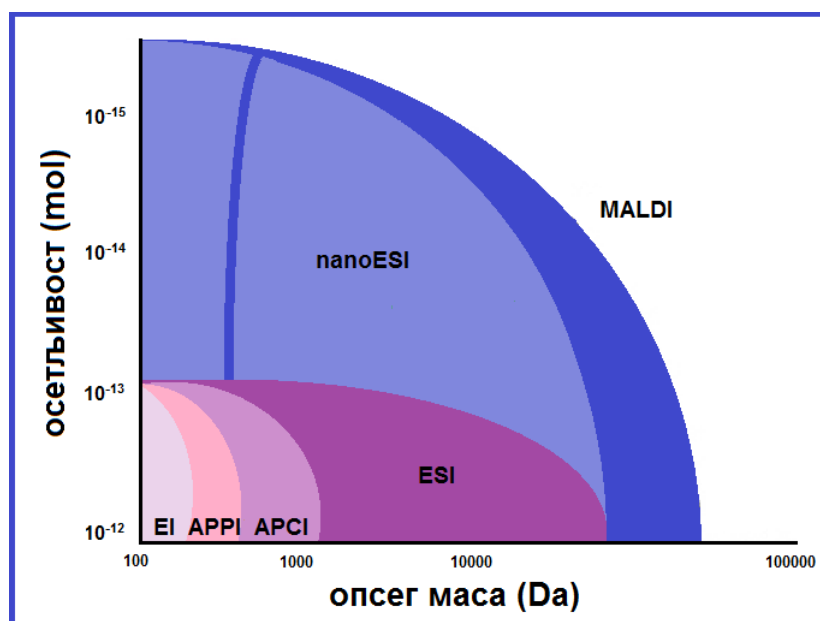
молекулима саопштава велика енергија карактерише се као „груба“. Резултат овакве јонизације је спектар са значајно смањеним интензитетом молекулског јона, али са пуно фрагмената [65]. Ове тзв. класичне методе јонизације користе се у гасној хроматографији и у њих спадају јонизација електронима (енг. *Electron Ionisation*, EI) и хемијска јонизација (енг. *Chemical Ionisation*, CI). Насупрот овоме, јонизација при којој се молекулима саопштава нижа енергија је „мека“ и даје спектар са доминантним молекулским јоном, готово без фрагмената. У „меке“ методе јонизације спадају електроспреј јонизација (енг. *Electrospray Ionisation*, ESI), хемијска јонизација под атмосферским притиском (енг. *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*, APCI), фотојонизација под атмосферским притиском (енг. *Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI), јонизација потпомогнута ласерском десорпцијом из матрикса (енг. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) и бомбардовање брзим атомима (енг. *Fast Atom Bombardment*, FAB) [65]. Ове методе јонизације користе се у течној хроматографији, а два најчешће коришћена интерфејса су ESI и APCI.



Слика 6. Разлика између јонизације под ниским и атмосферским притиском

Figure 6. Difference between low pressure and atmospheric pressure ionization

Приликом избора одговарајуће јонизационе технике, треба се руководити особинама и масом анализата, као што је приказано на слици 7.



Слика 7. Избор технике јонизације на основу особина анализата

Figure 7. The selection of ionization technique based on the analyte properties

У табели 1 приказан је упоредни преглед различитих техника јонизације.

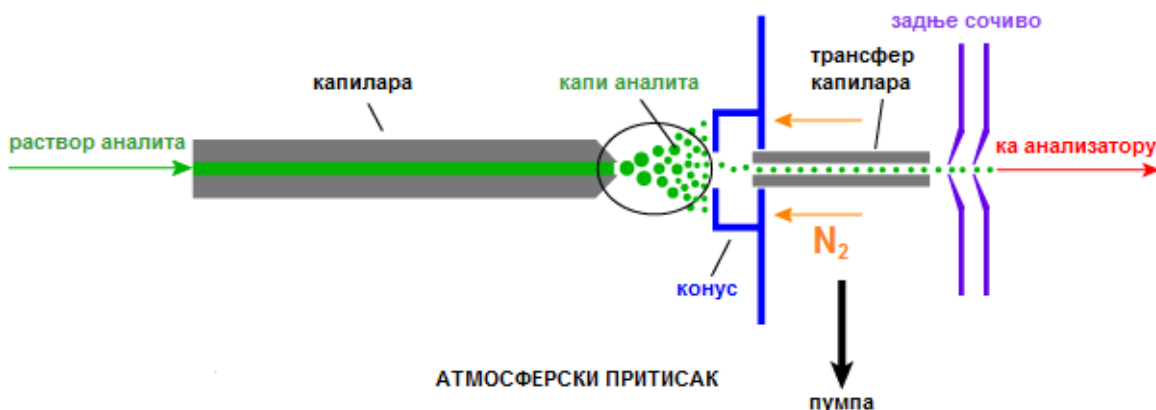
Табела 1. Поређење различитих техника јонизације

Table 1. Comparison of different ionization techniques

Јонизација	Опсег маса (Da)	Интерференције	Деградација	Примена на комплексне смеше	LC–MS компатибилност	Осетљивост (mol)
ESI	70000	нема	нема	донекле ограничена	одлична	$10^{-12} - 10^{-15}$
nanoESI	70000	нема	нема	донекле ограничена, али боља од ESI	добра, али мали протоци могу бити проблематични	$10^{-15} - 10^{-21}$
APCI	1200	нема	термална	донекле погодна	одлична	10^{-15}
APPI	1200	нема	фотодисоцијација	погодна	одлична	10^{-15}
MALDI	300000	има	фотодеградација и интеракције са матриксом	веома погодна	изводљива	10^{-15}
FAB	7000	има	реакције са матриксом и термална деградација	донекле погодна	веома ограничена	10^{-9}
EI	500	нема	термална деградација	ограничена, изузев кад се користи са GC–MS	веома ограничена	10^{-12}
CI	500	нема	термална деградација	ограничена, изузев кад се користи са GC–MS	веома ограничена	10^{-12}

1.3.2.1. Електроспреј јонизација

Овај тип јонизације подразумева стварање јона на вредностима атмосферског притиска. Настали јони се затим преносе у окружење високог вакуума који се постепено повећава до анализатора и достиже вредности од 10^{-5} Torr ($\approx 1,93 \times 10^{-7}$ psi односно $\approx 1,32 \times 10^{-8}$ atm) [66]. За овај трансфер потребно је применити различите вредности вакуума коришћењем пумпи које се налазе између коморе за јонизацију и анализатора. Електрично поље такође може бити примењено како би се јони убрзали и обезбедио њихов квантитативни прелазак до анализатора [67]. Шема ESI интерфејса приказана је на слици 8.

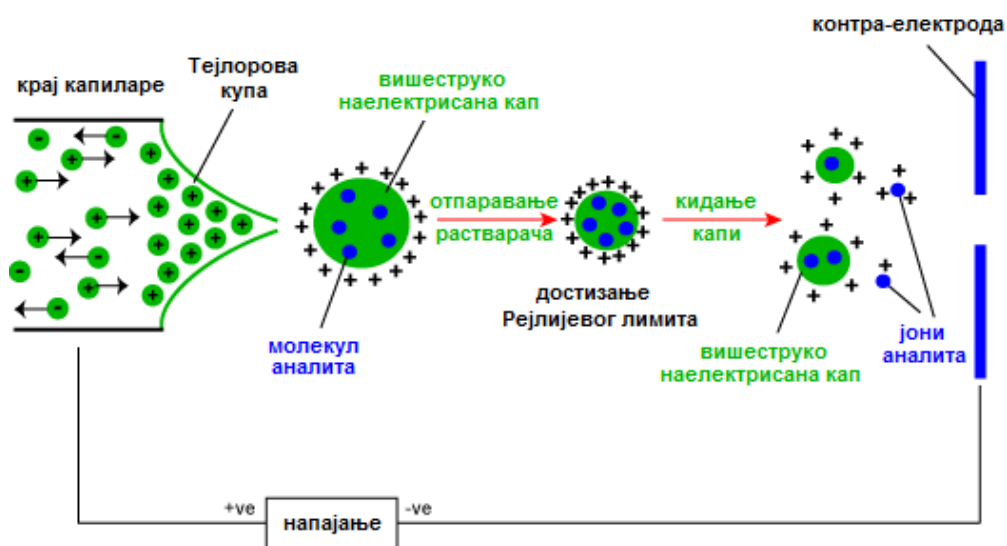


Слика 8. Шема ESI интерфејса

Figure 8. A scheme of an ESI source

Анализирани узорак уводи се у масени спектрометар у облику раствора, било да је претходно подвргнут екстракцији или се ради о директној анализи, било да се ињектује путем шприца или се елуира са хроматографске колоне. Овакав узорак у течном стању не може се директно анализирати, већ се најпре мора уклонити већи део растварача, што се кроз процес електроспреј јонизације и постиже [68].

Раствор анализата најпре пролази кроз капилару од инертног материјала, на чији крај се доводи висок позитиван или негативан напон, најчешће од 3 kV до 5 kV. Под дејством јаког електричног поља, течност се деформише у облик тзв. Тејлорове купе (енг. *Taylor Cone*), након чега се од течности формирају и одвајају капи сферног облика. Истовремено, константан проток загрејаног азота дуж капиларе доводи до формирања спреја. Дуж путање, долази до отпаривања растварача, тако да капи постају све мање и мање, до момента када површински напон надвладају репулзивне силе истоименог наелектрисања, што се назива достизање тзв. Рејлијевог лимита (енг. *Rayleigh Limit*), услед чега долази до кидања капи (енг. *Coulombic Explosion*). На овај начин стварају се мање капи које могу даље пролазити исти процес, али и наелектрисани молекули анализата и растварача (јони и кластер јони) (слика 9). Јони се затим усмеравају ка конусу на контра-електроди, која је од капиларе удаљена од 0,3 cm до 2 cm. Отвор на конусу функционише као сепаратор за молекуле растварача и анализата, при чему једино молекули анализата пролазе, као тежи, док молекули растварача који су отпарили, брзо и лако дифундују са ове путање. На крају, јони анализата долазе до анализатора, где се мери њихов однос масе и наелектрисања (m/z) [69–72].



Слика 9. Механизам настанка јона у ESI-(+) режиму рада

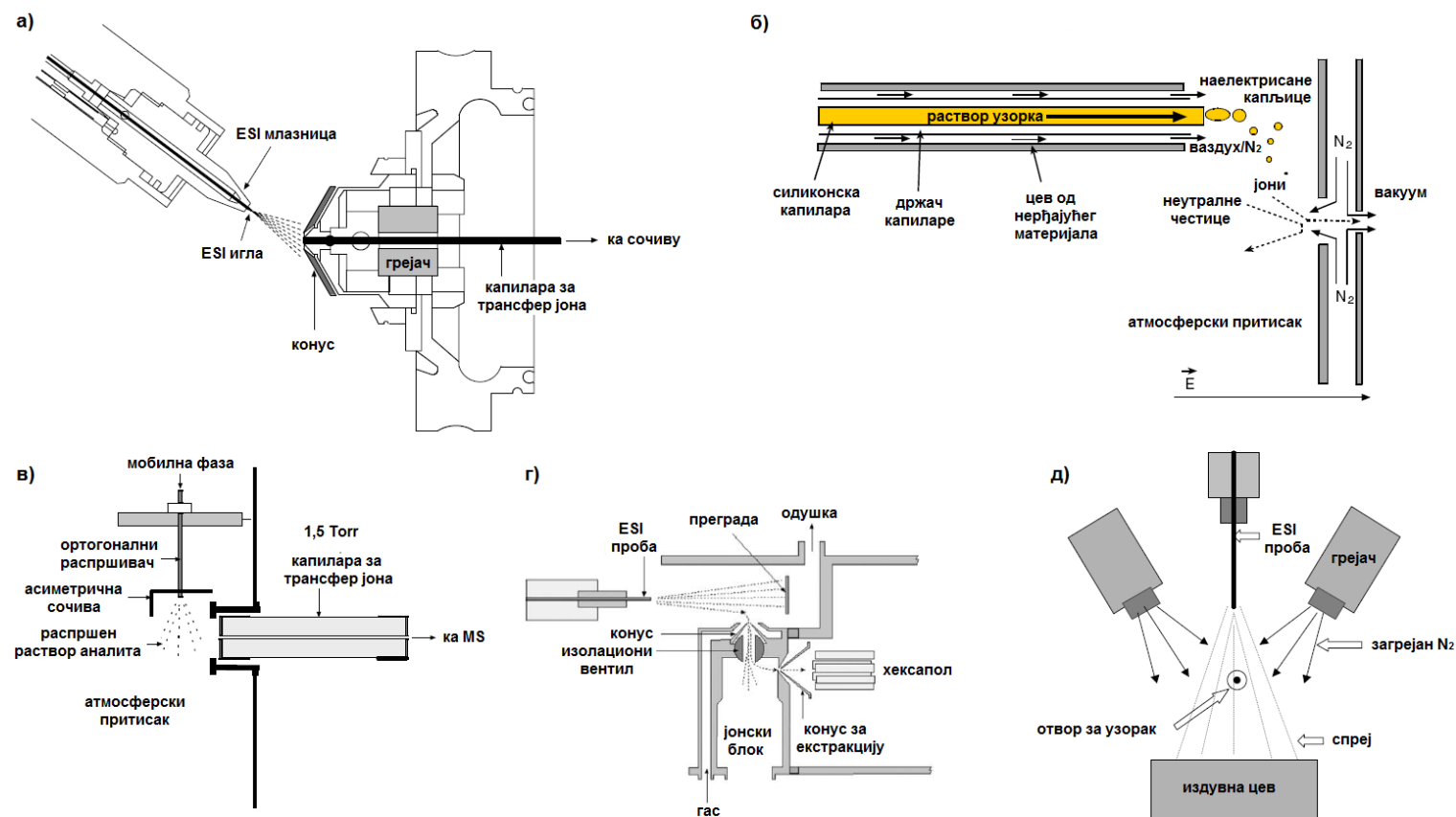
Figure 9. A scheme showing the mechanism of ion formation in ESI-(+) mode

Описани основни принцип електроспреј јонизације подразумева присуство капиларе која се обично загрева, затим гасова који се на различите начине доводе у јонизациону комору са циљем да потпомогну испаравање и контра-електроде, која служи за формирање јаког електричног поља. Међутим, произвођачи масених спектрометара су развили оригинална идејна решења јонских извора, што је резултирало и различитом терминологијом. Неки од постојећих јонских извора приказани су на слици 10.

Велика предност електроспреј јонизације је могућност брзе, у милисекундама мерене, промене напона на капилари. Овим се постиже истовремена јонизација супстанци различитих карактеристика, а формирану јони носе истоимено наелектрисање примењеног напона, што се означава као ESI-(+) односно ESI-(-) режим рада.

Јони који долазе до анализатора из електроспреја имају мали вишак унутрашње енергије и због тога се не фрагментишу. Многи од ових јона су облика $[M+X]^+$ или $[M-H]^-$, где X представља водоник или неки други елемент, као што је натријум или калијум. Ови молекулски јони пружају значајне информације о тачној молекулској маси, али не дају информације о структури. Да би се добиле информације о структури потребно је извршити фрагментацију, а молекулски јони додатну енергију потребну за фрагментацију добијају у судару са молекулима колизионог гаса.

Код електроспреј јонизације, готово јединствено, формира се још један тип јона, што ову технику чини веома корисном за испитивање супстанци великих молекулских маса, као што су протеини. Уобичајено, мерење m/z вредности представља мерење масе, јер је вредност наелектрисања z најчешће 1. Међутим, код електроспреј јонизације, вредности z веће од 1 су прилично уобичајене, па се тако могу формирати јони облика $[M + n \times H]^{n+}$, односно $[M - n \times H]^{n-}$ при чему n може имати вредности нпр. од 1 до 30 [73].



Слика 10. Различити дизајни ESI јонског извора: а) компанија *Thermo (Ion Max)*, б) идејно решење Бруинса из 1987. године, в) компанија *Agilent Technologies*, г) компанија *Waters/Micromass (Z-sprayTM)* и д) компанија *MDS Sciex (TurboVTM)*

Figure 10. Different designs of ESI ion source: а) *Thermo company (Ion Max)*, б) configuration developed by Bruins in 1987, в) *Agilent Technologies company*, г) *Waters/Micromass company (Z-sprayTM)* and д) *MDS Sciex company (TurboVTM)*

Фактори који утичу на електроспреј јонизацију су:

1. концентрација и карактеристике анализата – постоји линеарна зависност између интензитета сигнала и концентрације анализата до одређеног нивоа, после кога сигнал, са даљим повећањем концентрације, остаје непромењен или чак смањен. Ово се може приписати сатурацији површине насталих капи молекулима анализата и постојању „заробљених“ молекула у унутрашњости капи који се не могу ослободити. Одступање од линеарне зависности сигнала од концентрације може се приметити и при нижим концентрацијама због интерференција које потичу од других анализата или компоненти матрикса [70, 72, 74],
2. састав и својства мобилне фазе – у случају комбиновања масене спектрометрије са течном хроматографијом, одређене карактеристике мобилне фазе могу утицати на смањење или повећање сигнала [69, 70, 74, 75]. То се пре свега односи на:
 - а) присуство пуфера у мобилној фази, због чега је могуће формирање адукт-јона са натријумом или калијумом. Препоручује се употреба пуфера минималне концентрације (10 mmol/L), како би се избегла конкуренција јона за површину капи,
 - б) рН мобилне фазе, при чему одређена киселост или базност није неопходна за формирање јона, јер се они могу детектовати и на „неповољним“ вредностима рН (нпр. негативни јони при рН 3 – 4 и позитивни јони при рН 9 – 10). Међутим, модификација рН вредности у сврху оптимизације сигнала једна је од најчешћих промена које се испитују током развоја методе,
 - в) присуство неиспарљивих супстанци, што за последицу има отежано формирање капи или проблематично испаравање растварача и последично смањење концентрације јона присутних у гасовитој фази који долазе на детектор.

1.3.3. АНАЛИЗАТОРИ

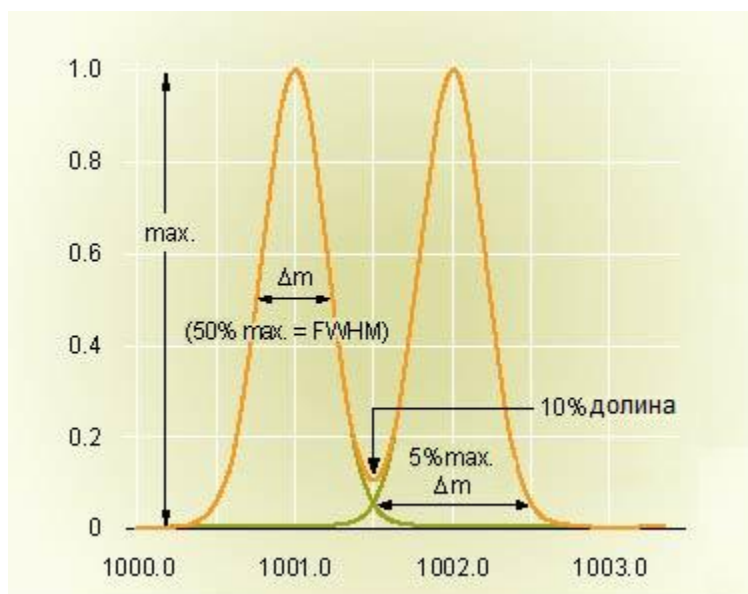
Анализатор представља најважнији део масеног спектрометра. Он у вакууму, на основу односа масе и наелектрисања (m/z вредности), применом електричног и магнетног поља, раздваја јоне у гасовитом стању. Сваки масени анализатор има своје посебне карактеристике и поље примене, предности и ограничења (табела 2) [76]. Избор масеног анализатора базира се првенствено на његовој намени и сходно томе потребним перформансама. Најчешћи критеријуми на основу којих се процењује масени анализатор су:

1. распон маса – дефинише се као опсег вредности односа масе и наелектрисања које се могу измерити. Изражава се у Da или Th,
2. резолуција (R) – дефинише се као способност масеног спектрометра да раздвоји две различите m/z вредности за $z = 1$ и може се израчунати на основу следеће једначине:

$$R = \frac{m/z}{\Delta m/z} = \frac{m}{\Delta m} \quad (1)$$

где је m/z однос масе и наелектрисања за дати пик, а $\Delta m/z$ разлика две вредности m/z , m и прве више вредности коју анализатор може да раздвоји од m . Резолуција се може дефинисати преко процентуалне величине тзв. „долине“ између два суседна пика, тј. процентуалним степеном раздвојености два пика. У овом случају, најчешћа вредност задовољавајућег степена раздвајања је 10%. Важно је да при одређивању резолуције на овај начин висине и ширине пикова буду приближно исте. Други начин израчунавања резолуције јесте преко наведене једначине (1), при чему се за Δm узима ширина пика на 5% његове висине. Најчешће коришћени начин за израчунавање резолуције јесте да се за вредност Δm узима ширина пика на половини његове висине (енг. *Full Width at Half Maximum*, FWHM) (слика 11). Вредност резолуције за масене спектрометре ниске резолуције је испод 5000, док за инструменте високе резолуције износи и више од

15000, што значи да се могу раздвојити јони који се у маси разликују на трећој и четвртој децимали [77],



Слика 11. Резолуција масеног спектрометра

Figure 11. Resolution of mass spectrometer

3. тачност мерења масе – изражава се као релативна грешка (изражена у апи или ppm) у одређивању m/z вредности у односу на тачну масу. У комбинацији са резолуцијом, овај параметар утиче на поузданост идентификације једињења. Основна предност масених спектрометара високе тачности мерења маса је могућност одређивања елементарног састава појединачних молекулских јона или фрагмената, а то свакако доприноси расветљавању или потврди хемијске структуре. Минимална прихватљива вредност овог параметра је 5 ppm. За одређивање тачне масе, неопходно је извршити коректну калибрацију масеног спектрометра, која може бити интерна и екстерна. Интерна калибрација подразумева истовремену анализу калибрационе смеше и испитиваног узорка. Калибратори ће се наћи у јонском извору у исто време када и узорак, па ће се њихово испитивање изводити под апсолутно идентичним условима. Интерном

калибрацијом постиже се највећа прецизност, али због истовременог увођења калибратора и узорка може доћи до јонске супресије или појаве интерферирајућих пикова у спектру. Екстерна калибрација подразумева мерење калибратора пре или после анализе узорка. Уколико је инструмент стабилан, екстерном калибрацијом могуће је добити готово идентичне резултате као и интерном [78],

4. брзина скенирања описује брзину којом масени спектрометар може да скенира опсег маса. Изражава се као број скенова по секунди и важан је параметар у хроматографској анализи, јер утиче на облик пика,
5. трансмисија се означава као број емитованих јона који стижу до детектора.

Масени анализатори могу бити континуални и пулсни. За раздвајање јона у масеној спектрометрији могу се користити:

1. квадрупол (енг. *Quadrupole Mass Analyzer*, Q),
2. анализатор на бази времена прелета (енг. *Time of Flight Mass Analyzer*, TOF),
3. анализатор магнетни/електростатички сектор (енг. *Magnetic Sector Mass Analyzer*, В и енг. *Electrostatic Sector Mass Analyzer*, E),
4. јонски трап (енг. *Ion Trap Mass Analyzers*),
5. Фуријеов трансформатор јон циклотрон резонантни анализатор (енг. *Fourier transform Ion Cyclotron Resonance*, FTICR),
6. орбитрап (енг. *Orbitrap Mass Analyzer*).

Табела 2. Поређење масених анализатора који се користе са електроспреј јонизацијом

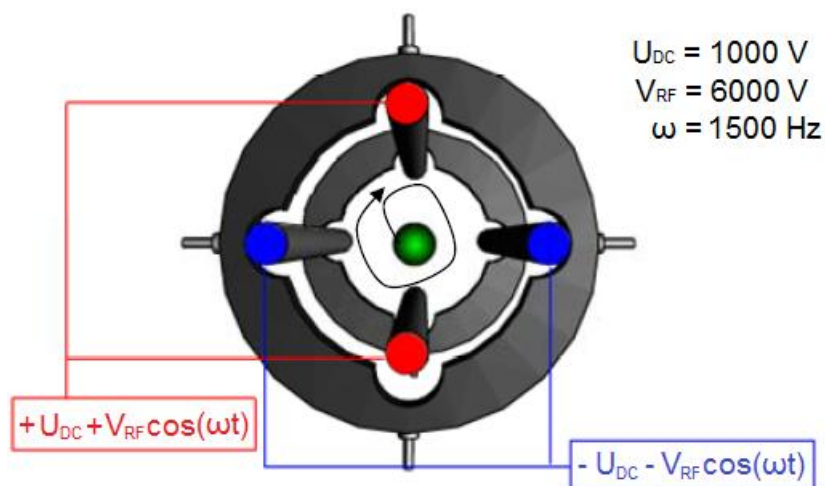
Table 2. Comparison of mass analyzers combined with electrospray ionization

	Квадрупол	Јонски трап	Магнетни сектор	TOF	FTICR	Орбитрап
Тачност	100 ppm	100 ppm	3 ppm	5 ppm	< 5 ppm	< 1 ppm
Резолуција	4000	4000	60000	60000	500000	400000
<i>m/z</i> опсег	4000	4000	10000	10000	10000	6000
Брзина скенирања	милисекунд	милисекунд	~ секунд	~ секунд	~ секунд	0,1 секунд
MS степен	MS ²	MS ⁿ	MS ²	MS ²	MS ⁿ	MS ² и MS ⁿ
Коментар	јефтин, једноставно пребацивање између M ⁺ /M ⁻ јона	јефтин, једноставно пребацивање између M ⁺ /M ⁻ јона, подесан за MS ⁿ	масиван инструмен високе резолуције	добра осетљивост, тачност резолуција и прецизност маса	висока резолуција, скуп	висока осетљивост, тачност резолуција и прецизност маса

1.3.3.1. Квадруполи и троструки квдаруполи

Због своје компактности, лакоће руковања и одржавања, велике осетљивости, брзог скенирања и рада у режиму умереног вакуума, квадруполи представљају најчешће коришћене масене анализаторе. То су практични инструменти, који се лако повезују са гасним или течним хроматографом.

Овај тип анализатора састоји се од четири паралелне шипке, тј. електроде, између којих се ствара електрично поље. Наспрамни парови шипки повезани су на извор једносмерног напона (енг. *Direct Current*, DC), који на једном пару електрода условљава позитиван, а на другом негативан потенцијал. Електроде су истовремено повезане и на извор наизменичног напона (енг. *Radio Frequency Voltage*, RF), који се између парова фазно разликује за 180° (слика 12). Тако је укупни напон на паровима електрода дефинисан изразом: $+U_{DC} + V_{RF} \cos(\omega t)$, односно $-U_{DC} - V_{RF} \cos(\omega t)$, где је U_{DC} једносмерна компонента напона, V_{RF} амплитуда наизменичне компоненте напона, ω фреквенција наизменичног напона и t време.



Слика 12. Шематски приказ квадрупола

Figure 12. A scheme of quadrupole analyzer

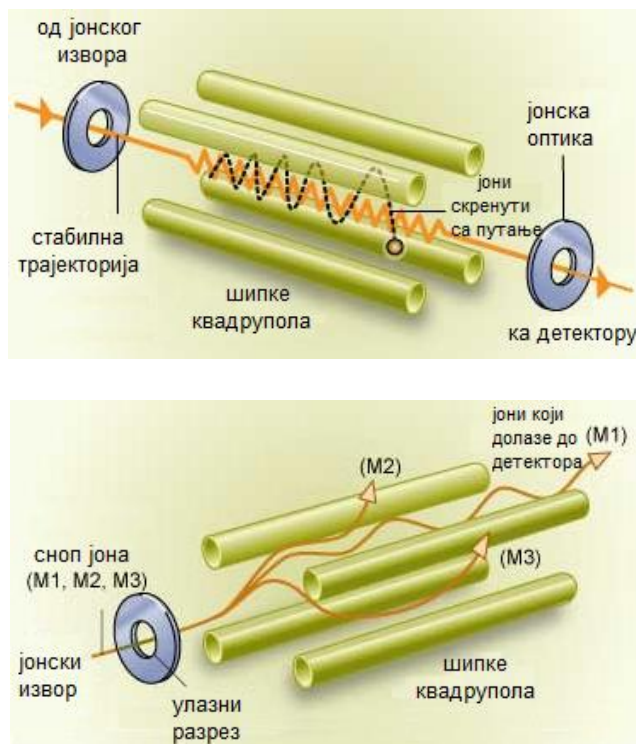
Док пролазе кроз анализатор, јони се филтрирају на основу m/z вредности, тако да само поједини стижу до детектора, јер имају стабилну путању, а остали

бивају разелектрисани на шипкама. Детаљан опис рада квадрупола биће приказан посматрањем позитивног пара шипки и уз претпоставку да се у анализатору налазе позитивни јони. Кретање ових јона под дејством наизменичног напона одвија се на следећи начин:

- током позитивних полупериода јони ће се кретати ка центру квадрупола, одбијајући се од шипки због присуства истоименог наелектрисања,
- током негативних полупериода позитивни јони биће привучени ка шипкама, и уколико достигну одговарајуће убрзање, удариће у њих и прећи у неутралне честице.

Пролазак јона до детектора стога зависи од: а) наелектрисања јона (вишеструко наелектрисани јони биће јаче привучени негативним вредностима наизменичног напона), б) масе јона (лакши јони ће имати веће убрзање и због тога лакше ударити у шипке током негативних полупериода наизменичног напона), в) јачине поља (јаче поље ће пре дестабилизovati позитивне јоне током негативних полупериода наизменичног напона) и г) фреквенције осцилација (што је она већа, утицај на јоне је мањи).

Једносмерни напон такође има утицај на кретање јона. Уколико је позитиван, усмераваће кретање позитивних јона ка центру квадрупола. Његов утицај је већи на „теже“ јоне, јер се они спорије рефокусирају под дејством наизменичног напона, за разлику од „лаких“ јона. Због тога ће до детектора стићи само они јони који имају m/z вредност већу од критичне вредности до које се сви јони дестабилишу на шипкама квадрупола. Негативан једносмерни напон привлачиће позитивне јоне ка шипкама квадрупола с тенденцијом да у њих ударе. Ови јони могу бити „спашени“ само под дејством наизменичног напона, али само уколико су довољно „лаки“ и могу на време да промене правац свог кретања. У овом случају, до детектора ће стићи само они јони који имају m/z вредност мању од критичне вредности [79–81]. Поједностављена трајекторија јона кроз квадрупол приказана је на слици 13.

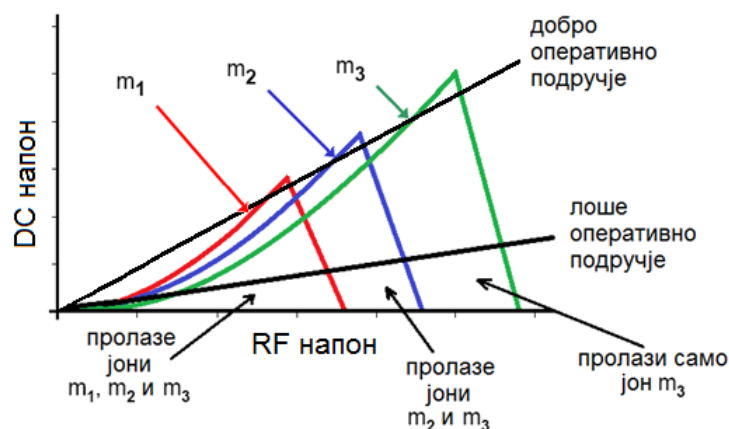


Слика 13. Пролазак јона кроз квадрупол

Figure 13. Ions passing through quadrupole

У одређеном времену, само јони са веома уским опсегом m/z вредности имаће стабилне трајекторије и успешно пролазити до детектора. Сви остали јони са вишим или нижим m/z вредностима имаће нестабилне путање и због тога остати недетектовани.

Путања јона се математички може описати веома комплексном Метјуовом (Mathieu) једначином, која се графички може представити на следећи начин:



Слика 14. Графички приказ региона стабилности јона различитих маса

Figure 14. Graphical presentation of stability region for ions of different mass

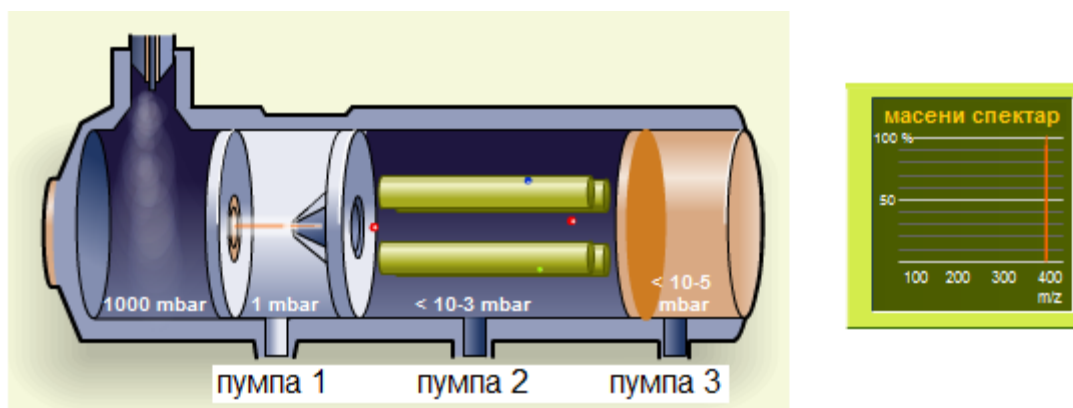
Снимање масеног спектра изводи се променом једносмерног и наизменичног напона, при чему је њихов однос константан.

У модерним лабораторијама, анализатори типа квадрупола имају две конфигурације. Веома често су повезани са гасним или течним хроматографом и служе за извођење једноставног високопропусног скрининга. Међутим, у случајевима када је структура анализата позната, квадрупол се може фокусирати само на један јон, одређене m/z вредности, (енг. *Single Ion Monitoring*, SIM) чиме се повећава осетљивост. Детектор у овом случају не снима масени спектар, већ зависност интензитета одабране m/z вредности од времена. Изводљиво је и снимање више одабраних јона, истовремено или током одређених временских сегмената (енг. *Multiple Ion Monitoring*, MIM).

Анализатори типа квадрупола се користе за квантификацију анализата, али нису погодни у случајевима када је потребно знати тачну молекулску масу. Ограничења анализатора типа квадрупола су: мала резолуција (< 5000), недовољна тачност маса (> 100 ppm) и ограничен опсег маса (најчешће до 3000).

Опсег маса и резолуција инструмента зависе од дужине и дијаметра шипки.

Информације које даје масени спектар зависе и од методе јонизације која је примењена. Када се користе класичне методе јонизације, као што су EI и CI, масени спектри најчешће садрже велику количину фрагментних јона који се могу искористити да потврде или разјасне хемијску структуру. Код модернијих метода јонизације, као што су ESI или MALDI, спектри најчешће садрже само јонизовани молекул, па се не могу искористити за структурну карактеризацију. На слици 15 приказани су јонизација узорка, пролазак кроз квадруполни анализатор и изглед масеног спектра.



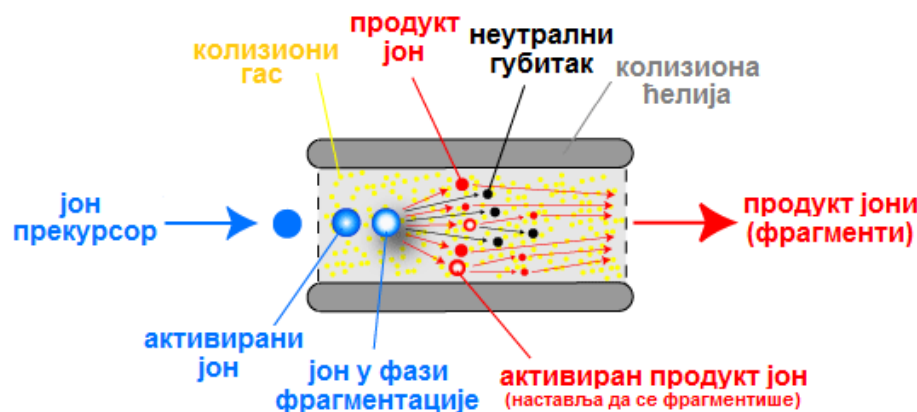
Слика 15. Пролазак узорка кроз масени спектрометар

Figure 15. The sample passing through a mass spectrometer

Квадрупולי се такође могу поставити у пару, и на тај начин се добијају анализатори типа троструког квадруполоа [82, 83]. У овом случају, први квадрупол се користи за изоловање јона прекурсора, други квадрупол функционише као колизиона ћелија, а трећи квадрупол анализира јоне настале фрагментацијом јона прекурсора у првом квадруполу.

Јон прекурсор у колизионој ћелији подлеже фрагментацији, формирајући продукт јоне. Најчешће коришћена метода фрагментације је колизионо-индукована дисоцијација (енг. *Collision Induced Dissociation*, CID), која се често назива и колизионо-активиран распад (енг. *Collisionally Activated Decomposition*,

CAD). Шема овог процеса приказана је на слици 16. Јон прекурсор улази у колизиону ћелију у којој се налази хемијски инертан колизионни гас – аргон, хелијум, азот или угљен-диоксид, под високим притиском.



Слика 16. Шема колизионо-индуковане дисоцијације

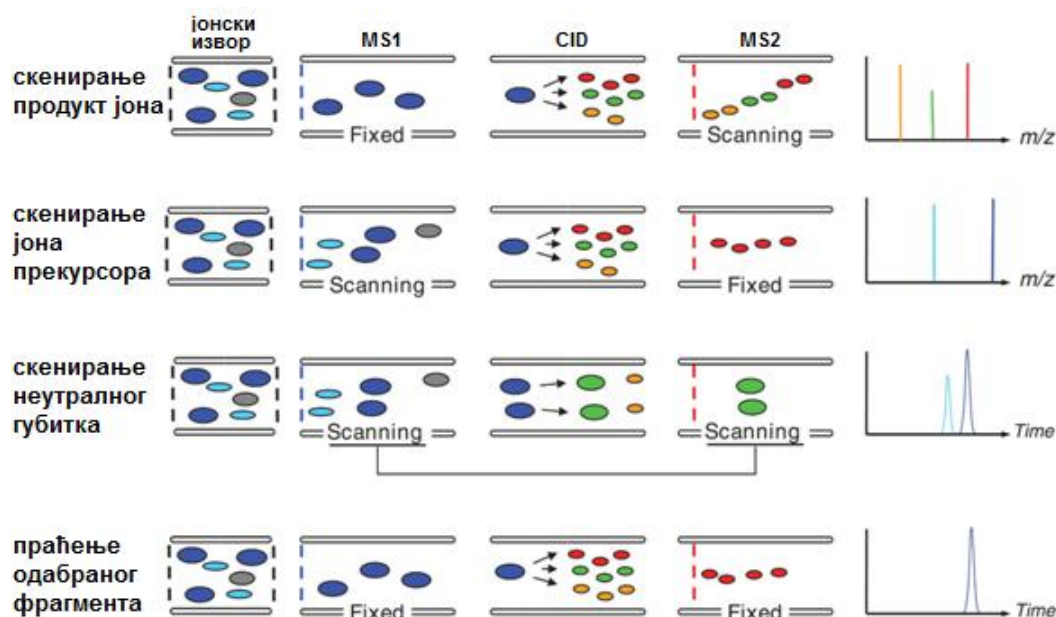
Figure 16. A scheme of CID fragmentation

Јон прекурсор подлеже поновљеним сударима са молекулама колизионог гаса чиме му се доводи потенцијална енергија све док се не достигне праг фрагментације и формирање продукт јона. Образац фрагментације зависи од типа продукт јона и количине енергије. При нижим енергијама, реакције фрагментације најчешће подразумевају неутрални губитак (молекула воде, метанола, угљен-моноксида, угљен-диоксида, ацетонитрила), који се не сматра структурно значајним, иако се може искористити за добијање података о присутним функционалним групама. При вишим енергијама, често се дешавају реакције ретро-синтезе. Оне су значајније, с обзиром да се раскидање молекула врши на карактеристичним местима. Ако је енергија превисока, може доћи до раскидања C-C везе и неконтролисане фрагментације, што свакако треба избегавати [84].

Троструки квадруполи омогућавају извођење додатних типова скенирања јона, као што су скенирање продукт јона, скенирање јона прекурсора, скенирање неутралног губитка и праћење одабраног фрагмента, односно праћење вишеструке фрагментације (слика 17) [65, 68, 85]:

1. скенирање продукт јона (енг. *Product Ion Scan*) – први квадрупол је фокусиран на јон прекурсор, он се доводи до колизионе ћелије у којој ступа у интеракцију са колизионим гасом и фрагментише се. Трећи квадрупол затим скенира настале продукт јоне и као резултат се добија њихов спектар,
2. скенирање јона прекурсора (енг. *Precursor Ion Scan*) – у овом случају трећи квадрупол је фокусиран на мерење одређеног фрагмента, док први квадрупол скенира све јоне. Као резултат добија се спектар јона прекурсора који транзицијом дају одређени продукт јон,
3. скенирање неутралног губитка (енг. *Neutral Loss Scan*) – оба квадрупола скенирају јоне, а резултат је спектар јона прекурсора који након фрагментације имају идентичан губитак неутралне масе. У случају анализе глукуронида, као метаболита друге фазе метаболизма, трећи квадрупол се подешава тако да скенира јон који је за 176 Da лакши од јона прекурсора на који је фокусиран први квадрупол. $\Delta m/z$ од 176 одговара неутралном губитку за глукурониде,
4. праћење одабраног фрагмента или праћење вишеструке фрагментације (енг. *Selected Reaction Monitoring*, SRM или *Multiple Reaction Monitoring*, MRM*) – први квадрупол фокусиран је на јон прекурсор ($[M+H]^+$ или $[M-H]^-$), а трећи на његов најинтензивнији продукт јон. Модерни масени спектрометри овако могу истовремено посматрати на десетине молекула, преко њихових специфичних MRM транзиција. Квантификација се најчешће изводи на овај начин, чак и у случајевима веома комплексних смеша. Образац фрагментације представља јединствену карактеристику анализата, а постојање интерференција од супстанци које имају исту масу јона прекурсора и дају исте продукт јоне, мало је вероватно.

*SRM и MRM су два појма који означавају исти начин снимања масеног спектра помоћу троструких квадруполних масених анализатора, при чему је SRM појам уведен од стране компаније *Thermo Fisher Scientific*, а MRM од стране компаније *Waters*.



Слика 17. Режији рада тандем масеног спектрометра

Figure 17. Operation modes of a tandem mass spectrometer

У ESI-MS/MS често је пожељно извршити фрагментацију више од једног јона прекурсора исте супстанце, нпр. протонованог молекула $[M+H]^+$ и адукта са натријумом $[M+Na]^+$. Због различитих процеса у гасној фази, могу настати различити продукт јони. Натријум је као катјон у могућности да стабилизује одређене структуре хелатизацијом, чиме се онемогућавају неки од путева фрагментације, док је протон способан да иницира реакције са хетероатомима, као што су кисеоник и азот.

1.3.4. ДЕТЕКТОРИ

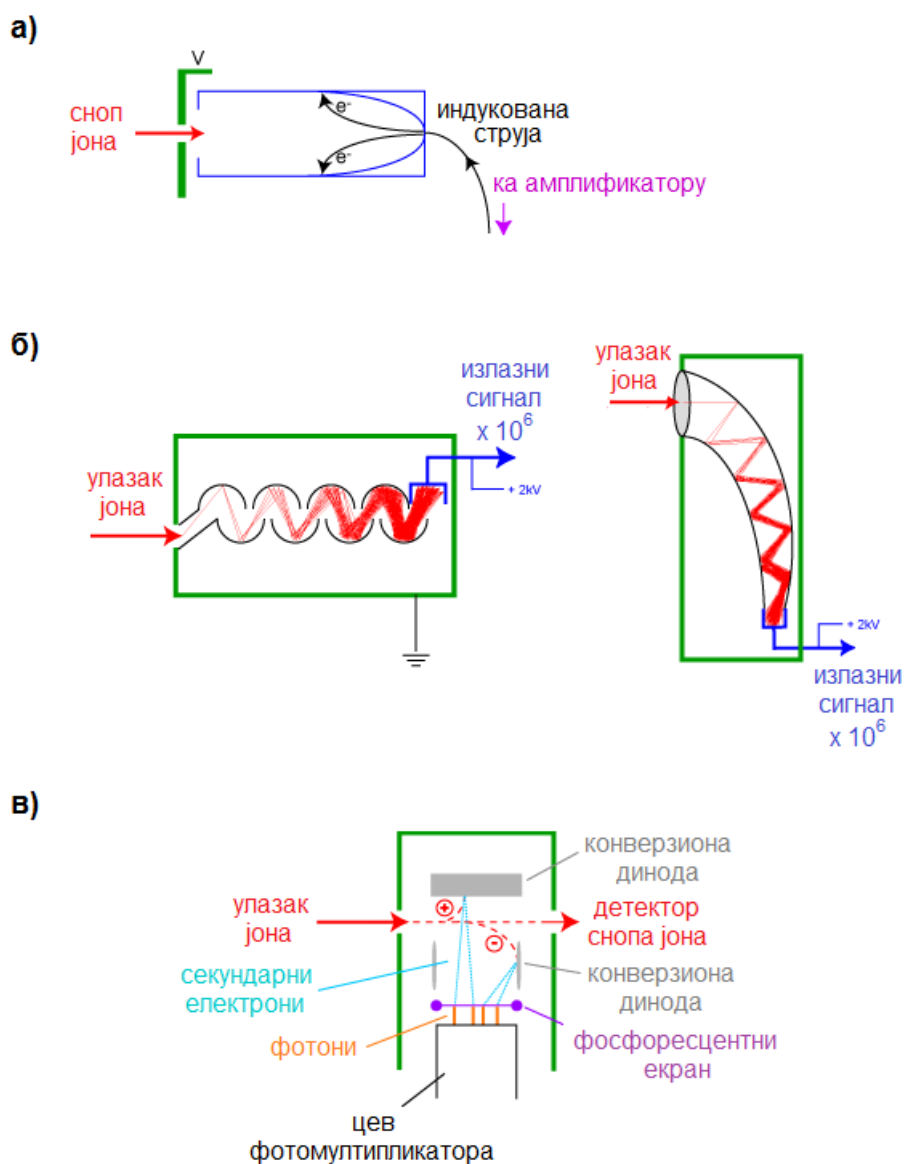
Анализа јона, односно њихово раздвајање на основу m/z вредности, само је део онога што ради масени спектрометар. Без неког облика тачне и поуздане детекције јона, сви претходни догађаји били би бесмислени. Готово сви масени спектрометри, изузев FTICR, који сам по себи представља комбинацију анализатора и детектора, захтевају детектор јона. Избор детектора зависи од дизајна инструмента и типа експеримента који се изводи. Сигнал на детектору

ствара се продукцијом електрона и даљом амплификацијом, или индуковањем струје настале кретањем наелектрисања. Најранији детектори били су састављени од фотографских плоча, постављених на крај анализатора. Сви јони задате m/z вредности ударили би у исто место на фотографској плочи, стварајући мрљу чије затамњење је било повезано са интензитетом одређеног јона. Најчешће коришћени детектори су Фарадејев цилиндар, електрон-мултипликатор и фото-мултипликатор односно сцинцилациони бројач (слика 18) [86].

Код Фарадејевог цилиндра јони ударају у површину диноде која емитује електроне и изазива струју. Динода је направљена од материјала као што је цезијум-антимонид, галијум-фосфид или берилијум-оксид.

Електрон-мултипликатори су најчешће коришћени инструменти за детекцију јона, нарочито када је потребно детектовати и позитивне и негативне јоне. Постоје два типа овог детектора чији је принцип функционисања заснован на Фарадејевом цилиндру. У обе варијанте, јони пролазе конверзиону диноду, у зависности од наелектрисања и ударају у површину прве амплификационе диноде уз емисију електрона, који су онда привучени или другом динодом, или континуираном динодом, при чему се ствара све више и више електрона. Амплификација сигнала износи милион пута.

Код фото-мултипликатора, јони најпре ударају у диноду, избијајући електроне. Они затим долазе до фосфорне плоче са које се ослобађају фотони, а они даље пролазе кроз мултипликатор где се дешава каскадна амплификација. Главна предност фотона је то што мултипликатор може бити затворен у вакууму чиме се спречава контаминација и значајно продужава животни век детектора.



Слика 18. Типови детектора: а) Фарадејев цилиндар, б) електрон-мултипликатор и в) фото-мултипликатор

Figure 18. Types of detectors: а) Faraday cup, б) electron-multiplier and в) photo-multiplier

1.4. ДЕРИВАТИЗАЦИЈА АНАЛИТА

Модерна фармацеутска анализа данас се ослања на прегршт различитих инструменталних метода и апарата који нуде решење готово сваког аналитичког проблема. Међутим, и даље постоје случајеви у којима је, и поред најприкладнијег система доступног за анализу, сам процес ограничен секундарним карактеристикама анализата, као што су његов облик, састав и количина расположивог узорка.

Процедура која се успешно суочава са наведеним изазовима јесте хемијска дериватизација. Њоме се мењају карактеристике анализата, како би се учинио погодним за анализу. Домет једне овакве модификације се можда најбоље може сагледати на примеру гасне хроматографије чије би могућности биле знатно ограничене без грађења испарљивих једињења дериватизацијом. Овом променом значајно се повећавају осетљивост и селективност, а неопходна је уколико су анализи присутни у траговима, као и за раздвајање енантиомера.

Критеријуми који се разматрају приликом одабира реагенса за дериватизацију односе се на [87, 88]:

1. принос – реакције са ниским приносом деривата нису погодне, као ни реакције у којима се формирају споредни производи,
2. брзину реакције – пожељно је да реакција буде брза и да се дериват формира одмах или кроз мали број интермедијера. Уколико је изводљиво, најбоље је дериватизацију изводити у току саме анализе,
3. услове реакције – пожељно је да се реакција дериватизације одиграва под истим условима (температура, притисак, итд) који су у систему заступљени током саме анализе. Уколико се аналит дериватује током фазе која претходи анализи, захтеви везани за услове су флексибилнији и односе се углавном на доступност лабораторијске опреме потребне за извођење реакције дериватизације,
4. једноставност и економичност – реакције дериватизације увек се разматрају у контексту развијања метода погодних за рутинску анализу узорака, а које

треба да буду једноставне и јефтине. Употреба скувих реагенса за дериватизацију или катализатора додатно усложњава анализу, повећавајући њену цену,

5. област примене – уколико се реакција дериватизације може применити на више сличних структура, то је добро, јер се повећава број анализата који се истовремено могу одређивати. С друге стране, реакција дериватизације може послужити и за раздвајање две супстанце, чиме се постиже селективност,
6. токсичност реагенса за дериватизацију по људе и околину.

У зависности од тренутка у коме се изводи, дериватизација може бити преколонска (енг. *pre-column*), која се изводи мануелно или аутоматски и постколонска (енг. *post-column*), која се изводи једино аутоматски. За преколонску дериватизацију неопходно је познавати стехиометрију реакције и структуру деривата, затим, реакција треба да буде брза, квантитативна и репродуктивна, настали деривати треба да су стабилни и да се могу раздвојити од полазног материјала. Код постколонске дериватизације захтева се брза и репродуктивна реакција, мада стабилност деривата није неопходна, а пожељно је да реагенс за дериватизацију буде са што слабијим одговором на детектору и да се додаје у што мањој запремини како би се смањило разблаживање [87].

1.4.1. ДЕРИВАТИЗАЦИЈА У ТЕЧНОЈ ХРОМАТОГРАФИЈИ–МАСЕНОЈ СПЕКТРОМЕТРИЈИ

За разлику од гасне хроматографије у којој се дериватизација примењује за побољшање испарљивости и стабилности анализата на повишеној температури, и течне хроматографије када се дериватизацијом једињења преводе у облик погодан за UV, флуоресцентну или електрохемијску детекцију, дериватизација у течној хроматографији–масеној спектрометрији најчешће није неопходна. За већину једињења, било да она садрже хромофоре или не, велика осетљивост својствена масеној спектрометрији омогућава њихову директну детекцију. Проблем се јавља код супстанци које у својој структури немају групе које могу да јонизују (нпр. стероиди) или цвитерјона, где је истовремено постојање позитивног и негативног наелектрисања одговорно за слаб сигнал.

Као процедура која изискује додатни утрошак времена и новца, дериватизација у овом случају мора пружити специфичну предност. Разлози за постојање још једне фазе најчешће се односе на повећање сигнала, и последично, постизање боље осетљивости методе. Код супстанци типа цвитерјона дериватизацијом се елиминише једна врста наелектрисања, или се додаје перманентно наелектрисање.

Реакција дериватизације примењена у масеној спектрометрији са циљем унапређења њених карактеристика заснива се на [89]:

1. увођењу група које су способне да стабилизују наелектрисање, чиме се продужава време детекције јона,
2. увођењу група које имају перманентно наелектрисање, чиме се од почетка обезбеђују наелектрисани молекули, независно од јонизације у јонском извору,
3. модификацији вредности површинског напона капи, чиме се утиче на степен јонизације, а што је последица повећања липофилности,
4. модификацији фрагментације – дериватизовани молекули се може фрагментисати другачије од недериватизованог. Сличне хемијске структуре, након дериватизације могу давати идентичне фрагменте, што заправо представља карактеристичан „*finger print*“ групе једињења, као што су, нпр. алкилкарнитини који детектовани као бутил-естри сви имају стабилан фрагмент m/z 85.

Два су основна услова које реагенс за дериватизацију у масеној спектрометрији треба да испуни: а) да је наелектрисан или да у својој структури садржи групу која се лако може протонovati и б) да садржи функционалну групу која ступа у хемијску реакцију са аналитом. Структура и маса реагенса за дериватизацију бирају се у зависности од конкретног аналитичког проблема, али правило које генерално важи јесте да су реагенси мањих молекулских маса одговорни за мање повећање масе и у могућности су да изврше дериватизацију стерно заклоњених група, док дериватизациони реагенси већих молекулских маса

доводе до већег повећања масе, а настали јони су лоцирани у региону масеног спектра са мање интерференција [89].

Како би се током анализе применом електроспреј јонизације достигла адекватна осетљивост, аналит иницијално мора бити у облику јона или се наелектрисати формирањем адукта у гасовитој фази [70]. Такође, пожељно је да у својој структури садржи неполарни регион, јер се хидрофобне супстанце добро раздвајају од соли и интерферирајућих компоненти одговорних за јонску супресију [90]. Неполарни јони имају већи афинитет за гасовито стање и налазе се на површини капи. Њихов прелазак у гасовиту фазу биће лакши од јона који се налазе у унутрашњости капи [70, 91–93]. Овакви аналити се такође елуирају мобилним фазама које садрже већи проценат органског растварача, који је важан за генерисање наелектрисаних капи електроспрејом [70]. На крају, пожељно је да се аналит ефикасно фрагментише колизионо-индукованом дисоцијацијом и да ствара интензивне продукт јоне који ће омогућити осетљиву детекцију.

У течној хроматографији–тандем масеној спектрометрији (енг. *Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*, LC–MS/MS), фрагмент добијен из дериватизоване супстанце може се класификовати као [94]:

1. фрагмент који потиче од реагенса за дериватизацију – представља веома специфичан индикатор за детекцију једињења која припадају сличној групи. На хроматограму ће се појавити велики број пикова, па је због тога неопходна ефикасна сепарациона техника,
2. фрагмент који потиче од интактног аналита – служи за специфичну детекцију анализиране супстанце, али се формирање овог фрагмента не може контролисати,
3. фрагмент који потиче од дериватизованог аналита – такође служи за специфичну детекцију анализиране супстанце, али има флексибилнију структуру.

1.4.1.1. Дериватизација карбоксилне функционалне групе

Присуство карбоксилне групе омогућава јонизацију молекула. Ипак, у неким случајевима то није довољно за постизање одговарајуће осетљивости, јер постоји утицај других карактеристика молекула, конкурентна јонизација других функционалних група, или потреба за истовременом анализом са молекулима који не формирају стабилне анјоне. Дериватизација карбоксилне функционалне групе обично подразумева њено превођење у естар или амид.

У литератури су описани бројни реагенси за дериватизацију карбоксилне функционалне групе [95–110], а њихове структуре приказане су у табели П1 (видети Прилоге дисертације).

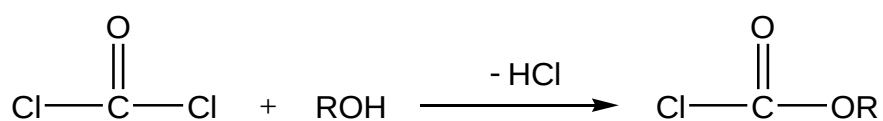
1.4.1.2. Дериватизација аминокиселинских функционалних група

Због своје базности, амини се лако протонују или ступају у реакцију са катјонима. Циљ дериватизације аминокиселинских група у течној хроматографији–масеној спектрометрији јесте повећање осетљивости и могућност разликовања примарних, секундарних и терцијарних амина.

У литератури су описани бројни реагенси за дериватизацију аминокиселинских функционалних група [111–133], а њихове структуре приказане су у табели П2 (видети Прилоге дисертације).

1.4.2. АЛКИЛХЛОРОФОРМАТИ КАО РЕАГЕНСИ ЗА ДЕРИВАТИЗАЦИЈУ

Хлороформати хемијски представљају естре хипотетичне хлороформне киселине, ClCOOH , а настају у реакцији између фосгена и алкохола, као што је приказано на слици 19. Транспортују се у цистернама од нерђајућег челика, посебно обложеним, како би се обезбедила заштита од корозије. Треба их чувати на хладном и сувом месту, пожељно у фрижидеру, нарочито током дужег периода [134]. Комерцијално доступни хлороформати приказани су у табели ПЗ (видети Прилоге дисертације).



Слика 19. Реакција добијања хлороформата

Figure 19. Chloroformate synthesis reaction

Хлороформати су бистре, безбојне течности, ниске температуре замрзавања и релативно високе температуре кључања ($> 100^\circ\text{C}$). За њихову термалну стабилност одговоран је алкил супституент. Хлороформати су растворни у већини органских растварача, а нерстворни су у води, иако у њој хидролизују. Физичке карактеристике одабраних *n*-алкилхлороформата представљене су у табели 3.

Хлороформати се карактеришу високом реактивношћу. У реакцији са водом хидролизују до одговарајућег алкохола, који затим са хлороформатом даје симетрични карбонат. Исти производ настаје и у реакцији са алкалним хидроксидима. Хлороформати такође реагују са алкохолима и тиолима, градећи карбонате и монотиолокарбонате, а са фенолима реагују тек на повишеној температури и у присуству катализатора. У реакцији са карбоксилним киселинама настаје мешовити анхидрид, који даље у присуству катализатора даје смешу естра, карбоната и анхидрида. Хлороформати реагују и са епоксидима, алдехидима, аминима, аминок-алкохолима и аминок-фенолима, дајући различите

производе као што су β -хлоро супституисани карбонати, 1-хлоро карбонатни естри и карбамати.

Због своје изузетне реактивности, хлороформати се сматрају општим реагенсима за дериватизацију у гасној и течној хроматографији, нарочито за једињења које садрже amino и карбоксилну функционалну групу. Након дериватизације хлороформатима, ова поларна једињења се једноставно и брзо трансформишу у супстанце погодне за анализу првенствено применом гасне хроматографије. Тако је изобутилхлороформат успешно примењен за одређивање биогених амина у пиву и вину [135, 136], етилхлороформат за одређивање бисфенола А у води и млеку [137], а метилхлороформат за квантификацију слободних масних киселина у серуму [138]. Применом течне хроматографије–масене спектрометрије и дериватизације са етилхлороформатом анализирани су ароматични амини у полиуретанској пени [139–142], катехоламини у хуманој плазми [143], односно урину [144] и линсидомин у хуманој плазми [145]. На исти начин, али коришћењем изобутилхлороформата, одређивани су полиамини у урину и серуму [146].

Табела 3. Физичке карактеристике одабраних хлороформата

Table 3. Physical characteristics of selected chloroformates

Хлороформат	Молекулска маса	Специфична густина	Индекс рефракције	Температура испаривања °C		Вискозитет	Температура кључања °C		
				отворен	затворен		2,67	13,3	101,3
				суд	суд		kPa	kPa	kPa
метил	94,50	1,250	1,3864	24,4	17,8	-	-	-	71,0
етил	108,53	1,138	1,3950	27,8	18,3	-	-	-	94,0
<i>n</i> -пропил	122,55	1,091	1,4045	34,4	-	0,80	25,3	57,5	112,4
<i>n</i> -бутил	136,58	1,0585	1,4106	52,2	46,0	0,888	44,0	77,6	-

1.4.2.1. Истовремена дериватизација аминокиселина и карбоксилних група

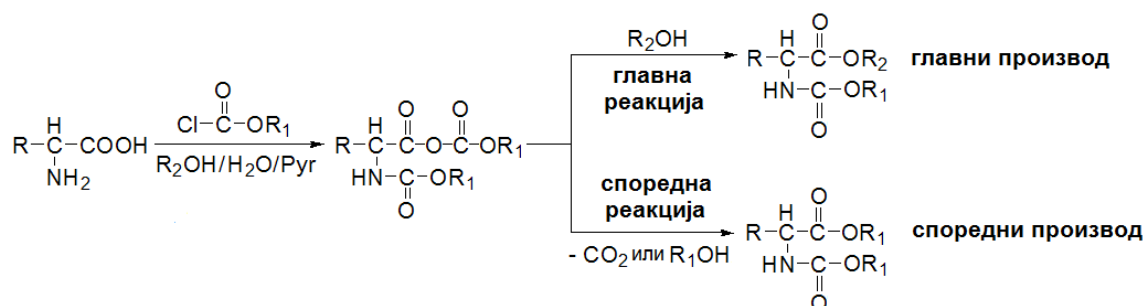
Реакције дериватизације најчешће се изводе коришћењем неполарних реагенса, у присуству органских растварача, некомпатибилних са воденим медијумом присутним у биолошком материјалу. Насупрот томе, хлороформати су постали опште прихваћени дериватизациони реагенси за конверзију амина до карбамата у воденим пуферским системима. Реакција се одиграва брзо на собној температури, па су због тога 9-флуоренилметилхлороформат и остали волуминозни хлороформати радо коришћени реагенси за LC анализу аминокиселина, дериватизацијом њихове аминокиселинских група.

Значајан помак у анализи једињења са карбоксилном функционалном групом начињен је открићем да хлороформати могу да естерификују карбоксилну функционалну групу у воденом медијуму, при чему као интермедијери настају тзв. мешовити анхидриди. Масне и кето киселине, дикарбоксилне киселине, ароматичне киселине, као и хидрокси карбоксилне киселине, анализирани су након дериватизације различитим алкилхлороформатима [147].

Аминокиселине, као полифункционални аналити, такође се могу дериватизовати хлороформатима. Овај поступак подразумева једноставан третман узорка у воденом медијуму, чије трајање се мери секундама, уз додатак микролитарских количина јефтиног реагенса, и као такав испуњава све критеријуме идеалне процедуре дериватизације. Модификација реакционих услова у смислу коришћења хлороформата и алкохола различитог алкил супституента, показала се као корисна додатна надоградња постојеће процедуре. Овим се отворила могућност за припремање широког спектра деривата, а према специфичним потребама анализе. Атрактивност овог необично једноставног приступа брзо је препозната, уз велики број процедура за одређивање аминокиселина у различитом материјалу. Описане су различите методе за одређивање једињења типа аминокиселина у крви [148], плазми [149], урину [150, 151], меду [152], дијететским суплементима [153] и физиолошким узорцима [154], применом GC-MS. У хуманом урину [155], мозгу пацова [156], бактерији *Escherichia coli* [157] и цијанобактеријама [158], аминокиселине су одређиване методом LC-MS/MS. На пољу метаболичког профилисања, још једне атрактивне

области модерне фармацеутске анализе, алкилхлороформати су искоришћени за GC анализу аминокиселина [159], или аминокиселина у комбинацији са органским киселинама [160–162] и аминима [163, 164], као и за неусмерено метаболичко профилисање [165, 166].

Како би се до детаља разумео сам механизам реакције, дериватизација је извођена са хлороформатима и алкохолима различитог алкил ланца. Са великом вероватноћом доказано је формирање естра након реакције алкохолизе мешовитог анхидрида. Испитивањем различитих комбинација хлороформата и алкохола, закључено је да мешовити анхидрид подлеже реакцији замене алкил радикала са оним присутним у структури алкохола, чиме се формира главни производ. Међутим, настаје и мала количина споредног производа који садржи исти алкил радикал у оквиру естарске функционалне групе као и примењени хлороформат, а настанак овог производа приписује се реакцији декарбоксилације или алкохолизе дејством алкохола ослобођеног из коришћеног хлороформата [167]. Шема реакције дериватизације са формирањем главног и споредног производа, приказана је на слици 20.



Слика 20. Реакција дериватизације једињења са аминок и карбоксилном групом применом алкилхлороформата

Figure 20. Derivatization reaction of the compounds containing amino and carboxylic groups by using alkyl chloroformates

Хлороформати, посебно они малих молекулских маса, супстанце су које изазивају сузе (лакриматори). Такође доводе и до тешких оштећења и иритације коже, слузнице и очију, уз тешке опекотине и могућа иреверзибилна оштећења

ткива (везиканти). Удисање испарења хлороформата малих молекулских маса изазива кашаљ, гушење и поремећаје дисања. Инхалација метилхлороформата може бити фатална због развоја плућног едема, а који се може јавити чак неколико сати након излагања.

1.5. АНАЛИТИКА ЦВИТЕРЈОНСКИХ АНТИЕПИЛЕПТИКА

1.5.1. ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКЕ ОСОБИНЕ ЦВИТЕРЈОНСКИХ АНТИЕПИЛЕПТИКА

Цвитерјонска структура вигабатрина, прегабалина и габапентина рефлектује се и на њихове физичко-хемијске особине.

Вигабатрин је бео или скоро бео прашак, лако растворан у води, тешко растворан у метанолу, врло тешко растворан у етанолу и хлороформу и нерастворан у толуену и хексану. При физиолошком рН, партициони коефицијент *n*-октанол/вода износи око 0,011 ($\log P = -1,96$). Константе дисоцијације (pK_a) вигабатрина су 4,0 и 9,7 на собној температури [40].

Прегабалин је бела или скоро бела кристална супстанца, са $pK_{a1} = 4,2$ и $pK_{a2} = 10,6$. Лако је растворан у води и растворима киселина и база. У систему *n*-октанол/0,05 mol/L фосфатни пуфер, $\log P$ вредност износи -1,35 [51].

Габапентин је бели или скоро бели кристални прашак са $pK_{a1} = 3,7$ и $pK_{a2} = 10,7$. Лако је растворан у води и воденим растворима база и киселина. У систему *n*-октанол/0,05 mol/L фосфатни пуфер, $\log P$ вредност износи -1,25 [60]. Као супстанца официналан је у Ph. Eur. 8 [168].

1.5.2. АНАЛИТИКА ВИГАБАТРИНА

Прегледом литературе, пронађен је одређени број публикација које користе различите методе за квантификацију вигабатрина, самог или у комбинацији са другим антиепилептицима. Овде ће бити приказани само радови у којима се као метода примењује масена спектрометрија у комбинацији са гасном или течном хроматографијом.

Фармакокинетика енантиомера вигабатрина проучавана је коришћењем различитих GC–MS протокола. Прва описана процедура датира из 1983. године када су Хегеле (Haegeler) и сарадници [169] у телесним течностима квантификовали *R*-(–) и *S*-(+) енантиомере вигабатрина након дериватизације, као *N*-трифлуороацетил-*O*-метил естре. Раздвајање дериватизованих енантиомера и интерног стандарда, *S*-(+)- γ -ацетиленске GABA, постигнуто је коришћењем 25 m $\times$ 0,92 mm O.D. капиларне колоне обложене L-валин-*tert*-бутиламидом у комбинацији са алкилсилоксанским полимером. Калибрациона крива конструисана је у опсегу од 2,5 nmol/L до 20 nmol/L. Реј (Rey) и сарадници [170] модификовали су постојећу процедуру и применили је за одређивање енантиомера вигабатрина у узорцима плазме. Узорак је третиран са пропанолом у хлороводоничној киселини, а затим са анхидридом трифлуоросирћетне киселине. Раздвајање дериватизованих енантиомера постигнуто је на 25 m $\times$ 0,22 mm *Chirasil-L-Val* колони, након хемијске јонизације и праћењем одабраних јона *m/z* 268 за γ -винил GABA и *m/z* 266 за γ -ацетилен GABA као интерни стандард. Опсег калибрационе криве био је од 5 mg/L до 50 mg/L. Исту процедуру користили су и Хегеле (Haegeler) и Шехтер (Schechter) [171] за испитивање кинетике енантиомера вигабатрина код одраслих након *per os* примене рацемата односно само активног *S*-(+) енантиомера. Није примећена хирална инверзија у *in vivo* условима.

За директну квантификацију вигабатрина у плазми примењена је LC–MS/MS метода [172]. Узорци су припремани преципитацијом протеина ацетонитрилом. Вигабатрин и интерни стандард, 4-фенил-4-аминобутерна киселина, детектовани су праћењем MRM транзиција *m/z* 129,57 $\rightarrow$ 70,99 за вигабатрин и 179,7 $\rightarrow$ 116,92 за интерни стандард, коришћењем *Xterra*TM C18 колоне и мобилне фазе састава ацетонитрил – вода (50:50 V/V) уз додатак 0,025% мравље киселине, при брзини протока од 0,1 mL/min. Линеарност је потврђена у опсегу 0,5 mg/mL – 10 mg/mL.

1.5.3. АНАЛИТИКА ПРЕГАБАЛИНА

Масена спектрометрија, у комбинацији са течном или гасном хроматографијом, коришћена је за одређивање прегабалина у узорцима биолошког материјала.

Применом GC–MS, а након дериватизације етилхлороформатом, прегабалин је квантификован у узорцима урина и у комерцијално доступним капсулама [173]. Као стационарна фаза коришћена је *Elite5MS* колона, 60 m × 0,25 mm, обложена филмом од 5% дифенилполисилоксана и 95% диметилполисилоксана, 0,25 µm дебљине. У раду су испитане и оптимизоване две методе микро-екстракције, при чему се као боља показала течно-течна микро-екстракција, због краћег времена трајања анализе и економичности.

Применом LC–MS/MS, прегабалин је квантификован у узорцима хумане плазме. Ваидија (Vaidya) и сарадници [174] поставили су методу за директно одређивање прегабалина, након преципитације протеина ацетонитрилом, у опсегу од 10 ng/mL до 10000 ng/mL. Коришћена је *Thermo Hypurity C18* колона (50 mm × 4,6 mm, 5 µm величине честица), уз мобилну фазу ацетонитрил – 2 mmol/L амонијум-ацетат (80:20 V/V). Прегабалин и интерни стандард, метаксалон, детектовани су у позитивном режиму рада на троструком квадрупол масеном спектрометру праћењем транзиција 160,2→142,2 за прегабалин и 222,2→161,1 за метаксалон.

Мандал (Mandal) и сарадници [175] поставили су методу за директно одређивање прегабалина у хуманој плазми, након преципитације протеина 20% трихлоросирћетном киселином. Анализа је рађена на *Gemini C18* колони (50 mm × 2,0 mm, 3 µm величине честица) уз мобилну фазу састава метанол – вода (98:2 V/V) са 0,5% V/V мравље киселине. Брзина протока мобилне фазе била је 1 mL/min. MS/MS детекција постигнута је праћењем следећих *m/z* транзиција: 160,2→55,1 за прегабалин и 172,2→67,1 за габапентин као интерни стандард. Линеарност методе испитана је у опсегу од 0,1 µg/mL до 15 µg/mL.

Шах (Shah) и сарадници [176] развили су методу за одређивање прегабалина у плазми, након депротеинизације 0,1% мрављом киселином и течно-течне екстракције метилен-хлоридом. Прегабалин и интерни стандард,

габапентин, детектовани су у позитивном ESI–MS/MS режиму рада, на *Hypurity advance* колони (50 mm × 4,6 mm, 5 µm величине честица), уз мобилну фазу састава метанол – 0,1% мравља киселина (80:20 V/V) и брзину протока од 0,250 mL/min. Коришћене транзиције за јон прекурсор → продукт јон биле су 160,2→55,1 (прегабалин) и 172,2→95,0 (габапентин). Метода је валидирана у опсегу од 99,79 ng/mL до 4019, 90 ng/mL.

Ума (Uma) и сарадници [177] такође су развили и валидирали методу за квантификацију прегабалина у хуманој плазми, након преципитације протеина 20% трихлорсирћетном киселином и чврсто-течне екстракције на *Strata X* 33 µm кертрицима. Сепарација је постигнута на *Kromasil 100 C18* колони, 3,5 µm величине честица, уз мобилну фазу састава ацетонитрил – 0,5% мравља киселина (80:20 V/V). За MS/MS детекцију праћени су следећи протоновани јони формиран турбо-спрејом: 160,2→55,1 (прегабалин) и 264,2→58,1 (трамадол као интерни стандард). Калибрациона крива конструисана је у опсегу од 50,00 ng/mL до 8003,55 ng/mL.

У склопу фармакокинетичких испитивања прегабалина у плазми пацова, за квантификацију је постављена LC–MS/MS метода која се базирала на чврсто-течној екстракцији и коришћењу *Thermo Hypurity C18* хроматографске колоне (150 mm × 4,6 mm, величине честица 5 µm), за опсег концентрација од 0,50 ng/mL до 20000 ng/mL уз деутеризовани прегабалин као интерни стандард [178].

Такође у плазми пацова, прегабалин је одређиван у комбинацији са силденафилом и његовим метаболитом, деметилсилденафилом, применом LC–MS/MS методе, након аутоматизоване чврсто-течне екстракције и коришћењем *Chromolith Speed Rod RP-18e*, 50 mm × 4,6 mm колоне [179]. Састав мобилне фазе вариран је према програму градијента уз брзину протока од 3 mL/min. Квантификација прегабалина у опсегу од 70 ng/mL до 10000 ng/mL вршена је праћењем транзиције 160,0→142,0.

Хирална сепарација изомера прегабалина описана је у раду Џанга (Zhang) и сарадника [180], коришћењем гликопептидне стационарне фазе *Chirobiotic T* (теикопланин, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm величине честица) уз мобилну фазу

етанол – 10 mmol/L амонијум-ацетат, рН 5,5 подешен сирћетном киселином (80:20 V/V) и при брзини протока од 1,2 mL/min. Прегабалин је детектован у позитивном режиму рада, праћењем транзиције m/z 160→142. Метода је примењена за одређивање прегабалина у бубрежном перфузату, префузату ултрафилтрату и урину пацова у опсегу од 50 ng/mL до 20000 ng/mL.

Прегабалин је одређиван и у коси [181], применом унапређене технике течне хроматографије ултра високих перформанси (енг. *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) и MS/MS методе у позитивном режиму рада, праћењем четири најинтензивније транзиције за прегабалин, 160,03→124,78, 160,03→97,04, 160,03→82,98 и 160,03→54,99. Хроматографско раздвајање постигнуто је на колони ВЕН C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μ m величине честица) уз вишестепени линеарни градијент растварача А (вода – ацетонитрил са 0,5% мрављом киселином, 95:5, V/V) и растварача Б (ацетонитрил са 0,5% мрављом киселином). Метаквалон је коришћен као интерни стандард, а линеарност је испитана у опсегу од 50 pg/mg до 1600 pg/mg.

У смеши са гама-хидроксибутиратом (GHB), бета-хидроксибутиратом (BHB), 1,4-бутан-диолом (1,4BD) и гама-бутиролактоном (GBL), прегабалин је одређиван у крви и урину применом UHPLC–MS/MS методе [182]. Коришћена је HSS T3 колона (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μ m величине честица), уз мобилну фазу састава 0,2% мравља киселина и метанол, при линеарном градијенту. Брзина протока мобилне фазе била је 0,5 mL/min. Припрема узорка крви базирала се на преципитацији протеина ацетонитрилом и метанолом, а затим на чврсто-течној екстракцији, док су узорци урина најпре разблажени, а затим филтрирани. Аналити су детектовани електроспреј јонизацијом у позитивном режиму рада, праћењем следећих транзиција за прегабалин: 160,13→142,12, 160,13→97,10 и 160,13→55,05. Лимит детекције за прегабалин износио је 0,004 μ g/mL, а лимит квантификације 0,008 μ g/mL.

За директно одређивање прегабалина, описана је и LC–APCI–MS/MS метода [183]. Након течно-течне екстракције коришћењем смеше *tert*-бутил метил етар – дихлорметан (80:20 V/V), сепарација анализата постигнута је на *Waters Symmetry*[®] C18 колони, 100 mm × 4,6 mm, 3,5 μ m величине честица, при

изократским условима елуирања мобилном фазом 0,03% мравља киселина – ацетонитрил (30:70 V/V) и при брзини протока од 1 mL/min. Један део узорка је ињектован, док се девет делова преусмеравало ка отпадном материјалу. Хемијска јонизација под атмосферским притиском извођена је у позитивном режиму рада, а праћена транзиција за прегабалин била је m/z 160→142, уз колизиону енергију од 15 eV. Као интерни стандард коришћен је росувастатин, а линеарност је испитана у опсегу од 1 ng/mL до 10000 ng/mL. Метода је успешно примењена за одређивање прегабалина у хуманој плазми.

Течна хроматографија хидрофилних интеракција (енг. *Hydrophilic Interaction Chromatography*, HILIC) у комбинацији са масеном спектрометријом примењена је за квантификацију прегабалина у *postmortem* узорцима крви, урина, жучи, бубрега и јетре [184]. Због коришћења масеног спектрометра високе резолуције и велике осетљивости методе, припрема узорака подразумевала је једноставну преципитацију протеина. За хроматографску анализу коришћена је колона XBridge® HILIC (100 mm × 2,1 mm, 3,5 μm величине честица), термостатирана на 50°C, уз мобилну фазу ацетонитрил и 0,1% мравља киселина (растварач А) и 2 mmol/L амонијум-формијат pH 3,0 (растварач Б), према програму градијента током 24 минута. Брзина протока мобилне фазе била је 250 μL/min. Квадрупол-орбитрап масени спектрометар високе резолуције, уз загревању електроспреј јонизацију у позитивном режиму рада, истовремено је подешен да скенира спектар маса и одабрану MS/MS транзицију за прегабалин (m/z = 160,1334 + 5 ppm) и деутеризовани кокаин (m/z = 307,1737 + 5 ppm). Калибрациона крива за одређивање прегабалина у крви постављена је за опсег од 0,06 mg/L до 200 mg/L, а за остале матриксе од 1 mg/L до 200 mg/L. Лимит детекције прегабалина у крви износио је 0,025 μg/mL, а лимит квантификације 0,060 μg/mL.

1.5.4. АНАЛИТИКА ГАБАПЕНТИНА

Прегледом литературних података, пронађен је одређен број радова који се баве квантификацијом габапентина коришћењем масене спектрометрије у комбинацији са гасном или течном хроматографијом.

У два публикована рада, као техника прикупљања узорак користе се DPS. Колокури (Kolocour) и сарадници [185] применили су LC-MS/MS методу за квантификацију габапентина у узорцима хумане плазме, прикупљеним у облику осушене капи. За хроматографску анализу коришћена је YMC Silica колона (50 mm × 4,6 mm, 3 μm величине честица), уз мобилну фазу ацетонитрил – 5 mmol/L амонијум-ацетат (70:30 V/V) и изократском елуирању при брзини протока од 0,6 mL/min. Ињектована је запремина од 30 μL, а време анализе било је 5 минута. Габапентин и интерни стандард, 4-аминоциклохексан карбоксилна киселина, детектовани су применом турбо-спреј јонизације као бутил-естри, након дериватизације *n*-бутанолом у присуству 3 mol/L хлороводоничне киселине, праћењем следећих транзиција *m/z* 228,1→154,0 за габапентин и 200,2→127,1 за интерни стандард. Припрема узорак комплетно је аутоматизована и извођена на плочи са 96 базена, а опсег у коме је габапентин одређиван био је 40,0 ng/mL – $10,0 \times 10^3$ ng/mL.

У раду Икеда (Ikeda) и сарадника [186] за квантификацију габапентина примењена је GC-EI-MS метода. Метода је намењена за анализу валпроинске киселине и габапентина у склопу терапијског мониторинга, у узорцима хумане плазме, прикупљеним у форми DPS. Као интерни стандарди коришћени су деутеризована валпроинска киселина и деутеризовани габапентин. За анализу је употребљена DB-5 ms капиларна колона (30 m × 0,25 mm, 0,25 μm дебљине филма). Оба анализита детектована су као триметилсилил деривати, након реакције детиватизације са *N*-метил-*N*-(триметилсилил)трифлуороацетамидом (MSTFA). Габапентин је квантификован као јон *m/z* вредности 210, у опсегу од 0,5 μg/mL до 10 μg/mL. У овом раду такође су испитана и два типа Гатри картица, Whatman FTA DMPK-A и Bond Elut DMS.

За потребе терапијског мониторинга лека, постављена је GC–MS метода за одређивање габапентина у серуму или плазми [187]. Rtx[®] капиларна колона (15 m × 0,25 mm, 0,5 µm дебљине филма) коришћена је за праћење дериватизованог габапентина m/z 337 и m/z 221. Припрема узорака је аутоматизована и подразумевала је преципитацију протеина ацетонитрилом и чврсто-течну екстракцију. За дериватизацију је коришћен 1-хлорбутан и *N*-метил-*N*-*tert*-бутилдиметилсилилтрифлуороацетамид (MTBSTFA) у трајању од 15 минута на 90°C. Линеарност је испитана у опсегу од 1 µg/mL до 35 µg/mL.

Гамбелунге (Gambelunghe) и сарадници [188] поставили су методу за одређивање габапентина у серуму мишева након *per os* и интраперитонеалне администрације лека, применом GC–MS/MS, такође у сврху испитивања фармакокинетице. Припрема узорака базирала се на преципитацији протеина и чврсто-течној екстракцији. Смеша *N*-метил-*N*-(триметилсилил) трифлуороацетамид – амонијум-јодид – дитиоеритритол (MSTFA:NH₄I:DTE, 1000:2:4 V/m/m) коришћена је за дериватизацију габапентина у трајању од 30 минута на 70°C. Chrompack капиларна колона CP-SIL 8CB-MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm дебљине филма) употребљена је за хроматографску анализу, док је квантификација постигнута MS/MS изоловањем и колизионо-индукованом дисоцијацијом молекулског јона m/z 226. Опсег методе био је од 1 µg/mL до 9 µg/mL.

С обзиром да је габапентин сврстан у класу III супстанци за побољшање перформанси од стране Међународне асоцијације за трке, и као такав потенцијално може да утиче на исход такмичења, Ленер (Lehner) и сарадници поставили су методу за квантификацију габапентина у плазми тркачких коња [189]. Као интерни стандард коришћена је деутеризована GABA. Након преципитације протеина ацетонитрилом и чврсто-течне екстракције, габапентин је дериватизован са *N,N*-диметилформаидом (DMF) и *N*-метил-*N*-(триметилсилил)трифлуороацетамидом (MSTFA), током сат времена на 70°C. За GC–MS анализу коришћена је Zebtron ZB-5MS column (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm дебљине филма). Линеарност је испитана у опсегу од 50 ng/mL до 3000 ng/mL.

Применом LC–MS методе, габапентин је највише одређиван у узорцима хумане плазме. За испитивање биоеквиваленције, развијена је метода за квантификацију габапентина [190] уз ацетаминофен као интерни стандард. Припрема узорака базирала се на преципитацији протеина. За хроматографску анализу коришћена је D4-613 *Shodex* колона (150 mm × 6,0 mm, 5 µm величине честица) и мобилна фаза састава ацетонитрил – 10 mmol/L мравља киселина (60:40 V/V), при брзини протока од 1 mL/min. Примењена је позитивна електроспреј јонизација, уз праћење транзиције m/z 172→137 за габапентин. Линеарност је испитана у опсегу од 50 ng/mL до 10000 ng/mL.

Рамакришна (Ramakrishna) и сарадници валидирани су методу за брзу квантификацију габапентина у хуманој плазми применом течне хроматографије–турбо електроспреј јонизације–тандем масене спектрометрије [191]. Коришћена је *Waters Symmetry C18* колона (150 mm × 4,6 mm, 5µm величине честица), термостатирана на 30°C. Састав мобилне фазе био је 10 mmol/L амонијум-формијат – ацетонитрил (20:80 V/V), рН подешен мрављом киселином на 3,0 и уз брзину протока од 1 mL/min. Протеини су преципитирани ацетонитрилом, а линеарност је испитана у опсегу од 40 ng/mL до 10000 ng/mL. Праћена јонска транзиција за габапентин била је m/z 172,1→154,1.

Још једна метода валидирана је за одређивање габапентина у склопу фармакокинетичких студија и студија биоеквиваленције у корејских добровољаца [192]. Узорци плазме припремани су преципитацијом протеина ацетонитрилом, а за хроматографску анализу коришћена је *Gemini C18* колона (150 mm × 2,0 mm, 5 µm величине честица) и мобилна фаза састава ацетонитрил – 10 mmol/L амонијум-ацетат (20:80 V/V), рН 3,2 подешен сирћетном киселином. Габапентин и интерни стандард, хидрат (S)-(+)-аминоциклохексан пропионске киселине, детектовани су у ESI-(+) режиму рада, праћењем транзиција m/z 172,0→154,0 и m/z 172,0→126,0. Линеарност је испитана у опсегу од 20 ng/mL до 5000 ng/mL.

За квантификацију габапентина у хуманој плазми валидирана је LC–MS/MS метода са електроспреј позитивном јонизацијом [193]. Припрема узорака базирала се на преципитацији протеина ацетонитрилом са следственом

хроматографском сепарацијом на колони *Acclaim 120 C8* (100 mm × 2,1 mm, 3 µm величине честица) уз претколону *C8* (4 mm × 3,0 mm) и мобилну фазу састава 10 mmol/L амонијум-формијат pH 3,0 подешен мрављом киселином и ацетонитрил (40:60 V/V) при брзини протока од 0,2 mL/min. Колона и аутосемплер термостатирани су на 30°C. Квантификација је изведена на основу SRM m/z 172→154 за габапентин и m/z 130→113 за метформин као интерни стандард, у опсегу од 50 ng/mL до 5000 ng/mL.

У плазми коња, а у склопу проучавања фармакокинетичког и фармакодинамичког профила, габапентин је одређиван применом LC–ESI–MS/MS методе, коришћењем хибридног троструког квадрупола-линеарног јонског трапа [194]. Припрема узорак подразумевала је преципитацију протеина ацетонитрилом, а хроматографска анализа изведена је на ACE C18 колони (75 mm × 2,1 mm, 5 µm величине честица), уз претколону (10 mm × 2,1 mm, 5 µm величине честица) и мобилну фазу 5 mmol/L амонијум-формијат (pH 3,51) и ацетонитрил, чији састав је вариран према програму градијента, при брзини протока од 300 µL/min. Укупно време анализе било је 7 минута. Праћена је транзиција m/z 172→137, за опсег концентрација од 10 ng/mL до 2500 ng/mL.

Карлсон (Carlsson) и сарадници [195] поставили су HPLC–ESI–MS/MS методу за одређивање габапентина у серуму, добијеном из венске и капиларне крви. Преципитација протеина постигнута је додатком ацетонитрила, а хроматографска анализа на колони ZORBAX® SB-C8 *Rapid Resolution* (30 mm × 2,1 mm, 3,5 µm величине честица), са претколоном ZORBAX® 300SB-C3 (12,5 mm × 2,1 mm, 5 µm величине честица). Изократско елуирање постигнуто је мобилном фазом састава 5 mmol/L амонијум-ацетат, pH 3,0 и метанол (96:4, V/V), при брзини протока од 0,4 mL/min и укупно време анализе од 4 минута. Праћене су транзиције m/z 172→154 за габапентин и m/z 172→126 за интерни стандард, хидрат (S)-(+)-аминоциклохексан пропионске киселине. Метода је валидирана за опсег од 6,75 ng/mL до 10125 ng/mL.

У смеси са леветирацетамом, габапентин је одређиван у хуманој плазми применом UHPLC–ESI–MS/MS методе [196]. Припрема узорак плазме базирала се на преципитацији протеина метанолом и ацетонитрилом (50:50 V/V).

Коришћена је *Acquity UPLC HSS T3* колона ($50\text{ mm} \times 2,1\text{ mm}$, $1,8\text{ }\mu\text{m}$ величине честица), уз линеарни градијент мобилне фазе састава ацетонитрил и вода са додатком $0,1\%$ мравље киселине. Масени спектрометар подешен је за рад у позитивном режиму, уз праћење две транзиције за габапентин, $172,18 \rightarrow 154,11$ и $172,18 \rightarrow 137,06$. Време анализе било је $1,5$ минута, а опсег методе од 1 mg/L до 150 mg/L .

За анализу габапентина у узорцима хумане плазме, примењена је и метода тандем масене спектрометрије са директним ињектовањем (енг. *Flow Injection Analysis*, FIA) [197]. Састав мобилне фазе био је ацетонитрил – вода – мравља киселина ($50:50:0,025\text{ V/V/V}$), а брзина протока $0,1\text{ mL/min}$. За квантификацију су одабране MRM транзиције $m/z\ 172 \rightarrow 154$ за габапентин и $m/z\ 180 \rightarrow 117$ за интерни стандард, 4-фенил-4-аминобутанску киселину, у опсегу од $0,1\text{ }\mu\text{g/mL}$ до $10\text{ }\mu\text{g/mL}$.

Применом LC–MS методе, габапентин је одређиван у узорцима хумане плазме [198], након чврсто-течне екстракције. Сепарација је постигнута на колони *Genesis CN* ($50\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$, $4\text{ }\mu\text{m}$ величине честица), уз мобилну фазу 5 mmol/L амонијум-ацетат $\text{pH}\ 3,5$ и ацетонитрил ($10:90\text{ V/V}$) и брзину протока од $0,4\text{ mL/min}$. Анализа је трајала 5 минута, а габапентин је детектован као јон $m/z\ 172,2$. Метода је валидирана у опсегу од $0,05$ до $6,4\text{ }\mu\text{g/mL}$.

За квантификацију габапентина примењена је и HILIC–MS/MS метода [199]. Предложена метода базирала се на преципитацији протеина ацетонитрилом и хроматографској сепарацији на *Atlantis HILIC* силика колони ($50\text{ mm} \times 3\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$ величине честица), уз мобилну фазу ацетонитрил – 100 mmol/L амонијум-формијат, $\text{pH}\ 3,0$ ($85:15\text{ V/V}$) и брзину протока од $0,5\text{ mL/min}$. Колона је термостатирана на 30°C , а време анализе било је $3,5$ минута. Аналити су детектовани у позитивном електроспреј режиму јонизације, праћењем MRM $m/z\ 172,4 \rightarrow 154,3$ за габапентин и $m/z\ 130,4 \rightarrow 71,8$ за метформин као интерни стандард. Метода је показала задовољавајућу линеарност у опсегу концентрација од $50,0\text{ ng/mL}$ до 10000 ng/mL .

1.5.5. ИСТОВРЕМЕНА АНАЛИЗА ЦВИТЕРЈОНСКИХ АНТИЕПИЛЕПТИКА

Прегледом литературних података, пронађен је одређен број радова који се баве истовременом анализом цвитерјонских антиепилептика.

За истовремено одређивање вигабатрина и габапентина у серуму, постављена је GC–MS метода [200]. Ацетонитрил је коришћен за преципитацију протеина, а *N*-триметилсулфонијум-хидроксид за дериватизацију анализата. VF-5MS капиларна колона (30 m × 0,25 mm, 0,25 μm дебљине филма) коришћена је за хроматографску анализу, у опсегу концентрација од 5 μg/mL до 80 μg/mL за вигабатрин и од 5 μg/mL до 30 μg/mL за габапентин.

Шабуни (Chahbouni) и сарадници [201] поставили су методу за одређивање вигабатрина, прегабалина и габапентина у серуму, применом LC–MS/MS методе. Додатком трихлорсирћетне киселине (30% V/V) постигнута је преципитација протеина, а затим и хроматографско раздвајање на *Kinetex* RP18 колони, уз мобилну фазу састава ацетонитрил и 2 mmol/L амонијум-ацетат са додатком 0,1% мравље киселине. Детекција анализата постигнута је праћењем MRM транзиција, током 2 минута. Метода је показала задовољавајући линеарност у опсегу концентрација 0,03 mg/L – 25 mg/L за габапентин, 0,03 mg/L – 25 mg/L за прегабалин и 0,06 mg/L – 50 за вигабатрин и као таква је погодна за терапијски мониторинг наведених лекова.

Вигабатрин и прегабалин одређивани су у плазми, у смеси са других 20 антиепилептика, применом UPLC–MS/MS методе, након преципитације протеина метанолом [202]. *Acquity* UPLC BEH C18 колона (50 mm × 2,1 mm, 1,7 μm величине честица), термостатирана на 50°C коришћена је за хроматографску анализу, уз мобилну фазу састава 10 mmol/L амонијум-ацетат са 0,1% мравље киселине и метанол, према програму градијента. Опсег одређивања вигабатрина био је од 1,1 μg/mL до 27,5 μg/mL, а габапентина од 2,6 μg/mL до 65,0 μg/mL.

Метода HILIC–ESI–MS/MS коришћена је за истовремену анализу вигабатрина, прегабалина и габапентина [203]. Узорци су припремани преципитацијом протеина ацетонитрилом. У раду су испитане четири HILIC

колоне, тестиране на две различите температуре, а као најбоља показала се TSKgel Amide-80 (150 mm × 2 mm, 3 µm величине честица) на температури од 35°C. Као мобилна фаза коришћена је смеша ацетонитрила, 2 mM амонијум-ацетата и мравље киселине, варирана према програму градијента и при брзини протока од 0,4 mL/min. За сваки аналит, праћене су по две транзиције и то: 130,0→113,0 и 130,0→70,8 за вигабатрин, 160,1→142,3 и 160,1→97,0 за прегабалин и 172,0→154,0 и 172,0→137,1 за габапентин. Лимит квантификације износио је 312 ng/mL.

Соренсен (Sørensen) и сарадници анализирали су аналоге GABA, применом HILIC-ESI-MS методе, у узорцима форензичке крви [204]. За хроматографску анализу коришћена је Acquity UPLC BEH Amide колоне (100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm величине честица), док је састав мобилне фазе вариран према програму градијента. Узорци су припремани преципитацијом протеина ацетонитрилом. За сваки аналит праћене су по три транзиције, од којих је једна коришћена за квантификацију (130→71 за вигабатрин, 160→97 за прегабалин и 172→137 за габапентин), а остале две за потврду структуре. Калибрационе криве конструисане су у опсегу од 1 mg/L до 50 mg/L.

Као што се из приказаног прегледа литературе може закључити, већина публикованих метода постављена је за директну квантификацију анализата применом LC-MS/MS, без примене реакције дериватизације. Процедура припреме узорака била је једноставна и базирана углавном на преципитацији протеина, што је за последицу имало добијање не тако чистих екстраката и неадекватно задржавање недериватизованих анализата на неполарним стационарним фазама.

2. ЦИЉ РАДА

Циљ ове докторске дисертације био је развој метода за анализу цвитерјонских антиепилептика у узорцима биолошког материјала. Истраживање је подељено у три фазе са намером да се:

1. испита утицај различитих реагенаса за дериватизацију на одговор испитиваних анализата у систему течна хроматографија–електроспреј јонизација–тандем масена спектрометрија (LC–ESI–MS/MS). Као реагенси за дериватизацију коришћене су различите комбинације парова *n*-алкилхлороформата (метил-, етил-, пропил- и бутилхлороформат) и *n*-алкохола (метанол, етанол, пропанол и бутанол),
2. изврши унапређење параметара масеног спектрометра, као и параметара методе течне хроматографије применом *one-factor-at-a-time* приступа и Бокс-Бенкен експерименталног дизајна,
3. потврди применљивост предложених LC–MS/MS метода за анализу садржаја цвитерјонских антиепилептика из течних узорака плазме, вигабатрина из осушених капи плазме (DPS) и прегабалина из осушених капи крви (DBS) и осушених капи плазме (DPS). Узорци плазме и крви добијени су од пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. АПАРАТИ

Хроматограф: *Accela, Thermo Fisher Scientific Inc*, Сан Хозе, Калифорнија, САД

Пумпа: *Accela Pump*, четвороканална пумпа за мешање под ниским притиском, са уграђеним дагазером

Аутосемплер: *Accela Autosampler*, капацитет узорака 200 стандардних бочица, обезбеђује контролу температуре узорка од 0°C до 60°C и садржи уграђену пећницу са могућношћу подешавања температуре колоне од 5°C до 95°C

Масени спектрометар: *TSQ Quantum Access MAX* масени спектрометар типа троструког квадрупола, *Thermo Fisher Scientific Inc*, Сан Хозе, Калифорнија, САД

Пријем и графичка обрада података: *Xcalibur1.2 software*

Електронска аналитичка вага: 121 *Sartorius, Sartorius Werke GmbH*, Гетинген, Немачка

pH–метар: PHM 210, *Radiometer Analytical SAS*, Вилербан, Француска

Вортекс мешалица: *Vortex-Genie2T, Scientific Industries, Inc*, Бохимија, Њујорк, САД

Упаривач: *Reacti-VapIII, Thermo Fisher Scientific Inc*, Сан Хозе, Калифорнија, САД

Ултразвучно купатило: *Fungilab*, Барселона, Шпанија

Систем за добијање дејонизоване и редестиловане воде (отпорност > 18 MΩ × cm): *Simplicity 185, Millipore*, Билерика, Масачусетс, САД

Центрифуга: EBA 20 *Hettich zentrifugen, DJB Labcare Ltd*, Бакингемшир, Енглеска

Аутоматски хематолошки анализатор: *Mythic 18, Orphée Medical*, Женева, Швајцарска

3.1.1. СОФТВЕРСКИ ПАКЕТИ

Софтверски пакети који су коришћени за анализу резултата и података генерисаних употребом наведених методологија су *Design-Expert*[®] 7.0.0. (*Stat-Ease Inc*, Минеаполис, Минесота, САД), *Table-Curve2D* v5.01.02 (пробна верзија), *Excel 2007* (*Microsoft*, Редмонд, Вашингтон, САД) и *MATLAB*[®] 7.10.0. (*The MathWorks Inc*, Неитик, Масачусетс, САД).

3.2. ЛАБОРАТОРИЈСКИ ПРИБОР

Систем за филтрирање: *Supelco Mobile Phase Filtration Apparatus 1*, *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

Филтри: *Nylon membrane filters*, 0,45 µm, *Whatman*, Мејдстон, Енглеска

Фиксне аутоматске пипете: *Finnpipette*[™] *F1 fixed-volume pipettes*, *Thermo Fisher Scientific Inc*, Ванта, Финска

Варијабилне аутоматске пипете: *Finnpipette*[™] *F1 adjustable-volume pipettes*, *Thermo Fisher Scientific Inc*, Ванта, Финска

Гатри картице: *Whatman 903 Neonatal Screening Cards*, *GE Healthcare*, Бакингемшир, Енглеска

Справа за перфорирање: некомерцијални бушачи, промера 5 mm и 4 mm

3.3. РЕАГЕНСИ

Ацетонитрил – LC–MS grade, *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

Амонијум-формијат – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

Мравља киселина – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

Метилхлороформат – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

Етилхлороформат – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

Пропилхлороформат – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

Бутилхлороформат – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

Пиридин – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

Хлороформ – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

n-хексан – *LGC Promochem GmbH*, Везел, Немачка

Етил-ацетат – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

Ди-изо-пропил етар – *Riedel-de H en AG*, Зелце, Немачка

Натријум-хидроксид – *J.T. Baker*, Девентер, Холандија

Физиолошки раствор натријум-хлорида – *Natrii chloridi infundibile* 0,9%,
Немофарм, а.д., Вршац, Република Србија

Хлороводонична киселина – *Lach-Ner*, Нератовице, Република Чешка

Метанол – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

Етанол – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

n-пропанол – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

n-бутанол – *Sigma-Aldrich*, Сент Луис, Мисури, САД

3.4. СТАНДАРДНЕ СУПСТАНЦЕ

Вигабатрин, референтни стандард – *British Pharmacopeia Commission Laboratory*,
Тедингтон, Енглеска

Прегабалин, референтни стандард – *Pfizer Inc*, Гротон, Конектикат, САД

Габапентин, референтни стандард – *Kleva Pharmaceutical Company*, Атина, Грчка

4-аминоциклохексан карбоксилна киселина, радни стандард – *Chembiotin*, Атина,
Грчка

3.5. ХУМАНА ПЛАЗМА И КРВ

Узорци хумане плазме и крви добијени су од здравих добровољаца, који у моменту донирања биолошког материјала нису били на терапији комерцијално доступним лековима.

3.6. УЗОРЦИ ПАЦИЈЕНАТА

Узорци крви и плазме добијени су од пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду, а који су били на непромењеном режиму дозирања комерцијално доступним фармацеутским облицима вигабатрина, односно прегабалина. Време узорковања за вигабатрин било је два сата након последње дозе, а за прегабалин сат времена након последње примењене дозе. Ови временски интервали одређени су на основу фармакокинетичких података о времену потребном за постизање максималне концентрације лека у крви (C_{max}).

3.7. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА РЕАГЕНАСА ЗА ДЕРИВАТИЗАЦИЈУ

3.7.1. ПРИПРЕМА РАСТВОРА

Раствори стандардних референтних супстанци вигабатрина, прегабалина и габапентина, припремљени су у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини, сваки концентрације 100 µg/mL.

3.7.2. ПРИПРЕМА РАСТВОРА НАТРИЈУМ-ХИДРОКСИДА

Раствор натријум-хидроксида, концентрације 0,33 mol/L, припремљен је растварањем 6,6 g чврсте супстанце у 0,5 L дестиловане воде.

3.7.3. ПРИПРЕМА РАСТВОРА АЛКОХОЛА

Раствори алкохола припремљени су у одмерним судовима од 10 mL, мешањем метанола, етанола, *n*-пропанола или *n*-бутанола са пиридином (77:23 V/V).

3.7.4. ПРИПРЕМА РАСТВОРА АЛКИЛХЛОРОФОРМАТА

Раствори алкилхлороформата припремљени су у одмерним судовима од 10 mL, мешањем одговарајућег хлороформата (метилхлороформат, етилхлороформат, *n*-пропилхлороформат или *n*-бутилхлороформат), хлороформа и *n*-хексана у односу 17,4:71,6:11,0 V/V/V.

3.7.5. ПРОТОКОЛ ДЕРИВАТИЗАЦИЈЕ

У 100 μ L стандардног раствора сваког антиепилептика додато је 150 μ L раствора натријум-хидроксида (припрема описана у поглављу 3.7.2), 80 μ L раствора алкохола (припрема описана у поглављу 3.7.3) и 50 μ L раствора алкилхлороформата (припрема описана у поглављу 3.7.4). Након мешања на *Vortex* апарату у трајању од два минута, додато је 500 μ L етил-ацетата. Новонастали деривати екстраховани су у органски растварач током 10 минута, а затим је 350 μ L горњег слоја упарено до сува у струји азота и реконституисано са 1500 μ L ацетонитрила. Сваки дериват припремљен је у трипликату како би се тестирала репродуктивност реакције дериватизације. До анализе, узорци су остављени у аутосемплеру на 10°C.

3.7.6. ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ

Мобилна фаза: ацетонитрил – 5 mmol/L амонијум-формијат (80:20 V/V)

pH мобилне фазе: 2,10 подешен мрављом киселином

Брзина протока мобилне фазе: 600 $\mu\text{L}/\text{min}$

Колона: *Zorbax Eclipse XDB–C8* (150 mm $\times$ 4,6 mm, величине честица 5 μm)

Температура колоне: 30°C

Ињекциона запремина: 3 μL

3.7.7. УСЛОВИ ТАНДЕМ МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА

Процесом ауто-подешавања (енг. *Autotune*), уз директно ињектовање дериватизованих анализата у масени спектрометар путем шприца, добијене су вредности за напон спреја (енг. *Spray Voltage*), притисак носећег гаса (енг. *Sheath Gas Pressure*), притисак гаса у конусу јонског извора (енг. *Ion Sweep Gas Pressure*), притисак помоћног гаса (енг. *Auxiliary Gas Pressure*), напон капиларног сочива (енг. *Tube Lens*), напон отклона задњег сочива (енг. *Skimmer Offset*) и колизионе енергије (енг. *Collision Energies*). На овај начин такође су добијена по четири најинтензивнија фрагмента за сваки јон прекурсор. Након одабира два најинтензивнија фрагмента, поново је одрађен процес ауто-подешавања, за смешу од четири деривата, груписана према истом *n*-алкилхлороформату коришћеном у реакцији дериватизације. На основу ових вредности, за сваки појединачни дериватизациони реагенс, креирана је посебна метода, свака са четири скен догађаја конфигурисана за праћење две одабране SRM транзиције. Температура испаривача (енг. *Vaporizer Temperature*) фиксирана је на вредност од 350°C, а температура трансфер капиларе (енг. *Capillary Temperature*) на 275°C. Време скенирања (енг. *Scan Time*) било је 0,1 s, ширина скенирања (енг. *Scan Width*) 0,025 *m/z* и FWHM 0,70 Q1.

3.8. ОПТИМИЗАЦИЈА ПАРАМЕТАРА МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА И МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ

3.8.1. ПРИПРЕМА РАСТВОРА

У 0,1 mol/L хлороводоничној киселини припремљен је раствор смеше стандардних супстанци вигабатрина, прегабалина и габапентина, сваки концентрације 100 µg/mL.

Раствор интерног стандарда, 4-аминоциклохексан карбоксилне киселине припремљен је у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини у концентрацији од 10 µg/mL.

3.8.2. ПРОТОКОЛ ДЕРИВАТИЗАЦИЈЕ

У 50 µL стандардног раствора смеше вигабатрина, прегабалина и габапентина додато је 150 µL раствора натријум-хидроксида (припрема описана у поглављу 3.7.2), 80 µL раствора *n*-пропанола у пиридину (припрема описана у поглављу 3.7.3) и 50 µL раствора реагенса *n*-пропилхлороформата (припрема описана у поглављу 3.7.4). Реакција дериватизације одвијала се током два минута мешања на *Vortex* апарату. Деривати су екстраховани са 500 µL етил-ацетата током 10 минута, а затим је 450 µL горњег слоја упарено до сува у струји азота и реконституисано са 2000 µL ацетонитрила. До анализе, узорци су остављени у аутосемплеру на 10°C.

3.8.3. ПОЧЕТНИ ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ

Почетна мобилна фаза: ацетонитрил – 0,1% мравља киселина (80:20 V/V)

Почетна брзина протока мобилне фазе: 600 µL/min

Колона: *Zorbaх Eclipse XDB–C8* (150 mm × 4,6 mm, величине честица 5 µm)

Температура колоне: 30°C

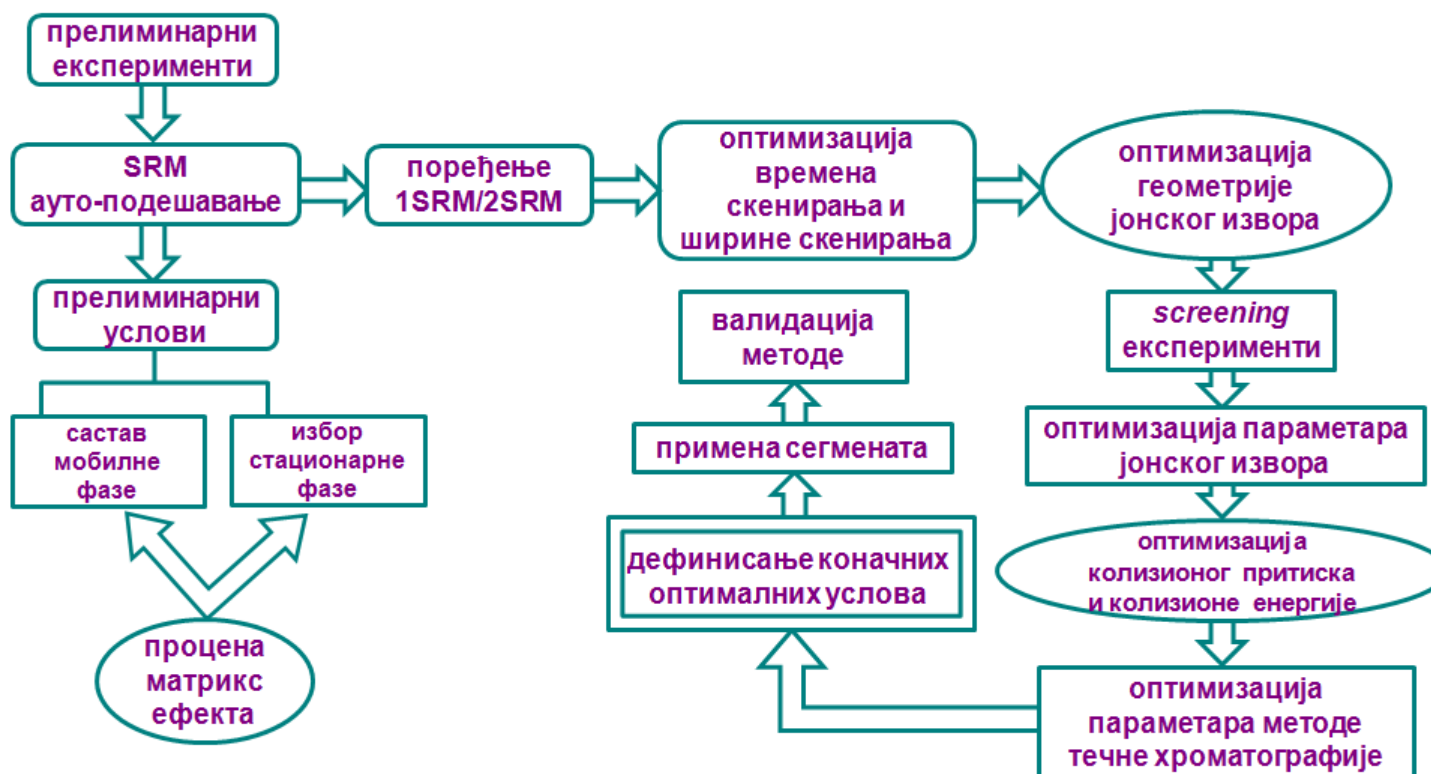
Ињекциона запремина: 3 µL

3.8.4. СТРАТЕГИЈА СИСТЕМАТИЧНОГ УНАПРЕЂЕЊА ОДГОВОРА АНАЛИТА

Стратегија оптимизације, погодна за доступан масени спектрометар коришћен у експерименталном раду, шематски је представљена на слици 21. Обухватала је неколико фаза током којих су извођени одређени дефинисани експерименти. У ESI-(+) режиму рада, детектовани су дериватизовани аналити и интерни стандард, директним ињектовањем из шприца при брзини протока од 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Прелиминарна метода масене спектрометрије састојала се од четири скен догађаја којима су праћене по две одабране SRM транзиције за дериватизоване аналите и интерни стандард. Време скенирања било је 0,1 s, ширина скенирања 0,025 m/z и FWHM 0,70 Q1.

Почетни услови методе течне хроматографије дефинисани су избором стационарне фазе и мобилне фазе одговарајућег састава, како би се добили оштри пикови, на задовољавајућим ретенционим временима. Како хроматографско раздвајање није било неопходно, претпоставило се да коначни састав мобилне фазе неће бити значајно другачији, осим уколико промена буде неопходна на основу резултата експеримената у којима се процењивао матрикс ефекат. За испитивање матрикс ефекта, реакција дериватизације, према протоколу описаном у поглављу 3.8.2, изведена је са 50 μL плазме, а реконституисани узорак је подвргнут тестирању јонске супресије, примењујући постколонску инфузију [205, 206].

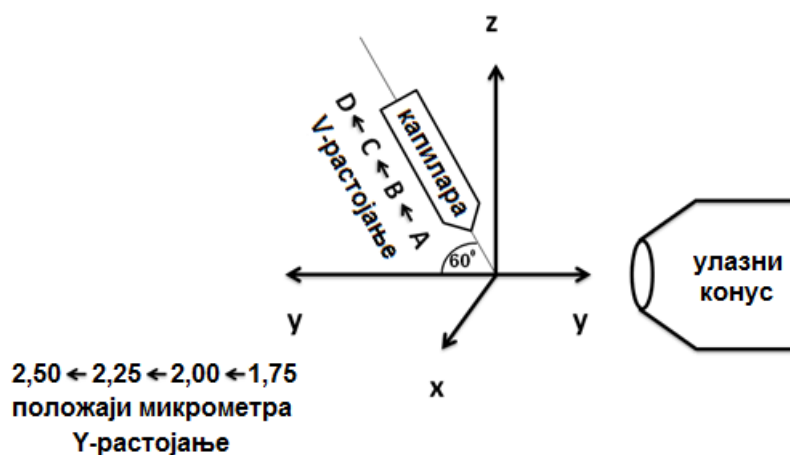
При почетним хроматографским условима, најпре је извршено поређење између праћења једне и две SRM транзиције јона прекурсора. Надаље, додатна унапређења односила су се на подешавање времена скенирања и ширине скенирања, применом тзв. *one-factor-at-a-time* приступа.



Слика 21. План вишестепене стратегије оптимизације
(публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 21. Plan of step-by-step optimization strategy
(published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

У наредном кораку, оптимизована је геометрија јонског извора, променом положаја капиларе. Оба испитивана фактора варирана су на четири нивоа, од А до D позиције за V-растојање и од 1,75 до 2,50 за положај микрометра у случају Y-растојања. Шематски приказ интерфејса јонског извора карактеристичног за коришћени масени спектрометар, приказан је на слици 22.



Слика 22. Шематски приказ интерфејса јонског извора
(публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 22. Shematic presentation of ion source interface
(published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Параметри јонског извора за значајним ефектом на одговор анализата идентификовани су кроз прелиминарне (енг. *Screening*) експерименте. Ефекти напона спреја, температуре испаривача, температуре трансфер капиларе, притиска носећег гаса и притиска помоћног гаса, испитани су кроз 16 експеримената, дефинисаних фракционим факторским дизајном 2^{5-1} , са три репликације у централној тачки. Фактори чији ефекти су испитивани у фази скрининга, и њихови нивои, представљени су у табели 4, а експериментални план дат је у табели 11 у поглављу 4.2.2. Фактори за које се показало да имају значајан утицај на ефикасност јонизације, накнадно су оптимизовани применом Бокс-Бенкен експерименталног дизајна, са 12 експеримената и три репликације у централној тачки (нивои испитиваних фактора дати су у табели 4, а експериментални план у табели 13 у поглављу 4.2.2).

Наредна фаза експеримената била је усмерена на проучавање потенцијалног утицаја колизионог притиска, на три различита нивоа, 1,0 mTorr, 1,5 mTorr и 2,0 mTorr, уз проверу вредности колизионих енергија добијених током процеса ауто-подешавања. Након ових експеримената, дефинисани су коначни услови за параметре масеног спектрометра.

Последњи корак вишестепене стратегије оптимизације бавио се финалним подешавањем параметара методе течне хроматографије, као што су садржај ацетонитрила у мобилној фази, садржај мравље киселине у воденој фази, као и брзина протока мобилне фазе. План експеримента дефинисан је Бокс-Бенкен експерименталним дизајном са 12 експеримената и три репликације у централној тачки. Горњи и доњи нивои за испитиване факторе представљени су у табели 4, а експериментални план дат је у табели 15 у поглављу 4.2.4.

На крају оптимизације примењен је још један приступ како би се додатно унапредио одговор анализата, минимизирањем шума. Хроматограм је подељен у неколико временских сегмената, током којих су посматране различите транзиције и поређене вредности односа сигнал-шум добијене сегментираним и несегментираним методом.

Табела 4. Испитивани фактори и њихови нивои за 2^{5-1} експериментални дизајн, Бокс-Бенкен дизајн за оптимизацију параметара јонског извора и Бокс-Бенкен дизајн за оптимизацију хроматографске методе
(публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Table 4. Experimental variables and their levels tested in 2^{5-1} experimental design, Box-Behnken design used for ion source parameters optimization and Box-Behnken design used for chromatography parameters optimization
(published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Фактори		Нивои фактора		
		– 1	0	+ 1
1. Скрининг јонског извора	напон спреја (V)	3000	4000	5000
	температура испаривача (°C)	200	300	400
	притисак носећег гаса*	10	30	50
	притисак помоћног гаса*	2	6	10
	температура трансфер капиларе (°C)	150	250	350
2. Оптимизација јонског извора	притисак носећег гаса*	30	40	50
	притисак помоћног гаса*	6	8	10
	температура трансфер капиларе (°C)	250	300	350
3. Оптимизација хроматографије	садржај ацетонитрила (%)	75	80	85
	садржај мравље киселине (%)	0,1	0,3	0,5
	брзина протока мобилне фазе ($\mu\text{L}/\text{min}$)	500	550	600

* вредности су исказане у арбитрарним јединицама

3.9. ПАРЦИЈАЛНА ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ЦВИТЕРЈОНСКИХ АНТИЕПИЛЕПТИКА ИЗ ТЕЧНИХ УЗОРАКА ПЛАЗМЕ

3.9.1. ПРИПРЕМА РАСТВОРА, КАЛИБРАЦИОНИХ СТАНДАРДА И УЗОРАКА ЗА ПРОВЕРУ КВАЛИТЕТА И ВАЛИДАЦИЈУ МЕТОДЕ

Основни раствор припремљен је као смеша три антиепилептика у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини тако да се добију концентрације од 100 µg/mL. Радни раствори су припремљени серијом разблажења основног раствора у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини тако да се добију следеће концентрације: 100 µg/mL, 50,0 µg/mL, 20,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 5,00 µg/mL, 2,00 µg/mL, 0,800 µg/mL и 0,400 µg/mL. Још један основни раствор сва три антиепилептика, концентрације 100 µg/mL, спремљен је након посебне одваге, за припрему радних раствора узорака за проверу квалитета и валидацију методе (енг. *Quality Control*, QC и *Method Validation*, MV) у четири концентрације: 75,0 µg/mL, 12,0 µg/mL, 1,20 µg/mL и 0,400 µg/mL.

Калибрациона крива конструисана је са осам стандарда, припремљених након разблажења одговарајућих радних раствора у хуманој плазми у односу 1:9, у коначним концентрацијама 10,0 µg/mL, 5,00 µg/mL, 2,00 µg/mL, 1,00 µg/mL, 0,500 µg/mL, 0,200 µg/mL, 0,0800 µg/mL и 0,0400 µg/mL. QC/MV узорци разблажени су на исти начин како би се добиле концентрације 7,50 µg/mL (QC₃/MV₃), 1,20 µg/mL (QC₂/MV₂), 0,120 µg/mL (QC₁/MV₁) и 0,0400 µg/mL (MV_L). На основу резултата добијених анализом QC узорака резултати аналитичких секвенци су прихватани или одбијани, док су резултати добијени анализом MV узорака коришћени за процену тачности и прецизности.

У 40 µL сваког од раствора додато је 100 µL раствора интерног стандарда, концентрације 10 µg/mL, а затим је изведена процедура дериватизације, према поступку описаном у поглављу 3.8.2, с тим што је за реконституисање узорака коришћено 500 µL ацетонитрила.

3.9.2. ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ

Мобилна фаза: ацетонитрил – 0,15% мравља киселина (85:15 V/V)

Брзина протока мобилне фазе: 550 $\mu\text{L}/\text{min}$

Колона: *Zorbaх Eclipse XDB–C8* (150 mm $\times$ 4,6 mm, величине честица 5 μm)

Температура колоне: 30°C

Ињекциона запремина: 15 μL

3.9.3. УСЛОВИ ТАНДЕМ МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА

V-растојање: позиција D

Y-растојање: 2,00

Ширина скенирања: 0,05 m/z

Време скенирања: 0,01 s

Напон спреја: 4500 V

Температура испаривача: 350°C

Температура трансфер капиларе: 290°C

Притисак носећег гаса: 50 арбитрарних јединица

Притисак помоћног гаса: 10 арбитрарних јединица

Колизионни притисак: 1,0 mTorr

3.10. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ВИГАБАТРИНА ИЗ ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ

3.10.1. ПРИПРЕМА РАСТВОРА, КАЛИБРАЦИОНИХ СТАНДАРДА И УЗОРАКА ЗА ПРОВЕРУ КВАЛИТЕТА И ВАЛИДАЦИЈУ МЕТОДЕ

Основни раствори вигабатрина и интерног стандарда припремљени су растварањем супстанци у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини тако да се добију концентрације од 500 µg/mL за вигабатрин и 100 µg/mL за интерни стандард. Радни раствори припремљени су серијом разблажења основног раствора вигабатрина у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини тако да се добију следеће концентрације: 500 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50,0 µg/mL, 20,0 µg/mL, 10,0 µg/mL и 5,00 µg/mL, док је радни раствор интерног стандарда припремљен у концентрацији од 0,500 µg/mL, такође у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини. Још један основни раствор вигабатрина, концентрације 500 µg/mL, спремљен је након посебне одваге, и он је коришћен за припрему QC/MV узорака у четири концентрације: 350 µg/mL, 75,0 µg/mL, 15,0 µg/mL и 5,00 µg/mL.

Калибрациона крива конструисана је са седам стандарда, припремљених након разблажења радних раствора у хуманој плазми у односу 1:9 у 1,5 mL епруветама за микроцентрифугу (*eppendorf*) тако да се добију концентрације: 50,0 µg/mL, 20,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 5,00 µg/mL, 2,00 µg/mL, 1,00 µg/mL и 0,500 µg/mL. Финалне концентрације QC/MV узорака након разблажења у плазми биле су: 35,0 µg/mL (QC₃/MV₃), 7,50 µg/mL (QC₂/MV₂), 1,50 µg/mL (QC₁/MV₁) и 0,500 µg/mL (MV_L). На основу резултата добијених анализом QC узорака резултати аналитичких секвенци су прихватани или одбијани, док су резултати добијени анализом MV узорака коришћени за процену тачности и прецизности.

3.10.2. ПРИПРЕМА ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ

Осушене капи плазме припремљене су наношењем 40 µL калибрационог стандарда, QC/MV узорка, односно узорка плазме добијеног од пацијента, на Гатри картице. Наведена запремина сваког узорка пажљиво је нанета на картицу у центар обележеног круга, предвиђеног за то. Картице су сушене два до три сата на

собној температури, заштићене од светлости и влаге. Након тога су спаковане у пластичне кесе са десикантом и складиштене у фрижидеру до анализе.

3.10.3. УЗОРЦИ ПАЦИЈЕНАТА

Ова студија је изведена у складу са Хелсиншком декларацијом и одобрена је од стране Етичког одбора Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду (видети Прилоге дисертације). Потписани Информисани пристанак добијен је од родитеља, односно старатеља пацијената. Пацијенти оболели од жаришне епилепсије или од Вестовог синдрома били су на терапији комерцијално доступним таблетама вигабатрина или раствором за *per os* примену, са или без комедикације.

Осушене капи плазме пацијената припремљене су након узорковања крви у вакутејнере који су као антикоагуланс садржали EDTA-K₃. Крв је центрифугирана на 4000 rpm (1538 g), а затим је 40 µL плазме нането на Гатри картице, коришћењем аутоматске пипете, формирајући четири осушене капи по картици.

3.10.4. ЕКСТРАКЦИЈА DPS И ПРОЦЕДУРА ДЕРИВАТИЗАЦИЈЕ

Коришћењем некомерцијалног бушача промера 5 mm, са картица је извађен диск из центра осушене капи плазме и пренет у епрувету за микроцентрифугу. Додато је 100 µL раствора интерног стандарда, а затим је уследило мешање на *Vortex* апарату у трајању од 10 минута како би се извршила екстракција анализата. Реакција дериватизације изведена је додатком 150 µL раствора натријум-хидроксида (припрема описана у поглављу 3.7.2), 80 µL раствора *n*-пропанола у пиридину (припрема описана у поглављу 3.7.3) и 50 µL раствора реагенса *n*-пропилхлороформата (припрема описана у поглављу 3.7.4) и мешањем на *Vortex* апарату у трајању од два минута. Течно-течна екстракција новоформираних деривата у органски слој изведена је додатком 500 µL етил-ацетата, током 10 минута, а затим је 450 µL горњег слоја пребачено у бочице и упарено до сува у

струји азота. Суви екстракти су реконституисани са 500 μL ацетонитрила и остављени у аутосемплеру на 10°C до анализе.

3.10.5. ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ

Мобилна фаза: ацетонитрил : 0,15% мравља киселина (85:15 V/V)

Брзина протока мобилне фазе: 550 $\mu\text{L}/\text{min}$

Колона: *Zorbax Eclipse XDB–C8* (150 mm $\times$ 4,6 mm, величине честица 5 μm)

Температура колоне: 30°C

Ињекциона запремина: 20 μL

3.10.6. УСЛОВИ ТАНДЕМ МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА

V-растојање: позиција D

Y-растојање: 2,00

Ширина скенирања: 0,05 m/z

Време скенирања: 0,01 s

Напон спреја: 4500 V

Температура испаривача: 350°C

Температура трансфер капиларе: 290°C

Притисак носећег гаса: 50 арбитрарних јединица

Притисак помоћног гаса: 10 арбитрарних јединица

Колизиони притисак: 1,0 mTorr

3.10.7. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ

3.10.7.1. Селективност

Селективност је тестирана са шест „празних“ узорак плазме (енг. *Blank*). За сваки узорак испитане су интерференције потенцијално истовремено примењених антиепилептика као што су валпроинска киселина, фенobarбитон, ламотригин, прегабалин, топирамат, леветирацетам, карбамазепин, али и лекова као што су парацетамол и амоксицилин. Селективност је тестирана у концентрацији 0,500 µg/mL (енг. *Lower Limit of Quantification*, LLOQ).

3.10.7.2. Калибрациона крива

Процењен је линеарни регресиони модел, $y = ax + b$, где је x концентрација вигабатрина, а y одговара односу површина дериватизованог вигабатрина и интерног стандарда. Због хетероскедастичности, одабран је одговарајући тежински фактор, на основу најмање суме процентуалне релативне грешке по линеарној регресији (објашњење поступка дато је у поглављу 4.3.1.2).

3.10.7.3. Тачност и прецизност

Током тестирања ових параметара, процењене су тачност и прецизност унутар аналитичке секвенце (енг. *Within-run*), као и између пет различитих аналитичких секвенци (енг. *Between-run*) у четири различите MV концентрације. Тачност је исказана као проценат приноса (енг. *Recovery*), а прецизност као релативна стандардна девијација (енг. *Relative Standard Deviation*, RSD) за сваки MV ниво.

3.10.7.4. Појава сигнала аналита заосталог из претходно анализираних узорка

Појава сигнала аналита заосталог из претходно анализираних узорка (енг. *Carry Over*) тестирана је током извођења аналитичке секвенце, ињектовањем растварача након калибрационог стандарда највише концентрације.

3.10.7.5. Принос екстракције

Принос екстракције из DPS израчунат је поређењем површина пикова за екстраховане и неекстраховане MV_1 , MV_2 и MV_3 узорке. Неекстраховани узорци припремљени су дериватизацијом 5 μL раствора вигабатрина у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини и реконституисањем са екстрактима „празних“ узорака. Тестирање је изведено у трипликату за све MV нивое.

3.10.7.6. Матрикс ефекат

Матрикс ефекат је квантитативно процењен у концентрацијама које одговарају MV_1 , MV_2 и MV_3 нивоу. Два сета узорака раствора вигабатрина у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини подвргнути су реакцији дериватизације и екстракције у трипликату, на начин како је претходно описано у поглављу 3.10.4. Узорци првог сета (означени са SOL) реконституисани су ацетонитрилом, док су узорци другог сета реконституисани екстрактима добијеним из „празних“ DPS (означени са ME).

3.10.7.7. Стабилност

У склопу валидације методе, испитана је краткорочна стабилност и дугорочна стабилност, стабилност основног раствора и радног раствора, као и стабилност деривата у аутосемплеру.

Краткорочна стабилност, дугорочна стабилност и стабилност у аутосемплеру испитане су коришћењем два сета узорака, у концентрацији 2 $\mu\text{g/mL}$ (S_L) и 40 $\mu\text{g/mL}$ (S_H). Сви узорци анализирани су у трипликату. Краткорочна стабилност процењена је поређењем свеже припремљених узорака DPS са узорцима DPS који су стајали на собној температури током четири сата. Дугорочна стабилност испитана је поређењем свеже припремљених DPS узорака са онима који су стајали у фрижидеру на температури од 2°C до 8°C током четири месеца. Стабилност анализата у аутосемплеру процењена је анализирањем узорака

на почетку и на крају аналитичке секвенце, после 15 сати, што одговара времену у коме би се изанализирао максималан број од 200 узорака који стају у носач аутосемплера.

Стабилност основног раствора и радног раствора, складиштених у фрижидеру на температури од 2°C до 8°C испитана је за период од три месеца за основни раствор, односно две недеље за радни раствор. „Стари“ раствори, разблажени су са 0,1 mol/L хлороводоничном киселином тако да се добију раствори концентрације 1 µg/mL за основни раствор и 0,5 µg/mL за радни раствор. Ови раствори анализирани су у односу на свеже припремљене растворе истих концентрација.

3.10.7.8. Реанализа узорака

Свих 12 узорака добијених од пацијената, подвргнуто је поновној анализи (енг. *Incurred Sample Reanalysis*), и ови резултати су упоређени са оригинално добијеним вредностима.

3.10.7.9. Тест разблажења

Припремљен је QC узорак у концентрацији од 90 µg/mL и 40 µL овог раствора је нането на Гатри картицу. Процедура припреме узорка изведена је према протоколу описаном у поглављу 3.10.4, с тим што је за реконституисање додато 500 µL ацетонитрила и још додатних 1000 µL ацетонитрила којим су реконституисани узорци који су садржали само интерни стандард (енг. *Zero*), како би се испитао утицај разблажења (енг. *Dilution Integrity*). Припремљено је пет оваквих узорака и они су тестирани као QC узорци разблажени три пута у односу на номиналну вредност од 30 µg/mL.

3.11. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ПРЕГАБАЛИНА ИЗ ОСУШЕНИХ КАПИ КРВИ И ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ

3.11.1. ПРИПРЕМА РАСТВОРА, КАЛИБРАЦИОНИХ СТАНДАРДА И УЗОРАКА ЗА ПРОВЕРУ КВАЛИТЕТА И ВАЛИДАЦИЈУ МЕТОДЕ

Основни раствори прегабалина и интерног стандарда припремљени су растварањем супстанци у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини тако да се добију концентрације од 1000 µg/mL за прегабалин и 100 µg/mL за интерни стандард. Радни раствори припремљени су серијом разблажења основног раствора прегабалина у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини тако да се добију следеће концентрације: 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50,0 µg/mL, 20,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 4,00 µg/mL и 2,00 µg/mL за одређивање у осушеним капима крви и 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 40,0 µg/mL, 20,0 µg/mL, 8,00 µg/mL и 4,00 µg/mL за одређивање у осушеним капима плазме. Радни раствор интерног стандарда припремљен је у концентрацији од 2,00 µg/mL, такође у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини. Још један основни раствор прегабалина, концентрације 1000 µg/mL, спремљен је након посебне одваге, и коришћен за припрему QC/MV узорака у четири концентрације: 150 µg/mL, 30,0 µg/mL, 6,00 µg/mL и 2,00 µg/mL за одређивање у осушеним капима крви, односно 300 µg/mL, 60,0 µg/mL, 12,0 µg/mL и 4,00 µg/mL за одређивање у осушеним капима плазме.

Калибрациона крива конструисана је са седам стандарда, припремљених након разблажења радних раствора у хуманој крви односно плазми у односу 1:9, у 1,5 mL епруветама за микроцентрифугу. Коначне концентрације раствора за одређивање из крви биле су 20,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 5,00 µg/mL, 2,00 µg/mL, 1,00 µg/mL, 0,400 µg/mL и 0,200 µg/mL, а за одређивање из плазме 40,0 µg/mL, 20,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 4,00 µg/mL, 2,00 µg/mL, 0,800 µg/mL и 0,400 µg/mL. Концентрације QC/MV узорака након разблажења биле су: 15,0 µg/mL (QC_{3B}/MV_{3B}), 3,00 µg/mL (QC_{2B}/MV_{2B}), 0,600 µg/mL (QC_{1B}/MV_{1B}) и 0,200 µg/mL (MV_{LB}) за DBS, односно 30,0 µg/mL (QC_{3P}/MV_{3P}), 6,00 µg/mL (QC_{2P}/MV_{2P}), 1,20 µg/mL (QC_{1P}/MV_{1P}) и 0,400 µg/mL (MV_{LP}) за DPS. На основу резултата добијених анализом QC узорака резултати аналитичких

секвенци су прихватани или одбијани, док су резултати добијени анализом MV узорака коришћени за процену тачности и прецизности. Крв са вредношћу хематокрита 37% коришћена је за припрему осушених капи крви за валидацију методе.

3.11.2. ПРИПРЕМА ОСУШЕНИХ КАПИ КРВИ И ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ

Осушене капи матрикса припремљене су наношењем одређене количине калибрационог стандарда, QC/MV узорка, односно узорка крви/плазме добијеног од пацијента, на Гатри картице, на место предвиђено за то, унутар граница обележеног круга. Узорци крви нанети су у запремини од 50 μL , а узорци плазме у запремини од 40 μL , због различитог афинитета ширења ова два матрикса. Картице су сушене два до три сата на собној температури, заштићене од светлости и влаге. Након тога су спаковане у пластичне кесе са десикантом и складиштене у фрижидеру до анализе.

3.11.3. УЗОРЦИ ПАЦИЈЕНАТА

Ова студија изведена је у складу са Хелсиншком декларацијом и одобрена је од стране Етичког одбора Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду (видети Прилоге дисертације). Потписани Информисани пристанак добијен је од пацијената лично или од њихових родитеља, односно старатеља.

Студијом су били обухваћени деца и адолесценти оба пола, са парцијалним епилептичким нападима, са или без секундарне генерализације, у складу са дефиницијом Комисије међународне лиге за борбу против епилепсија. Испитивани пацијенти имали су високо резистентне нападе током најмање две године трајања терапије антиепилептичким лековима избора за жаришне нападе. Терапија прегабалином започета је након неуспешне терапије другим антиепилептицима. Сви пацијенти били су на терапији комерцијално доступним капсулама прегабалина са или без комедикације, али без истовремене примене габапентина.

У вакутејнере са додатком EDTA- K_3 узорковано је 500 μL крви. Један део ове запремине коришћен је за припрему осушених капи крви, остатак је центрифугиран на 4000 rpm (1538 g), а затим су са супернатантом припремљене осушене капи плазме. Коришћењем аутоматске пипете, на картицу су нанете по четири осушене капи матрикса.

3.11.4. ЕКСТРАКЦИЈА DBS/DPS И ПРОЦЕДУРА ДЕРИВАТИЗАЦИЈЕ

Коришћењем некомерцијалног бушача промера 4 mm, са картица је извађен диск из центра осушене капи крви односно плазме и пренет у епрувету за микроцентрифугу. Додато је 100 μL раствора интерног стандарда, а затим мешано на *Vortex* апарату 10 минута како би се извршила екстракција анализата. Реакција дериватизације изведена је додатком 150 μL раствора натријум-хидроксида (припрема описана у поглављу 3.7.2), 80 μL *n*-пропанола у пиридину (припрема описана у поглављу 3.7.3) и 50 μL смеше реагенса *n*-пропилхлороформата (припрема описана у поглављу 3.7.4). Течно-течна екстракција новоформираних деривата у органски слој одвијала се током 10 минута, након додатка 500 μL етил-ацетата. Затим је 400 μL горњег слоја пренето у бочице и упарено до сува у струји азота. Суви екстракти су реконституисани са 100 μL ацетонитрила, пренети у инсерт-вијале и остављени у аутосемплер на 10°C до анализе.

3.11.5. ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ

Мобилна фаза: ацетонитрил – 0,15% мравља киселина (85:15 V/V)

Брзина протока мобилне фазе: 550 $\mu\text{L}/\text{min}$

Колона: *YMC-Pack Octyl* (50 mm $\times$ 4,0 mm, величине честица 3 μm)

Температура колоне: 30°C

Ињекциона запремина: 20 μL

3.11.6. УСЛОВИ ТАНДЕМ МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА

V-растојање: позиција D

Y-растојање: 2,00

Ширина скенирања: 0,05 m/z

Време скенирања: 0,01 s

Напон спреја: 4500 V

Температура испаривача: 350°C

Температура трансфер капиларе: 290°C

Притисак носећег гаса: 50 арбитрарних јединица

Притисак помоћног гаса: 10 арбитрарних јединица

Колизионни притисак: 1,0 mTorr

3.11.7. ПРИПРЕМА УЗОРАКА КРВИ РАЗЛИЧИТИХ ХЕМАТОКРИТА

У вакутејнере са EDTA-K₃ као антикоагулансом, сакупљена је крв здравог добровољца који у моменту донирања биолошког материјала није био на терапији комерцијално доступним лековима. Крв је центрифугирана пет минута на 4000 rpm (1538 g), а након уклањања плазме, еритроцити су испрани три пута са 0,9% раствором натријум-хлорида. Узорци различитих вредности хематокрита (20%, 30%, 40%, 50% и 60%) припремљени су додавањем плазме у корпускуларне елементе. Са овако припремљеним узорцима разблажен је раствор прегабелина концентрације 50 µg/mL, у односу 9:1, након чега је поново измерена вредност хематокрита. Наношењем 50 µL сваког од ових узорака на Гатри картице, добијене су осушене капи крви различитих вредности хематокрита.

3.11.8. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ

3.11.8.1. Селективност

Тестирано је пет „празних“ узорака крви и плазме на потенцијалне интерференције од истовремено примењених лекова, као што су валпроинска киселина, вигабатрин, габапентин, фенобарбитон, ламотригин, топирамат, леветирацетам, карбамазепин, парацетамол и амоксицилин. Концентрација свих тестираних лекова била је 10 µg/mL. Селективност је тестирана у LLOQ концентрацији од 0,200 µg/mL за крв и 0,400 µg/mL за плазму.

3.11.8.2. Калибрациона крива

За одређивање прегабалина из DBS и DPS изведене су четири аналитичке секвенце за сваки матрикс, а затим је процењен линеарни регресиони модел, $y = ax + b$, где је x концентрација прегабалина, а y одговара односу површина дериватизованог прегабалина и интерног стандарда. Због хетероскедастичности, одабран је одговарајући тежински фактор, на основу најмање суме процентуалне релативне грешке по линеарној регресији (објашњење поступка дато је у поглављу 4.3.1.2).

3.11.8.3. Тачност и прецизност

Тачност и прецизност унутар аналитичке секвенце, као и између различитих аналитичких секвенци, процењене су анализом пет сетова MV узорака на четири нивоа, током четири различита дана. Тачност је исказана као проценат одступања (енг. *Bias*), а прецизност као релативна стандардна девијација (RSD) за сваки MV ниво.

3.11.8.4. Појава сигнала анализата заосталог из претходно анализираних узорка

Појава сигнала анализата заосталог из претходно анализираних узорка тестирана је током извођења аналитичке секвенце, ињектовањем растварача након калибрационог стандарда највише концентрације.

3.11.8.5. Принос екстракције

Принос екстракције из DBS и DPS, за сваки матрикс посебно, израчунат је поређењем површина пикова за два сета узорка. Први сет узорка представљали су узорци чистог матрикса, у које је накнадно додат дериватизовани аналит, а други сет DBS/DPS MV узорци, на три нивоа (MV_1 , MV_2 и MV_3). Узорци чистог матрикса припремљени су на следећи начин: DBS и DPS дискови подвргнути су реакцији дериватизације у трипликату и упарени до сува након екстракције, као што је претходно описано у поглављу 3.11.4. Реконституисани су са 100 μL раствора дериватизованог прегабалина и интерног стандарда у ацетонитрилу. Ови раствори добијени су након дериватизације раствора прегабалина и интерног стандарда у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини, у запреминама од 5,6 μL за крв и 3,3 μL за плазму, јер је то запремина која одговара количини узорка која се узима коришћењем једног диска DPS/DBS (опис израчунавања дат је у поглављу 4.4).

3.11.8.6. Матрикс ефекат

Матрикс ефекат је квантитативно процењен на три нивоа, MV_1 , MV_2 и MV_3 , поређењем површина пикова дериватизованог прегабалина за два сета узорка, узорка који садрже матрикс и узорка који не садрже матрикс. Најпре су формиране осушене капи раствора прегабалина у 0,1 mol/L хлороводоничној киселини, у концентрацијама 0,600 $\mu\text{g/mL}$, 3,00 $\mu\text{g/mL}$ и 15,0 $\mu\text{g/mL}$ за DBS и 1,20 $\mu\text{g/mL}$, 6,00 $\mu\text{g/mL}$ и 30,0 $\mu\text{g/mL}$ за DPS. Два сета дискова подвргнута су реакцији дериватизације и екстракције у трипликату, на начин као што је већ описано у поглављу 3.11.4. Узорци првог сета (означени са SOL) реконституисани

су са чистим ацетонитрилом, док су узорци другог сета реконституисани са екстрактима добијеним реконституисањем „празних“ узорака осушене крви и плазме (означени са МЕ).

3.11.8.7. Стабилност

У склопу валидације методе, испитана је краткорочна и дугорочна стабилност, стабилност основног и радног раствора, као и стабилност деривата у аутосемплеру.

Краткорочна и дугорочна стабилност испитане су коришћењем два сета узорака за крв и плазму, у нижој концентрацији од 0,500 $\mu\text{g/mL}$ (S_{LB}) и 1,00 $\mu\text{g/mL}$ (S_{LP}), односно у вишој концентрацији од 15,0 $\mu\text{g/mL}$ (S_{HB}) и 30,0 $\mu\text{g/mL}$ (S_{HP}). Током испитивања стабилности, сви узорци су анализирани у трипликату. Краткорочна стабилност процењена је поређењем свеже припремљених узорака DBS/DPS са узорцима који су стајали на собној температури током четири сата. Дугорочна стабилност испитана је поређењем свеже припремљених DBS/DPS са онима које су стајале у фрижидеру на температури од 2°C до 8°C током четири месеца.

Стабилност основног раствора и радног раствора, складиштених у фрижидеру на температури од 2°C до 8°C, испитана је за период од четири месеца, односно две недеље. „Стари“ раствори, разблажени су са 0,1 mol/L хлороводоничном киселином тако да се добију раствори концентрације 1,00 $\mu\text{g/mL}$ за основни раствор и 0,500 $\mu\text{g/mL}$ за радни раствор. Ови раствори анализирани су у односу на свеже припремљене растворе истих концентрација.

Стабилност анализата у аутосемплеру процењена је анализирањем MV_1 , MV_2 и MV_3 узорака на почетку и на крају аналитичке секвенце, после седам сати, што одговара времену у коме би се изанализирао максималан број од 200 узорака који стају у носач аутосемплера.

3.11.8.8. Реанализа узорака

Свих 12 узорака добијених од пацијената, поново је анализирано, и добијени резултати су упоређени са оригинално добијеним вредностима.

3.11.8.9. Тест разблажења

На Гатри картицу нането је 50 μL QC узорка концентрације 30 $\mu\text{g/mL}$ за крв и 40 μL QC узорка концентрације 60 $\mu\text{g/mL}$ за плазму. Процедура припреме узорка изведена је према протоколу описаном у поглављу 3.11.4, али је за реконституисање додато 100 μL ацетонитрила и још додатних 200 μL ацетонитрила искоришћеног за реконституисање узорака који су садржали само интерни стандард. Припремљено је пет оваквих узорака и они су тестирани као QC узорци разблажени три пута у односу на номиналну концентрацију од 10 $\mu\text{g/mL}$ за DBS и 20 $\mu\text{g/mL}$ за DPS.

3.11.8.10. Хомогеност осушених капи

Током испитивања овог параметра, тестирана је хомогеност узорка крви и узорка плазме адсорбованог на картицу. Узимајући у обзир површину осушене капи, дијаметар бушача и границе круга намењеног за наношење узорка, било је изводљиво екстраховање диска са четири различита положаја, мимо вађења диска из самог центра. Дискови DBS и DPS, за концентрацију прегабалина од 5 $\mu\text{g/mL}$, извађени из горњег левог, горњег десног, доњег левог и доњег десног дела осушене капи, подвргнути су процесу припреме узорака описаном у поглављу 3.11.4.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације јесте анализа антиепилептика цвитерјонске структуре (вигабатрин, прегабалин, габапентин) у узорцима биолошког материјала прикупљеним у облику DPS и DBS. Са аналитичког аспекта веома је значајно да ови лекови не подлежу метаболизму, па је могуће њихово директно праћење у узорцима биолошког материјала. Међутим, због цвитерјонске структуре, која отежава јонизацију у масеном спектрометру, а тиме и детекцију, неопходна је дериватизација ових молекула како би се повећала ефикасност јонизације, а тиме постигла и боља осетљивост. Истраживање је подељено у неколико фаза које су обухватале: проучавање утицаја различитих комбинација *n*-алкилхлороформата и *n*-алкохола за дериватизацију вигабатрина, прегабалина и габапентина на одговор анализата у LC–ESI–MS/MS систему, унапређење параметара масеног спектрометра као и параметара методе течне хроматографије и, на крају, валидацију метода за одређивање одабраних антиепилептика у узорцима биолошког материјала прикупљеним од пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду.

4.1. ИЗБОР ОДГОВАРАЈУЋЕГ РЕАГЕНСА ЗА ДЕРИВАТИЗАЦИЈУ

У првом делу истраживања вигабатрин, прегабалин и габапентин дериватизовани су применом различитих *n*-алкилхлороформата, као што је објашњено у поглављу 3.7.5. Циљ овог дела докторске дисертације био је да се испитају ефекти примењених *n*-алкилхлороформата (од метил- до бутил-), комбинованих са различитим *n*-алкохолима (од метанола до бутанола) на LC–ESI–MS/MS анализу одабраних антиепилептика.

Због великог броја деривата који су синтетисани коришћењем различитих комбинација *n*-алкилхлороформата и *n*-алкохола, сваком деривату додељено је кодирано име као комбинација првог слова или првих слова алкил радикала хлороформата (метил = M, Me, Met; етил = E, Et, Eth; пропил = P, Pr, Pro и бутил = B, Bu, But) и алкил радикала алкохола (метил = M, Me, Met; етил = E, Et, Eth; пропил = P, Pr, Pro и бутил = B, Bu, But). Акроними за деривате вигабатрина

означени су са два (нпр. ММ), за деривате прегабалина са четири (нпр. МеМе), а за деривате габапентина са шест (нпр. MetMet) слова.

4.1.1. ЕФЕКТИ РЕАКЦИЈЕ ДЕРИВАТИЗАЦИЈЕ НА РЕТЕНЦИОНО ВРЕМЕ

Дериватизација одабраних молекула и њихова LC–ESI–MS/MS анализа довела је до низа закључака. Коришћењем различитих комбинација реагенаса за дериватизацију синтетисани су деривати испитиваних једињења чија су се ретенциона времена очигледно разликовала. Под истим експерименталним условима, са повећањем дужине алкил низа (односно броја угљеникових атома), ретенционо време на C8 колони је продужено, тако да су се у RP–HPLC систему најдуже задржавали деривати добијени коришћењем комбинације *n*-бутилхлороформат/*n*-бутанол. Најмање липофилан од свих деривата, ММ (дериват вигабатрина), имао је ретенционо време од 2,77 минута, док је најлипофилнији дериват, ButBut (дериват габапентина), елуиран на 7,24 минута. Такође се може уочити да су сви деривати са истим бројем угљеникових атома (нпр. МЕ и ЕМ деривати вигабатрина, елуирани на 2,90 минута и 2,91 минута) испољили практично исто ретенционо понашање, уз незнатна одступања. Из овога се може закључити да је број угљеникових атома, тј. липофилност деривата, имао пресудан утицај на ретенциона времена у одабраном хроматографском систему. Подаци о свим испитиваним дериватима приказани су у табели 5 за вигабатрин, табели 6 за прегабалин и табели 7 за габапентин.

Табела 5. Подаци за све деривате вигабатрина добијени након LC–ESI–MS/MS анализе (публиковано у Talanta 116 (2013) 91–99)

Table 5. Data for all vigabatrin derivatives obtained after LC–ESI–MS/MS analysis (published in Talanta 116 (2013) 91–99)

Дериват ^а	Број С атома	t _R ^б (min)	SRM (m/z) и колизионе енергије ^в	LOD (µg/mL) ^г
ММ	9	2,77	201,96 → 85,15 (17), 127,10 (7)	0,264
МЕ	10	2,90	215,99 → 99,12 (15), 141,08 (7)	0,184
МР	11	3,08	229,98 → 113,09 (13), 155,08 (6)	0,151
МВ	12	3,37	244,04 → 113,09 (14), 169,16 (5)	0,180
ЕМ	10	2,91	215,98 → 85,14 (17), 127,08 (7)	0,125
ЕЕ	11	3,06	229,97 → 99,11 (16), 141,09 (8)	0,063
ЕР	12	3,27	244,00 → 113,10 (15), 155,09 (6)	0,045
ЕВ	13	3,60	258,00 → 113,10 (14), 169,08 (6)	0,032
РМ	11	3,07	230,01 → 85,15 (19), 127,10 (7)	0,110
РЕ	12	3,27	244,02 → 99,15 (16), 141,10 (8)	0,050
РР	13	3,54	258,03 → 113,10 (14), 155,10 (6)	0,039
РВ	14	3,94	272,05 → 113,11 (14), 169,11 (6)	0,029
ВМ	12	3,36	244,02 → 85,14 (20), 127,08 (7)	0,069
ВЕ	13	3,53	258,03 → 99,11 (17), 141,08 (10)	0,027
ВР	14	3,88	272,04 → 113,09 (15), 155,08 (8)	0,022
ВВ	15	4,36	286,06 → 113,09 (15), 169,08 (7)	0,017

^а видети поглавље 4.1.

^б t_R – ретенционо време, средња вредност (n = 3)

^в вредности за одговарајуће колизионе енергије (eV) дате су у заградама

^г LOD – лимит детекције (енг. *Limit of Detection*), средња вредност (n = 3)

Табела 6. Подаци за све деривате прегабалина добијени након LC–ESI–MS/MS анализе (публиковано у Talanta 116 (2013) 91–99)

Table 6. Data for all pregabalin derivatives obtained after LC–ESI–MS/MS analysis (published in Talanta 116 (2013) 91–99)

Дериват ^а	Број С атома	t _R ^б (min)	SRM (m/z) и колизионе енергије ^в	LOD (µg/mL) ^г
MeMe	11	3,22	231,95 → 167,99 (14), 200,00 (7)	0,509
MeEt	12	3,47	245,95 → 167,98 (15), 199,98 (6)	0,370
MePr	13	3,80	259,96 → 167,98 (15), 199,99 (5)	0,400
MeBu	14	4,22	273,99 → 167,99 (16), 199,99 (7)	0,284
EtMe	12	3,49	246,02 → 142,07 (19), 214,00 (7)	0,284
EtEt	13	3,79	260,02 → 142,06 (19), 214,00 (7)	0,218
EtPr	14	4,22	274,03 → 142,07 (20), 213,99 (8)	0,167
EtBu	15	4,76	288,05 → 142,07 (21), 214,00 (6)	0,147
PrMe	13	3,76	259,98 → 142,03 (18), 227,97 (5)	0,212
PrEt	14	4,15	273,98 → 142,03 (20), 227,97 (6)	0,156
PrPr	15	4,69	287,99 → 142,04 (19), 227,96 (7)	0,125
PrBu	16	5,38	302,00 → 142,02 (18), 227,95 (6)	0,136
BuMe	14	4,16	274,00 → 142,03 (18), 242,00 (5)	0,287
BuEt	15	4,68	288,00 → 142,03 (18), 241,98 (7)	0,181
BuPr	16	5,40	302,01 → 142,04 (18), 241,98 (6)	0,172
BuBu	17	6,29	316,02 → 142,03 (19), 241,98 (7)	0,128

^а видети поглавље 4.1.

^б t_R – ретенционо време, средња вредност (n = 3)

^в вредности за одговарајуће колизионе енергије (eV) дате су у заградама

^г LOD – лимит детекције (енг. *Limit of Detection*), средња вредност (n = 3)

Табела 7. Подаци за све деривате габапентина добијени након LC–ESI–MS/MS анализе (публиковано у Talanta 116 (2013) 91–99)

Table 7. Data for all gabapentin derivatives obtained after LC–ESI–MS/MS analysis (published in Talanta 116 (2013) 91–99)

Дериват ^а	Број С атома	t _R ^б (min)	SRM (m/z) и колизионе енергије ^в	LOD (µg/mL) ^г
MetMet	12	3,40	243,96 → 179,98 (14), 211,98 (6)	0,105
MetEth	13	3,73	257,97 → 179,98 (15), 211,97 (5)	0,068
MetPro	14	4,14	271,98 → 179,98 (15), 211,98 (5)	0,056
MetBut	15	4,68	285,99 → 179,97 (17), 211,98 (7)	0,044
EthMet	13	3,69	257,98 → 154,06 (20), 225,99 (7)	0,032
EthEth	14	4,12	271,98 → 154,04 (20), 225,99 (5)	0,021
EthPro	15	4,65	285,99 → 154,04 (23), 225,98 (6)	0,020
EthBut	16	5,32	300,00 → 154,03 (23), 225,96 (7)	0,020
ProMet	14	4,06	271,97 → 154,03 (19), 239,96 (7)	0,027
ProEth	15	4,58	285,97 → 154,02 (22), 239,95 (7)	0,015
ProPro	16	5,26	299,98 → 154,02 (21), 239,94 (6)	0,016
ProBut	17	6,15	314,00 → 154,01 (23), 239,93 (7)	0,013
ButMet	15	4,57	285,96 → 154,00 (19), 253,92 (6)	0,015
ButEth	16	5,26	299,95 → 154,00 (18), 253,91 (6)	0,013
ButPro	17	6,17	313,96 → 153,99 (19), 253,90 (7)	0,012
ButBut	18	7,24	327,96 → 153,98 (22), 253,88 (7)	0,012

^а видети поглавље 4.1.

^б t_R – ретенционо време, средња вредност (n = 3)

^в вредности за одговарајуће колизионе енергије (eV) дате су у заградама

^г LOD – лимит детекције (енг. *Limit of Detection*), средња вредност (n = 3)

Како би се извршила корелација хроматографског понашања анализираних деривата са бројем угљеникових атома, креиране су дескриптивне математичке једначине коришћењем софтвера *TableCurve2D*. Једначина којом се са високом вредношћу коефицијента детерминације (R^2) може описати зависност ретенционог времена од броја угљеникових атома за сва три дериватизована молекула била је облика $\ln y = a + bx^3$ (табела 8). Интересантно је да су једначине добијене за прегабалин и габапентин имале практично исте вредности коефицијената a и b , што је последица сличног ретенционог понашања деривата са истим бројем угљеникових атома. На пример, вредности t_R за EtEt дериват прегабалина и MetEtH дериват габапентина (оба са 13 угљеникових атома) била су 3,79 минута и 3,73 минута. Ово додатно потврђује да је ретенционо понашање заиста под доминантним утицајем броја угљеникових атома, без обзира на основну структуру одабраних супстанци.

Табела 8. Једначине које описују хроматографско понашање у функцији волуминозности/броја C атома деривата и статистички подаци (публиковано у *Talanta* 116 (2013) 91–99)

Table 8. Mathematical equations which describe chromatographic behavior as a function of the bulk/length of the derivatives and statistical data (published in *Talanta* 116 (2013) 91–99)

Аналит	Једначина ^a	R^2	Adj. R^2	p -вредност ^b
Вигабатрин	$\ln y = 0,898 + 0,000170x^3$	0,9991	0,9986	0,00
Прегабалин	$\ln y = 0,925 + 0,000186x^3$	0,9999	0,9999	0,00
Габапентин	$\ln y = 0,910 + 0,000184x^3$	0,9998	0,9997	0,00

^a x – број угљеникових атома, y – ретенционо време

^b ниво значајности $p = 0,05$

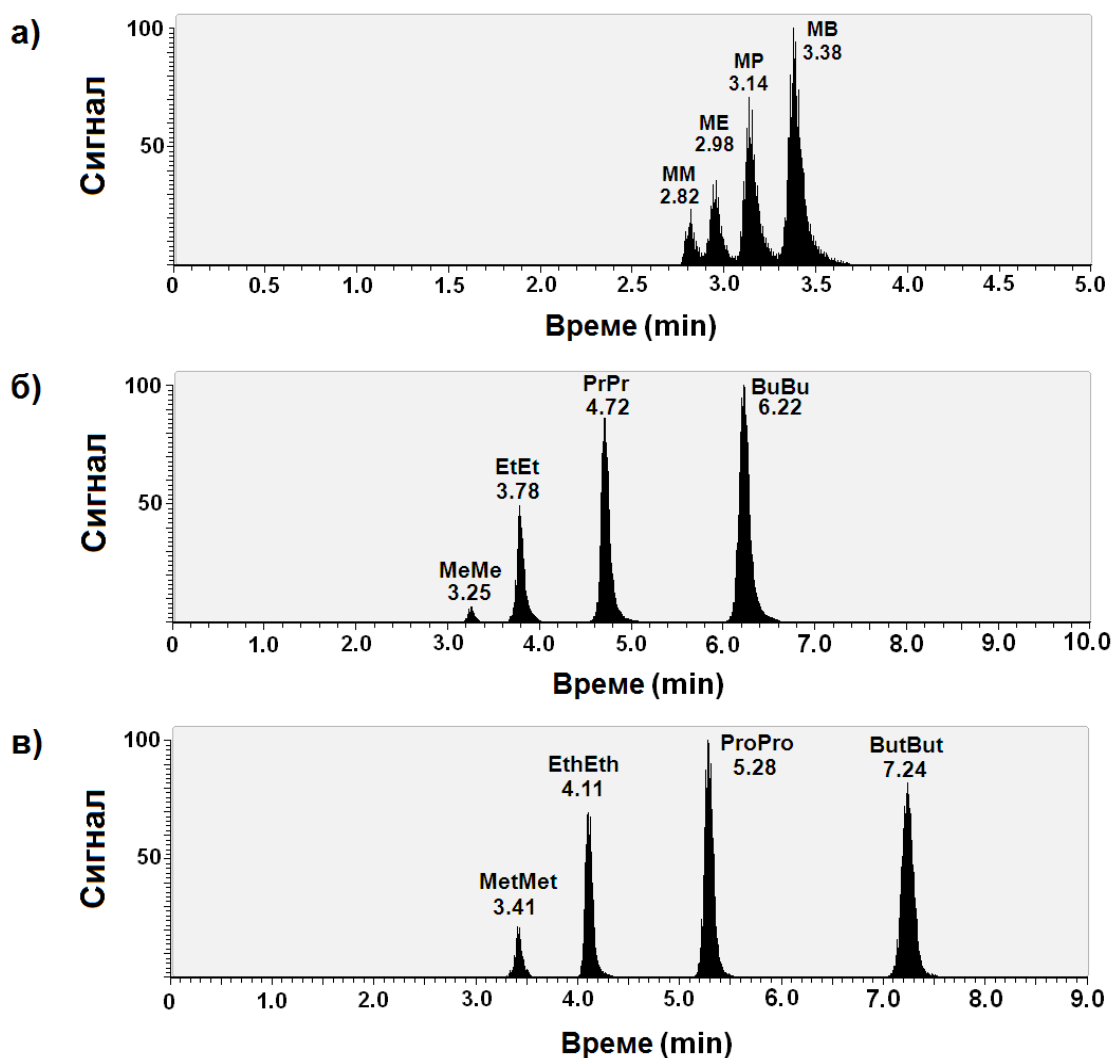
4.1.2. MS/MS СИГНАЛ ДЕРИВАТА

Друга значајна промена, а која је у вези са дериватизацијом различитим комбинацијама *n*-алкилхлороформата и *n*-алкохола, јесте јачина сигнала, процењена на основу површине пикова.

Пикови су добијени праћењем две SRM транзиције за сваки дериват, али се разлике у површинама, као и у ретенционим временима, могу боље уочити посматрањем хроматограма свих јона (енг. *Total Ion Chromatograms*, TIC). На слици 23 приказан је TIC добијен за смешу деривата вигабатрина MM, ME, MP и MB у једнаким запреминама. Евидентно је да интензитет сигнала расте са повећањем дужине *n*-алкил радикала, пореклом од алкохола (слика 23а). Повећање сигнала као последица варирања дужине *n*-алкил радикала, пореклом од хлороформата и од алкохола, приказано је на слици 23б (TIC за MeMe, EtEt, PrPr и BuBu деривате прегабалина) и 23в (TIC за MetMet, EthEth, ProPro и ButBut деривате габапентина). На основу слике 23в, и јачине сигнала, могло би се претпоставити да ProPro дериват има већу површину у односу на ButBut. Међутим, продужавање алкил низа повећава не само интензитет сигнала, већ и липофилност деривата, доводећи до њиховог дужег задржавања на C8 колони и промене облика пика. Пикови постају шири, што резултира повећањем површине, али смањењем интензитета сигнала.

Слика 24 збирно приказује резултате за све деривате, груписане према аналиту. Груписани стубичасти графикони јасно показују разлике међу дериватима приликом коришћења истог хлороформата, а које су последица примене различитог алкохола у реакционој смеси. Слични ефекти су примећени приликом промене дужине *n*-алкил ланца пореклом од хлороформата. И са ове слике јасно се види да продужење *n*-алкил ланца утиче на површину пика, уз значајно повећање уколико су присутне дуге *n*-алкил групе. До истог закључка дошли су и други истраживачи, приликом испитивања аминокиселина, дериватизованих коришћењем *N*-хидрокси-сукцинимидних естара *N*-алкилникотинске киселине (C_{*n*}-NA-NHS) [117]. Овај феномен приписан је механизму електроспреј јонизације, уз објашњење да са продужетком алкил низа

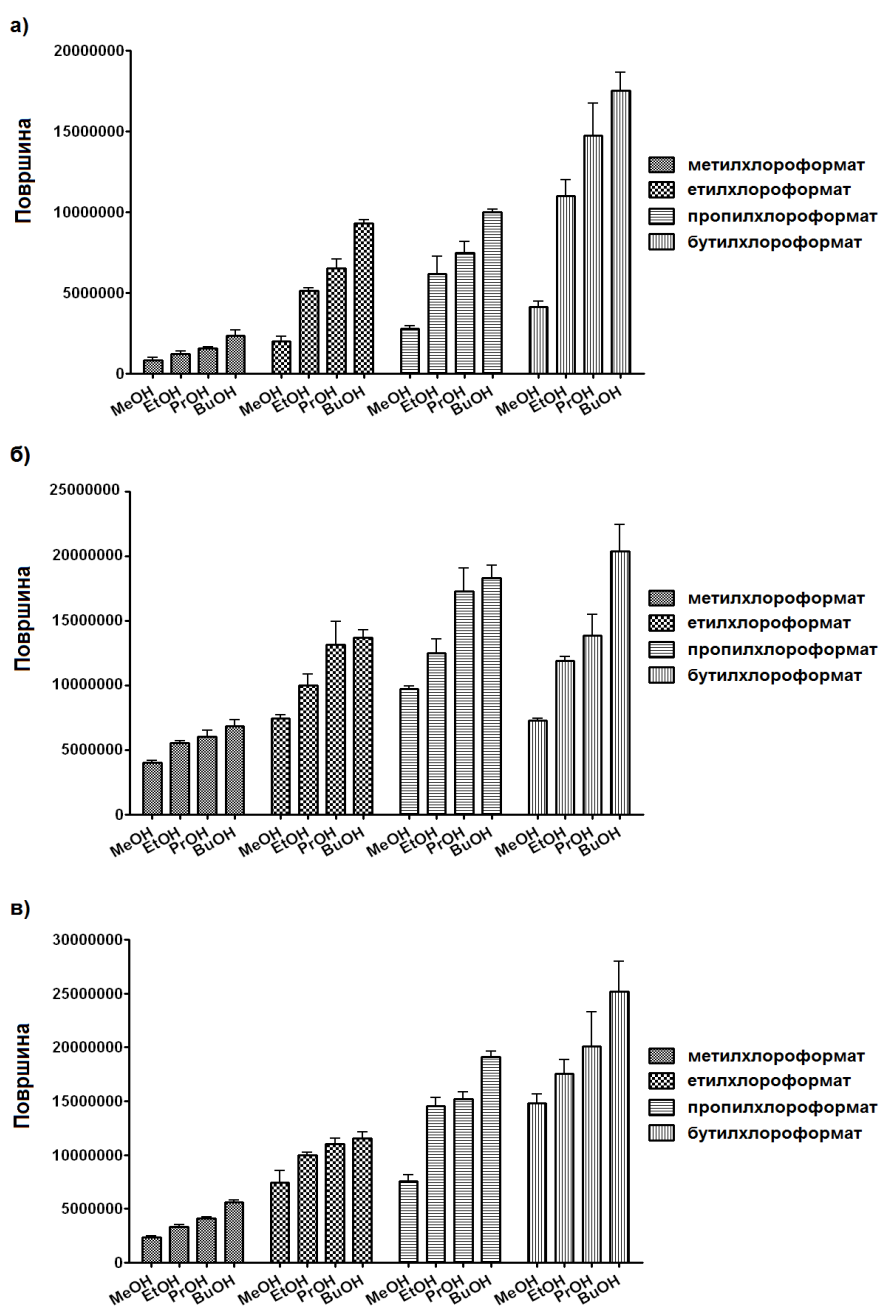
деривати попримају особине сурфактаната, чиме се повећава њихова концентрација на површини капи, где се јонизација и дешава.



Слика 23. ТИС добијен ињектовањем смеше једнаких запремина различитих деривата: а) смеша ММ, МЕ, МР и МВ деривата вигабатрина, б) смеша МеМе, ЕтЕт, ПрПр и БуБу деривата прегабалина и в) смеша МетМет, ЕтЕт, ПроПро и БуТбу деривата габапентина (публиковано у *Talanta* 116 (2013) 91–99)

Figure 23. TIC obtained from mixtures prepared using equal volumes of various derivatives: а) mixture of MM, ME, MP and MB derivatives of vigabatrin, б) mixture of MeMe, EtEt, PrPr and BuBu derivatives of pregabalin and в) mixture of MetMet, EthEth, ProPro and ButBut derivatives of gabapentin (published in *Talanta* 116 (2013) 91–99)

Као резултат коришћења различитих дериватизационих сетова, добијено је 16 деривата за сваки аналит, који су се значајно разликовали по површинама пикова за одабрани хроматографски систем. Директним поређењем површина пикова између „најкраћег“ (ММ, МеМе, MetMet) и „најдужег“ деривата за сваки аналит (ВВ, ВуВу, ButBut), добија се мера овог повећања. Тако је за вигабатрин примећено највеће повећање (2089%), за прегабалин 508,7%, а за габапентин 1075%. Најевидентнији ефекат дериватизације приликом повећања *n*-алкил низа за деривате вигабатрина може се приписати најмањој величини основног молекула, односно најмањем броју угљеникових атома.



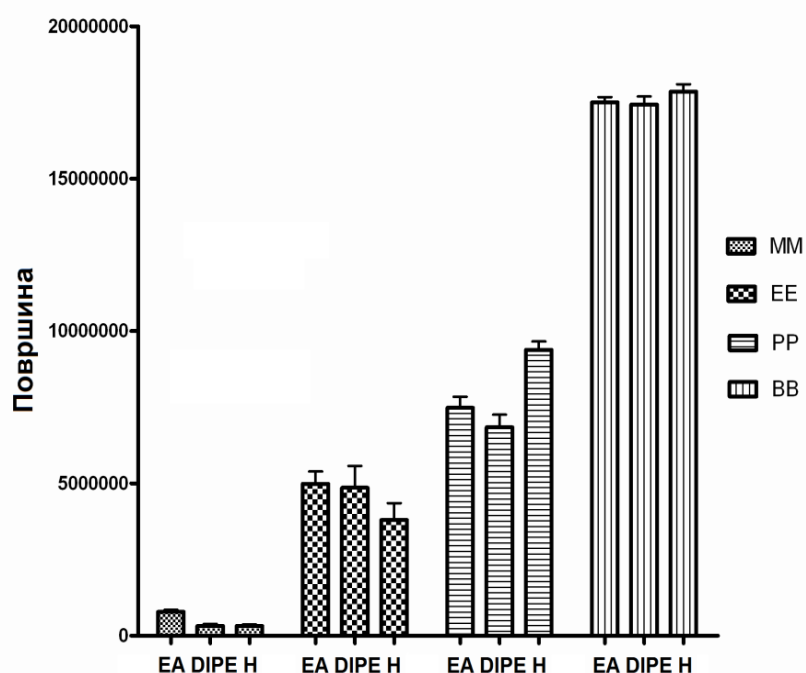
Слика 24. Разлике у површинама за све деривате ($n = 3$) добијене коришћењем различитих сетова *n*-алкилхлороформат/*n*-алкохол: а) вигабатрин, б) прегабалин и в) габапентин (публиковано у Talanta 116 (2013) 91–99)

Figure 24. Differences in areas for all derivatives ($n = 3$) using various *n*-alkyl chloroformate/*n*-alcohol derivatization sets: a) vigabatrin, б) pregabalin and в) gabapentin (published in Talanta 116 (2013) 91–99)

4.1.3. УТИЦАЈ ОРГАНСКОГ РАСТВОРАЧА НА MS/MS СИГНАЛ

Како би се испитало да ли је повећање површине пика у вези не само са механизмом електроспреј јонизације, већ и са органским растварачем коришћеним за течностно-течну екстракцију, испитана су три различита растварача (етил-ацетат, ди-*изо*-пропилетар и *n*-хексан). Специфична тежина сва три растварача је мања од воде па се издвајају као горњи слој, што олакшава руковање екстрактима. Избор три органска растварача која се не мешају са водом, базиран је пре свега на њиховим физичко-хемијским карактеристикама. На основу индекса поларности (0,0 за *n*-хексан, 2,2 за ди-*изо*-пропилетар и 4,4 за етил-ацетат) [207], може се закључити да испољавају велике разлике у погледу поларности, па самим тим и у погледу афинитета за дериватизоване молекуле. Добијени резултати, представљени на слици 25, показују да су сви растварачи показали сличан афинитет за деривате добијене коришћењем комбинација *n*-пропилхлороформат/*n*-пропанол и *n*-бутилхлороформат/*n*-бутанол, што се може приписати повећаној липофилности награђених деривата. За етилхлороформат/етанол дериватизациони сет, етил-ацетат и ди-*изо*-пропилетар показали су слично понашање, док је мање поларан *n*-хексан испољио смањење ефикасности екстракције. За деривате добијене коришћењем комбинације метилхлороформат/метанол, мање поларни растварачи (ди-*изо*-пропилетар и *n*-хексан) нису могли да обезбеде задовољавајући трансфер новоформираних деривата у органски слој. С друге стране, етил-ацетат, као поларнији растварач, био је одговоран за повећање сигнала од око 140% за ММ дериват вигабатрина.

На основу претходних запажања, донети су следећи закључци: а) на редослед рангирања сигнала није утицао избор растварача за екстракцију, б) деривати са мањим алкил радикалима морају се екстраховати релативно поларним органским растварачима који се не мешају са водом јер се на тај начин повећава ефикасност екстракције и в) од испитиваних растварача, етил-ацетат се показао као најбољи за екстракцију свих деривата одабраних антиепилептика.



Слика 25. Ефекти растварача за екстракцију: EA – етил-ацетат, DIPE – ди-*изо*-пропил етар, H – *n*-хексан на ESI сигнал ($n = 3$) за деривате виgabатрина (публиковано у Talanta 116 (2013) 91–99)

Figure 25. Effect of extraction solvents: EA – ethyl acetate, DIPE – di-*iso*-propylether, H – *n*-hexane on ESI signal ($n = 3$) of vigabatrin derivatives (published in Talanta 116 (2013) 91–99)

4.1.4. ЛИМИТИ ДЕТЕКЦИЈЕ И КОРЕЛАЦИЈА СА ПОВРШИНАМА

Лимит детекције представља карактеристичан параметар методе и указује на њену осетљивост. Одређивање лимита детекције, саставни је део процеса валидације који омогућава постављање опсега методе. Ово је од посебног значаја у биоаналитици, где се лекови и њихови метаболити налазе у малим концентрацијама у комплексном матриксу. У оваквим ситуацијама, може се применити реакција дериватизације како би се постигла одговарајућа осетљивост, и ниже LOD вредности за испитивани аналит.

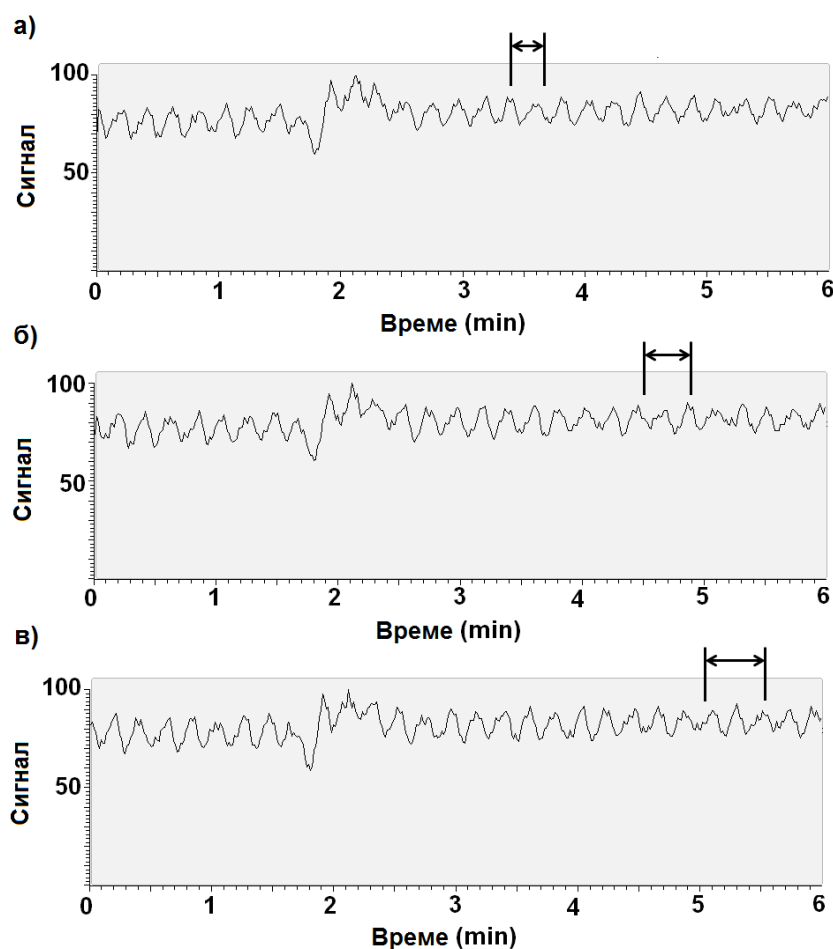
Као што је већ истакнуто, коришћењем *n*-алкилхлороформат/*n*-алкохол дериватизационог сета, постигло се значајно повећање интензитета сигнала за три одабрана антиепилептика, па се слично могло очекивати и за LOD вредности. Ове

вредности су представљене у табелама 5, 6 и 7, а добијене су разблаживањем реконституисаних узорака ацетонитрилом до постизања вредности односа сигнал-шум од 3,3. Важно је истаћи да предмет овог истраживања нису биле апсолутне LOD вредности, с обзиром да на њих утичу параметри као што су запремина раствора за реконституисање, запремина ињектованог раствора, као и матрикс. Насупрот томе, релативне разлике у LOD вредностима су значајније и несумњиво могу послужити за извођење општих закључака приликом поређења синтетисаних деривата. Резултати приказани у табелама 5, 6 и 7 били су у складу са очекивањима, јер су се LOD вредности константно смањивале с порастом липофилности деривата. За све деривате вигабатрина, прегабалина и габапентина постизање нижих LOD вредности било је обрнуто пропорционално повећању површине пика, до тренутка када је даље повећање сигнала додатком дужег *n*-алкил низа, спречено због промене у облику пика. Другим речима, када се дериватизацијом додају дужи *n*-алкил низови, то се одражава пре свега на ширину пика, а не на повећање интензитета сигнала који је у директној вези са LOD вредностима. Ширење пикова резултат је дужег задржавања на C8 колони, због повећања липофилности.

За вигабатрин, повећање површине од 2089% од MM до BB деривата, праћено је унапређењем LOD вредности од 1553%. Код прегабалина повећање површине од MeMe до BuBu деривата износило је 508,7%, а резултирало је унапређењем LOD вредности од 397,7%, док је код габапентина повећање површине од MetMet до ButBut деривата било 1075% и резултирало је унапређењем LOD вредности од 875,0%. За сва три анализита такође се могло приметити да иницијално нагло повећање LOD вредности достиже плато, након чега оне остају практично исте, или се само незнатно мењају. Најочигледнији ефекти дериватизације дужим *n*-алкил радикалима у случају вигабатрина поново се могу приписати најмањој величини молекула, која је у директној вези са липофилношћу новонасталих деривата и њиховим понашањем на C8 колони.

4.1.5. ИСПИТИВАЊЕ ЈОНСКЕ СУПРЕСИЈЕ

Квалитативна и квантитативна процена могућег матрикс ефекта даје важне информације о ретенционим временима на којима се елуирају компоненте матрикса и саставни је део валидације биоаналитичких метода. Иако је овај део испитивања имао за циљ извођење општих закључака о одабраним структурама цвитерјонских антиепилептика дериватизованих хлороформатима, испитан је матрикс ефекат „празних“ узорака плазме. За ово испитивање, протокол дериватизације описан у поглављу 3.7.5. примењен је на 10 μL плазме и реконституисани раствор је подвргнут испитивању јонске супресије, како би се утврдило да се јони који би били одговорни за интерференције не коелуирају са анализитима. На овај начин, интерференције пореклом из плазме, као и од самог дериватизационог реагенса, као што је рецимо пиридин [155], процењене су током трајања хроматографске анализе, за све SRM транзиције, примењујући постколонски инфузиони протокол [205, 206]. Дериватизовани узорци „празне“ плазме ињектовани су у LC–ESI–MS/MS систем заједно са постколонском инфузијом смеше дериватизованих вигабатрина, прегабалина и габапентина (сваки концентрације 1 $\mu\text{g/mL}$) у ацетонитрилу преко *Hamilton* шприц-пумпе. Шприц-пумпа била је повезана са јонским извором преко тзв. Т-конекције. Доток анализита из шприц-пумпе подешен је на 50 $\mu\text{L/min}$, а брзина протока мобилне фазе била је 600 $\mu\text{L/min}$. Хроматограм који показује одсуство матрикс ефекта на временима елуирања структура дериватизованих сетом *n*-пропилхлороформат/*n*-пропанол, приказан је на слици 26. Исти резултати добијени су и за друге деривате.



Слика 26. Испитивање матрикс ефекта континуираном инфузијом смеше PP (а), PrPr (б) и ProPro (в) и истовременим ињектовањем узорка „празне“ плазме. Стрелицама је обележен положај пика PP, PrPr и ProPro деривата (публиковано у Talanta 116 (2013) 91–99)

Figure 26. Study of the matrix effect phenomenon by means of continuous infusion of mixture containing PP (a), PrPr (б) and ProPro (в) and parallel injection of extract of a blank plasma sample. Retention times of PP, PrPr and ProPro derivatives are indicated with arrows (published in Talanta 116 (2013) 91–99)

4.1.6. ИСПИТИВАЊЕ ПРИНОСА СПОРЕДНЕ РЕАКЦИЈЕ

На слици 20 у поглављу 1.4.2.1. приказан је механизам реакције дериватизације, са главном реакцијом код које се алкил група која потиче од хлороформата мења алкил групом алкохола присутног у реакционој смеси. Међутим, ова супституција се не дешава у потпуности и због тога је производ споредне реакције увек присутан. Настанак овог производа систематично је праћен током свих анализа, а његов принос је рачунат поређењем одговарајуће површине у свакој реакцији (нпр. ММ у МЕ, МР и МВ) са просечном површином која одговара производу насталом када је за дериватизацију коришћен сет који садржи комбинацију хлороформата и алкохола истог *n*-алкил низа (нпр. када постоји само ММ).

У табели 9 приказани су резултати за принос споредне реакције, приликом коришћења различитих алкохола. Добијени резултати су у сагласности са подацима из литературе, с обзиром да је у већини случајева принос производа споредне реакције био мањи од 10% [167]. Разлог за добијање оваквих бројчаних вредности је највероватније величина алкил групе алкохола и њена способност да замени алкил групу хлороформата. Индикативно је да се најмањи принос производа споредне реакције добијао у свим случајевима у којима је коришћен метанол у комбинацији са хлороформатом који садржи радикал са већим бројем угљеникових атома. Другим речима, мала метил група није била у стању да супституише дужи етил, пропил или бутил низ. С друге стране, принос споредне реакције расте приликом коришћења алкохола дужих радикала, изузев у случају етанола, када је принос споредне реакције био највиши. Може се претпоставити да је разлог за ово повећање приноса одабрани растварач за екстракцију (етил-ацетат) који може да фаворизује трансфер ових деривата у органски слој. Практично, коришћење етанола у реакционој смеси је главни узрок престизања „лимита“ од 10% за принос споредне реакције, што је праћено смањењем ове вредности при примени алкохола са већим бројем угљеникових атома (*n*-пропанола и *n*-бутанола).

Табела 9. Принос производа споредне реакције добијен за све комбинације *n*-алкилхлороформат/*n*-алкохол. За сваки дериват приказане су средње вредности (*n* = 3) (публиковано у Talanta 116 (2013) 91–99)

Table 9. The yields of side reaction products obtained for all *n*-alkyl chloroformate/*n*-alcohol combinations. Average values (*n* = 3) are presented for each derivative (published in Talanta 116 (2013) 91–99)

Вигабатрин							
Метилхлороформат		Етилхлороформат		Пропилхлороформат		Бутилхлороформат	
% MM		% EE		% PP		% BB	
MM	-	EM	0,80	PM	2,7	BM	4,7
ME	12	EE	-	PE	11	BE	13
MP	5,7	EP	2,4	PP	-	BP	5,5
MB	2,7	EB	2,4	PB	6,5	BB	-

Прегабалин							
Метилхлороформат		Етилхлороформат		Пропилхлороформат		Бутилхлороформат	
% MeMe		% EtEt		% PrPr		% BuBu	
MeMe	-	EtMe	1,6	PrMe	4,1	BuMe	7,1
MeEt	9,5	EtEt	-	PrEt	11	BuEt	15
MePr	6,9	EtPr	4,3	PrPr	-	BuPr	7,5
MeBu	8,1	EtBu	7,6	PrBu	8,3	BuBu	-

Габапентин							
Метилхлороформат		Етилхлороформат		Пропилхлороформат		Бутилхлороформат	
% MetMet		% EthEth		% ProPro		% ButBut	
MetMet	-	EthMet	1,6	ProMet	3,4	ButMet	7,8
MetEth	9,2	EthEth	-	ProEth	14	ButEth	21
MetPro	5,1	EthPro	3,2	ProPro	-	ButPro	8,5
MetBut	7,7	EthBut	3,6	ProBut	8,6	ButBut	-

4.1.7. ЗНАЧАЈ ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА ЗА БИОАНАЛИТИЧКА ИСТРАЖИВАЊА

У овим испитивањима, за реакцију дериватизације применом сета *n*-алкилхлороформат/*n*-алкохол коришћена су три антиепилептика цвитерјонске структуре. Праћена је погодност извођења саме реакције заједно са значајним променама у LC–ESI–MS/MS анализи различитих новонасталих деривата. Изведени експерименти пружају значајне податке аналитичарима чији су предмет истраживања одабрани антиепилептици, нарочито у узорцима биолошког материјала. Ове супстанце, због своје цвитерјонске структуре, не могу се лако екстраховати у органски растварач који се не меша са водом. Због тога, преципитација протеина представља основну, ако не и једину опцију за припрему узорака, што резултује добијањем прилично прљавих узорака са израженим матрикс ефектом. Ово знатно отежава хроматографску анализу, а ESI сигнал је под значајним утицајем присутне негативно наелектрисане карбоксилне групе. Реакција дериватизације коришћењем *n*-алкилхлороформат/*n*-алкохол сета чини се погодном за превазилажење свих наведених проблема: настали деривати лако се екстрахују у органски растварач применом течно-течне екстракције, матрикс ефекат је минималан, дериватизацијом се повећава липофилност па је могућа анализа на RP стационарним фазама, а сигнал је повећан блокирањем негативног наелектривања и продужењем алкил низа. Могуће је одабрати жељени дериватизациони сет, на основу доступности реагенса, облика пика деривата и потребне осетљивости методе, дужине трајања анализе или потребе за решавањем проблема као што је нпр. повећање липофилног карактера уз последично лакше раздвајање анализата од поларних компоненти одговорних за матрикс ефекат.

Међутим, резултати овог дела истраживања могу бити веома корисна полазна тачка и за друге апликације, укључујући све популарније поље метаболомика, када је потребно добити значајне податке о великом броју анализата коришћењем једног дериватизационог сета.

4.2. ОПТИМИЗАЦИЈА ПАРАМЕТАРА МАСЕНОГ СПЕКТРОМЕТРА И МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ

За добијање максималног одговора на детектору неопходни су искуство аналитичара и разумевање принципа стварања сигнала у масеној спектрометрији, што се огледа у способности да се процене ефекти низа LC–MS/MS параметара на сигнал анализата. Већина истраживача изводи основну оптимизацију MS параметара, најчешће процесом ауто-подешавања, помоћу софтвера за оптимизацију обезбеђеног од стране самог произвођача. Затим се постављају параметри методе течне хроматографије, који подразумевају избор одговарајуће стационарне фазе, састав мобилне фазе укључујући одабир органског растварача и његову количину, са или без подешавања рН вредности, подешавање брзине протока мобилне фазе и температуре колоне. Ова процедура је најчешће адекватна, међутим, када је потребно постићи већу осетљивост, мора се извршити додатна оптимизација MS параметара, која води повећању сигнала анализата.

До сада су описане различите оптимизационе стратегије које подразумевају примену експерименталног дизајна на пољу масене спектрометрије. Природа фактора укључених у оптимизацију, као и њихов број, првенствено су били везани за опрему коришћену у експерименталном раду. Неки истраживачи оптимизују LC и MS параметре независно [208, 209], док се други одлучују за истовремену оптимизацију [210–216]. Такође је описан значај оптимизације параметара јонског извора [217–223], јонског трапа [224, 225] или троструког квадрупола [226]. Експериментални дизајн је коришћен и за оптимизацију фактора који имају утицај на тачност мерења масе [227].

Један од одлучујућих фактора које треба размотрити на самом почетку оптимизације јесте избор технике јонизације. За одређени инструмент, ограничавајући фактори приликом избора технике јонизације јесу молекулска структура и поларност анализата, као и присуство група подложних јонизацији. У случају „меких“ метода јонизације, ESI је ефикаснија за поларније, а APCI за мање поларне супстанце. Уколико је могуће применити обе технике, потребно је извршити поређење како би се одабрала она која је ефикаснија [228–231]. Током оптимизације, некада се може испитати и ефикасност APPI [232–235]. Избор

режима рада, позитиван или негативан, такође може бити укључен у рану фазу оптимизације [219].

У овом делу истраживања примењена је систематична стратегија оптимизације (слика 21 у поглављу 3.8.4) са циљем да се повећају LC–MS/MS одговори одабраних антиепилептика, вигабатрина, прегабалина и габапентина. Због тога је спроведено детаљно испитивање фактора са потенцијалним утицајем на сигнал, извођењем више оптимизационих процедура, почевши од прелиминарних експеримената, до постављања коначних услова. На крају сваке фазе, одабране су вредности одговарајућих параметара, и процењено постигнуто унапређење. Параметри јонског извора са значајним утицајем на MS одговор идентификовани су кроз скрининг експерименте, применом фракционог факторског дизајна. Оптимизација ових параметара, а затим и оптимизација параметара методе течне хроматографије, изведена је применом Бокс-Бенкен дизајна. Методологија површине одговора (енг. *Response Surface Methodology*, RSM) и Дерингерова функција пожељних одговора (енг. *Derringer Desirability Function*) [236, 237] коришћени су за процену утицаја испитиваних параметара и за дефинисање оптималних услова. Резултат овог обимног поступка оптимизације било је постизање значајног повећања MS сигнала, чиме су омогућени развој и валидација веома осетљивих биоаналитичких метода за одређивање одабраних антиепилептика у биолошком материјалу.

4.2.1. ПРЕЛИМИНАРНИ ЕКСПЕРИМЕНТИ

Дериватизовани антиепилептици и интерни стандард детектовани су загреваном електроспреј јонизацијом у позитивном режиму рада (енг. *Heated Electrospray Ionization*, HESI). Током процеса SRM ауто-подешавања, за две транзиције по аналиту, дефинисане су вредности за следеће параметре: напон спреја, притисак носећег гаса, притисак гаса у конусу јонског извора, притисак помоћног гаса, температуру испаривача, температуру трансфер капиларе, напон капиларног сочива, колизионе енергије и колизионни притисак (табела 10). На основу ових прелиминарних подешавања дефинисани су почетни хроматографски услови, као што су C8 стационарна фаза, састав мобилне фазе (ацетонитрил – 0,1% мравља киселина, 80:20 V/V) и брзина протока мобилне фазе (600 $\mu\text{L}/\text{min}$). Иницијално креирана LC–MS/MS метода садржала је четири скен догађаја, сваки са две транзиције, временом скенирања од 0,1 s, ширином скенирања 0,025 m/z , и FWHM 0,70 Q1. Добијени су симетрични пикови са Гаусовом расподелом.

Адекватност почетних хроматографских услова испитана је квалитативном проценом потенцијалног матрикс ефекта како би се утврдило да се интерферирајуће компоненте плазме, одговорне за јонску супресију, не коелуирају са аналитима. „Празна” плазма у запремини од 50 μL третирана је на начин као што је описано у поглављу 3.8.2. Након реконституисања овај раствор ињектован је у LC–MS/MS систем, истовремено са постколонском инфузијом смеше дериватизованих аналита у ацетонитрилу, преко екстерне шприц-пумпе. На основу хроматограма приказаног на слици 27, види се одсуство матрикс ефекта на временима елуирања аналита, па су се могли задржати почетни хроматографски услови.

У наредном кораку извршено је поређење сигнала и односа сигнал-шум за хроматограме добијене праћењем једне односно две SRM транзиције по аналиту. Сигнали изражени као површине, показали су значајно повећање када се користе две SRM транзиције (24,9% за вигабатрин, 30,0% за прегабалин и 37,7% за габапентин). Међутим, било је дискутабилно да ли ће се исти резултати добити и када се процењује однос сигнал-шум. Након изведених експеримената, показало се да су односи сигнал-шум такође унапређени коришћењем две SRM транзиције,

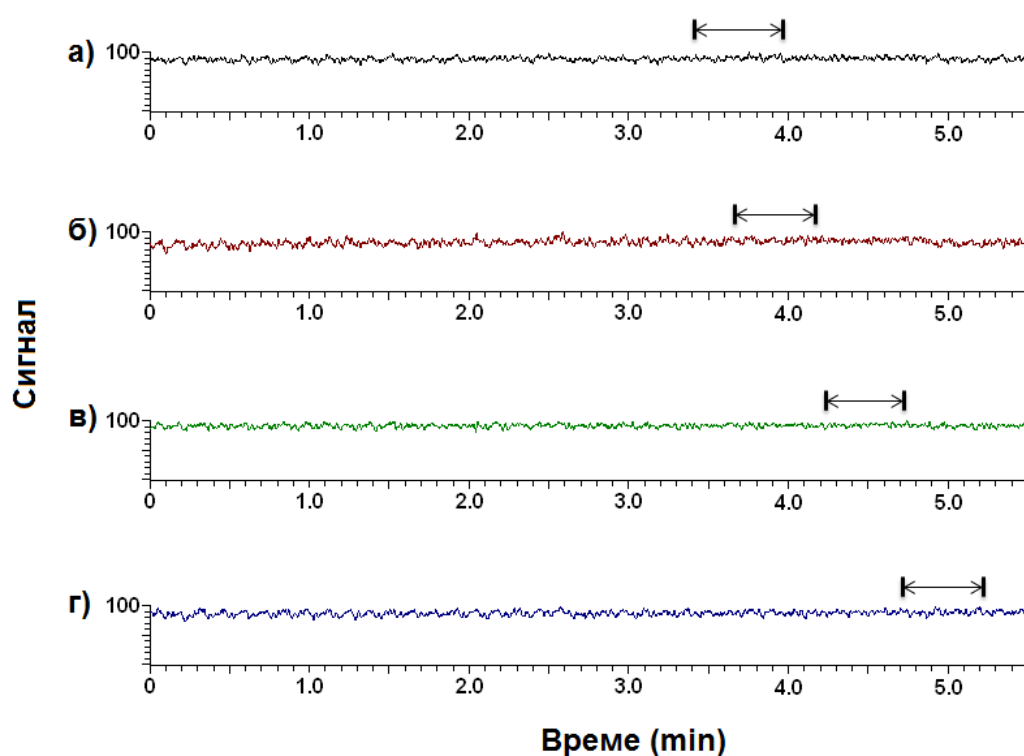
али су били нешто слабијег интензитета (16,0% за вигабатрин, 18,0% за прегабалин и 21,5% за габапентин). Према томе, за даље експерименте одабрана је метода са две SRM транзиције, зато што омогућава достизање нижих вредности за лимит квантификације.

Табела 10. Вредности параметара масеног спектрометра добијене процесом ауто-подешавања (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Table 10. Values for mass spectrometer parameters obtained via autotuning procedure (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Супстанца		SRM (m/z)	Колизиона енергија (eV)	Напон капиларног сочива (V)
Транзиције	вигабатрин	257,95 → 113,04*	15	61,07
		257,95 → 155,05	7	
	прегабалин	288,00 → 142,06*	21	63,82
		288,00 → 228,04	7	
	габапентин	300,00 → 154,05*	21	65,33
		300,00 → 240,07	8	
	интерни стандард	272,03 → 127,01	17	53,81
		272,03 → 212,00*	7	
Јонски извор и колизиона ћелија	Параметар		Вредност	
	напон спреја		5000 V	
	притисак носећег гаса		30 psi	
	притисак гаса у конусу јонског извора		неуспешна регулација	
	притисак помоћног гаса		неуспешна регулација	
	температура испаривача		201,94°C	
	температура трансфер капиларе		275,13°C	
	колизиони притисак		1,5 mTorr	

* најинтензивнији фрагмент



Слика 27. Хроматограми добијени током експеримената за испитивање матрикс ефекта: а) виgabатрин, б) интерни стандард, в) прегабалин и г) габапентин.

Стрелице означавају временски интервал елуирања пика

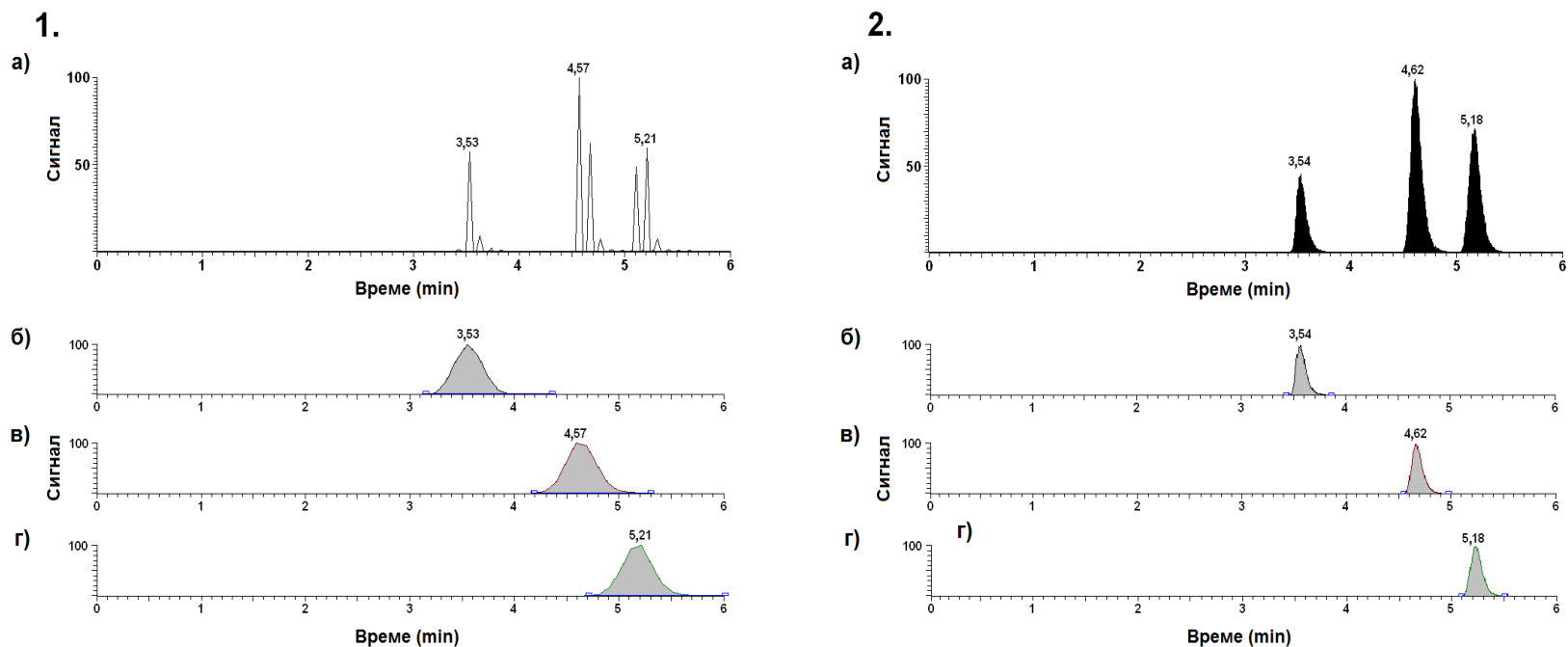
(публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 27. Representative chromatograms obtained during matrix effect experiments: а) vigabatrin; б) internal standard; в) pregabalin and г) gabapentin.

Retention times of peaks are indicated with arrows

(published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Последњи параметри који су оптимизовани у прелиминарној фази били су ширина скенирања и време скенирања. Њихов утицај на MS сигнал дериватизованих анализата процењен је применом *one-factor-at-a-time* приступа, почевши од подразумеваних, унапред препоручених вредности. Оба фактора варирана су на седам нивоа, у опсегу од 1,00 m/z до 0,01 m/z за ширину скенирања и од 1,00 s до 0,01 s за време скенирања. Резултати ових експеримената показали су да није било статистички значајне разлике када су вариране вредности за ширину скенирања. Због тога је за даље експерименте вредност овог параметра подешена на 0,05 m/z . Међутим, време скенирања показало се као изузетно значајно, нарочито за облик пика. Хроматограми добијени са препорученом вредношћу од 1,00 s и оптимизованом вредношћу од 0,01 s приказани су на слици 28. Јасно се види да су са смањењем вредности времена скенирања добијени оштрији пикови, са побољшаним профилем у укупном јонском хроматограму. На основу овога, одабрана је вредност од 0,01 s за време скенирања у свим наредним експериментима.

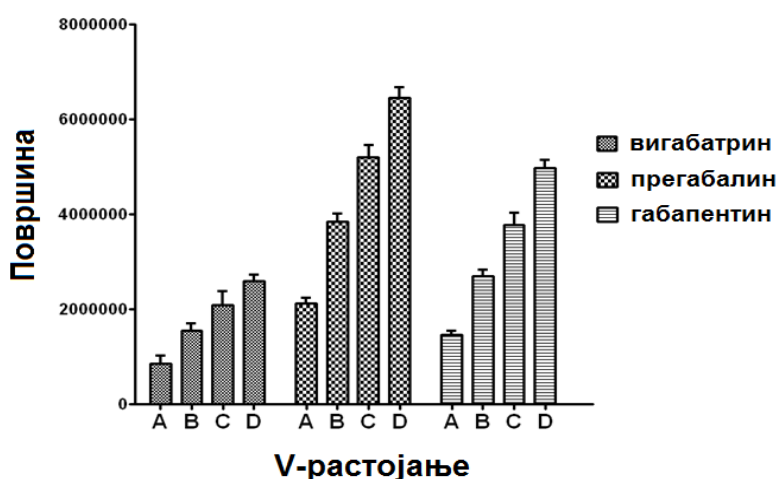


Слика 28. Хроматограми добијени при различитим вредностима за време скенирања: (1) препоручена вредност 1,00 s и (2) одабрана вредност 0,01 s. а) укупни јонски хроматограм, б) виgabатрин, в) прегабалин и г) габапентин (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 28. Chromatograms presenting the influence of scan time with default value of 1.00 s (1) and optimal value of 0.01 s (2). а) total ion chromatogram, б) vigabatrin, в) pregabalin and г) gabapentin (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

4.2.2. ОПТИМИЗАЦИЈА ПАРАМЕТАРА ЈОНСКОГ ИЗВОРА

Позиција јонског извора је један од параметара који се обично не тестира током развоја методе. Међутим, њен утицај показао се значајним за сигнал анализираних супстанци. Позиција носача пробе варирана је између А и D за V-растојање, а положај микрометра (Y-позиција) између 1,75 и 2,50 на четири нивоа (слика 22 у поглављу 3.8.4). Експериментима је показано да се максимални сигнал, за све деривате, добија на позицији D. Поређење површина деривата за различите положаје носача пробе приказано је на слици 29. Насупрот томе, положај микрометра није имао утицаја на резултате, што је показано Студентовим *t*-тестом за парове. На основу добијених резултата, за даље експерименте одабрана је позиција D и положај 2,0 микрометра.



Слика 29. Графичко поређење површина вигабатрина, прегабалина и габапентина добијено током оптимизације геометрије јонског извора за различите положаје V-растојања (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 29. Graphical comparison of areas for vigabatrin, pregabalin and gabapentin obtained during optimization of ion source geometry under different settings for V-distance parameter (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Након дефинисања положаја јонског извора, коришћењем експерименталног дизајна, оптимизовани су параметри јонског извора. Одабрано је пет фактора са потенцијално значајним утицајем на ефикасност јонизације и то: напон спреја, температура испаривача, температура трансфер капиларе, притисак носећег гаса и притисак помоћног гаса. Фракциони факторски скрининг дизајн 2^{5-1} , са три репликације у централној тачки, коришћен је за креирање плана експеримената. Деветнаест експеримената изведено је насумичним редоследом, у дуплику, праћењем средње вредности за површине анализата (табела 11). Интерни стандард није био укључен у овој фази експеримената, с обзиром да се у анализирани узорак увек додаје у релативно високој концентрацији па није потребно максимизирати његов одговор.

Ефекти фактора су процењени и приказани у табели 12. На основу апсолутних вредности ефеката за кодиране вредности испитиваних фактора било је могуће рангирање утицаја (фактори са највећим вредностима ефекта највише утичу на одговор). Утицај фактора анализиран је коришћењем графика за процену значајности ефеката фактора (енг. *Half-normal Probability Plots*) (слика 30).

Табела 11. План 2^{5-1} скрининг експеримената и добијени резултатиTable 11. Plan of 2^{5-1} screening experiments and obtained results

№	Напон спреја (V)	Температура испаривача (°C)	Притисак носећег гаса*	Притисак помоћног гаса*	Температура трансфер капиларе (°C)	Површина вигабатрина	Површина прегабалина	Површина габапентина
1.	3000	200	10	2	350	1554310	3788076	4178757
2.	5000	200	10	2	150	436229,5	1053224	1050753
3.	3000	400	10	2	150	422925,5	1084888	1188447
4.	5000	400	10	2	350	1641115	3744454	4014962
5.	3000	200	50	2	150	1472147	3534861	2667652
6.	5000	200	50	2	350	3336244	11152758	9599162
7.	3000	400	50	2	350	2384189	9252833	7420896
8.	5000	400	50	2	150	1961235	4399017	3512475
9.	3000	200	10	10	150	820542,5	1675482	1601578
10.	5000	200	10	10	350	2237997	5333611	5042209
11.	3000	400	10	10	350	1268756	3455691	3936453
12.	5000	400	10	10	150	1599523	3164134	3484118
13.	3000	200	50	10	350	3179098	11678016	8438822
14.	5000	200	50	10	150	2523855	5454999	4572507
15.	3000	400	50	10	150	3755670	9081238	8853869
16.	5000	400	50	10	350	3710308	14210080	11373635
17.	4000	300	30	6	250	2646885	6863340	6705189
18.	4000	300	30	6	250	2840004	6950272	6616328
19.	4000	300	30	6	250	2886654	6867576	6771203

* вредности су исказане у арбитрарним јединицама

Табела 12. Добијене вредности ефекта фактора за фракциони факторски 2^{5-1} експериментални дизајн
(публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Table 12. Factor effects for fractional factorial 2^{5-1} experimental design
(published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

	Ефекат		
	Вигабатрин	Прегабалин	Габапентин
A	3,24E+05	6,20E+05	5,45E+05
B	1,48E+05	5,90E+05	8,29E+05
C	1,54E+06	5,68E+06	3,99E+06
D	7,36E+05	2,01E+06	1,71E+06
E	7,90E+05	4,15E+06	3,38E+06
AB	-5,34E+04	4,06E+04	-2,99E+05
AC	-1,38E+05	-2,03E+05	-1,26E+05
AD	-6,17E+04	-5,20E+04	-1,35E+05
AE	3,11E+05	9,46E+05	9,68E+05
BC	1,77E+05	6,90E+05	6,42E+05
BD	2,45E+05	8,52E+05	1,17E+06
BE	-4,74E+05	-9,13E+05	-9,57E+05
CD	2,68E+05	1,02E+06	8,01E+05
CE	-6,58E+04	1,81E+06	9,22E+05
DE	-3,66E+05	-3,21E+05	-8,14E+05

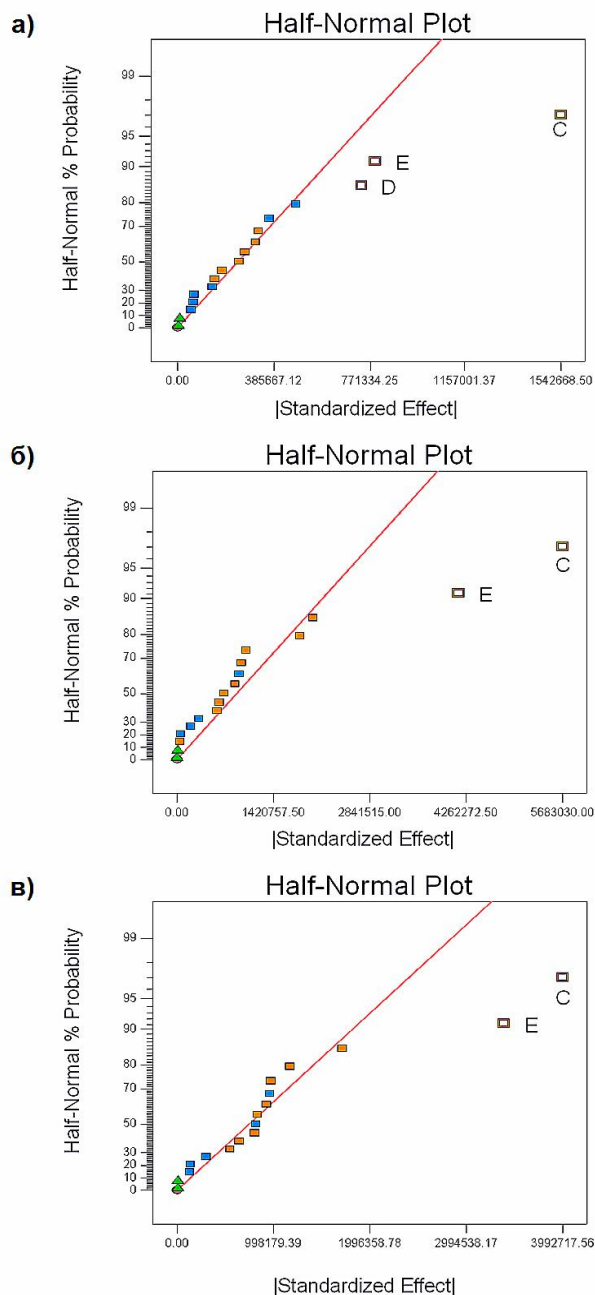
A – напон спреја

B – температура испаривача

C – температура трансфер капиларе

D – проток носећег гаса

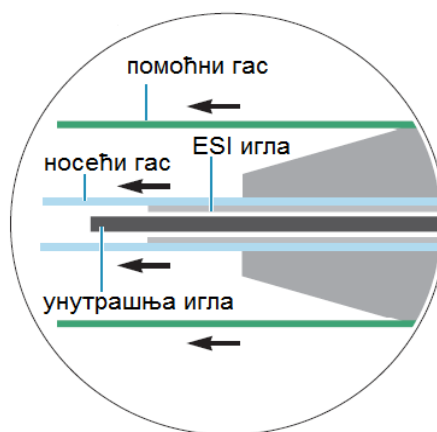
E – проток помоћног гаса



Слика 30. График за процену значајности ефекта фактора током скрининг експеримената: C – притисак носећег гаса, D – притисак помоћног гаса и E – температура трансфер капиларе: а) виgabатрин; б) прегабалин и в) габапентин (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 30. Half-normal probability plots presenting statistically significant influence of the following factors: C – sheath gas pressure, D – auxiliary gas pressure and E – capillary temperature, during screening experiments: а) vigabatrin; б) pregabalin and в) gabapentin (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

За факторе који немају статистички значајан утицај, апсолутне вредности ефекта позиционирање су на или близу нулте линије, а за значајне факторе, ова вредност је дислоцирана изван нулте линије. За све анализе, фактори С и Е, односно притисак носећег гаса и температура трансфер капиларе, показали су се као значајни, док је за вигабатрин фактор D (притисак помоћног гаса) идентификован као додатни фактор са значајним утицајем. Статистичка значајност ова три параметра потврдила је и теоријска знања о њиховом утицају: носећи гас је унутрашњи коаксијални гас (азот), који служи за небулизацију узорка и његово превођење из раствора у fine честице магле при изласку из ESI млазнице. Помоћни гас, други коаксијални гас азот, помаже носећем гасу током процеса десолватације (слика 31).



Слика 31. Правац кретања носећег гаса и помоћног гаса

Figure 31. Flow direction of sheath gas and auxiliary gas

Током проласка кроз испаривач (енг. *Vaporizer*) помоћни гас се греје, али су изведени експерименти показали да температура испаривача није значајно утицала на одговор анализираних једињења. Насупрот томе, грејањем капиларе се максимизира трансмисија јона ка детектору, па је и очекивано да температура трансфер капиларе буде параметар са значајним утицајем на квалитет сигнала. Додатно, овај параметар је директно повезан са брзином протока мобилне фазе, па се перпоручује одређивање његове вредности у реалним условима, за разлику од малих вредности брзине протока који се срећу током инфузије раствора из

шприца током процеса ауто-подешавања. Имајући у виду да анализа зависи од природе самог анализата и да наведени параметри могу утицати на робусност система, оптимизација коришћењем хеометрије потребна је како би се утврдила оптимална комбинација њихових вредности.

Температура трансфер капиларе, притисак носећег гаса и притисак помоћног гаса одабрани су као фактори за оптимизацију параметара јонског извора. За постављање плана експеримента коришћен је Бокс-Бенкен експериментални дизајн (табела 13). Сви експерименти су изведени у дупликату, а као одговор система праћене су површине, исказане као средња вредност. Током ове процедуре постављени су ужи опсези у поређењу са онима који су коришћени током скрининга. Бокс-Бенкен експериментални дизајн омогућио је уклапање добијених података у квадратни модел представљен следећом једначином:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + \varepsilon \quad (2)$$

где је y одговор система, x_i је испитивани фактор, b_0 је константа, b_1 , b_2 и b_3 представљају коефицијенте главних фактора, b_{12} , b_{13} и b_{23} су коефицијенти факторских интеракција, b_{11} , b_{22} и b_{33} одговарају коефицијентима квадратних чланова, а ε је остатак тј. разлика између експериментално добијених и моделом предвиђених вредности одговора.

Табела 13. План Бокс-Бенкен експерименталног дизајна и добијени резултати за оптимизацију параметара јонског извора**Table 13.** Plan of Box-Behnken experimental design and obtained results for ion source parameters optimization

№	Температура трансфер капиларе (°C)	Притисак носећег гаса*	Притисак помоћног гаса*	Површина вигабатрина	Површина прегабалина	Површина габапентина
	x_1	x_2	x_3			
1.	250	30	8	3392498	8428063	8431474
2.	350	30	8	3080688	10118182	8883028
3.	250	50	8	4319602	11826791	10859822
4.	350	50	8	3816221	13668100	10765381
5.	250	40	6	3789393	9651582	9219140
6.	350	40	6	3447494	11831679	10011521
7.	250	40	10	4392846	11670152	11355680
8.	350	40	10	3657778	12922963	10522473
9.	300	30	6	3321041	8859618	8906805
10.	300	50	6	4187141	12617769	11250751
11.	300	30	10	3653721	10292875	9991458
12.	300	50	10	4770646	14778051	13204282
13.	300	40	8	4072479	12328075	11023588
14.	300	40	8	4304035	12592515	11733129
15.	300	40	8	4278835	12567214	11612034

* вредности су исказане у арбитрарним јединицама

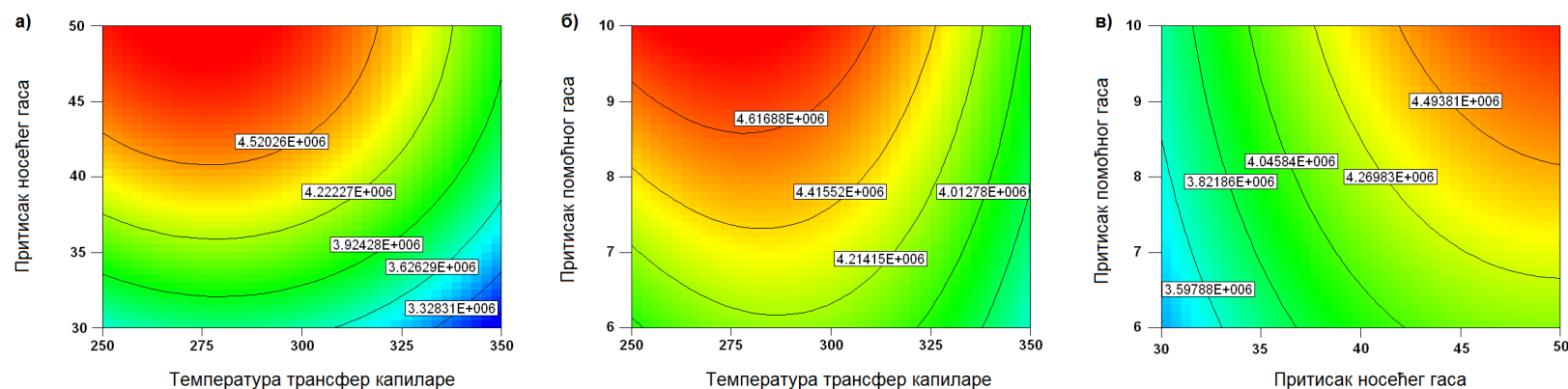
Коефицијенти модела за кодиране вредности фактора и статистички параметри добијени ANOVA тестом за квадратни модел површине одговора (енг. *Response Surface Quadratic Model*) представљени су у табели 14. Сви добијени модели имали су високу вредност R^2 , $Adj. R^2$ и $Pred. R^2$, што показује да се могу примењивати за предвиђање одговора система. Показано је да параметар за процену уклапања експериментално добијених резултата у модел (енг. *Lack of Fit*) није значајан, што је потврдило да је предложени модел адекватан и да једначина добро описује посматрани систем. Линеарни чланови за температуру трансфер капиларе, притисак носећег гаса и притисак помоћног гаса, као и квадратни чланови за температуру трансфер капиларе и притисак носећег гаса показали су се статистички значајним ($p < 0,05$) за вигабатрин и прегабалин. Линеарни чланови за притисак носећег и помоћног гаса, као и квадратни чланови за температуру трансфер капиларе и притисак носећег гаса показали су се као значајни за габапентин. Утицај фактора може се визуелно приказати коришћењем графика контура (енг. *Contour Plots*) на којима се могу идентификовати региони са највишим вредностима жељених одговора (слике 32 – 34). Анализом графика контура, дефинисани су коначни услови за параметре јонског извора и то: 50 арбитрарних јединица за притисак носећег гаса, 10 арбитрарних јединица за притисак помоћног гаса и 290°C за температуру трансфер капиларе, као компромис између њених опречних ефеката на сигнал дериватизованог вигабатрина и дериватизованог прегабалина.

Табела 14. Добијене вредности ефеката фактора за Бокс-Бенкен експериментални дизајн током оптимизације параметара јонског извора (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Table 14. Obtained results for factor effects for Box-Behnken experimental design during optimization of ion source parameters (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

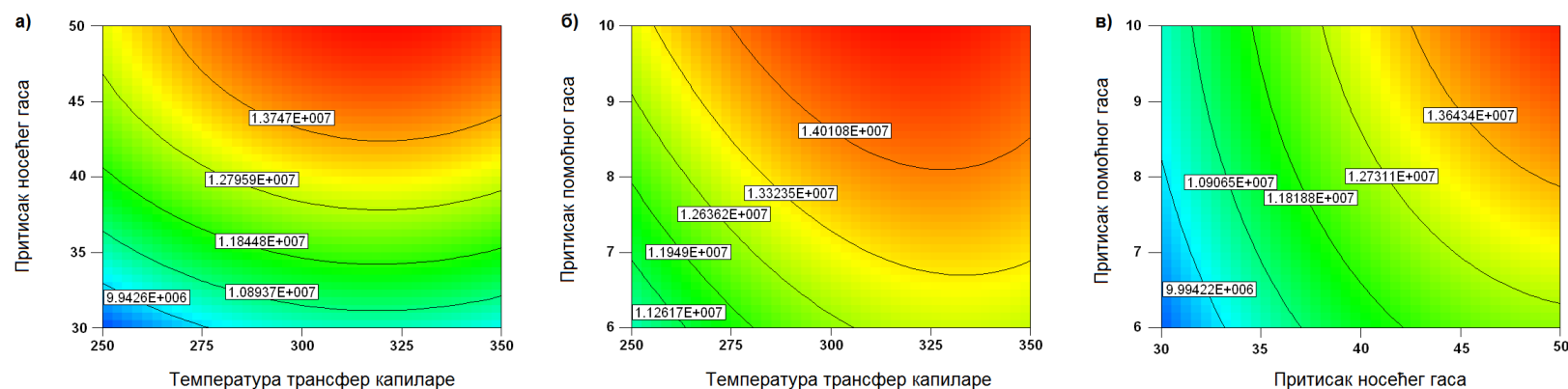
	Вигабатрин		Прегабалин		Габапентин	
	Коефицијент	<i>p</i> -вредност	Коефицијент	<i>p</i> -вредност	Коефицијент	<i>p</i> -вредност
b₀	4,22E+06	-	1,25E+07	-	1,15E+07	-
b₁	-2,37E+05	0,0014*	8,71E+05	0,0001*	3,95E+04	0,7432
b₂	4,56E+05	< 0,0001*	1,90E+06	< 0,0001*	1,23E+06	0,0001*
b₃	2,16E+05	0,0021*	8,38E+05	0,0002*	7,11E+05	0,0016*
b₁₂	-4,79E+04	0,4029	3,78E+04	0,7633	-1,36E+05	0,4363
b₁₃	-9,83E+04	0,1197	-2,32E+05	0,1086	-4,06E+05	0,0533
b₂₃	6,27E+04	0,2854	1,82E+05	0,1868	2,17E+05	0,2362
b₁₁	-3,64E+05	0,0011*	-8,02E+05	0,0013*	-1,14E+06	0,0011*
b₂₂	-2,02E+05	0,0139*	-6,84E+05	0,0027*	-5,80E+05	0,0182*
b₃₃	-3,28E+04	0,5736	-1,75E+05	0,2163	-3,78E+04	0,8308
Модел	-	0,0007*	-	<0,0001*	-	0,0013*
Lack of Fit	-	0,7346	-	0,2173	-	0,7011
R²	0,9828	-	0,9937	-	0,9777	-
Adj. R²	0,9519	-	0,9824	-	0,9377	-
Pred. R²	0,8639		0,9125		0,8130	

* коефицијенти модела значајни за $p < 0,05$



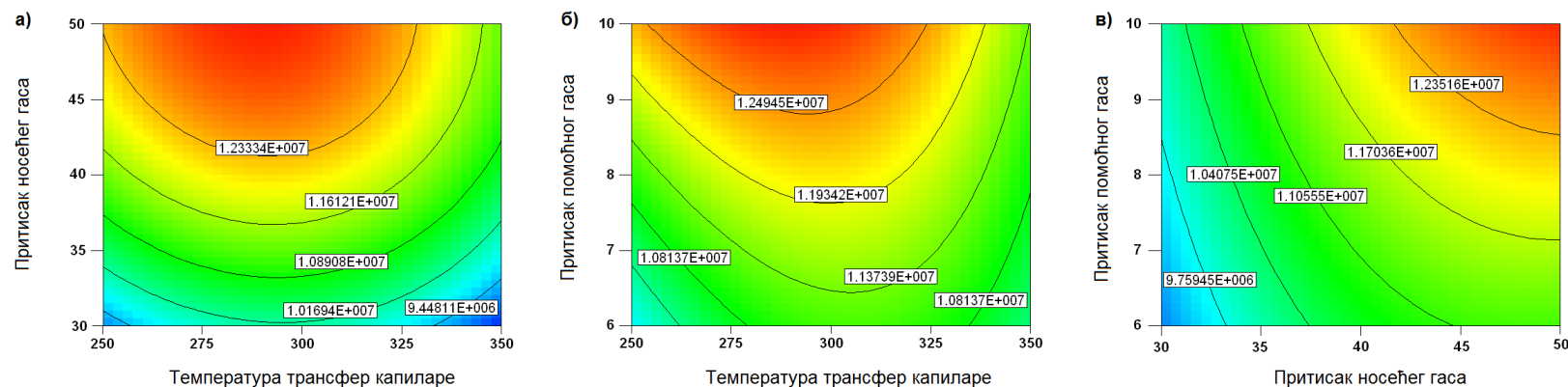
Слика 32. График контура за дериватизовани вигабатрин: а) површина пика = f (температура трансфер капиларе, притисак носећег гаса), б) површина пика = f (температура трансфер капиларе, притисак помоћног гаса), в) површина пика = f (притисак носећег гаса, притисак помоћног гаса) (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 32. Contour plots created for defining the optimal ion source conditions for derivatized vigabatrin: а) peak area = f (capillary temperature, sheath gas pressure), б) peak area = f (capillary temperature, auxiliary gas pressure), в) peak area = f (sheath gas pressure, auxiliary gas pressure) (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)



Слика 33. График контура за дериватизовани прегабалин: а) површина пика = f (температура трансфер капиларе, притисак носећег гаса), б) површина пика = f (температура трансфер капиларе, притисак помоћног гаса), в) површина пика = f (притисак носећег гаса, притисак помоћног гаса) (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 33. Contour plots created for defining the optimal ion source conditions for derivatized pregabalin: а) peak area = f (capillary temperature, sheath gas pressure), б) peak area = f (capillary temperature, auxiliary gas pressure), в) peak area = f (sheath gas pressure, auxiliary gas pressure) (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)



Слика 34. График контура за дериватизовани габапентин: а) површина пика = f (температура трансфер капиларе, притисак носећег гаса), б) површина пика = f (температура трансфер капиларе, притисак помоћног гаса), в) површина пика = f (притисак носећег гаса, притисак помоћног гаса) (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 34. Contour plots created for defining the optimal ion source conditions for derivatized gabapentin: а) peak area = f (capillary temperature, sheath gas pressure), б) peak area = f (capillary temperature, auxiliary gas pressure), в) peak area = f (sheath gas pressure, auxiliary gas pressure) (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

4.2.3. ОПТИМИЗАЦИЈА ПАРАМЕТАРА КОЛИЗИОНЕ ЋЕЛИЈЕ

Параметри који су испитани на нивоу колизионе ћелије су колициони притисак и колизионе енергије. У оба случаја, коришћен је *one-factor-at-a-time* приступ, а за централне вредности узете су оне добијене процесом ауто-подешавања, што је за колициони притисак била вредност од 1,5 mTorr, а за колизионе енергије вредности су приказане у табелама 5 – 7. Ефекат колизионог притиска на сигнал испитан је за вредности 1,0 mTorr, 1,5 mTorr и 2,0 mTorr. Резултати експеримената указали су да је фрагментација јона прекурсора била ефикаснија за вредност колизионог притиска од 1,0 mTorr. Повећање ове вредности на 1,5 mTorr довело је до смањења у површинама од око 14% за вигабатрин, 21% за прегабалин и 17% за габапентин, док је даље повећање до вредности 2,0 mTorr било одговорно за додатно смањење површина од око 34% за вигабатрин, 40% за прегабалин и 41% за габапентин. Добијени резултати указују да је за добијање максималних одговора анализата било потребно применити нижу вредност колизионог притиска (1,0 mTorr) од оне која је предложена процесом ауто-подешавања.

До ове фазе, сви експерименти извођени су са колизионим енергијама добијеним процесом ауто-подешавања (табеле 5 – 7). *One-factor-at-a-time* приступ је примењен на сваку SRM транзицију и резултати су потврдили да су ове вредности заиста биле адекватне за оптималну фрагментацију јона прекурсора уз максималан одговор анализата.

4.2.4. ОПТИМИЗАЦИЈА ПАРАМЕТАРА МЕТОДЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ ПРИМЕНОМ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ ДИЗАЈНА

Додатно побољшање предложене LC–MS/MS методе постигнуто је оптимизацијом три класична хроматографска параметра: а) садржаја ацетонитрила у мобилној фази (x_1), б) садржаја мравље киселине у воденој фази (x_2) и в) брзине протока мобилне фазе (x_3). Бокс-Бенкен експериментални дизајн одабран је за креирање плана експеримената (табела 15). Наведени параметри идентификовани су као фактори са значајним ефектом на LC–MS/MS анализу. Повећање садржаја органског растварача смањује површински напон течности, фаворизујући формирање Тејлорове купе и сићушних наелектрисаних капи, док садржај мравље киселине утиче на проводљивост течности [215]. Брзина протока мобилне фазе одабрана је као фактор који утиче на формирање спреја [238, 239]. На основу научних података и експерименталног искуства, ефекти промене температуре колоне могу се лако предвидети, па је вредност овог параметра током свих експеримената одржавана константном на 30°C.

У овом случају, као одговори система праћене су површине пикова дериватизованих антиепилептика, као и ретенциона времена анализата. На основу резултата приказаних у табелама 16 и 17, може се закључити да су сви добијени модели имали високе R^2 , $Adj. R^2$ и $Pred. R^2$ вредности, док параметар за процену уклапања експериментално добијених резултата у модел није био значајан ($p > 0,05$), чиме је потврђено да су модели адекватни за предвиђање одговора система. На сигнал свих деривата, изражен као површина пика, највише је утицао садржај мравље киселине и са смањењем њеног садржаја у воденој фази сигнал расте. Међутим, овај фактор се показао статистички незначајним када су у питању ретенциона времена анализата ($p > 0,05$), док су друга два фактора, садржај ацетонитрила и брзина протока мобилне фазе, као и њихове интеракције, показали значајан утицај на ове одговоре.

Табела 15. План Бокс-Бенкен експерименталног дизајна и добијени резултати за оптимизацију параметара методе течне хроматографије

Table 15. Plan of Box-Behnken experimental design and obtained results for optimization of liquid chromatography parameters

№	Садржај ацетонитрила (%)	Садржај мравље киселине (%)	Брзина протока мобилне фазе ($\mu\text{L}/\text{min}$)	В* површина	П** површина	Г*** површина	В* t_R (min)	П** t_R (min)	Г*** t_R (min)
1.	75	0,1	550	5096841	15506184	14081194	4,24	5,97	6,79
2.	85	0,1	550	5145523	17325235	15719695	3,59	4,41	4,86
3.	75	0,5	550	3072564	8715865	7532005	4,25	5,98	6,80
4.	85	0,5	550	3641201	11560811	10038772	3,58	4,41	4,86
5.	75	0,3	500	5193724	15803742	13812679	4,68	6,62	7,52
6.	85	0,3	500	5587131	19160046	16664041	3,95	4,87	5,36
7.	75	0,3	600	4061218	12269634	11221371	3,89	5,46	6,19
8.	85	0,3	600	4489191	15378060	13510597	3,29	4,01	4,42
9.	80	0,1	500	5827879	18934537	16414946	4,24	5,57	6,25
10.	80	0,5	500	3575436	10577787	8861707	4,26	5,59	6,27
11.	80	0,1	600	4582998	14797297	13145765	3,54	4,66	5,20
12.	80	0,5	600	3016489	8637693	7694581	3,54	4,64	5,20
13.	80	0,3	550	5049050	16477995	14892020	3,85	5,05	5,65
14.	80	0,3	550	4585723	14500310	12858784	3,86	5,07	5,68
15.	80	0,3	550	4783820	15100616	13290659	3,86	5,06	5,67

* вигабатрин, ** прегабалин, *** габапентин

Табела 16. Добијене вредности ефекта фактора за Бокс-Бенкен експериментални дизајн на површине пикова анализата током оптимизације параметара методе течне хроматографије (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Table 16. Obtained results for factor effects for Box-Behnken experimental design for peak areas during optimization of liquid chromatography parameters (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

	Површина пика					
	Вигабатрин		Прегабалин		Габапентин	
	Коефицијент**	<i>p</i> -вредност	Коефицијент**	<i>p</i> -вредност	Коефицијент**	<i>p</i> -вредност
b₀	4,81E+06	-	1,54E+07	-	1,37E+07	-
b₁	1,80E+05	0,0311*	1,39E+06	0,0042*	1,16E+06	0,0066*
b₂	-9,18E+05	< 0,0001*	-3,38E+06	< 0,0001*	-3,15E+06	< 0,0001*
b₃	-5,04E+05	0,0004*	-1,67E+06	0,0019*	-1,27E+06	0,0045*
b₁₂	1,30E+05	0,1894	2,56E+05	0,5456	2,17E+05	0,5809
b₁₃	8,64E+03	0,9235	-6,20E+04	0,8817	-1,41E+05	0,7182
b₂₃	1,71E+05	0,1015	5,49E+05	0,2239	5,26E+05	0,2126
b₁₁	7,48E+03	0,9364	1,67E+05	0,7025	2,18E+05	0,5944
b₂₂	-5,75E+05	0,0013*	-2,25E+06	0,0028*	-2,06E+06	0,0030*
b₃₃	1,91E+04	0,8384	1,27E+05	0,7712	-9,60E+04	0,8121
Модел	-	0,0004*	-	0,0011*	-	0,0013*
Lack of Fit	-	0,8654	-	0,7983	-	0,9405
R²	0,9862	-	0,9796	-	0,9781	-
Adj. R²	0,9613	-	0,9428	-	0,9386	-
Pred. R²	0,9191		0,8575		0,9047	

* коефицијенти модела значајни за $p < 0,05$

** коефицијенти квадратног модела израчунати за кодиране вредности ефекта фактора

Табела 17. Добијене вредности ефекта фактора за Бокс-Бенкен експериментални дизајн на ретенциона времена анализата током оптимизације параметара методе течне хроматографије (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Table 17. Obtained results for factor effects for Box-Behnken experimental design for analyte retention times during optimization of liquid chromatography parameters (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

	Ретенционо време					
	Вигабатрин		Прегабалин		Габапентин	
	Коефицијент**	<i>p</i> -вредност	Коефицијент**	<i>p</i> -вредност	Коефицијент**	<i>p</i> -вредност
b₀	3,8567	-	5,0600	-	5,6667	-
b₁	-0,3313	< 0,0001*	-0,7913	< 0,0001*	-0,9750	< 0,0001*
b₂	0,0025	0,3558	0,0012	0,9057	0,0037	0,7142
b₃	-0,3588	< 0,0001*	-0,4850	< 0,0001*	0,5488	< 0,0001*
b₁₂	-0,0050	0,2098	-0,0025	0,8670	-0,0025	0,8622
b₁₃	0,0325	0,0002*	0,0750	0,0032*	0,0975	0,0008*
b₂₃	-0,0050	0,2098	-0,0100	0,5123	-0,0050	0,7297
b₁₁	0,0579	< 0,0001*	0,1288	0,0003*	0,1516	< 0,0001*
b₂₂	0,0004	0,9128	0,0038	0,8069	0,0092	0,5480
b₃₃	0,0379	0,0001*	0,0513	0,0178*	0,0542	0,0126*
Модел	-	0,0001*	-	< 0,0001*	-	< 0,0001*
Lack of Fit	-	0,3838	-	0,0736	-	0,1811
R²	0,9999	-	0,9994	-	0,9996	-
Adj. R²	0,9996	-	0,9984	-	0,9990	-
Pred. R²	0,9985		0,9912		0,9947	

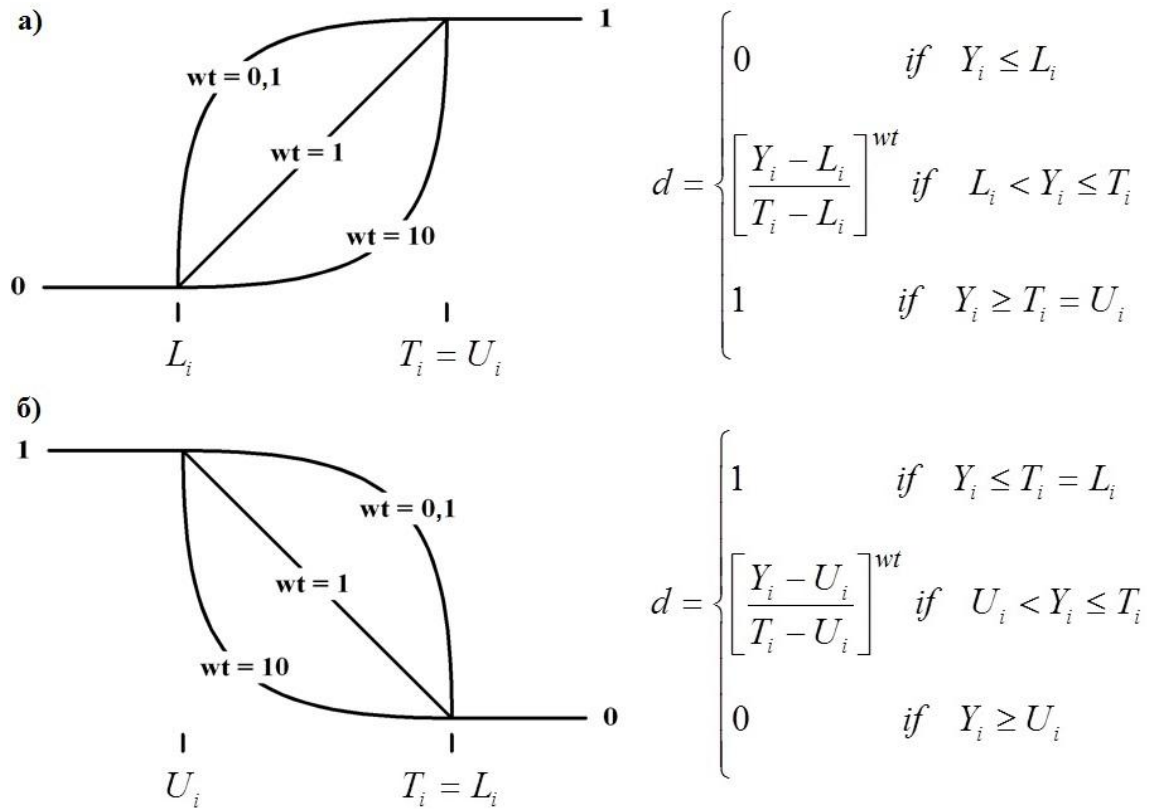
* коефицијенти модела значајни за $p < 0,05$

** коефицијенти квадратног модела израчунати за кодиране вредности ефекта фактора

Како је садржај ацетонитрила у мобилној фази имао супротне ефекте на дефинисане циљеве, оптимални услови су одабрани коришћењем Дерингерове функције пожељних одговора. Избор оптималних услова применом овог приступа подразумева неколико корака:

1. дефинисање циљева за одабране одговоре:
 - ✓ максимизација,
 - ✓ минимизација или
 - ✓ циљана, тачно дефинисана вредност,
2. одабир тежина (енг. *Weights, wt*) у опсегу од 0,1 до 10 којима се потенцира важност достизања постављеног циља (слика 35), а у неким случајевима се додатно додељују вредности важности достизања одређеног циља (енг. *Importance*) у опсегу од + до +++++,
3. превођење експериментално добијених одговора и моделом предвиђених одговора у индивидуалну функцију пожељних одговора (*d*).

Циљ предложене оптимизације методе течне хроматографије био је максимизација одговора анализата уз истовремено смањење времена трајања анализе. У табели 18 приказани су одговарајући опсези за испитиване факторе, додељени тежински коефицијенти и вредности важности достизања дефинисаних циљева.



Слика 35. Графички приказ циљева оптимизације и једначине за израчунавање индивидуалне функције пожељног одговора (d): а) максимизација, б) минимизација

Figure 35. Graphical presentation of the optimization aims and equations for calculating individual desirability function (d): а) maximization, б) minimization

Табела 18. Опсези за испитиване факторе, тежински коефицијенти и вредности важности достизања дефинисаних циљева приликом дефинисања оптималних услова применом Дерингерове функције пожељних одговора

Table 18. Ranges for investigated factors, weights and importance for the optimization by Deringer desirability function

		Циљ	Опсег		Тежински коефицијент	Коефицијент значајности
Фактори	садржај ацетонитрила у мобилној фази	максимизација	75%	85%	1	+++
	садржај мравље киселине у воденој фази	минимизација	0,15%	0,5%	1	+++
	брзина протока мобилне фазе	у опсегу	530 $\mu\text{L}/\text{min}$	560 $\mu\text{L}/\text{min}$	-	-
Одговори	површина пика вигабатрина	максимизација	у опсегу*		0,5	+++
	површина пика прегабалина	максимизација	у опсегу*		0,5	+++
	површина пика габапентина	максимизација	у опсегу*		0,5	+++
	ретенционо време вигабатрина	минимизација	у опсегу*		1	+
	ретенционо време прегабалина	минимизација	у опсегу*		1	+
	ретенционо време габапентина	минимизација	у опсегу*		1	+

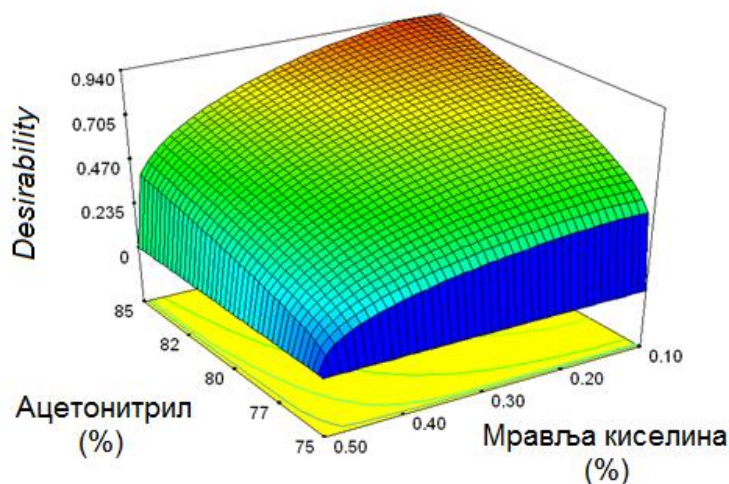
* опсег је дат на слици 37

На основу израчунатих вредности индивидуалних функција пожељних одговора, према једначини 3, израчунава се вредност глобалне функције пожељних одговора (D):

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{\frac{1}{n}} \quad (3)$$

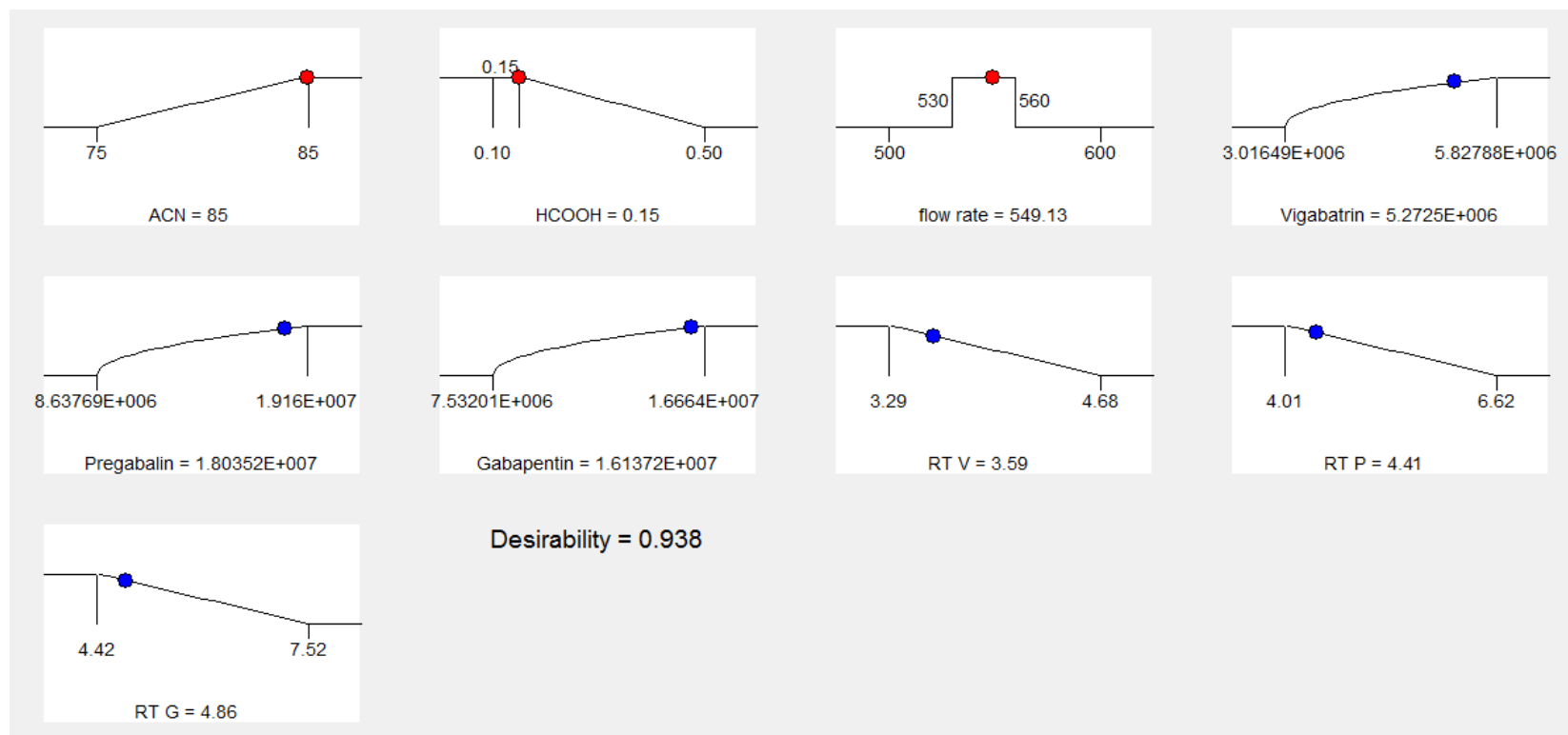
Максимална вредност D добија се када све зависно променљиве (одговори система) истовремено имају максималне вредности индивидуалних функција пожељних одговора. Оптимални услови су они којима одговара највећа вредност D .

3D дијаграм зависности $D = f$ (% ацетонитрила, % мравље киселине) приказан је на слици 36. У случају оптимизације параметара методе течне хроматографије, као оптималан предложен је следећи састав мобилне фазе: садржај ацетонитрила у мобилној фази 85%, садржај мравље киселине у воденој фази 0,15% при брзини протока од 550 $\mu\text{L}/\text{min}$. Вредност глобалне функције пожељних одговора износила је 0,938 (слика 36).



Слика 36. 3D дијаграм функције пожељних одговора у зависности од % ацетонитрила и % мравље киселине при константној брзини протока од 550 $\mu\text{L}/\text{min}$ (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 36. 3D Response surface plot showing desirability as a function of % acetonitrile and % formic acid for a constant flow rate 550 $\mu\text{L}/\text{min}$, indicating the optimal conditions (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

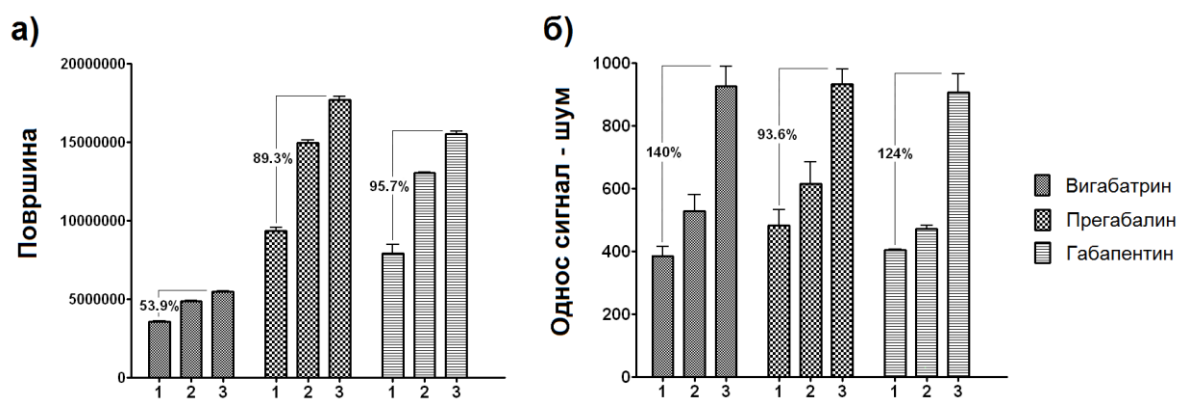


Слика 37. Графички приказ оптималних услова и предвиђених вредности одговора

Figure 37. Graphical presentation of optimal conditions and predicted response values

4.2.5. ПРОЦЕНА УНАПРЕЂЕЊА СИГНАЛА ПОСЛЕ СВАКЕ ФАЗЕ ОПТИМИЗАЦИЈЕ

Након две значајне фазе оптимизације, везане за јонски извор и параметре методе течне хроматографије, процењено је унапређење сигнала извођењем експеримената у трипликату под различитим експерименталним условима: а) коришћењем вредности добијених ауто-подешавањем за параметре јонског извора са почетним условима за методу течне хроматографије, б) коришћењем оптимизованих вредности за параметре јонског извора уз почетне услове за методу течне хроматографије и в) коришћењем оптимизованих вредности за параметре јонског извора и методу течне хроматографије. Примећено је унапређење сигнала анализата, исказаног кроз површине, као и односа сигнал-шум. Добијени резултати са акцентом на процентуално побољшање праћених одговора, приказани су на слици 38.



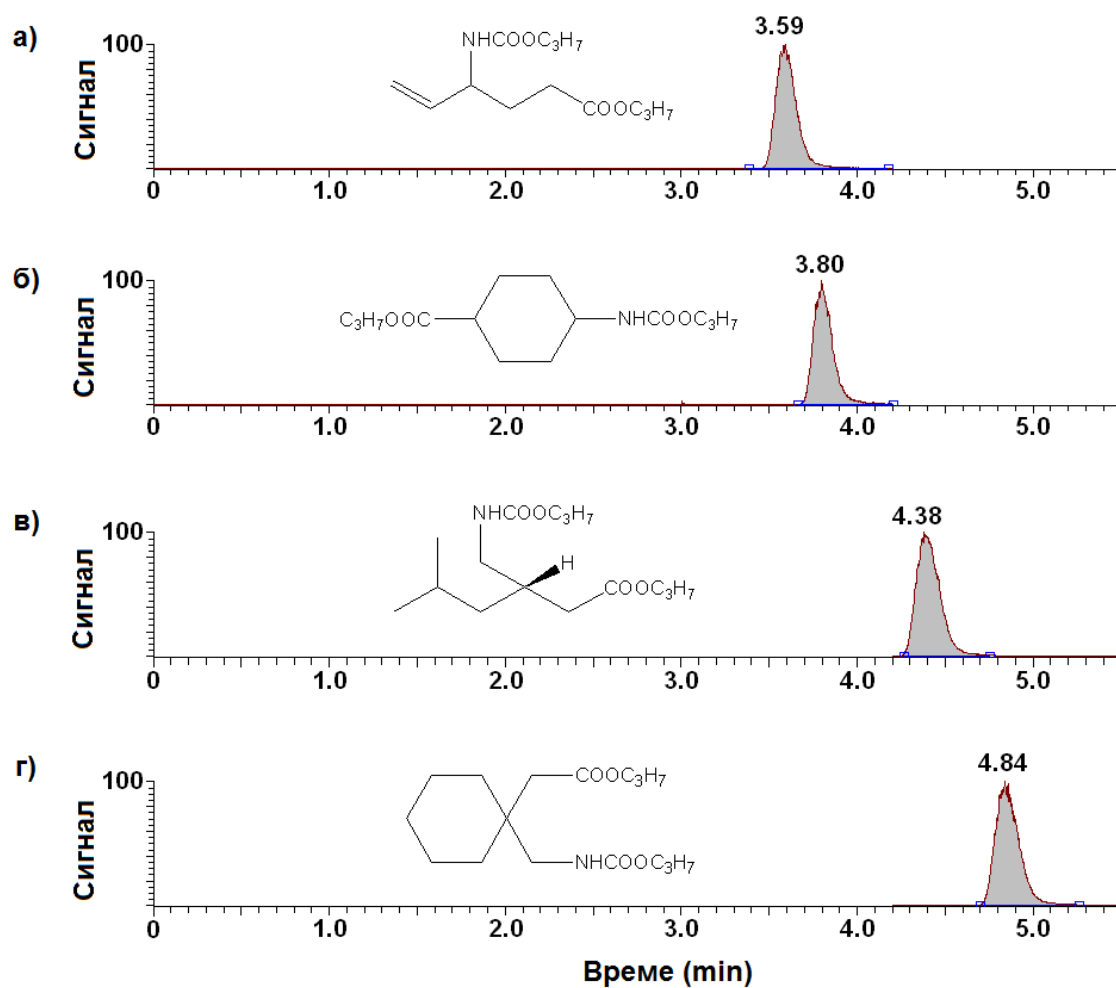
Слика 38. Поређење површина анализата (а) и односа сигнал-шум (б) добијених при различитим LC–MS/MS условима: 1 – ауто-подешавање, 2 – након оптимизације параметара јонског извора и 3 – након оптимизације параметара методе течне хроматографије (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 38. Comparison of analyte areas (a) and signal-to-noise values (b) generated under different LC–MS/MS conditions: 1 – autotune settings, 2 – optimized ion source parameters and 3 – optimized chromatography parameters (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

На основу ове слике, може се закључити да су, у поређењу са резултатима који су добијени процесом ауто-подешавања и применом уобичајених почетних услова LC методе, обе фазе оптимизације у изузетној мери допринеле унапређењу сигнала. Изведеним експериментима јасно је показано да се оптимизацијом MS и LC параметара може увећати потенцијал LC–MS/MS система. Иако избор фактора који су обухваћени оптимизацијом и сама тактика зависе првенствено од искуства и способности аналитичара, применом предложене вишестепене процедуре успоставља се боља контрола система.

4.2.6. ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ВРЕМЕНСКОГ СЕГМЕНТИРАЊА

Како би се испитало да ли је могуће даље смањење шума, тестиран је приступ временског сегментирања. Овај приступ се најчешће примењује за протоколе са великим бројем SRM транзиција, када се због „пребацивања“ масеног спектрометра са једне на другу SRM транзицију смањује осетљивост за све појединачне транзиције, јер је време мерења расподељено на различите јоне [240]. Како би се овај недостатак превазишао, хроматограм се може поделити у неколико временских сегмената, током којих се масени спектрометар фокусира са мноштва јона само на посебан јон прекурсор и његове фрагменте. За предложену методу примењен је овај приступ иако укупан број SRM транзиција није био толико велики, а затим су резултати добијени сегментираном и несегментираном методом упоређени кроз однос сигнал-шум. Креирана су два сегмента, један за дериватизовани виgabатрин и интерни стандард (до 4,2 минута) и други за дериватизовани прегабалин и габапентин (од 4,2 минута до 5,5 минута). Пребацивање позиције вентила за преусмеравање са „за отпад“ у „ка детектору“ програмирано је на 3,0 минута. Првобитна хипотеза је потврђена и временским сегментирањем се заиста повећала осетљивост предложене методе, с обзиром на повећање вредности односа сигнал-шум 3,5 пута за виgabатрин, 1,4 пута за прегабалин и 1,2 пута за габапентин. Хроматограм добијен под коначним оптималним условима приказан је на слици 39.



Слика 39. SRM хроматограми добијени под коначним оптималним условима:
а) виgabатрин, б) интерни стандард, в) прегабалин и г) габапентин
(публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Figure 39. Indicative SRM chromatograms obtained under final conditions:
а) vigabatrin, б) internal standard, в) pregabalin and г) gabapentin
(published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

4.2.7. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ

Постављена LC–MS/MS метода парцијално је валидирана за одређивање вигабатрина, прегабалина и габапентина у течним узорцима хумане плазме. Метода је показала задовољавајућу селективност, линеарност, тачност и прецизност, а добијени резултати приказани су у табели 19. Испитивање јонске супресије показало је одсуство интерферирајућих елемената из матрикса, док је одабрани опсег од 0,0400 µg/mL до 10,0 µg /mL погодан за фармакокинетичка испитивања цвитерјонских антиепилептика.

Табела 19. Резултати валидације методе за одређивање одабраних антиепилептика у плазми (публиковано у J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Table 19. Results of method validation for the determination of selected antiepileptics in plasma (published in J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884)

Супстанца	Вигабатрин	Прегабалин	Габапентин
Опсег (µg/mL)	0,0400 – 10,0	0,0400 – 10,0	0,0400 – 10,0
Калибрациона крива ^{а, б}	$y = 0,00250 + 0,279 x$	$y = 0,0420 + 1,35 x$	$y = 0,0761 + 1,16 x$
Тачност^в			
R²	0,991	0,994	0,996
MV_L^д	82,1	81,3	85,8
MV₁	88,8	93,8	91,6
MV₂	90,8	115	111
MV₃	86,3	85,5	87,1
Прецизност^г			
MV_L	6,7	14	17
MV₁	13	15	12
MV₂	9,8	11	11
MV₃	5,8	6,1	9,1

^а $n = 4$

^б тежински фактор $1/x^2$

^в (средња вредност)/(номинална вредност) $\times 100$, $n = 24$

^г % RSD, $n = 24$

^д MV_L (0,0400 µg/mL), MV₁ (0,120 µg/mL), MV₂ (1,20 µg/mL), MV₃ (7,50 µg /mL)

4.3. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ВИГАБАТРИНА ИЗ ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ

Примена масене спектрометрије за анализу осушених капи матрикса постаје све популарнија у модерној биоаналитици. Велика осетљивост, својствена масеној спектрометрији, заједно са довољно високим концентрацијама лека у узорцима узетим од пацијената, омогућила је примену осушених капи плазме за одређивање вигабатрина. Реакција дериватизације применом *n*-пропилхлороформат/*n*-пропанол дериватизационог сета, резултирала је јачим интензитетом сигнала и побољшаним хроматографским понашањем анализата на C8 колони. Коришћење само једног диска, што одговара запремини од око 5 µL плазме, показало се као адекватно за постизање жељеног лимита квантификације од 0,500 µg/mL. Запремина узорка узета за анализу коришћењем једног диска израчуната је према једначини:

$$V_{\text{диска}} = \frac{A_{\text{диска}}}{A_{\text{DPS}}} V_{\text{DPS}} = \frac{\pi \left(\frac{d}{2}\right)^2}{\pi \left(\frac{D}{2}\right)^2} V_{\text{DPS}} = \left(\frac{d}{D}\right)^2 V_{\text{DPS}} \quad (4)$$

где је V_{DPS} запремина нанете плазме, A_{DPS} површина осушене капи плазме, $A_{\text{диска}}$ површина извађеног диска, d је дијаметар екстрахованог диска, а D је дијаметар осушене капи плазме. Како је промер некомерцијалног бушача био 5 mm, дијаметар осушене капи плазме 14 mm и запремина нанете плазме 40 µL, запремина плазме екстрахована једним диском износила је приближно 5 µL.

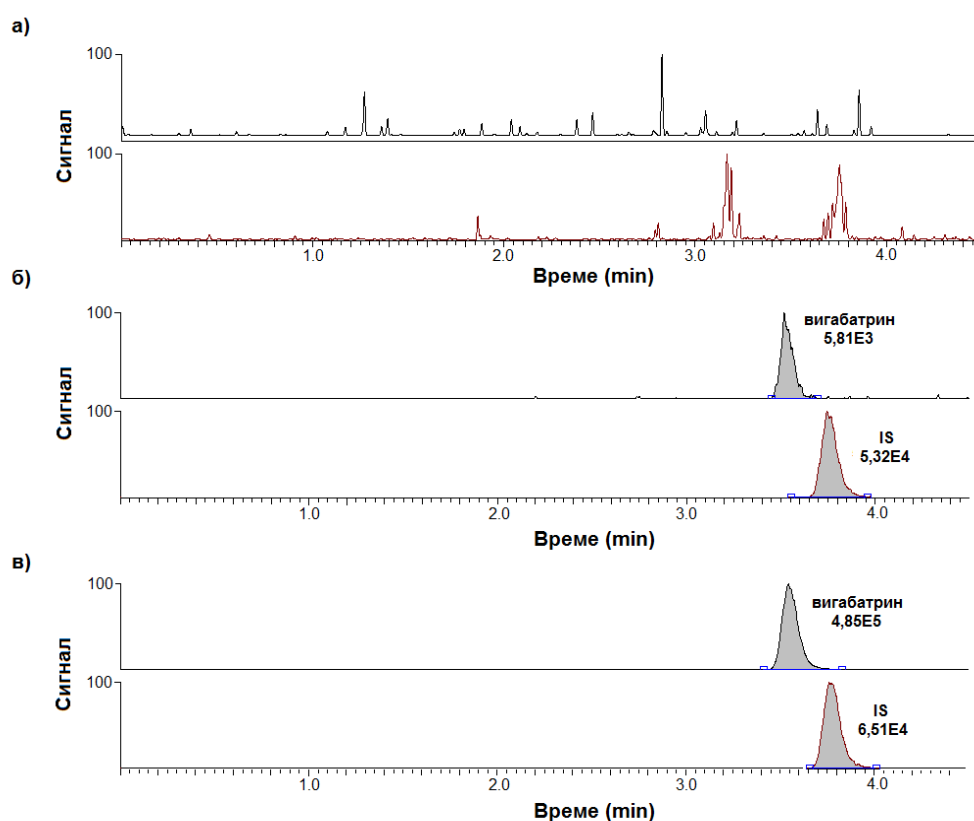
Дериватизовани вигабатрин и интерни стандард детектовани су у позитивном режиму рада, док је квантитативна анализа изведена праћењем две SRM транзиције по аналиту. Молекулски јон вигабатрина m/z 257,95 након фрагментације дао је продукт јоне m/z 113,04 и 155,05. Молекулски јон интерног стандарда m/z 272,03 фрагментацијом је дао продукт јоне m/z 127,01 и 212,00.

Оптимизовани хроматографски услови омогућили су добијање оштрих, симетричних, Гаусових пикова за вигабатрин и интерни стандард. Ретенциона времена износила су 3,54 минута за вигабатрин и 3,76 минута за интерни стандард.

4.3.1. РЕЗУЛТАТИ ВАЛИДАЦИЈЕ

4.3.1.1. Селективност

Селективност методе процењена је према поступку описаном у поглављу 3.10.7.1. Утврђено је да на ретенционим временима анализата нема интерференција приликом анализе „празних“ узорака DPS из шест различитих извора. Хроматограм „празног“ узорка плазме приказан је на слици 40а. Такође, ни други антиепилептици (валпроинска киселина/валпроат, фенобарбитон, ламотригин, прегабалин, топирамат, леветирацетам, карбамазепин), као и парацетамол и амоксицилин нису утицали на сигнал на LLOQ нивоу.



Слика 40. SRM хроматограм вигабатрина и интерног стандарда за: а) *blank*, б) LLOQ и в) узорак пацијента (публиковано у J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

Figure 40. Representative SRM chromatograms of vigabatrin and IS obtained from: а) blank, б) LLOQ and в) patient sample (published in J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

4.3.1.2. Калибрациона крива

Добро осмишљена и правилно интерпретирана калибрациона крива је кључна за сваку анализу, с обзиром да се концентрација анализата у непознатим узорцима процењује на основу регресионих података, обрађених најчешће применом линеарне регресије.

Када се за уклапање експерименталних података у линеарну калибрациону криву користи метода најмањег квадрата, једнака важност се даје варијабилности података за све тачке на калибрационој кривој. С обзиром да је калибрационом кривом у биоаналитици најчешће обухваћен опсег од неколико редова величине, апсолутна варијабилност за више концентрације је већа. Због тога ови подаци постају доминантни приликом израчунавања линеарног регресионог модела па се у делу калибрационе криве са нижим концентрацијама јављају прекомерне грешке. „Вагање“ података инверзно концентрацији, односно пондерисање криве један је од начина за компензацију грешке која се јавља и постизање бољег уклапања експерименталних података.

Према смерницама за валидацију биоаналитичких метода [2], уклапање података у калибрациону криву изводи се применом *најједноставнијег* модела који *адекватно* описује везу између концентрације и одговора коришћењем *одговарајућег* пондерисања и *статистичких тестова* за процену уклапања експериментално добијених резултата у модел. Темељну процену адекватности пондерисања криве и одабир тежинског фактора најбоље је урадити на крају развоја методе или током валидације када постоји довољно података за рачунање стандардне девијације на сваком калибрационом нивоу.

У првом кораку *F*-тестом се утврђује постојање статистички значајне разлике између варијансе на почетку и на крају калибрационе криве [241, 242]. Овај корак се условно може и прескочити, с обзиром да је калибрационом кривом увек обухваћен велики опсег концентрација. То ће значити одбијање нулте хипотезе *F*-теста (да подаци нису хетероскедастични), јер стандардна девијација односно апсолутна грешка расте са порастом концентрације. С друге стране, релативна грешка (енг. *Relative Error*, RE) је релативно константна, што је на

основу дозвољених одступања за тачност и прецизност предвиђено и самим смерницама. Резултати F -теста добијени током валидације методе за одређивање вигабатрина приказани су у табели 20.

Табела 20. Резултати F -теста за процену хомоскедастичности

Table 20. Results of F -test for the estimation of homoscedascity

Статистички параметар	Стандард 1 (0,500 µg/mL)	Стандард 7 (50,0 µg/mL)
Одговор анализата ($n = 5$)	0,11	10,58
Стандардна девијација (σ)	0,06	2,89
Варијанса (σ^2)	0,0034	8,33
$F_{\text{израчунато}} (\sigma_7^2/\sigma_1^2)$		2463,41
$F_{\text{табеларно}} (f_1, f_2; 0,99)$		15,98
С обзиром да је $F_{\text{израчунато}} > F_{\text{табеларно}}$ нулта хипотеза се одбија, односно подаци су хетероскедастични.		

* $f_1 = f_2 = n - 1$

У наредном кораку потребно је одредити одговарајући тежински фактор, коришћењем опција инкорпорираних у софтвер за обраду података (нпр. $1/x^0$, $1/x^{0,5}$, $1/x$, $1/x^2$, $1/y^{0,5}$, $1/y$, $1/y^2$). Применом сваког од тежинских фактора креира се пондерисана калибрациона крива методом најмањег квадрата, која се користити за рачунање релативне грешке за сваки калибрациони ниво применом следеће једначине:

$$\% \text{ RE} = \frac{C_{\text{израчунато}} - C_{\text{номинално}}}{C_{\text{номинално}}} \times 100 \quad (5)$$

Ефикасност различитих тежинских фактора за смањење грешке процењује се на основу суме апсолутних вредности релативне грешке (ΣRE), а најбољи је онај који даје најмању вредност ΣRE .

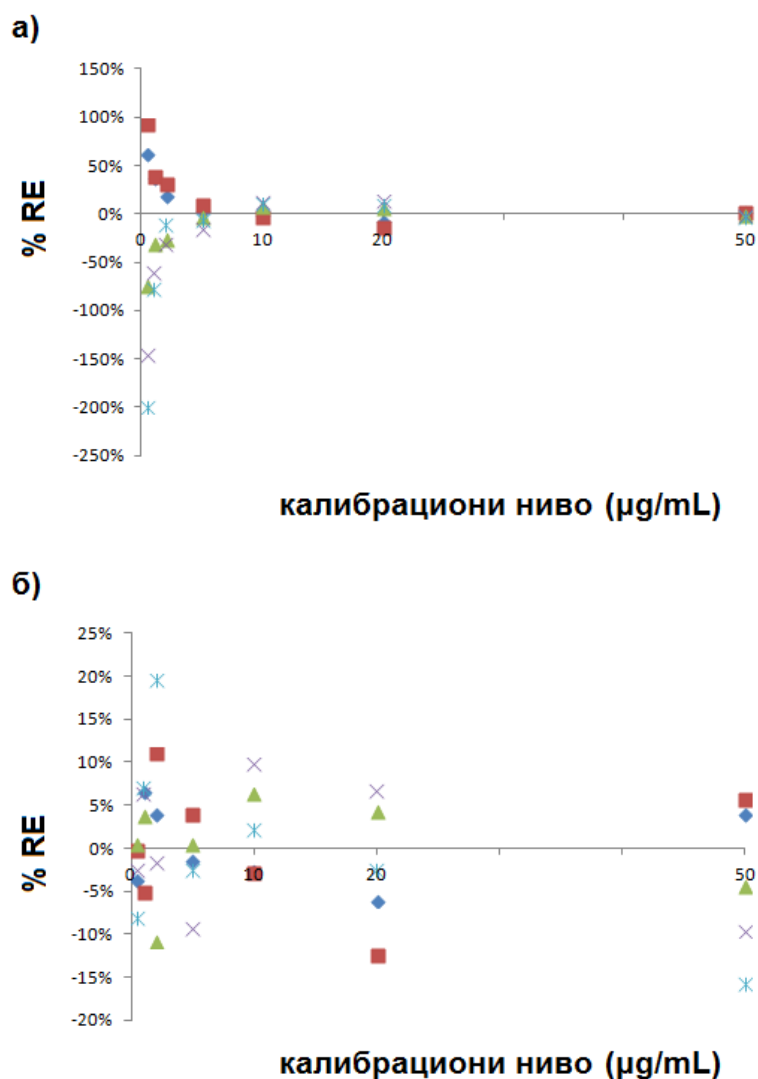
Током валидације методе за одређивање вигабатрина из осушених капи плазме, изведено је пет аналитичких секвенци, свака са седам стандарда који су коришћени за конструисање калибрационе криве применом пондерисане линеарне регресије. Као најбољи тежински фактор одабран је $1/x^2$ јер у поређењу са другим тежинским факторима, као и непондерисаном линеарном регресијом, даје најмању суму процентуалне релативне грешке (табела 21).

Табела 21. Избор одговарајућег тежинског фактора на основу резултата добијених за једну аналитичку секвенцу

Table 21. Selection of appropriate weighting factor based on results obtained for one analytical run

		Калибрациони ниво							
		стандард 1	стандард 2	стандард 3	стандард 4	стандард 5	стандард 6	стандард 7	
Тежински фактор	1/x	C _{израчунато}	0,435	1,03	1,98	4,64	11,35	22,13	46,9
		C _{номинално}	0,500	1,00	2,00	5,00	10,0	20,0	50,0
		% RE	-13	3	-1	-7	13	11	-6
		Abs % RE	13	3	1	7	13	11	6
		ΣRE % = 55				R ² = 0,9917			
	1/x ²	C _{израчунато}	0,488	1,06	1,97	4,53	11,0	21,3	45,2
		C _{номинално}	0,500	1,00	2,00	5,00	10,0	20,0	50,0
		% RE	-2	6	-2	-9	10	7	-10
		Abs % RE	2	6	2	9	10	7	10
		ΣRE % = 46				R ² = 0,9912			
	1/y	C _{израчунато}	0,430	1,03	1,98	4,67	11,4	22,3	47,3
		C _{номинално}	0,500	1,00	2,00	5,00	10,0	20,0	50,0
		% RE	-14	3	-1	-7	14	11	-5
		Abs % RE	14	3	1	7	14	11	5
		ΣRE % = 56				R ² = 0,9921			
	1/y ²	C _{израчунато}	0,486	1,07	1,99	4,60	11,1	21,7	45,9
		C _{номинално}	0,500	1,00	2,00	5,00	10,0	20,0	50,0
		% RE	-3	7	0	-8	11	8	-8
		Abs % RE	3	7	0	8	11	8	8
		ΣRE % = 47				R ² = 0,9911			
	непондерисано	C _{израчунато}	-0,231	0,401	1,39	4,21	11,3	22,7	48,8
		C _{номинално}	0,500	1,00	2,00	5,00	10,0	20,0	50,0
		% RE	-146	-60	-30	-16	13	13	-2
		Abs % RE	146	60	30	16	13	13	2
		ΣRE % = 281				R ² = 0,9938			

Смањење грешке постигнуто пондерисањем калибрационе криве приказано је на слици 41.



Слика 41. Релативна грешка (%) за непондерисану калибрациону криву (а) и уз примену тежинског фактора $1/x^2$ (б); $\blacklozenge$ аналитичка секвенца 1, $\blacksquare$ аналитичка секвенца 2, $\blacktriangle$ аналитичка секвенца 3, $\times$ аналитичка секвенца 4 и $\star$ аналитичка секвенца 5

Figure 41. Relative error (%) for unweighted calibration curve (a) and with weighting wactor $1/x^2$ (б); $\blacklozenge$ run 1, $\blacksquare$ run 2, $\blacktriangle$ run 3, $\times$ run 4 and $\star$ run 5

Сви калибрациони стандарди испунили су унапред дефинисане критеријуме (одступање $\pm 15\%$ у односу на номиналну вредност, изузев за LLOQ где је дозвољено одступање $\pm 20\%$ у односу на номиналну вредност). Линеарност је потврђена у опсегу од $0,500 \mu\text{g/mL}$ до $50,0 \mu\text{g/mL}$ уз $R^2 > 0,991$ (табела 22). Статистичка валидност калибрационе криве за ниво значајности од 5% тестирана је анализом варијансе ($p = 0,988$). Хроматограм најнижег калибрационог стандарда, што истовремено представља и доњи лимит квантификације (LLOQ), приказан је на слици 40б.

Табела 22. Статистички параметри за једначине калибрационе криве
(публиковано у J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

Table 22. Statistical parameters for calibration curve equations
(published in J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

Аналитичка секвенца	Регресиона једначина	R^2	Стандардна девијација	
			нагиб	одсечак
1	$y = 0,0000155 + 0,168x$	0,997	0,0043	0,0049
2	$y = -0,00343 + 0,167x$	0,992	0,0067	0,0077
3	$y = -0,0249 + 0,166x$	0,995	0,0053	0,0061
4	$y = 0,0230 + 0,308x$	0,991	0,0130	0,0149
5	$y = 0,0369 + 0,308x$	0,991	0,0146	0,0160

4.3.1.3. Тачност и прецизност

Резултати за тачност (изражену као % приноса, *Recovery*) и прецизност (изражену као релативна стадардна девијација у %, *Relative Standard Deviation*), процењени унутар аналитичке секвенце, као и између секвенци и приказани су у табели 23. Критеријуми за прихватљивост резултата дефинисани су на следећи начин: за тачност, средња вредност треба да буде $\pm 15\%$ у односу на номиналну вредност за сваки ниво осим за MV_L , где је дозвољено одступање $\pm 20\%$, а за прецизност % RSD износи 15%, односно 20% за MV_L ниво. Сви резултати су били прихватљиви и у опсегу дозвољених одступања.

Табела 23. Тачност и прецизност унутар аналитичке секвенце и између аналитичких секвенци (публиковано у J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

Table 23. Within-run and between-run accuracy and precision results (published in J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

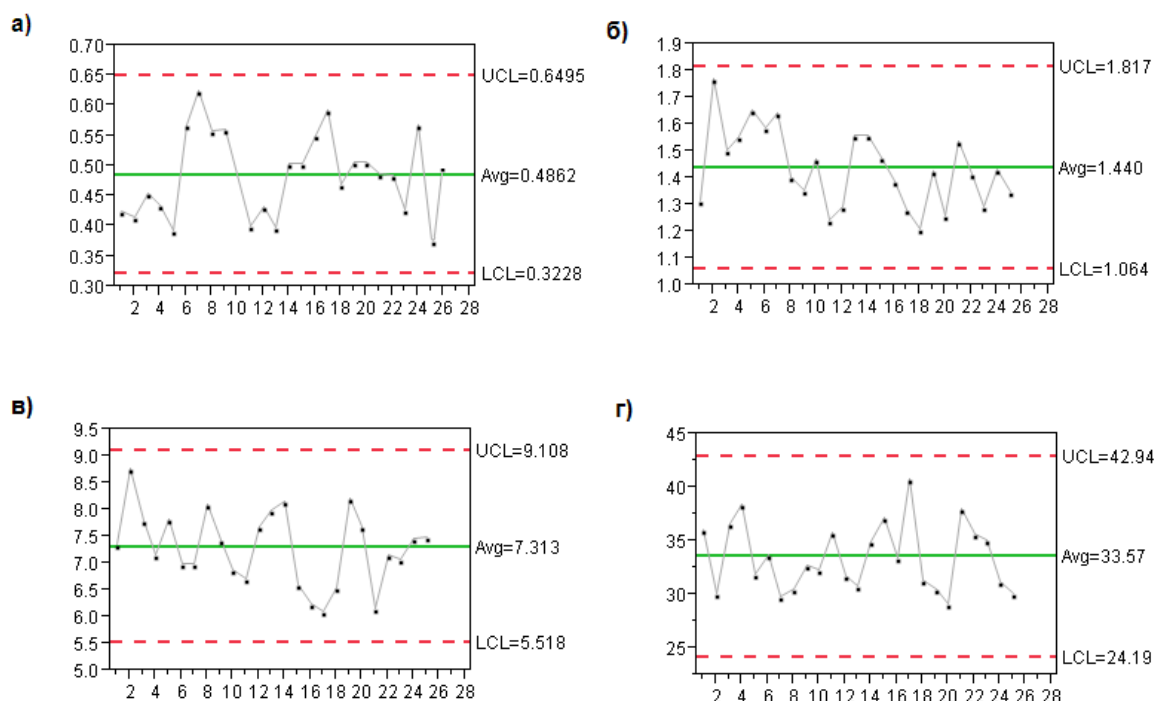
MV узорак ($\mu\text{g/mL}$)	Тачност	Тачност	Прецизност	Прецизност
	унутар	између	унутар	између
	аналитичке секвенце ^a (% Recovery)	аналитичких секвенци ^b (% Recovery)	аналитичке секвенце ^b (% RSD)	аналитичких секвенци ^b (% RSD)
MV_L (0,500)	105	97,2	15	15
MV_1 (1,50)	87,7	96,0	6,6	10
MV_2 (7,50)	92,9	97,5	7,7	9,4
MV_3 (35,0)	94,6	95,9	9,6	9,5

^a ($n = 5$), рачунато као $100 \times (\text{средња израчуната концентрација})/(\text{номинална концентрација})$

^b вредности добијене за свих пет аналитичких секвенци ($n = 25$)

^B ($n = 5$)

Додатно, као што је приказано на контролним картама (слика 42), сви MV узорци су имали вредности између горњег и доњег контролног лимита, који су дефинисани као $\mu \pm 3\sigma$, где је μ средња вредност одређивања, а σ стандардна девијација. Анализом контролних карти није примећена појава тренда резултата ни ка горњем ни ка доњем контролном лимиту.



Слика 42. Контролне карте за MV_L (а), MV_1 (б), MV_2 (в) и MV_3 (г) ниво.
Испрекидане линије одговарају $\mu + 3\sigma$ као горњем контролном лимиту (UCL) и $\mu - 3\sigma$ као доњем контролном лимиту (LCL)
(публиковано у J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

Figure 42. Control charts at MV_L (а), MV_1 (б), MV_2 (в) and MV_3 (г) levels.
Dashed lines correspond to $\mu + 3\sigma$ as the upper control limit (UCL), and $\mu - 3\sigma$ as the lower control limit (LCL)
(published in J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

4.3.1.4. Појава сигнала аналита заосталог из претходно анализираних узорка

Ињектовањем чистог растварача након калибрационог стандарда највише концентрације, показано је одсуство сигнала присутног из претходног ињектовања, с обзиром да није детектован ни сигнал аналита, ни сигнал интерног стандарда.

4.3.1.5. Принос екстракције

У табели 24 приказане су средње вредности добијене за принос екстракције. За сва три испитивана нивоа, добијени су слични резултати.

4.3.1.6. Матрикс ефекат

Матрикс ефекат (%), за сваки испитивани ниво, израчунат је из односа површина средњих вредности ME и SOL према једначини (6):

$$\text{Матрикс ефекат (\%)} = \frac{\text{ME}}{\text{SOL}} \times 100 \quad (6)$$

Добијени резултати приказани су у табели 24. Као што се види, није било утицаја ендогених компоненти плазме на анализу вигабатрина. Овај резултат је донекле и очекиван, уколико се у обзир узме: а) коришћење мале запремине плазме (~ 5 µL), б) добијање чистих екстраката применом течно-течне екстракције и в) велика запремина ацетонитрила коришћена за реконституисање раствора (500 µL).

Табела 24. Резултати за принос екстракције и матрикс ефекат
(публиковано у J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

Table 24. Recovery and matrix effect results
(published in J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

	Концентрација (µg/mL)	Recovery* (%)	Матрикс ефекат* (%)
Вигабатрин	1,50	70,1	97,2
	7,50	78,0	102,9
	35,0	76,8	95,5
Интерни стандард	0,500	74,8	100,3

* средња вредност, n = 3

4.3.1.7. Стабилност

Прегледом литературе нису пронађени подаци који би указивали на потенцијално проблематичну стабилност вигабатрина током складиштења и руковања, што је и очекивано с обзиром на његову једноставну хемијску структуру. За процену стабилности коришћена је следећа једначина:

$$\text{Одступање (\%)} = \frac{S_2 - S_1}{S_1} \times 100 \quad (7)$$

где је S_1 свеже припремљен узорак, а S_2 узорак након примене услова чији утицај се процењује. За сва испитивања варирања су износила мање од 15%, што је лимит прописан у међународним смерницама [2, 3].

Током испитивања краткорочне стабилности на собној температури, одступање између узорака који су стајали и свежих узорака износило је 3,52% за S_L ниво и -0,06% за S_H ниво. Исти закључак следио је и за испитивање дугорочне стабилности, уз одступање од 3,31% за S_L и 1,85% за S_H ниво.

Стабилност основног раствора испитана је за период од три месеца, а стабилност радног раствора за период од две недеље. Током ових периода раствори су складиштени на температури од 2°C до 8°C. Резултати су показали да

су оба раствора стабилна, с обзиром на одступање од 0,27% за основни раствор, односно -3,29% за радни раствор.

Стабилност деривата испитана је за период од 15 сати стајања у аутосемплеру. За ово испитивање, такође су анализирани узорци у две концентрације, S_L и S_H . Највеће одступање износило је 4,54%, за оба испитивана нивоа.

4.3.1.8. Реанализа узорака

Свих 12 узорака пацијената поново је анализирано и резултати су упоређени са иницијално добијеним, коришћењем следеће једначине:

$$\text{Одступање (\%)} = \frac{\text{резултат реанализе} - \text{оригинални резултат}}{\text{средња вредност}} \times 100 \quad (8)$$

Максимална примећена разлика износила је 9,7%, док је захтев да дозвољено одступање од $\pm 20\%$ треба да има најмање 67% узорка.

4.3.1.9. Тест разблажења

Тест разблажења изводи се како би се омогућила поновна анализа узорака чија је концентрација иницијално процењена као „изнад калибрационе криве“. За разлику од класичне процедуре, када се као матрикс користи течна плазма, примена DPS подразумева неконвенционално испитивање овог параметра. Као што је описано у поглављу 3.10.7.9, тестирање је изведено припремањем пет QC узорака високе концентрације. Одступање од теоријске концентрације од 30 $\mu\text{g/mL}$, као и коефицијент варијације треба да буду мањи од 15%. Добијени резултати за тачност (89,4%) и прецизност ($RSD = 1,5\%$) испуњавају дефинисане критеријуме.

4.3.1.10. Примена методе за анализу узорака сакупљених од пацијената

Предложена метода примењена је за анализу DPS сакупљених од 12 пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду. Учесници испитивања била су деца и омладина оба пола на монотерапији вигабатрином или на комбинованој терапији. Испитаници су били различитог животног доба, телесне масе и различитог неуролошког, когнитивног, психијатријског и соматског статуса. Комерцијално доступан вигабатрин је примењиван у облику таблета или раствора за *per os* примену, најмање три до пет дана у непромењеном режиму дозирања. Узорковање крви обављено је два сата након последње дозе, што одговара времену када се постиже максимална концентрација ($C_{\max}$). Иако би примена DBS била погоднија, нарочито за бебе као што су пацијенти означени са S07 и S10, примена DPS, због предности које су већ наведене, има своје место у биоаналитици. У том контексту, примена тандем масене спектрометрије може драстично да редукује количину крви потребне за анализу. Репрезентативни хроматограм добијен анализом узорка пацијента приказан је на слици 40в. У табели 25 приказани су демографски подаци, доза вигабатрина и добијене вредности за $C_{\max}$. У једном случају (S02), примећено је и непоштовање комплијансе, јер је измерена концентрација вигабатрина одговарала равнотежним нивоима лека, постигнутим пре примене нове дозе.

Табела 25. Демографски подаци и концентрације вигабатрина добијене за 12 пацијената два сата након последње дозе
(публиковано у J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

Table 25. Demographic data and vigabatrin concentration values obtained from 12 patients 2 h after last dosing
(published in J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108)

Шифра пацијента	Пол	Узраст (године)	Телесна маса (kg)	Доза (mg)	Концентрација (µg/mL)
S01	M	18	32	750	23,2
S02	F	17	75	500	4,54
S03	F	5	25	500	22,9
S04	F	2	15	500	19,8
S05	M	6	23	1000	31,6
S06	F	2	14	500	28,5
S07	F	0,4	6,7	500	45,4
S08	F	15	50	500	12,8
S09	F	15	62	500	26,2
S10	M	0,8	10	375	43,9
S11	F	14	55	500	12,0
S12	F	7	21,5	250	10,7

4.4. ВАЛИДАЦИЈА МЕТОДЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ ПРЕГАБАЛИНА ИЗ ОСУШЕНИХ КАПИ КРВИ И ОСУШЕНИХ КАПИ ПЛАЗМЕ

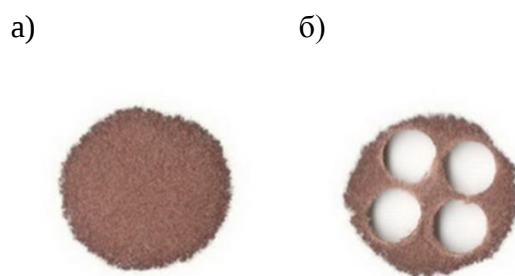
Осушене капи матрикса, а пре свега осушене капи крви, представљају актуелни тренд у биоаналитици. Број публикација на ову тему константно расте, почевши од неонаталног скрининга [243, 244], преко фармакокинетичких и фармакодинамских студија [245–248] и других области модерне биоаналитике и молекуларне биологије. Што се тиче фармакокинетичких студија, главно питање које се поставља јесте да ли DBS могу да замене плазму као стандардни матрикс [249]. Из тог разлога, пожељно је развијати методе погодне за одређивање концентрације лека и у крви и у плазми, јер доприносе процени односа концентрација између ова два матрикса. Ово је свакако први корак у замени узорка плазме са DBS. До тада, користиће се плазма, било у облику течних узорка или DPS, с обзиром да се већина фармакокинетичких података односи на плазму. У овом делу докторске дисертације, приказан је први покушај да се корелишу нивои прегабалина у DBS и DPS, а на основу две валидиране методе у одговарајућем опсегу концентрација.

Осетљивост својствена тандем масеној спектрометрији омогућила је адекватну анализу прегабалина коришћењем само једног диска DBS и DPS (промера 4 mm), што одговара запремини од око 5,6 μL крви и око 3,3 μL плазме, јер су на тај начин достигнути одговарајући лимити квантификације од 0,200 $\mu\text{g/mL}$ за крв и 0,400 $\mu\text{g/mL}$ за плазму.

За израчунавање запремине узорка која је узета за анализу коришћењем једног диска DBS примењена је методологија обраде слике (енг. *Image Processing Tool*). Софтвер MATLAB® 7.10.0. коришћен је за креирање одговарајућег алгорита којим је израчуната површина осушене капи крви (слика 43а), а затим и површина сваког извађеног диска (слика 43б). Запремина узорка израчуната је према једначини:

$$V_{\text{диска}} = \frac{A_{\text{диска}}}{A_{\text{DBS}}} V_{\text{DBS}} \quad (9)$$

где је где је V_{DBS} запремина нанете крви, A_{DBS} површина осушене капи крви, а $A_{\text{диска}}$ је површина извађеног диска. Како је израчуната површина осушене капи крви износила $1,1160 \text{ cm}^2$, средња вредност израчунате површине четири извађена диска $0,1259 \text{ cm}^2$ и запремина нанете крви $50 \text{ }\mu\text{L}$, запремина крви екстрахована једним диском износила је приближно $5,6 \text{ }\mu\text{L}$.



Слика 43. а) DBS и б) DBS након вађења дискова некомерцијалним бушачем

Figure 43. а) DBS and б) DBS after punching discs using non-commercial puncher

Запремина узорка узета за анализу коришћењем једног диска DPS израчуната је према једначини (4). Како је промер некомерцијалног бушача био 4 mm , дијаметар осушене капи плазме 14 mm и запремина нанете плазме $40 \text{ }\mu\text{L}$, запремина плазме екстрахована једним диском износила је приближно $3,3 \text{ }\mu\text{L}$.

Сигнал је додатно побољшан реакцијом дериватизације коришћењем сета *n*-пропилхлороформат/*n*-пропанол. Дериватизацијом је унапређено хроматографско понашање на C8 колони. Додатна предност овакве припреме узорака засноване на течно-течној екстракцији, била је добијање веома чистих екстраката, чиме се, између осталог, продужава „живот“ коришћене стационарне фазе. Генерално, недостатак дуже припреме узорака превазиђен је значајним предностима добијеним током анализе.

Дериватизовани прегабалин и интерни стандард детектовани су у позитивном ESI режиму рада, док је квантитативна анализа изведена праћењем две SRM транзиције по аналиту. За прегабалин, молекулски јон m/z 288,00 фрагментисао се до продукт јона m/z 142,06 и 228,04. Молекулски јон интерног стандарда, m/z 272,03 након фрагментације дао је продукт јоне m/z 127,01 и

212,00. Оптимизовани хроматографски услови обезбедили су добијање оштрих, симетричних Гаусових пикова како за аналит, тако и за интерни стандард. Ретенциона времена износила су 1,17 минута за дериватизовани интерни стандард, односно 1,30 минута за дериватизовани прегабалин.

4.4.1. РЕЗУЛТАТИ ВАЛИДАЦИЈЕ

4.4.1.1. Селективност

Селективност је тестирана је према поступку описаном у поглављу 3.11.8.1, са пет различитих узорака крви и плазме. Утврђено је да на ретенционим временима аналита нема интерференција пореклом од ендогених компоненти, нити од потенцијално истовремено примењених лекова као што су валпроинска киселина, вигабатрин, габапентин, фенобарбитон, ламотригин, топирамат, леветирацетам, карбамазепин, парацетамол и амоксицилин. Хроматограм „празног“ узорка DPS приказан је на слици 44а.

4.4.1.2. Калибрациона крива

Четири аналитичке секвенце су изведене за сваки матрикс, свака са калибрационом кривом од седам стандарда. Избор тежинског фактора изведен је на начин како је описано у поглављу 4.3.1.2, а резултати су приказани у табели 26. Најмању суму процентуалне релативне грешке имао је тежински фактор $1/x^2$. Калибрациони стандарди испунили су унапред дефинисане критеријуме ($\pm 15\%$ у односу на номиналну вредност, изузев за LLOQ где је дозвољено одступање $\pm 20\%$), док је линеарност потврђена у опсегу од 0,200 $\mu\text{g/mL}$ до 20,0 $\mu\text{g/mL}$ за DBS и од 0,400 $\mu\text{g/mL}$ до 40,0 $\mu\text{g/mL}$ за DPS уз $R^2 > 0,990$ (табела 27). Хроматограм најнижег калибрационог стандарда за DBS приказан је на слици 44б.

Табела 26. Избор тежинског фактора на основу најмање суме процентуалне грешке**Table 26.** Selection of weighting factor based on the least sum of percentage error

				Аналитичка секвенца			
				1	2	3	4
DBS	Тежински фактор	1/x	ΣRE (%)	60,32	64,78	88,98	110,23
		1/x ²		60,82	64,39	58,24	70,15
		1/y		59,47	66,05	90,90	116,76
		1/y ²		62,36	73,85	58,51	77,88
		непондерисано		212,70	368,33	82,37	162,83
DPS	Тежински фактор	1/x	ΣRE (%)	61,19	61,67	64,63	54,08
		1/x ²		47,16	56,85	60,75	43,88
		1/y		62,72	65,79	64,74	60,12
		1/y ²		45,27	56,85	60,90	44,24
		непондерисано		345,94	197,03	206,56	198,26

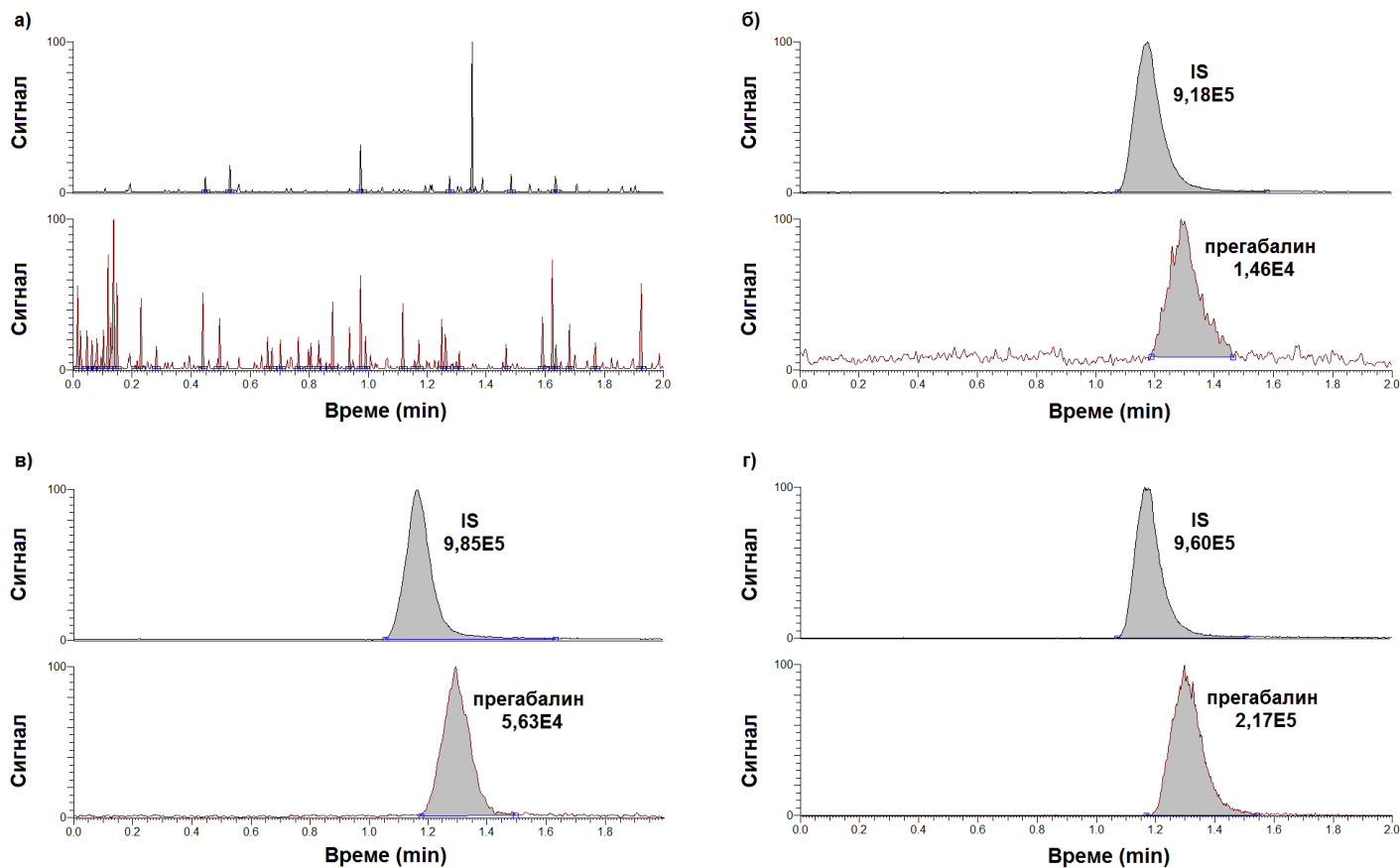
Табела 27. Статистички параметри за једначине калибрационе криве за одређивање прегабалина из DBS и DPS

(публиковано у J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

Table 27. Statistical parameters for calibration curve equations for the determination of pregabalin in DBS and DPS

(published in J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

		Аналитичка секвенца	Регресиона једначина	R ²
DBS	1		y = 0,00292 + 0,108x	0,990
	2		y = 0,00194 + 0,142x	0,994
	3		y = 0,00225 + 0,136x	0,990
	4		y = 0,00280 + 0,248x	0,990
DPS	1		y = 0,0100 + 0,0884x	0,991
	2		y = 0,0103 + 0,0882x	0,992
	3		y = 0,00996 + 0,0882x	0,990
	4		y = 0,0150 + 0,0731x	0,993



Слика 44. SRM хроматограм прегабалина и интерног стандарда за: а) *blank* DPS, б) LLOQ DBS, в) DPS узорак пацијента и г) DBS узорак пацијента (публиковано у J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

Figure 44. Representative SRM chromatograms of pregabalin and internal standard obtained from: a) blank DPS, б) LLOQ DBS, в) patient DPS and г) patient DBS sample (published in J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

4.4.1.3. Тачност и прецизност

Резултати за тачност (изражену као % одступања, *Bias*) и прецизност (RSD), процењени унутар аналитичке секвенце, као и између секвенци изведених током четири дана приказани су у табели 28. Критеријуми за прихватање резултата дефинисани су на следећи начин: за тачност, средња вредност треба да буде $\pm 15\%$ у односу на номиналну вредност за сваки ниво осим за MV_L где је дозвољено одступање $\pm 20\%$, а за прецизност RSD износи 15% односно 20% за MV_L ниво. Сви резултати били су у опсегу дозвољених одступања. Анализом резултата на свим MV нивоима, није примећена појава тренда одступања ни ка горњем ни ка доњем контролном лимиту.

4.4.1.4. Појава сигнала анализата заосталог из претходно анализираних узорка

Ињектовањем чистог растварача након калибрационог стандарда највише концентрације, показано је одсуство сигнала присутног из претходног ињектовања, с обзиром да није детектован ни сигнал анализата, ни сигнал интерног стандарда.

Табела 28. Тачност и прецизност унутар аналитичке секвенце и између аналитичких секвенци (публиковано у J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

Table 28. Within-run and between-run accuracy and precision results
(published in J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

MV узорак (µg/mL)	Тачност унутар аналитичке секвенце^a (% Bias)	Тачност између аналитичких секвенци^b (% Bias)	Прецизност унутар аналитичке секвенце^b (% RSD)	Прецизност између аналитичких секвенци^b (% RSD)
MV_{LB} (0,200)	-2,41	2,43	8,8	9,5
MV_{1B} (0,600)	9,66	2,11	8,3	9,3
MV_{2B} (3,00)	11,1	3,13	13	11
MV_{3B} (15,0)	8,34	1,43	7,7	8,7
MV_{LP} (0,400)	-0,104	4,17	12	9,7
MV_{1P} (1,20)	-8,96	0,425	5,5	8,1
MV_{2P} (6,00)	-3,92	0,214	12	9,5
MV_{3P} (30,0)	-6,46	2,04	7,3	9,0

^a (n = 5), рачунато као $100 \times (\text{средња израчуната концентрација})/(\text{номинална концентрација})$

^b вредности добијене за све четири аналитичке секвенце (n = 20)

^b (n = 5)

4.4.1.5. Принос екстракције

У табели 29 приказане су средње вредности за принос екстракције добијене према поступку описаном у поглављу 3.11.8.5. За сва три испитивана нивоа, добијени су слични резултати.

4.4.1.6. Матрикс ефекат

Матрикс ефекат је израчунат према поступку описаном у поглављу 3.11.8.6. из односа површина средњих вредности МЕ и SOL узрака према једначини (6). Резултати су приказани у табели 29. Може се закључити да ендogene компоненте крви и плазме нису интерферирале приликом анализе прегабалина. Овај резултат може се приписати веома малој запремини крви односно плазме употребљене за анализу и чистим екстрактима који се добијају течно-течном екстракцијом.

Табела 29. Резултати за принос екстракције и матрикс ефекат
(публиковано у J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

Table 29. Extraction recovery and matrix effect results
(published in J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

		Концентрација ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery* (%)	Матрикс ефекат* (%)
DBS	Прегабалин	0,600	98,4	103
		3,00	102	92,2
		15,0	99,7	96,1
	Интерни стандард	2,00	99,1	98,4
DPS	Прегабалин	1,20	97,4	107
		6,00	92,5	107
		30,0	105	100
	Интерни стандард	2,00	104	92,7

* средња вредност, $n = 3$

4.4.1.7. Стабилност

У склопу валидације методе, испитана је стабилност прегабалина, и то краткорочна, дугорочна, стабилност основног раствора и радног раствора, као и стабилност деривата у аутосемплеру, на начин како је описано у поглављу 3.11.8.7. и коришћењем једначине (7).

Резултати свих тестова испунили су критеријуме прописане међународним смерницама [2, 3], с обзиром да није примећено одступање веће од 15%. Испитивањем краткорочне стабилности на собној температури, показано је да је прегабалин стабилан, имајући у виду варирање у односу на свеже узорке од -0,32% за ниво S_{LB} и 0,95% за ниво S_{HB} , односно 1,54% за ниво S_{LP} и -2,51% за ниво S_{HP} .

До истог закључка се дошло анализом резултата добијених испитивањем дугорочне стабилности, с обзиром на варирање од -4,70% за ниво S_{LB} и -1,10% за ниво S_{HB} , односно -1,54% за ниво S_{LP} и 3,51% за ниво S_{HP} .

Основни раствор и радни раствор прегабалина такође су се показали стабилним током испитиваног периода, јер је примећено варирање од 4,05% за стабилност основног раствора, односно -1,26% за стабилност радног раствора.

Према резултатима добијеним тестирањем стабилности деривата у аутосемплеру утврђено је да је она била у границама дозвољених одступања, јер није прелазила -7,36% за DBS односно 7,05% за DPS на свим испитиваним нивоима.

Сви резултати добијени током испитивања стабилности прегабалина били су донекле очекивани, с обзиром на његову једноставну хемијску структуру и одсуство група подложних деградацији или оксидацији.

4.4.1.8. Реанализа узорака

Свих 12 узорака пацијената поново је анализирано и резултати поновљене анализе су упоређени са иницијално добијеним резултатима, коришћењем једначине (8). Максимална разлика износила је 15,5% за DBS, односно -15,4% DPS, што је у границама прописаних дозвољених одступања (дозвољено одступање од $\pm 20\%$ треба да има најмање 67% узорка).

4.4.1.9. Тест разблажења

Тест разблажења изводи се како би се омогућила реанализа узорака чија је концентрација иницијално процењена као „изнад калибрационе криве“. За разлику од класичне процедуре, када се као матрикс користе течна крв и плазма, примена осушених капи матрикса подразумева неконвенционално испитивање овог параметра. Као што је описано у поглављу 3.11.8.9, тестирање је изведено припремањем пет QC узорка високе концентрације за сваки матрикс који су тестирани за номиналне концентрације 10 $\mu\text{g/mL}$ (DBS) и 20 $\mu\text{g/mL}$ (DPS). Одступање од теоријске концентрације, као и коефицијент варијације треба да буду мањи од 15%. Добијени резултати били су у складу са дефинисаним критеријумима: 96,5% за тачност и 10% RSD за осушене капи крви, односно 89,7% за тачност и 3,9% RSD за осушене капи плазме.

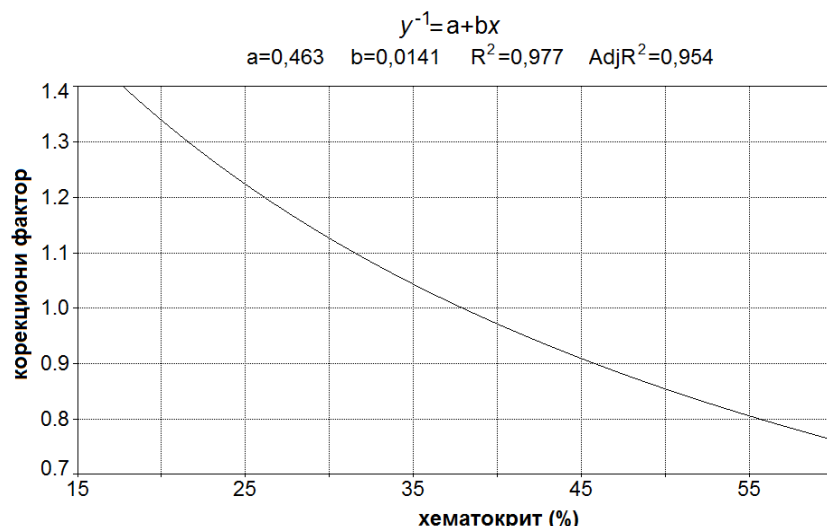
4.4.1.10. Хомогеност осушених капи

На основу изведених експеримената, описаних у поглављу 3.11.8.10, показало се да су осушене капи хомогене, с обзиром да је највиша RSD вредност износила 9,0% за крв, односно 4,5% за плазму, а што је мање од дозвољеног варирања ($\leq 15\%$).

4.4.1.11. Примена методе за анализу узорака сакупљених од пацијената

Валидирана метода примењена је за анализу DBS и DPS узорака 12 пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду. Учесници испитивања била су деца и омладина оба пола на монотерапији прегабалином или на комбинованој терапији. Испитаници су били пацијенти оболели од епилепсије, различите животне доби, телесне масе и различитог неуролошког, когнитивног, психијатријског и соматског статуса. Сви пацијенти били су на терапији комерцијално доступним капсулама прегабалина, са или без комедикације. Узорци крви узети су сат времена након последње дозе, што одговара времену када се постиже максимална концентрација прегабалина ($C_{\max}$). Ниво лека одређен је у оба матрикса, с тим што су иницијално добијене вредности за DBS кориговане, због ефекта хематокрита.

Најпре су, према поступку описаном у поглављу 3.11.7, припремљени узорци крви различитих вредности хематокрита, од 20% до 60%. Након што су ови узорци оптерећени раствором прегабалина, хематокрит је поново измерен коришћењем хематолошког анализатора, а затим су формиране осушене капи крви. За сваку вредност хематокрита, анализирано је по пет узорака и израчунато је одступање концентрације прегабалина од номиналне вредности 5 $\mu\text{g/mL}$. Однос између добијене и теоријске концентрације коришћен је за израчунавање тачности (*Recovery*), а затим и корекционог фактора, израженог као $1/\text{Recovery}$. Како би се утврдила корелација између хематокрита и корекционог фактора, генерисане су једноставне математичке једначине коришћењем софтвера *Table-Curve 2D v5,01,02*. Једначина која је најбоље успела да опише ову корелацију, уз вредност коефицијента детерминације $R^2 = 0,977$ била је облика $y^{-1} = a + bx$ и графички је приказана на слици 45.



Слика 45. Графички приказ везе између хематокрита и корекционог фактора коришћеног за корекцију иницијално добијених концентрација прегабалина у DBS

Figure 45. Relationship between % hematocrit and correction factor used to adjust initially obtained DBS pregabalin levels

Након тога, било је могуће израчунати корекциони фактор за сваку појединачну вредност хематокрита и искористити га за множење првобитно добијених DBS концентрација. Иако након корекције иницијално добијене вредности нису значајно промењене (у свим узорцима одступања су била унутар граница прихватљивости од $\pm 15\%$), предложени поступак нуди поуздано решење за превазилажење ефекта хематокрита, као главног проблема током анализе DBS.

Подаци за ниво прегабалина у DPS, као и кориговане вредности за DBS, заједно са релевантним демографским подацима о сваком пацијенту, приказани су у табели 30.

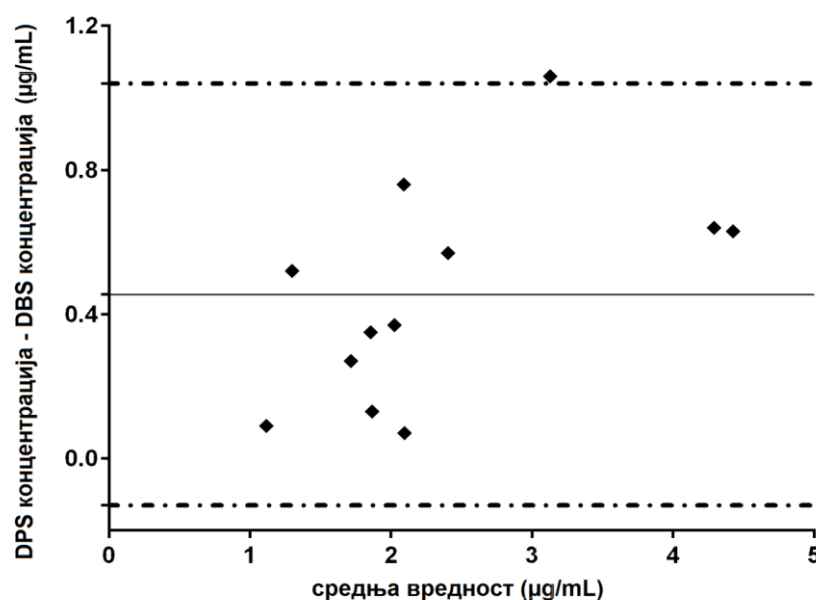
Табела 30. Демографски подаци и концентрације прегабалина добијене за 12 пацијената један сат након последње дозе (публиковано у J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

Table 30. Demographic data and pregabalin concentration values obtained from 12 patients one hour after last dosing (published in J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

Шифра пацијента	Пол	Узраст (године)	Телесна маса (kg)	Доза (mg)	Хематокрит (%)	DBS концентрација* (µg/mL)	DPS концентрација (µg/mL)	DBS:DPS однос
S01	M	8	25	50	35	2,60	3,66	0,71
S02	F	16	43	75	37	1,07	1,16	0,93
S03	F	19	42	75	39	1,71	2,47	0,69
S04	M	15	78	150	47	3,97	4,61	0,86
S05	F	24	64	75	35	1,68	2,03	0,83
S06	F	20	60	75	35	2,12	2,69	0,79
S07	M	30	88	75	48	1,04	1,56	0,67
S08	M	14	53	75	45	2,06	2,13	0,97
S09	M	18	72	75	45	1,58	1,85	0,85
S10	F	18	40	150	40	1,84	2,21	0,83
S11	F	16	50	50	39	1,80	1,93	0,93
S12	F	23	61	150	40	4,11	4,74	0,87

* концентрације добијене након корекције према индивидуалним вредностима хематокрита

Репрезентативни хроматограми добијени анализом DPS и DBS узорака пацијената приказани су на слици 44в и 44г. Осим тога, однос концентрације прегабалина између крви и плазме кретао се у опсегу од 0,67 до 0,97, уз средњу вредност од 0,83, што указује на то да се прегабалин делимично дистрибуира у еритроците. Овај резултат у складу је са подацима који су у литератури пронађени за вигабатрин, антиепилептик сличне хемијске структуре [250]. Поређење резултата добијених два метода извршено је коришћењем Бланд-Алтман теста. Са графика приказаног на слици 46, може се закључити да су методе компарабилне, с обзиром да су разлике између концентрација добијених анализом DBS и DPS за скоро све пацијенте (осим једног) биле у интервалу поузданости од 95%.



Слика 46. Бланд-Алтман график за поређење концентрација прегабалина у узорцима DBS и DPS за свих 12 пацијената. Пуном линијом представљена је средња разлика концентрација између DPS и DBS (0,455 µg/mL; SD = 0,298 µg/mL), а испрекиданим линијама представљен је интервал поузданости 95% (доњи лимит -0,130 µg/mL, горњи лимит 1,04 µg/mL) (публиковано у J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

Figure 46. Bland-Altman plot comparing pregabalin concentrations in DBS and DPS specimens obtained from 12 patients. Solid line represents mean concentration difference (0.455, SD = 0.298 µg/mL) between DPS and DBS; dashed lines represent 95% limits of agreement (lower = -0.130 µg/mL, upper = 1.04 µg/mL) (published in J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84)

5. ЗАКЉУЧАК

1. Примена различитих комбинација *n*-алкилхлороформата и *n*-алкохола за дериватизацију вигабатрина, прегабалина и габапентина указала је на велики значај дужине *n*-алкил низа на LC–ESI–MS/MS анализу одабраних антиепилептика. За сваки антиепилептик синтетисано је по 16 деривата (укупно 48) који су упоређени у погледу ретенционог времена, измереног сигнала, лимита детекције, као и приноса споредне реакције. За сва три дериватизована анализита, коришћењем реагенаса за дериватизацију дужих *n*-алкил низова, ретенционо време се продужавало, а сигнал појачаво због ефикасније електроспреј јонизације. Вредност лимита детекције се последично константно смањивала до тренутка када је са даљим продужењем алкил низа, услед превелике липофилности деривата, дошло до ширења пикова, што се одразило на смањење осетљивости. Утицај приноса споредне реакције, иако углавном мањи од 10%, могао се превазићи једино коришћењем хлороформата и алкохола истог *n*-алкил низа, јер тада производи настали главном и споредном реакцијом дериватизације имају идентичну хемијску структуру. За наставак истраживања, као реагенс за дериватизацију одабрана је комбинација *n*-пропилхлороформат/*n*-пропанол због тога што омогућава добијање оштрог пика и малу вредност лимита детекције тј. постизање најбоље осетљивости уз прихватљиво време трајања анализе.
2. За синтетисане деривате PP, PrPr и ProPro извршено је систематично унапређење LC–ESI–MS/MS одговора, подешавањем параметара масеног спектрометра и параметара методе течне хроматографије. Параметри, као што су време скенирања и ширина скенирања, као и геометрија јонског извора оптимизовани су применом *one-factor-at-a-time* приступа. Кроз скрининг експерименте, фракционим факторским експерименталним дизајном 2^{5-1} најпре су идентификовани параметри јонског извора са значајним утицајем на одговор система. Применом Бокс-Бенкен експерименталног дизајна оптимизовани су параметри са значајним утицајем тј. температура трансфер капиларе, притисак носећег гаса и притисак помоћног гаса. У наредној фази, такође применом Бокс-Бенкен експерименталног дизајна, оптимизовани су и

параметри методе течне хроматографије (удео органског растварача у мобилној фази, удео мравље киселине у воденој фази и брзина протока мобилне фазе). Оптимални услови за параметре јонског извора дефинисани су методом преклапања графика контура, а за параметре методе течне хроматографије применом Дерингерове функције пожељних одговора.

3. У складу са дефинисаним циљевима, потврђена је применљивост предложених LC–MS/MS метода за анализу садржаја цвтерјонских антиепилептика. Испитивањем селективности, линеарности, тачности, прецизности и матрикс ефекта парцијално је валидирана метода за одређивање вигабатрина, прегабалина и габапентина из течних узорака плазме. Одабрани опсег методе погодан је за праћење нивоа одабраних лекова током терапије.

Испитивањем селективности, линеарности, тачности, прецизности, појаве сигнала анализата из претходног ињектовања, приноса екстракције, матрикс ефекта, краткорочне стабилности, дугорочне стабилности, као и стабилности у аутосемплеру, стабилности основног и радног раствора, реанализе узорака и теста разблажења, валидирана је метода за одређивање вигабатрина у осушеним капима плазме. Метода је примењена за анализу узорака добијених од пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду, а који су били на терапији комерцијално доступним фармацеутским облицима вигабатрина. У свим анализираним узорцима, концентрација вигабатрина добијена два сата након последње дозе (C_{max}) била је у складу са литературним подацима, осим у случају S02 где је примећено непоштовање комплијансе.

Испитивањем селективности, линеарности, тачности, прецизности, појаве сигнала анализата из претходног ињектовања, приноса екстракције, матрикс ефекта, краткорочне стабилности, дугорочне стабилности, као и стабилности у аутосемплеру, стабилности основног и радног раствора, реанализе узорака, теста разблажења и хомогености осушених капи крви и плазме, валидиране су методе за одређивање прегабалина у осушеним капима крви и плазме. Методе су примењене за анализу узорака добијених од пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду, а који су били на

терапији комерцијално доступним фармацеутским облицима прегабалина. Предложен је начин за корекцију ефекта хематокрита приликом анализе осушених капи крви. Применом предложене математичке једначине извршена је корекција иницијално добијених вредности концентрације прегабалина, а на основу индивидуалне вредности хематокрита пацијента. Упореджени су нивои лека у оба матрикса при чему је уочена парцијална дистрибуција прегабалина у еритроците. Могућност корелације нивоа лека присутног у крви и плазми први је корак у замени течних узорака биолошког материјала осушеним капима крви.

6. ЛИТЕРАТУРА

- [1] M. Pawula, G. Hawthorne, G.T. Smith, H.M. Hill, Best practice in biological sample collection, processing, and storage for LC–MS in bioanalysis of drugs, in: W. Li, J. Zhang, F.L.S. Tse (Eds.), Handbook of LC–MS bioanalysis: best practices, experimental protocols, and regulations, first ed., John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2013, pp. 139–164.
- [2] Guidance for industry: bioanalytical method validation FDA (draft guidance)
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf> Accessed 16 December 2014.
- [3] Guideline on validation of bioanalytical methods EMA
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf Accessed 16 December 2014.
- [4] J. Gonzales, M.S. Willis, Robert Guthrie, MD, PhD, Clinical chemistry/Microbiology, LabMedicine 40 (2009) 748–749.
- [5] J. Déglon, A. Thomas, P. Mangin, C. Staub, Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: concepts and biomedical applications, Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 2485–2498.
- [6] GE healthcare life sciences, Sample collection cards and kits
http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences/products/AlternativeProductStructure_21465 Accessed 12 January 2015.
- [7] P.L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala, Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods, Biomed. Chromatogr. 25 (2011) 199–217.
- [8] R. Whelpton, Pharmaceutical Analysis/Sample Preparation, in: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (Eds.), Encyclopedia of analytical science, second ed., Elsevier Ltd., London, UK, 2005, pp. 107–116.

- [9] B.L.M. van Baar, T. Verhaeghe, O. Heudi, M. Rohde, S. Wood, J. Wieling, R. de Vries, S. White, Z. Cobb, P. Timmerman, IS addition in bioanalysis of DBS: results from the EBF DBS-microsampling consortium, *Bioanalysis* 5 (2013) 2137–2145.
- [10] R.J.W. Meesters, G.P. Hooff, State-of-the-art dried blood spot analysis: an overview of recent advances and future trends, *Bioanalysis* 5 (2013) 2187–2208.
- [11] P.M. Edelbroek, J. van der Heijden, L.M.L. Stolk, Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls, *Ther. Drug Monit.* 31 (2009) 327–336.
- [12] C.L. Bowen, M.D. Hemberger, J.R. Kehler, C.A. Evans, Utility of dried blood spot sampling and storage for increased stability of photosensitive compounds, *Bioanalysis* 2 (2010) 1823–1828.
- [13] A. D’Avolio, M. Simiele, M. Siccardi, L. Baietto, M. Sciandra, S. Bonora, G. di Perri, HPLC–MS method for the quantification of nine anti-HIV drugs from dry plasma spot on glass filter and their long term stability in different conditions, *J. Pharmaceut. Biomed.* 52 (2010) 774–780.
- [14] R. Ter Heine, J.W. Mulder, E.C.M. van Gorp, J.F.P. Wagenaar, J.H. Beijnen, A.D.R. Huitema, Clinical evaluation of the determination of plasma concentrations of darunavir, etravirine, raltegravir and ritonavir in dried blood spot samples, *Bioanalysis* 3 (2011) 1093–1097.
- [15] G. la Marca, E. Giocaliere, F. Villanelli, S. Malvagia, S. Funghini, D. Ombrone, L. Filippi, M. de Gaudio, M. de Martino, L. Galli, Development of an UPLC–MS/MS method for the determination of antibiotic ertapenem on dried blood spots, *J. Pharmaceut. Biomed.* 61 (2012) 108–113.

- [16] R. de Vries, M. Barfield, N. van de Merbel, B. Schmid, C. Siethoff, J. Ortiz, E. Verheij, B. van Baar, Z. Cobb, S. White, P. Timmerman, The effect of hematocrit on bioanalysis of DBS: results from the EBF DBS-microsampling consortium, *Bioanalysis* 5 (2013) 2147–2160.
- [17] A.J. Wilhelm, J.C.G. den Burger, R.M. Vos, A. Chahbouni, A. Sinjewel, Analysis of cyclosporin A in dried blood spots using liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1595–1598.
- [18] F. Li, J. Zulkoski, D. Fast, S. Michael, Perforated dried blood spots: a novel format for accurate microsampling, *Bioanalysis* 3 (2011) 2321–2333.
- [19] R.S. Fisher, C. Acevedo, A. Arzimanoglou, A. Bogacz, J.H. Cross, C.E. Elger, J.J. Engel, L. Forsgren, J.A. French, M. Glynn, D.C. Hesdorffer, B.I. Lee, G.W. Mathern, S.L. Moshé, E. Perucca, I.E. Scheffer, T. Tomson, M. Watanabe, S. Wiebe, ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy, *Epilepsia* 55 (2014) 475–482.
- [20] S.D. Shorvon, The etiologic classification of epilepsy, *Epilepsia* 52 (2011) 1052–1057.
- [21] J.W. Sander, The epidemiology of epilepsy revisited, *Curr. Opin. Neurol.* 16 (2003) 165–170.
- [22] C. Linehan, A.T. Berg, Epidemiologic aspects of epilepsy, in: E. Wyllie (Ed.), *Wyllie's treatment of epilepsy: principles and practice*, fifth ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, 2011, pp. 1–10.
- [23] A. Gaitatzis, K. Carroll, A. Majeed, J.W. Sander, The epidemiology of the comorbidity of epilepsy in the general population, *Epilepsia* 45 (2004) 1613–1622.
- [24] Commission on classification and terminology of the ILAE. A proposed international classification of epileptic seizures, *Epilepsia* 5 (1964) 297–306.

- [25] Commission on classification and terminology of the ILAE. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures, *Epilepsia* 22 (1981) 489–501.
- [26] Commission on classification and terminology of the ILAE. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes, *Epilepsia* 30 (1989) 389–399.
- [27] J.J. Engel, A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and terminology, *Epilepsia* 42 (2001) 796–803.
- [28] J.J. Engel, Report of the ILAE classification core group, *Epilepsia* 47 (2006) 1558–1568.
- [29] J.J. Engel, Classifications of the International League against epilepsy: time for reappraisal, *Epilepsia* 39 (1998) 1014–1017.
- [30] H. Lüders, J. Acharya, C. Baumgartner, S. Benbadis, A. Bleasel, R. Burgess, D.S. Dinner, A. Ebner, N. Foldvary, E. Geller, H. Hamer, H. Holthausen, P. Kotagal, H. Morris, H.J. Meencke, S. Noachtar, F. Rosenow, A. Sakamoto, B.J. Steinhoff, I. Tuxhorn, E. Wyllie, Semiological seizure classification, *Epilepsia* 39 (1998) 1006–1013.
- [31] A.T. Berg, S.F. Berkovic, M.J. Brodie, J. Buchhalter, J.H. Cross, W. van Emde Boas, J. Engel, J. French, T.A. Glauser, G.W. Mathern, S.L. Moshé, D. Nordli, P. Plouin, I.E. Scheffer, Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE commission on classification and terminology, 2005–2009, *Epilepsia* 51 (2010) 676–685.
- [32] F.M.C. Besag, P.N. Patsalos, New developments in the treatment of partial-onset epilepsy, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 8 (2012) 455–464.
- [33] B.A. Lynch, N. Lambeng, K. Nocka, P. Kensel-Hammes, S.M. Bajjalieh, A. Matagne, B. Fuks, The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 9861–9866.

- [34] J. Cormier, C.J. Chu, Safety and efficacy of levetiracetam for the treatment of partial onset seizures in children from one month of age, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 9 (2013) 295–306.
- [35] M.J. Main, J.E. Cryan, J.R.B. Dupere, B. Cox, J.J. Clare, S.A. Burbidge, Modulation of KCNQ_{2/3} potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine, *Mol. Pharmacol.* 58 (2000) 253–262.
- [36] T.V. Wuttke, G. Seeböhm, S. Bail, S. Maljevic, H. Lerche, The new anticonvulsant retigabine favors voltage-dependent opening of the K_v7.2 (KCNQ₂) channel by binding to its activation gate, *Mol. Pharmacol.* 67 (2005) 1009–1017.
- [37] B.J. Steinhoff, Introduction: perampanel – new mode of action and new option for patients with epilepsy, *Epilepsia* 55 Suppl.1 (2014) 1–2.
- [38] M.C. Lu, Anticonvulsants, in: J.M. Beale, J.H. Block (Eds.), *Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry*, twelfth ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, 2011, pp. 491–503.
- [39] H.J. Huppertz, T.J. Feuerstein, A. Schulze-Bonhage, Myoclonus in epilepsy patients with anticonvulsive add-on therapy with pregabalin, *Epilepsia* 42 (2001) 790–792.
- [40] Sabril official FDA information, side effects and uses
<http://www.drugs.com/pro/sabril.html> Accessed 05 February 2014.
- [41] P. Curatolo, S. Jóźwiak, R. Nabbout, on behalf of the participants of the TSC consensus meeting for SEGA and epilepsy management, Management of epilepsy associated with tuberous sclerosis complex (TSC): clinical recommendations, *Eur. J. Paediatr. Neuro.* 16 (2012) 582–586.
- [42] N. Fejerman, R. Cersósimo, R. Caraballo, J. Grippo, S. Corral, R.H. Martino, G. Martino, M. Aldao, P. Caccia, M. Retamero, M.C. Macat, M.A. Di Blasi, J. Adi, Vigabatrin as a first-choice drug in the treatment of West syndrome, *J. Child. Neurol.* 15 (2000) 161–165.

- [43] R.C. Sergott, R.M. Bittman, E.M. Christen, S.M. Sagar, Vigabatrin-induced peripheral visual field defects in patients with refractory partial epilepsy, *Epilepsy Res.* 92 (2010) 170–176.
- [44] P. Parisi, R. Bombardieri, P. Curatolo, Current role of vigabatrin in infantile spasms, *Eur. J. Paediatr. Neuro.* 11 (2007) 331–336.
- [45] L.M. Clayton, W.M. Stern, W.D. Newman, J.W. Sander, J. Acheson, S.M. Sisodiya, Evolution of visual field loss over ten years in individuals taking vigabatrin, *Epilepsy Res.* 105 (2013) 262–271.
- [46] J.M. Wild, C. Chiron, H. Ahn, M. Baulac, J. Bursztyn, E. Gandolfo, I. Goldberg, F.J. Goñi, F. Mercier, J.P. Nordmann, A.B. Safran, U. Schiefer, E. Perucca, Visual field loss in patients with refractory partial epilepsy treated with vigabatrin: final results from an open-label, observational, multicentre study, *CNS Drugs* 23 (2009) 965–982.
- [47] J.M. Rho, R. Sankar, The pharmacologic basis of antiepileptic drug action, *Epilepsia* 40 (1999) 1471–1483.
- [48] M.J. Jung, B. Lippert, B.W. Metcalf, P. Böhlen, P.J. Schechter, γ -vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new selective irreversible inhibitor of GABA-T: effects on brain GABA metabolism in mice, *J. Neurochem.* 29 (1977) 797–802.
- [49] B. Zhang, S.S. McDaniel, N.R. Rensing, M. Wong, Vigabatrin inhibits seizures and mTOR pathway activation in a mouse model of tuberous sclerosis complex, *PLoS One* 8 (2013) e57445.
- [50] E. Rey, G. Pons, G. Olive, Vigabatrin. Clinical pharmacokinetics, *Clin. Pharmacokinet.* 23 (1992) 267–278.
- [51] Lyrica – FDA prescribing information, side effects and uses
<http://www.drugs.com/pro/lyrica.html> Accessed 16 December 2014.

- [52] C.E. Elger, M.J. Brodie, H. Anhut, C.M. Lee, J.A. Barrett, Pregabalin add-on treatment in patients with partial seizures: a novel evaluation of flexible-dose and fixed-dose treatment in a double-blind, placebo-controlled study, *Epilepsia* 46 (2005) 1926–1936.
- [53] J.J. Łuszczki, Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions, *Pharmacol. Rep.* 61 (2009) 197–216.
- [54] C.P. Taylor, T. Angelotti, E. Fauman, Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel $\alpha_2\text{-}\delta$ ($\alpha_2\text{-}\delta$) subunit as a target for antiepileptic drug discovery, *Epilepsy Res.* 73 (2007) 137–150.
- [55] M.J. Brodie, Pregabalin as adjunctive therapy for partial seizures, *Epilepsia* 45 Suppl.6 (2004) 19–27.
- [56] L.D. Errante, O.A.C. Petroff, Acute effects of gabapentin and pregabalin on rat forebrain cellular GABA, glutamate, and glutamine concentrations, *Seizure* 12 (2003) 300–306.
- [57] C.P. Taylor, M.G. Vartanian, Y. Po-Wai, C. Bigge, N. Suman-Chauhan, D.R. Hill, Potent and stereospecific anticonvulsant activity of 3-isobutyl GABA relates to *in vitro* binding at a novel site labeled by tritiated gabapentin, *Epilepsy Res.* 14 (1993) 11–15.
- [58] E. Ben-Menachem, Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice, *Epilepsia* 45 Suppl.6 (2004) 13–18.
- [59] M. Grosshans, T. Lemenager, C. Vollmert, N. Kaemmerer, R. Schreiner, J. Mutschler, X. Wagner, F. Kiefer, D. Hermann, Pregabalin abuse among opiate addicted patients, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69 (2013) 2021–2025.
- [60] Gabapentin – FDA prescribing information, side effects and uses
<http://www.drugs.com/pro/gabapentin.html> Accessed 12 January 2015.

- [61] N.S. Gee, J.P. Brown, V.U.K. Dissanayake, J. Offord, R. Thurlow, G.N. Woodruff, The novel anticonvulsant drug, gabapentin (neurontin), binds to the $\alpha_2\delta$ subunit of a calcium channel, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 5768–5776.
- [62] T.M. Freiman, J. Kukolja, J. Heinemeyer, K. Eckhardt, H. Aranda, A. Rominger, D.J. Dooley, J. Zentner, T.J. Feuerstein, Modulation of K^+ -evoked [3H]-noradrenaline release from rat and human brain slices by gabapentin: involvement of K_{ATP} channels, *N.-S. Arch. Pharmacol.* 363 (2001) 537–42.
- [63] Scripps center for metabolomics and mass spectrometry
http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms_details.php#Basics
Accessed 15 February 2014.
- [64] R.B. van Breemen, E.M. Martinez, Best practice in mass spectrometry for LC–MS, in: W. Li, J. Zhang, F.L.S. Tse (Eds.), *Handbook of LC–MS bioanalysis: best practices, experimental protocols, and regulations*, first ed., John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2013, pp. 205–216.
- [65] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*, third ed., John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, England, 2007.
- [66] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* 246 (1989) 64–71.
- [67] A.P. Bruins, Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure, *Mass Spectrom. Rev.* 10 (1991) 53–77.
- [68] C.G. Herbert, R.A.W. Johnstone, *Mass spectrometry basics*, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 2003.
- [69] P. Kebarle, U.H. Verkerk, On the mechanism of electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS), in: R.B. Cole (Ed.), *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications*, second ed., John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2010, pp. 3–48.

- [70] N.B. Cech, C.G. Enke, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrom. Rev.* 20 (2001) 362–387.
- [71] T.C. Rohner, N. Lion, H.H. Girault, Electrochemical and theoretical aspects of electrospray ionization, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 3056–3068.
- [72] P. Kebarle, L. Tang, From ions in solution to ions in the gas phase – the mechanism of electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 65 (1993) 972A–986A.
- [73] M. Mann, C.K. Meng, J.B. Fenn, Interpreting mass spectra of multiply charged ions, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1702–1708.
- [74] A.P. Bruins, Mechanistic aspects of electrospray ionization, *J. Chromatogr. A*, 794 (1998) 345–357.
- [75] S. Gao, Z.P. Zhang, H.T. Karnes, Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives, *J. Chromatogr. B* 825 (2005) 98–110.
- [76] C. Brunnée, The ideal mass analyzer: fact or fiction?, *Int. J. Mass Spectrom.* 76 (1987) 125–237.
- [77] A.D. McNaught, A. Wilkinson, IUPAC. Compendium of chemical terminology, second ed., (the "Gold Book"), Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1997.
- [78] F. Garofolo, LC–MS instrument calibration, in: C.C. Chan, H. Lam, Y.C. Lee, X.M. Zhang (Eds.), *Analytical method validation and instrument performance verification*, first ed., John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2004, pp. 197–220.
- [79] R.E. March, J.F. Todd, *Quadrupole storage mass spectrometry*, second ed., John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005.
- [80] R. Willoughby, E. Sheehan, S. Mitrovich, *A global view of LC–MS*, second ed., Global View Publishing, Pittsburgh, Pennsylvania, 2002.

- [81] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, Principles of instrumental analysis, fifth ed., Thomson Learning, Boston, Massachusetts, 1998.
- [82] E. de Hoffmann, Tandem mass spectrometry: a primer, J. Mass Spectrom. 31 (1996) 129–137.
- [83] R.K. Boyd, Linked-scan techniques for MS/MS using tandem-in-space instruments, Mass Spectrom. Rev. 13 (1994) 359–410.
- [84] University of Bristol, School of chemistry, Mass spectrometry facility
<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/cid.xhtml> Accessed 17 January 2015.
- [85] R.E. Ardrey, Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction, first ed., J. Wiley and Sons, London, UK, 2003.
- [86] University of Bristol, School of chemistry, Mass spectrometry facility
<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/detectors.xhtml> Accessed 17 January 2015.
- [87] N.D. Danielson, P.A. Gallagher, J.J. Bao, Pharmaceutical and drugs/Chemical reagents and derivatization procedures in drug analysis, in: R.A. Meyers (Ed.), Encyclopedia of analytical chemistry, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, England, 2007, pp. 7042–7075.
- [88] M. Star-Weinstock, B.L. Williamson, S. Dey, S. Pillai, S. Purkayastha, LC–ESI–MS/MS analysis of testosterone at sub-picogram levels using a novel derivatization reagent, Anal. Chem. 84 (2012) 9310–9317.
- [89] V.G. Zaikin, J.M. Halket, Derivatization in mass spectrometry–8. Soft ionization mass spectrometry of small molecules, Eur. J. Mass Spectrom. 12 (2006) 79–115.
- [90] A. Nordström, P. Tarkowski, D. Tarkowska, K. Dolezal, C. Åstot, G. Sandberg, T. Moritz, Derivatization for LC–electrospray ionization–MS: a tool for improving reversed-phase separation and ESI response of bases, ribosides, and intact nucleotides, Anal. Chem. 76 (2004) 2869–2877.

- [91] N.B. Cech, J.R. Krone, C.G. Enke, Predicting electrospray response from chromatographic retention time, *Anal. Chem.* 73 (2001) 208–213.
- [92] N.B. Cech, C.G. Enke, Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2717–2723.
- [93] S. Zhou, K.D. Cook, A mechanistic study of electrospray mass spectrometry: charge gradients within electrospray droplets and their influence on ion response, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 12 (2001) 206–214.
- [94] M. Niwa, Chemical derivatization as a tool for optimizing MS response in sensitive LC–MS/MS bioanalysis and its role in pharmacokinetic studies, *Bioanalysis* 4 (2012) 213–220.
- [95] W.J. Leavens, S.J. Lane, R.M. Carr, A.M. Lockie, I. Waterhouse, Derivatization for liquid chromatography/electrospray mass spectrometry: synthesis of tris(trimethoxyphenyl)phosphonium compounds and their derivatives of amine and carboxylic acids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 433–441.
- [96] X. Chen, D. Zhong, Y. Han, Z. Xie, Determination of carbocysteine in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry employing precolumn derivatization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 192–196.
- [97] R. Peters, J. Hellenbrand, Y. Mengerink, S.J. van der Wal, On-line determination of carboxylic acids, aldehydes and ketones by high–performance liquid chromatography–diode array detection–atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry after derivatization with 2-nitrophenylhydrazine, *J. Chromatogr. A*, 1031 (2004) 35–50.
- [98] C. Yomota, Y. Ohnishi, Determination of biotin following derivatization with 2-nitrophenylhydrazine by high–performance liquid chromatography with on-line UV detection and electrospray–ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1142 (2007) 231–235.

- [99] S. Uran, K.E. Landmark, G. Hjellum, T. Skotland, Quantification of ^{13}C pyruvate and ^{13}C lactate in dog blood by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry after derivatization with 3-nitrophenylhydrazine, *J. Pharmaceut. Biomed.* 44 (2007) 947–954.
- [100] T. Hayama, Y. Sakaguchi, H. Yoshida, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta, Fluorous derivatization combined with liquid chromatography/tandem mass spectrometry: a method for the selective and sensitive determination of sialic acids in biological samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2868–2874.
- [101] T.M. Li, J. Chen, X. Li, X.J. Ding, Y. Wu, L.F. Zhao, S. Chen, X. Lei, M.Q. Dong, Absolute quantification of a steroid hormone that regulates development in *Caenorhabditis elegans*, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9281–9287.
- [102] T. Higashi, T. Ichikawa, S. Inagaki, J.Z. Min, T. Fukushima, T. Toyo’oka, Simple and practical derivatization procedure for enhanced detection of carboxylic acids in liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry, *J. Pharmaceut. Biomed.* 52 (2010) 809–818.
- [103] Y.Q. Huang, J.Q. Liu, H. Gong, J. Yang, Y. Li, Y.Q. Feng, Use of isotope mass probes for metabolic analysis of the jasmonate biosynthetic pathway, *Analyst* 136 (2011) 1515–1522.
- [104] M. Wang, R.H. Han, X. Han, Fatty acidomics: global analysis of lipid species containing a carboxyl group with a charge-remote fragmentation-assisted approach, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9312–9320.
- [105] M.L. Chen, X.M. Fu, J.Q. Liu, T.T. Ye, S.Y. Hou, Y.Q. Huang, B.F. Yuan, Y. Wu, Y.Q. Feng, Highly sensitive and quantitative profiling of acidic phytohormones using derivatization approach coupled with nano-LC–ESI–Q–TOF–MS analysis, *J. Chromatogr. B*, 905 (2012) 67–74.

- [106] M. Shamsipur, M.T. Naseri, M. Babri, Quantification of candidate prostate cancer metabolite biomarkers in urine using dispersive derivatization liquid-liquid microextraction followed by gas and liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Pharmaceut. Biomed.* 81–82 (2013) 65–75.
- [107] J. Qiu, C. Wu, Y. Fang, C. Yang, X. Li, X. Piao, D. Li, Derivatization and liquid chromatography–UV–tandem mass spectrometric analysis of perfluorinated carboxylic acids, *J. Chromatogr. A* 1235 (2012) 132–140.
- [108] M.B. Woudneh, M. Coreen Hamilton, J.P. Benskin, G. Wang, P. McEachern, J.R. Cosgrove, A novel derivatization-based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantitative characterization of naphthenic acid isomer profiles in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1293 (2013) 36–43.
- [109] T. Santa, O.Y. Al-Dirbashi, T. Yoshikado, T. Fukushima, K. Imai, Synthesis of benzofurazan derivatization reagents for short chain carboxylic acids in liquid chromatography/electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC/ESI–MS/MS), *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 443–446.
- [110] B. Mohammadi, M.B. Majnooni, P.M. Khatabi, R. Jalili, G. Bahrami, 9-Fluorenylmethyl chloroformate as a fluorescence-labeling reagent for derivatization of carboxylic acid moiety of sodium valproate using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for binding characterization: a human pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B* 880 (2012) 12–18.
- [111] W. Blum, R. Aichholz, P. Ramstein, J. Kühnöl, W. Froestl, S. Desrayaud, Determination of the GABA(B) receptor agonist CGP 44532 (3-amino-2-hydroxypropylmethylphosphinic acid) in rat plasma after pre-column derivatization by micro–high–performance liquid chromatography combined with negative electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 748 (2000) 349–359.
- [112] I. Bobeldijk, K. Broess, P. Speksnijder, T. van Leerdam, Determination of the herbicide amitrole in water with pre-column derivatization, liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 15–22.

- [113] I. Hanke, H. Singer, J. Hollender, Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2265–2276.
- [114] R. Rebane, K. Herodes, Comparison of three buffer solutions for amino acid derivatization and following analysis by liquid chromatography electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1245 (2012) 134–142.
- [115] Y. Song, Z. Quan, J.L. Evans, E.A. Byrd, Y.M. Liu, Enhancing capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry of biogenic amines by pre-column derivatization with 7-fluoro-4-nitrobenzoxadiazole, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 989–994.
- [116] T.M. Huang, L. Cai, B. Yang, M.X. Zhou, Y.F. Shen, G.L. Duan, Liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry method for the assay of glucosamine sulfate in human plasma: validation and application to a pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 251–256.
- [117] W.C. Yang, H. Mirzaei, X. Liu, F.E. Regnier, Enhancement of amino acid detection and quantification by electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4702–4708.
- [118] C. Ji, W. Li, X.D. Ren, A.F. El-Kattan, R. Kozak, S. Fountain, C. Lepsy, Diethylation labeling combined with UPLC/MS/MS for simultaneous determination of a panel of monoamine neurotransmitters in rat prefrontal cortex microdialysates, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9195–9203.
- [119] M.R. Shortreed, S.M. Lamos, B.L. Frey, M.F. Phillips, M. Patel, P.J. Belshaw, L.M. Smith, Ionizable isotopic labeling reagent for relative quantification of amine metabolites by mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006), 6398–6403.

- [120] J. Lee, B.X. Huang, Z. Yuan, H.Y. Kim, Simultaneous determination of salsolinol enantiomers and dopamine in human plasma and cerebrospinal fluid by chemical derivatization coupled to chiral liquid chromatography/electrospray ionization–tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2007) 9166–9173.
- [121] G. Vanhoenacker, E. Dumont, F. David, A. Baker, P. Sandra, Determination of arylamines and aminopyridines in pharmaceutical products using *in-situ* derivatization and liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3563–3570.
- [122] S. Bomke, B. Seiwert, L. Dudek, S. Effkemann, U. Karst, Determination of biogenic amines in food samples using derivatization followed by liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 247–256.
- [123] R. Liu, Y. Jia, W. Cheng, J. Ling, L. Liu, K. Bi, Q. Li, Determination of polyamines in human urine by precolumn derivatization with benzoyl chloride and high–performance liquid chromatography coupled with Q–time–of–flight mass spectrometry, *Talanta* 83 (2011) 751–756.
- [124] P. Song, O.S. Mabrouk, N.D. Hershey, R.T. Kennedy, *In vivo* neurochemical monitoring using benzoyl chloride derivatization and liquid chromatography–mass spectrometry, *Anal. Chem.* 84 (2012) 412–419.
- [125] S.B. Turnipseed, S.B. Clark, C.M. Karbiwnyk, W.C. Andersen, K.E. Miller, M.R. Madson, Analysis of aminoglycoside residues in bovine milk by liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry after derivatization with phenyl isocyanate, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1487–1493.
- [126] M.L. Salomonsson, U. Bondesson, M. Hedeland, *In vitro* formation of phase I and II metabolites of propranolol and determination of their structures using chemical derivatization and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.* 44 (2009) 742–755.

- [127] N. García-Villar, S. Hernández-Cassou, J. Saurina, Determination of biogenic amines in wines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 6387–6393.
- [128] R. Rebane, K. Herodes, A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: application to the honey analysis, *Anal. Chim. Acta* 672 (2010) 79–84.
- [129] S. Inagaki, Y. Tano, Y. Yamakata, T. Higashi, J.Z. Min, T. Toyo'oka, Highly sensitive and positively charged precolumn derivatization reagent for amines and amino acids in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 1358–1364.
- [130] J.Y. Park, S.W. Myung, I.S. Kim, D.K. Choi, S.J. Kwon, S.H. Yoon, Simultaneous measurement of serotonin, dopamine and their metabolites in mouse brain extracts by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry following derivatization with ethyl chloroformate, *Biol. Pharm. Bull.* 36 (2013) 252–258.
- [131] K. Nakanishi, M. Katagi, K. Zaitse, N. Shima, H. Kamata, A. Miki, H. Kato, K.I. Harada, H. Tsuchihashi, K. Suzuki, Simultaneous enantiomeric determination of MDMA and its phase I and phase II metabolites in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with chiral derivatization, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2427–2435.
- [132] K. Shimbo, T. Oonuki, A. Yahashi, K. Hirayama, H. Miyano, Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1483–1492.

- [133] R. Nirogi, P. Komarneni, V. Kandikere, R. Boggavarapu, G. Bhyrapuneni, V. Benade, S. Gorentla, A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysates by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 913–914 (2013) 41–47.
- [134] C.B. Kreutzberger, Chloroformates and carbonates, in: Kirk–Othmer (Ed.), *Kirk–Othmer encyclopedia of chemical technology*, volume 6, fifth ed., John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007, pp. 290–323.
- [135] C. Almeida, J.O. Fernandes, S.C. Cunha, A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer, *Food Control* 25 (2012) 380–388.
- [136] S.C. Cunha, M.A. Faria, J.O. Fernandes, Gas chromatography–mass spectrometry assessment of amines in port wine and grape juice after fast chloroformate extraction/derivatization, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 8742–8753.
- [137] M.K.R. Mudiam, R. Jain, V.K. Dua, A.K. Singh, V.P. Sharma, R.C. Murthy, Application of ethyl chloroformate derivatization for solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometric determination of bisphenol-A in water and milk samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1695–1701.
- [138] P. Hušek, P. Šimek, E. Tvrzická, Simple and rapid procedure for the determination of individual free fatty acids in serum, *Anal. Chim. Acta* 465 (2002) 433–439.
- [139] J.R. Johnson, D. Karlsson, M. Dalene, G. Skarping, Determination of aromatic amines in aqueous extracts of polyurethane foam using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 678 (2010) 117–123.

- [140] Å. Marand, D. Karlsson, M. Dalene, G. Skarping, Extractable organic compounds in polyurethane foam with special reference to aromatic amines and derivatives thereof, *Anal. Chim. Acta* 510 (2004) 109–119.
- [141] D. Karlsson, J. Dahlin, G. Skarping, M. Dalene, Determination of isocyanates, aminoisocyanates and amines in air formed during the thermal degradation of polyurethane, *J. Environ. Monit.* 4 (2002) 216–222.
- [142] H. Tinnerberg, M. Spanne, M. Dalene, G. Skarping, Determination of complex mixtures of airborne isocyanates and amines: part 2. Toluene diisocyanate and aminoisocyanate and toluenediamine after thermal degradation of a toluene diisocyanate-polyurethane, *Analyst* 121 (1996) 1101–1106.
- [143] N.C. van de Merbel, G. Hendriks, R. Imbos, J. Tuunainen, J. Rouru, H. Nikkanen, Quantitative determination of free and total dopamine in human plasma by LC–MS/MS: the importance of sample preparation, *Bioanalysis* 3 (2011) 1949–1961.
- [144] W.Y. Pyo, C.H. Jo, S.W. Myung, An effective high–performance liquid chromatographic–mass spectrometric assay for catecholamines, as the *N*(*O,S*)-ethoxycarbonyl ethyl esters, in human urine, *Chromatographia* 64 (2006) 731–737.
- [145] F.C.W. Sutherland, A.D. de Jager, K.J. Swart, H.K.L. Hundt, T. Scanes, A.F. Hundt, Determination of linsidomine in human plasma by tandem LC–MS with ESI, *J. Pharmaceut. Biomed.* 22 (2000) 461–467.
- [146] J.A. Byun, S.H. Lee, B.H. Jung, M.H. Choi, M.H. Moon, B.C. Chung, Analysis of polyamines as carbamoyl derivatives in urine and serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 22 (2008) 73–80.
- [147] P. Hušek, Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents, *J. Chromatogr. B* 717 (1998) 57–91.
- [148] S. Kawana, K. Nakagawa, Y. Hasegawa, S. Yamaguchi, Simple and rapid analytical method for detection of amino acids in blood using blood spot on filter paper, fast-GC/MS and isotope dilution technique, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 3113–3118.

- [149] Z. Švagera, D. Hanzlíková, P. Šimek, P. Hušek, Study of disulfide reduction and alkyl chloroformate derivatization of plasma sulfur amino acids using gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2953–2963.
- [150] B. Cavaliere, B. Macchione, M. Monteleone, A. Naccarato, G. Sindona, A. Tagarelli, Sarcosine as a marker in prostate cancer progression: a rapid and simple method for its quantification in human urine by solid-phase microextraction–gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2903–2912.
- [151] H. Kaspar, K. Dettmer, Q. Chan, S. Daniels, S. Nimkar, M.L. Daviglus, J. Stamler, P. Elliott, P.J. Oefner, Urinary amino acid analysis: a comparison of iTRAQ[®]–LC–MS/MS, GC–MS, and amino acid analyzer, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1838–1846.
- [152] A. Leggio, E.L. Belsito, R. De Marco, A. Liguori, C. Siciliano, M. Spinella, Simultaneous extraction and derivatization of amino acids and free fatty acids in meat products, *J. Chromatogr. A* 1241 (2012) 96–102.
- [153] C. Haberhauer-Troyer, G. Álvarez-Llamas, E. Zitting, P. Rodríguez-González, E. Rosenberg, A. Sanz-Medel, Comparison of different chloroformates for the derivatisation of seleno amino acids for gas chromatographic analysis, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 1–10.
- [154] K. Dettmer, A.P. Stevens, S.R. Fagerer, H. Kaspar, P.J. Oefner, Amino acid analysis in physiological samples by GC–MS with propyl chloroformate derivatization and iTRAQ–LC–MS/MS, *Methods Mol. Biol.* 828 (2012) 165–181.
- [155] J. Cimlová, P. Kružberská, Z. Švagera, P. Hušek, P. Šimek, *In situ* derivatization–liquid liquid extraction as a sample preparation strategy for the determination of urinary biomarker prolyl-4-hydroxyproline by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 294–302.

- [156] P. Uutela, R.A. Ketola, P. Piepponen, R. Kostainen, Comparison of different amino acid derivatives and analysis of rat brain microdialysates by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 223–231.
- [157] N.M. Halliday, K.R. Hardie, P. Williams, K. Winzer, D.A. Barrett, Quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometry profiling of activated methyl cycle metabolites involved in LuxS-dependent quorum sensing in *Escherichia coli*, *Anal. Biochem.* 403 (2010) 20–29.
- [158] M. Esterhuizen-Londt, S. Downing, T.G. Downing, Improved sensitivity using liquid chromatography mass spectrometry (LC–MS) for detection of propyl chloroformate derivatised β -*N*-methylamino-L-alanine (BMAA) in cyanobacteria, *Water SA* 37 (2011) 133–138.
- [159] X. Gao, E. Pujos-Guillot, J.F. Martin, P. Galan, C. Juste, W. Jia, J.L. Sebedio, Metabolite analysis of human fecal water by gas chromatography/mass spectrometry with ethyl chloroformate derivatization, *Anal. Biochem.* 393 (2009) 163–175.
- [160] H.F.N. Kvitvang, T. Andreassen, T. Adam, S.G. Villas-Bôas, P. Bruheim, Highly sensitive GC/MS/MS method for quantitation of amino and nonamino organic acids, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2705–2711.
- [161] K.F. Smart, R.B.M. Aggio, J.R. van Houtte, S.G. Villas-Bôas, Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometry, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 1709–1729.
- [162] K.A. Azizan, S.N. Baharum, N.M. Noor, Metabolic profiling of *Lactococcus lactis* under different culture conditions, *Molecules* 17 (2012) 8022–8036.
- [163] Y. Qiu, M. Su, Y. Liu, M. Chen, J. Gu, J. Zhang, W. Jia, Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography–mass spectrometry based metabonomic profiling, *Anal. Chim. Acta* 583 (2007) 277–283.

- [164] X. Tao, Y. Liu, Y. Wang, Y. Qiu, J. Lin, A. Zhao, M. Su, W. Jia, GC–MS with ethyl chloroformate derivatization for comprehensive analysis of metabolites in serum and its application to human uremia, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2881–2889.
- [165] V. Košťál, J. Korbelová, J. Rozsypal, H. Zahradníčková, J. Cimlová, A. Tomčala, P. Šimek, Long-term cold acclimation extends survival time at 0°C and modifies the metabolomic profiles of the larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster*, *PLoS ONE* 6 (2011) e25025.
- [166] V. Košťál, H. Zahradníčková, P. Šimek, Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (2011) 13041–13046.
- [167] J. Wang, Z.H. Huang, D.A. Gage, J.T. Watson, Analysis of amino acids by gas chromatography–flame ionization detection and gas chromatography–mass spectrometry: simultaneous derivatization of functional groups by an aqueous-phase chloroformate-mediated reaction, *J. Chromatogr. A* 663 (1994) 71–78.
- [168] *European Pharmacopoeia*, European directorate for the quality of medicines and healthcare (EDQM & HealthCare), Council of Europe, eight ed., Strasbourg, France, 2014.
- [169] K.D. Haegele, J. Schoun, R.G. Alken, N.D. Huebert, Determination of the *R*(–)- and *S*(+)-enantiomers of γ -vinyl- γ -aminobutyric acid in human body fluids by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 274 (1983) 103–110.
- [170] E. Rey, G. Pons, M.O. Richard, F. Vauzelle, P. D’Athis, C. Chiron, O. Dulac, D. Beaumont, G. Olive, Pharmacokinetics of the individual enantiomers of vigabatrin (γ -vinyl GABA) in epileptic children, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30 (1990) 253–257.
- [171] K.D. Haegele, P.J. Schechter, Kinetics of the enantiomers of vigabatrin after an oral dose of the racemate or the active *S*-enantiomer, *Clin. Pharmacol. Ther.* 40 (1986) 581–586.

- [172] K.M. Matar, M.E. Abdel-Hamid, Quantification of vigabatrin in human plasma by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 28 (2005) 395–406.
- [173] M.K.R. Mudiam, A. Chauhan, R. Jain, R. Ch, G. Fatima, E. Malhotra, R.C. Murthy, Development, validation and comparison of two microextraction techniques for the rapid and sensitive determination of pregabalin in urine and pharmaceutical formulations after ethyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometric analysis, *J. Pharmaceut. Biomed.* 70 (2012) 310–319.
- [174] V.V. Vaidya, S.M. Yetal, S.M.N. Roy, N.A. Gomes, S.S. Joshi, LC–MS–MS determination of pregabalin in human plasma, *Chromatographia* 66 (2007) 925–928.
- [175] U. Mandal, A.K. Sarkar, K.V. Gowda, S. Agarwal, A. Bose, U. Bhaumik, D. Ghosh, T.K. Pal, Determination of pregabalin in human plasma using LC–MS–MS, *Chromatographia* 67 (2008) 237–243.
- [176] G.R. Shah, C. Ghosh, B.T. Thaker, Determination of pregabalin in human plasma by electrospray ionisation tandem mass spectroscopy, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 1 (2010) 354–357.
- [177] G. Uma, M. Manimala, M. Vasudevan, S. Karpagam, Deecarman, LC–MS–MS method for the determination of pregabalin in human plasma, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4 Suppl.3 (2012) 108–112.
- [178] T.M. Karavadi, B.R. Challa, Bioanalytical method development and validation of pregabalin in rat plasma by solid phase extraction with HPLC–MS/MS: application to a pharmacokinetics study, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 37 (2014) 130–144.
- [179] P. Dzygiel, D. Fraier, Simultaneous determination of pregabalin, sildenafil and its active metabolite in rat plasma utilising SPE followed by LC–MS–MS, *Chromatographia* 73 (2011) 1177–1182.

- [180] Y. Zhang, C. Holliman, D. Tang, D. Fast, S. Michael, Development and validation of a direct enantiomeric separation of pregabalin to support isolated perfused rat kidney studies, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 148–153.
- [181] C. Pauly, M. Yegles, S. Schneider, Pregabalin determination in hair by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 676–679.
- [182] S.R. Dahl, K.M. Olsen, D.H. Strand, Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC–MSMS, *J. Chromatogr. B* 885–886 (2012) 37–42.
- [183] R. Nirogi, V. Kandikere, K. Mudigonda, P. Komarneni, R. Aleti, Liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry method for the quantification of pregabalin in human plasma, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3899–3906.
- [184] C. Priez-Barallon, J. Carlier, B. Boyer, M. Benslima, L. Fanton, C. Mazoyer, Y. Gaillard, Quantification of pregabalin using hydrophilic interaction HPLC-high-resolution MS in postmortem human samples: eighteen case reports, *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 143–148.
- [185] F. Kolocouri, Y. Dotsikas, Y.L. Loukas, Dried plasma spots as an alternative sample collection technique for the quantitative LC–MS/MS determination of gabapentin, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1339–1347.
- [186] K. Ikeda, K. Ikawa, S. Yokoshige, S. Yoshikawa, N. Morikawa, Gas chromatography–electron ionization–mass spectrometry quantitation of valproic acid and gabapentin, using dried plasma spots, for therapeutic drug monitoring in in-home medical care, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2014) 1756–1762.

- [187] M.M. Kushnir, J. Crossett, P.I. Brown, F.M. Urry, Analysis of gabapentin in serum and plasma by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry for therapeutic drug monitoring, *J. Anal. Toxicol.* 23 (1999) 1–6.
- [188] C. Gambelunghe, G. Mariucci, M. Tantucci, M.V. Ambrosini, Gas chromatography–tandem mass spectrometry analysis of gabapentin in serum, *Biomed. Chromatogr.* 19 (2005) 63–67.
- [189] A.F. Lehner, J. Stewart, A. Dafalla, K.J. Ely, A.L. Connerly, C.N. Jones, H. Elkholy, K. Thompson, T. Tobin, L. Dirikolu, Gabapentin in horses: validation of an analytical method for gabapentin quantitation, *J. Anal. Toxicol.* 31 (2007) 555–565.
- [190] D.R. Ifa, M. Falci, M.E. Moraes, F.A.F. Bezerra, M.O. Moraes, G. de Nucci, Gabapentin quantification in human plasma by high–performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence study, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 188–194.
- [191] N.V.S. Ramakrishna, K.N. Vishwottam, M. Koteshwara, S. Manoj, M. Santosh, J. Chidambara, B. Sumatha, D.P. Varma, Rapid quantification of gabapentin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Pharmaceut. Biomed.* 40 (2006) 360–368.
- [192] J.H. Park, O.H. Jhee, S.H. Park, J.S. Lee, M.H. Lee, L.M. Shaw, K.H. Kim, J.H. Lee, Y.S. Kim, J.S. Kang, Validated LC–MS/MS method for quantification of gabapentin in human plasma: application to pharmacokinetic and bioequivalence studies in Korean volunteers, *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 829–835.
- [193] T. Wattananat, W. Akarawut, Validated LC–MS–MS method for the determination of gabapentin in human plasma: application to a bioequivalence study, *J. Chromatogr. Sci.* 47 (2009) 868–871.
- [194] Y. Liu, C.E. Uboh, L.R. Soma, X. Li, F. Guan, Y. You, J.A. Rudy, J.W. Chen, Analysis of gabapentin in equine plasma with measurement uncertainty estimation by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 35 (2011) 75–84.

- [195] K.C. Carlsson, J.L.E. Reubsaet, Sample preparation and determination of gabapentin in venous and capillary blood using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Pharmaceut. Biomed.* 34 (2004) 415–423.
- [196] J.M. Juenke, P.I. Brown, K.L. Johnson-Davis, G.A. McMillin, Simultaneous quantification of levetiracetam and gabapentin in plasma by ultra–pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection, *Ther. Drug Monit.* 33 (2011) 209–213.
- [197] K.M. Matar, M.E. Abdel-Hamid, Rapid tandem mass spectrometric method for determination of gabapentin in human plasma, *Chromatographia* 61 (2005) 499–504.
- [198] A. Ojha, R. Rathod, C. Patel, H. Padh, LC–MS determination of gabapentin from human plasma, *Chromatographia* 66 (2007) 853–857.
- [199] Y.J. Hye, W.J. Dong, H.K. Young, H.H. Kim, Y.S. Yoon, K.C. Lee, H.S. Lee, Determination of gabapentin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2127–2132.
- [200] D.C.R. Borrey, K.O. Godderis, V.I.L. Engelrelst, D.R. Bernard, M.R. Langlois, Quantitative determination of vigabatrin and gabapentin in human serum by gas chromatography–mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta* 354 (2005) 147–151.
- [201] A. Chahbouni, A. Sinjewel, J.C.G. den Burger, R.M. Vos, A.J. Wilhelm, A.I. Veldkamp, E.L. Swart, Rapid quantification of gabapentin, pregabalin, and vigabatrin in human serum by ultraperformance liquid chromatography with mass–spectrometric detection, *Ther. Drug. Monit.* 35 (2013) 48–53.
- [202] M. Shibata, S. Hashi, H. Nakanishi, S. Masuda, T. Katsura, I. Yano, Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra–performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 1519–1528.

- [203] R. Oertel, N. Arenz, J. Pietsch, W. Kiroh, Simultaneous determination of three anticonvulsants using hydrophilic interaction LC–MS, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 238–243.
- [204] L.K. Sørensen, J.B. Hasselstrøm, Determination of therapeutic γ -aminobutyric acid analogs in forensic whole blood by hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 177–183.
- [205] F.L. Sauvage, J.M. Gaulier, G. Lachâtre, P. Marquet, A fully automated turbulent–flow liquid chromatography–tandem mass spectrometry technique for monitoring antidepressants in human serum, *Ther. Drug Monit.* 28 (2006) 123–130.
- [206] Y. Dotsikas, C.K. Markopoulou, J.E. Koundourellis, Y.L. Loukas, Validation of a novel LC–MS/MS method for the quantitation of colistin A and B in human plasma, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 37–45.
- [207] <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/21697dd1-51b2-43ac-bc35-e1605e5c2f80.pdf> Accessed 16 December 2012.
- [208] G.A. Zachariadis, E. Rosenberg, Use of modified Doehlert–type experimental design in optimization of a hybrid electrospray ionization ion trap time–of–flight mass spectrometry technique for glutathione determination, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 489–499.
- [209] M. Moberg, J. Bergquist, D. Bylund, A generic stepwise optimization strategy for liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry methods, *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 1334–1345.
- [210] G. Székely, B. Henriques, M. Gil, A. Ramos, C. Alvarez, Design of experiments as a tool for LC–MS/MS method development for the trace analysis of the potentially genotoxic 4-dimethylaminopyridine impurity in glucocorticoids, *J. Pharmaceut. Biomed.* 70 (2012) 251–258.

- [211] Y. Zhou, J.Z. Song, F.F.K. Choi, H.F. Wu, C.F. Qiao, L.S. Ding, S.L. Gesang, H.X. Xu, An experimental design approach using response surface techniques to obtain optimal liquid chromatography and mass spectrometry conditions to determine the alkaloids in *Meconopsi* species, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7013–7023.
- [212] N.D. de Sousa, C.J. Ellett, M. Gilbert, A.D. Wright, Use of chemometrics to optimize the operation of an ion source, *Anal. Chem.* 80 (2008) 873–877.
- [213] N.C. Maragou, E. Rosenberg, N.S. Thomaidis, M.A. Koupparis, Direct determination of the estrogenic compounds 8-prenylnaringenin, zearalenone, α - and β -zearalenol in beer by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 47–57.
- [214] V. Tak, P.K. Kanaujia, D. Pardasani, R. Kumar, R.K. Srivastava, A.K. Gupta, D.K. Dubey, Application of Doehlert design in optimizing the determination of degraded products of nerve agents by ion-pair liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 198–206.
- [215] L. Charles, S. Caloprisco, S. Mohamed, M. Sergent, Chemometric approach to evaluate the parameters affecting electrospray: application of statistical design of experiments for the study of arginine ionization, *Eur. J. Mass Spectrom.* 11 (2005) 361–370.
- [216] M. Moberg, D. Bylund, R. Danielsson, K. Markides, Optimization strategy for liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry methods, *Analyst* 125 (2000) 1970–1976.
- [217] N.C. Maragou, N.S. Thomaidis, M.A. Koupparis, Optimization and comparison of ESI and APCI LC–MS/MS methods: a case study of irgarol 1051, diuron, and their degradation products in environmental samples, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 1826–1838.

- [218] L.A. Dillon, V.N. Stone, L.A. Croasdell, P.R. Fielden, N.J. Goddard, C.L.P. Thomas. Optimisation of secondary electrospray ionisation (SESI) for the trace determination of gas-phase volatile organic compounds, *Analyst* 135 (2010) 306–314.
- [219] T. Gruending, M. Guilhaus, C. Barner-Kowollik, Design of experiment (DoE) as a tool for the optimization of source conditions in SEC–ESI–MS of functional synthetic polymers synthesized via ATRP, *Macromol. Rapid Comm.* 30 (2009) 589–597.
- [220] M.A. Raji, K.A. Schug, Chemometric study of the influence of instrumental parameters on ESI–MS analyte response using full factorial design, *Int. J. Mass Spectrom.* 279 (2009) 100–106.
- [221] O. Pardo, V. Yusà, N. León, A. Pastor, Development of a pressurized liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization–tandem mass spectrometry method for the determination of domoic acid in shellfish, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 287–294.
- [222] G.M. Titato, R.C. Bicudo, F.M. Lanças, Optimization of the ESI and APCI experimental variables for the LC/MS determination of s-triazines, methylcarbamates, organophosphorous, benzimidazoles, carboxamide and phenylurea compounds in orange samples, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1348–1357.
- [223] I. Mazsaroff, W. Yu, B.D. Kelley, J.E. Vath, Quantitative comparison of global carbohydrate structures of glycoproteins using LC–MS and in source fragmentation, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2517–2524.
- [224] L.S. Riter, O. Vitek, K.M. Gooding, B.D. Hodge, R.K.J.. Julian, Statistical design of experiments as a tool in mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 565–579.
- [225] M. Moberg, K.E. Markides, D. Bylund, Multi-parameter investigation of tandem mass spectrometry in a linear ion trap using response surface modeling, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 317–324.

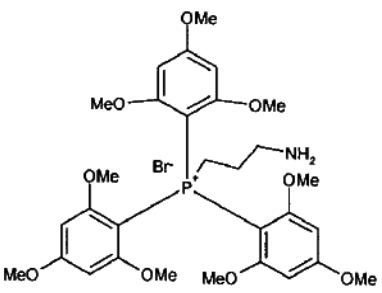
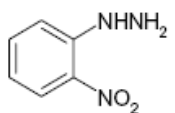
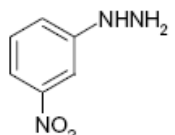
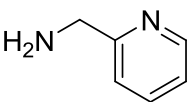
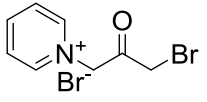
- [226] J. Jiao, A.J. Carella, G.S. Steeno, R.T. Darrington, Optimization of triple quadrupole mass spectrometer for quantitation of trace degradants of pharmaceutical compounds, *Int. J. Mass Spectrom.* 216 (2002) 209–218.
- [227] A.M.F. Laures, J.C. Wolff, C. Eckers, P.J. Borman, M.J. Chatfield, Investigation into the factors affecting accuracy of mass measurements on a time-of-flight mass spectrometer using design of experiment, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 529–535.
- [228] A. Wick, G. Fink, T.A. Ternes, Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV-filters and benzothiazoles in aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2088–2103.
- [229] C. Apostolou, Y. Dotsikas, C. Kousoulos, Y.L. Loukas, Development and validation of an improved high-throughput method for the determination of anastrozole in human plasma by LC–MS/MS and atmospheric pressure chemical ionization, *J. Pharmaceut. Biomed.* 48 (2008) 853–859.
- [230] J. Beyer, F.T. Peters, T. Kraemer, H.H. Maurer, Detection and validated quantification of toxic alkaloids in human blood plasma – comparison of LC–APCI–MS with LC–ESI–MS/MS, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 621–633.
- [231] E. Rosenberg, The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 841–889.
- [232] S. Louw, M. Njoroge, N. Chigorimbo-Murefu, K. Chibale, Comparison of electrospray ionisation, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionisation for the identification of metabolites from labile artemisinin-based anti-malarial drugs using a QTRAP[®] mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 2431–2442.

- [233] L. Li, S. Huhtala, M. Sillanpää, P. Sainio, Liquid chromatography–mass spectrometry for C₆₀ fullerene analysis: optimisation and comparison of three ionisation techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1931–1938.
- [234] A. Garcia-Ac, P.A. Segura, L. Viglino, C. Gagnon, S. Sauvé, Comparison of APPI, APCI and ESI for the LC–MS/MS analysis of bezafibrate, cyclophosphamide, enalapril, methotrexate and orlistat in municipal wastewater, *J. Mass Spectrom.* 46 (2011) 383–390.
- [235] G.W. Lien, C.Y. Chen, G.S. Wang, Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 956–966.
- [236] B. Jančić-Stojanović, A. Malenović, D. Ivanović, T. Rakić, M. Medenica, Chemometrical evaluation of ropinirole and its impurity's chromatographic behavior, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1263–1269.
- [237] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escalera, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 76 (2008) 965–977.
- [238] L. Tang, P. Kebarle, Effect of the conductivity of the electrosprayed solution on the electrospray current. Factors determining analyte sensitivity in electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2709–2715.
- [239] S.K. Chowdhury, B.T. Chait, Method for the electrospray ionization of highly conductive aqueous solutions, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1660–1664.
- [240] E. Calvo, E. Camafeita, B. Fernández-Gutiérrez, J.A. López, Applying selected reaction monitoring to targeted proteomics, *Expert Rev. Proteomics* 8 (2011) 165–173.
- [241] A.M. Almeida, M.M. Castel-Branco, A.C. Falcão, Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods, *J. Chromatogr. B* 774 (2002) 215–222.

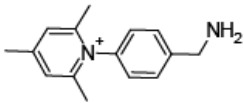
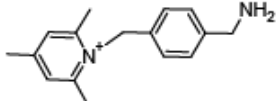
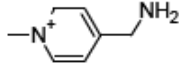
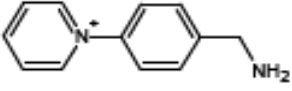
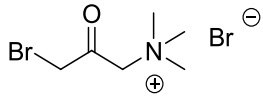
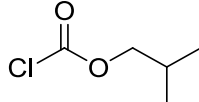
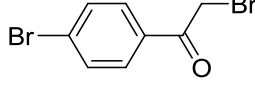
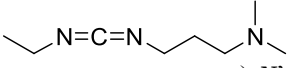
- [242] S.V.C. de Souza, R.G. Junqueira, A procedure to assess linearity by ordinary least squares method, *Anal. Chim. Acta* 552 (2005) 25–35.
- [243] D.H. Chace, Mass spectrometry in newborn and metabolic screening: historical perspective and future directions, *J. Mass Spectrom.* 44 (2009) 163–170.
- [244] J. Hachani, S. Duban-Deweert, G. Pottiez, G. Renom, C. Flahaut, J.M. Périni, MALDI–TOF MS profiling as the first-tier screen for sickle cell disease in neonates: matching throughput to objectives, *Proteom. Clin. Appl.* 5 (2011) 405–414.
- [245] N. Spooner, R. Lad, M. Barfield, Dried blood spots as a sample collection technique for the determination of pharmacokinetics in clinical studies: considerations for the validation of a quantitative bioanalytical method, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1557–1563.
- [246] P. Beaudette, K.P. Bateman, Discovery stage pharmacokinetics using dried blood spots, *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 153–158.
- [247] P.T. Kissinger, Thinking about dried blood spots for pharmacokinetic assays and therapeutic drug monitoring, *Bioanalysis* 3 (2011) 2263–2266.
- [248] P. Patel, H. Mulla, S. Tanna, H. Pandya, Facilitating pharmacokinetic studies in children: a new use of dried blood spots, *Arch. Dis. Child.* 95 (2010) 484–487.
- [249] G. Emmons, M. Rowland, Pharmacokinetic considerations as to when to use dried blood spot sampling, *Bioanalysis* 2 (2010) 1791–1796.
- [250] S.L. Durham, J.F. Hoke, T.M. Chen, Pharmacokinetics and metabolism of vigabatrin following a single oral dose of [¹⁴C]vigabatrin in healthy male volunteers. *Drug Metab. Dispos.* 21 (1993) 480–484.

Прилози

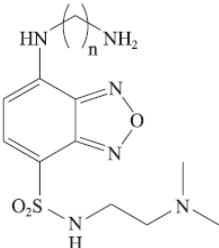
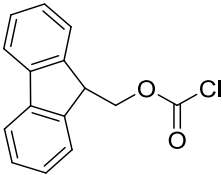
Табела П1. Одабрани реагенси за дериватизацију карбоксилне функционалне групе у течној хроматографији–масеној спектрометрији

Реагенс	Реакција дериватизације	Метода масене спектрометрије	Референца
 трис(триметоксифенил)фосфонијум пропиламин бромид	грађење амида	ESI-qTOF	95
HCl/CH ₃ OH хлороводонична киселина/метанол	грађење естара	APCI-MS/MS	96
 2-нитрофенилхидразин	грађење хидразинкарбоксилних киселина	APCI-ion trap ESI-MS	97, 98
 3-нитрофенилхидразин	грађење хидразинкарбоксилних киселина	ESI-ion trap	99
NH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ C ₈ F ₁₇ хептадекафлуороундециламин (HFUA)	грађење амида	ESI-Qtrap	100
 2-пиколиламин	грађење амида	ESI-MS/MS	101, 102
 ω-бромоацетонилпиридинијум бромид (BPB)	грађење естара	ESI-qTOF	103

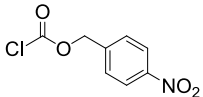
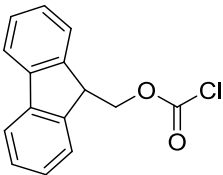
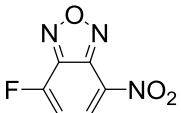
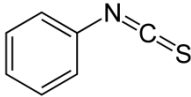
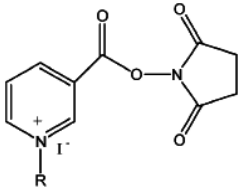
Табела П1. (наставак)

 <i>N</i> -(бензенметиламин)-2,4,6-триметилпиридинијум (BMA-TMP)	грађење амида	ESI-MS ESI-MS/MS	104
 <i>N</i> -[4-(аминометил)бензил]-2,4,6-триметилпиридинијум (AMB-TMP)			
 4-(аминометил)-1-метилпиридин-1-ијум (AMMP)			
 <i>N</i> -[4-(аминометил)фенил]пиридинијум (AMPP)			
 3-бромоактонилтриметиламонијум бромид (BTA)	грађење естара	ESI-qTOF	105
 изобутилхлороформат (i-BuCF)	грађење естара	ESI-MS/MS	106
 <i>p</i> -бромофенацил бромид (BPBr)	грађење естара	ESI-MS/MS	107
 <i>N</i> -(3-диметиламинопропил)- <i>N'</i> -етилкарбодиимид (EDC)	грађење деривата ацил-урее	ESI-MS/MS	108

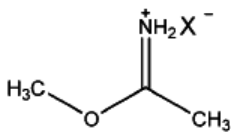
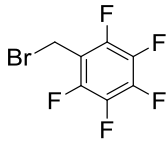
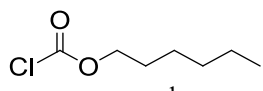
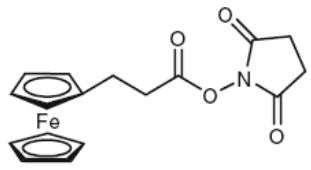
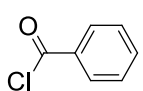
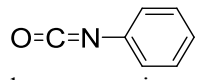
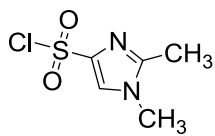
Табела П1. (наставак)

 n=4 DAABD-AB, 4-[2-(<i>N,N</i>-диметиламино)етиламиносулфонил]-7-(2-аминобутиламино)-2,1,3-бензоксадиазол n=5 DAABD-AP, 4-[2-(<i>N,N</i>-диметиламино)етиламиносулфонил]-7-(2-аминопентиламино)-2,1,3-бензоксадиазол	грађење амида	ESI-qTOF	109
 9-флуоренилметилхороформат (FMOC-Cl)	грађење естара	ESI-MS/MS	110

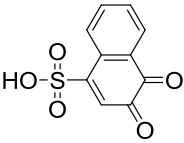
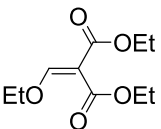
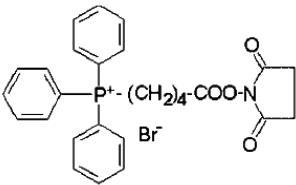
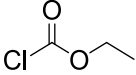
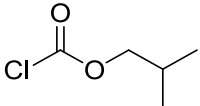
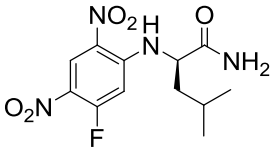
Табела П2. Одабрани реагенси за дериватизацију примарне и секундарне амино групе у течној хроматографији–масеној спектрометрији

Реагенс	Реакција дериватизације	Метода масене спектрометрије	Референца
 4-нитробензилхлороформат	грађење карбамата	ESI-MS/MS	111
 9-флуоренилметил хлороформат (FMOC-Cl)	грађење карбамата	APCI-MS/MS ESI-MS/MS ESI-MS	112–114
 7-флуоро-4-нитробензоксадиазол (NBD-F)	фениловање	ESI-MS/MS	115
 фенилизотиоцијанат	формирање тиоурее	ESI-MS	116
 $R = C_nH_{2n+1}, n=1\sim4$ <i>N</i> -хидроксисукцинимидни естри <i>N</i> -алкилникотинске киселине	<i>N</i> -ациловање	ESI-qTOF	117
CD_3CDO ацеталдехид- d_4	редуктивно аминавање	ESI-MS/MS	118

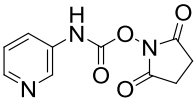
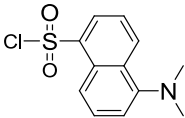
Табела П2. (наставак)

 метилацетимидат	грађење амидина	ESI-TOF	119
 пентафлуоробензил бромид (PFB Br)	алкиловање	ESI-MS/MS	120
 хексилхлороформат	грађење карбамата	ESI-MS	121
 сукцинимидилфероценил пропионат	грађење амида	ESI-ion trap	122
 бензоил хлорид	грађење амида	ESI-qTOF ESI-MS/MS	123, 124
 фенилизоцијанат	грађење урее	ESI-ion trap	125
 1,2-диметилимидазол-4-сулфонил хлорид (DMISC)	грађење сулфонамида	ESI-ion trap ESI-MS/MS	126

Табела П2. (наставак)

 1,2-нафтохинон-4-сулфонат (NQS)	грађење обојеног арил-амина	APCI-MS	127
 диетилетоксиметиленмалонат	грађење енамина	ESI-MS	114, 128
 (5-<i>N</i>-сукцинимидокси-5-оксопентил)трифенилфосфонијум бромид (SPTPP)	грађење амида	ESI-MS/MS	129
 етилхлороформат	грађење карбамата	ESI-MS	130
 изобутилхлороформат (i-BuCF)	грађење карбамата	ESI-MS/MS	106
 <i>N</i>^α-(5-флуоро-2,4-динитрофенил)-D-леуцинамид (D-FDLA)	фениловање	ESI-MS/MS	131

Табела П2. (наставак)

 3-аминопиридил-<i>N</i>- хидроксисукцинимидил карбамат (APDS)	грађење урее	ESI-MS/MS	132
 данзил хлорид (Dns Cl)	грађење сулфонамида	ESI-MS/MS	133

Табела ПЗ. Комерцијално доступни хлороформати

Естар	Формула
метил	ClCOOCH_3
хлорометил	$\text{ClCOOCH}_2\text{Cl}$
етил	$\text{ClCOOC}_2\text{H}_5$
1-хлороетил	ClCOOCHClCH_3
2-хлороетил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$
2,2,2-трихлороетил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CCl}_3$
винил	$\text{ClCOOCH}=\text{CH}_2$
изопропил	$\text{ClCOOCH}(\text{CH}_3)_2$
<i>n</i> -пропил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
3-хлоропропил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$
алил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
металил	$\text{ClCOOCH}_2(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CH}_2$
<i>n</i> -бутил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
<i>sec</i> -бутил	$\text{ClCOOCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$
изобутил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
изоамил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
<i>n</i> -пентил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
циклопентил	$\text{ClCOOC}_5\text{H}_9$
4- <i>tert</i> -бутилциклохексил	$\text{ClCOOC}_6\text{H}_{10}\text{C}(\text{CH}_3)_3$
2-етилхексил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$
2-октил	$\text{ClCOOCH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$
<i>n</i> -децил	$\text{ClCOOCH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$
додецил	$\text{ClCOOCH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$
миристил	$\text{ClCOOCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$
цетил	$\text{ClCOOCH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$
октадецил	$\text{ClCOOCH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$
2-метоксиетил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$
2-феноксиетил	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_5$
фенил	$\text{ClCOOC}_6\text{H}_5$
<i>p</i> -нитрофенил	$\text{ClCOOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$
бензил	$\text{ClCOOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$
<i>p</i> -нитробензил	$\text{ClCOOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$
4-кумилфенил	$\text{ClCOOC}_6\text{H}_4\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5$
9-флуоренилметил	$\text{ClCOOCH}_2\text{C}_{13}\text{H}_9$
1-нафтил	$\text{ClCOOC}_{10}\text{H}_7$
холестерол	$\text{ClCOOC}_{28}\text{H}_{45}$
етилен бис	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_2\text{OOCCL}$
диетилен гликол бис	$\text{ClCOOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OOCCL}$
1,6-хександиол бис	$\text{ClCOO}(\text{CH}_2)_6\text{OOCCL}$
бисфенол А бис	$\text{ClCOOC}_6\text{H}_4\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OOCCL}$

ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Радови објављени у часописима међународног значаја

1. **N. Kostić**, Y. Dotsikas, A. Malenović, M. Medenica, Effects of derivatization reagents consisting of *n*-alkyl chloroformate/*n*-alcohol combinations in LC–ESI–MS/MS analysis of zwitterionic antiepileptic drugs, *Talanta* 116 (2013) 91–99. **M 21**
2. **N. Kostić**, Y. Dotsikas, A. Malenović, B. Jančić Stojanović, T. Rakić, D. Ivanović, M. Medenica, Stepwise optimization approach for improving LC–MS/MS analysis of zwitterionic antiepileptic drugs with implementation of experimental design, *J. Mass. Spectrom.* 48 (2013) 875–884. **M 21**
3. **N. Kostić**, Y. Dotsikas, N. Jović, G. Stevanović, A. Malenović, M. Medenica, Vigabatrin in dried plasma spots: Validation of a novel LC–MS/MS method and application to clinical practice, *J. Chromatogr. B* 962 (2014) 102–108. **M21**
4. **N. Kostić**, Y. Dotsikas, N. Jović, G. Stevanović, A. Malenović, M. Medenica, Quantitation of pregabalin in dried blood spots and dried plasma spots by validated LC–MS/MS methods, *J. Pharmaceut. Biomed.* 109 (2015) 79–84. **M21**

Радови саопштени на скуповима међународног значаја штампани у изводу

1. **Kostić, N.**, Dotsikas, Y., Vemić, A., Kečkeš, S., Malenović, A.: High sensitivity analysis of vigabatrin by UHPLC–MS/MS using dried plasma spots for sample collection. *7th International Conference on Instrumental Methods of Analysis. Modern Trends and Applications*, Chania Crete, Greece, 2011.
2. **Kostić, N.**, Dotsikas, Y., Malenović, A., Medenica, M.: Study of the effects of derivatization reagents consisting of *n*-alkyl chloroformate/*n*-alcohol combinations in LC–MS/MS analysis of zwitterionic compounds with antiepileptic activity. *8th International Conference on Instrumental Methods of Analysis. Modern Trends and Applications*, Thessaloniki, Greece, 2013.

3. **Kostić, N.**, Dotsikas, Y., Jović, N., Stevanović, G., Malenović, A.: Quantitation of pregabalin in dried blood spots and dried plasma spots by validated LC–MS/MS methods. Прихваћена постер презентација за *21th International Symposium on Separation Sciences*, Ljubljana, Slovenia, 2015.

Усмена излагања

1. **Kostić, N.** Анализа узорака биолошког материјала – шта све може једна кап?
6. Конгрес фармацеута Србије са међународним учешћем, Belgrade, Serbia, 2014.

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Дипл. фарм. Нађа Костић рођена је 1983. године у Чачку, где је завршила основну школу и гимназију. Такође, завршила је и основну музичку школу, одсек клавир. Студије на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду уписала је 2002. године, а дипломирала 2008. године с просечном оценом 8,61.

По завршетку студија, обавила је приправнички стручни стаж у апотеци „Веко“ и у априлу 2010. године положила стручни испит.

Током школске 2008/2009. године била је ангажована као стручни сарадник на предмету Аналитика лекова на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду. Током првог полугодишта школске 2009/2010. године радила је као професор предмета Козметологија у средњој медицинској школи „Надежда Петровић“ у Земуну.

Докторске академске студије, модул Фармацеутска хемија, уписала је школске 2009/2010. године на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду. Од децембра 2009. године запослена је, најпре као истраживач припрвник, а затим као истраживач сарадник, на научноистраживачким пројектима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије и то на Пројекту 142077, а затим на Пројекту 172052, чији је руководилац проф. др Мирјана Меденица. Као докторанд учествовала је у реализацији практичне наставе на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду у оквиру предмета Физиологија (2011/12. и 2012/13. године) на Катедри за физиологију, као и изборног предмета Медицинска средства (2010/11. и 2011/12. године) на Катедри за аналитику лекова.

Од децембра 2013. године запослена је на Медицинском факултету Универзитета у Београду на Институту за судску медицину „Милован Миловановић“ као стручни сарадник ван наставе.

До сада је објавила 16 научних радова у часописима међународног значаја (седам радова M21, један рад M22 и седам радова M23) и три рада у часопису

националног значаја (M53). На научним скуповима међународног значаја учествовала је са 24 рада који су штампани у изводу и једним усменим излагањем.

Члан је Савеза фармацеутских удружења Србије.

Говори енглески језик.

Члан је хора Академског културно уметничког друштва „Шпанац“.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Нађа Костић

број уписа 23/09

Изјављујем

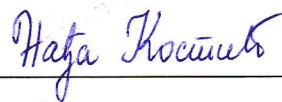
да је докторска дисертација под насловом

*Биоаналитика антиепилептика цвитерјонске структуре
након дериватизације n-алкилхлороформатима
применом течне хроматографије с масеном детекцијом*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 24. априла 2015.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Нађа Костић

Број уписа 23/09

Студијски програм Фармацеутска хемија

Наслов рада Биоаналитика антиепилептика цвитерјонске структуре
након дериватизације *n*-алкилхлороформатима
применом течне хроматографије с масеном детекцијом

Ментор Др Анђелија Маленовић, ванредни професор
Др Небојша Јовић, редовни професор

Потписани-а Нађа Костић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 24. априла 2015.

Нађа Костић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Биоаналитика антиепилептика цвитерјонске структуре
након дериватизације *n*-алкилхлороформатима
применом течне хроматографије с масеном детекцијом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 24. априла 2015.



**КЛИНИКА ЗА НЕУРОЛОГИЈУ И ПСИХИЈАТРИЈУ
ЗА ДЕЦУ И ОМЛАДИНУ, БЕОГРАД, др Суботића 6а**

Број: 178/
Датум: 11.04.2013.

На основу Закона о здравственој заштити („Сл. гласник РС“ бр. 107/05, бр. 72/09 бр. 88/10, бр. 99/10), Закона о изменама и допунама Закона о здравственој заштити („Сл. гласник РС“ број 57/2011), члана 37. Статута Клинике и члана 17. Пословника о раду Етичког одбора Клинике, а у складу са начелима Добре клиничке праксе у клиничком испитивању (ICH GCP/ ДКП) („Сл. гласник РС“, бр. 28/2008), Етички одбор Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду, у саставу: проф. др сци мед. Анета Лакић, проф. др сци мед. Небојша Јовић, др сци мед. Душан Караклић, доц. др сци мед. Јасна Јанчић, др Ана Пешић и Драгана Бољевић, члан ЕО Клинике из реда грађана, са завршеним правним факултетом, на XXX (тридесетој) редовној седници одржаној дана **03.04.2013. године**, већином гласова од укупног броја чланова је дао

С А Г Л А С Н О С Т

Нађи Костић, дипл. фармацеуту Катедре за аналитику лекова Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, да у Клиници за неурологију и психијатрију за децу и омладину, др Суботића 6а, Београд, може спровести истраживање :»Биоаналитика антиепилептика цвитерјонске структуре након дериватизације н-алкилхлороформатима применом течне хроматографије уз масену детексију».

Истраживање ће се спровести у оквиру докторске дисертације.

Ментор докторског рада је доц. др Анђелија Маленовић, доцент Катедре за аналитику лекова Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, а ко-ментор проф. др Небојша Јовић, редовни професор Катедре за неурологију Медицинског факултета Универзитета у Београду.

Именована је уз молбу приложила и:

- протокол студије;
- информацију за пацијента;
- информисани пристанак;
- интервју за пацијента ;
- изјаву да ће се подаци о пацијенту користити само у сврху истраживачког рада;
- биографију.



Председник Етичког одбора

Проф. др сци мед. Анета Лакић