



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανάπτυξη χρωματογραφικής μεθόδου για την παρακολούθηση επιπέδων
λικαρβαζεπίνης στον ορό ασθενών που βρίσκονται υπό θεραπεία με
οξυκαρβαζεπίνη**

Γεώργιος Βατίδης

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής
- Ευθύμιος Δαρδιώτης, Επίκουρος Καθηγητής

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως
μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην
Φαρμακολογία

Λάρισα, Οκτώβριος 2016



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the
therapeutic drug monitoring of licarbazepine in serum of patients under
oxcarbazepine treatment**

By
Georgios Vatidis

Advisory committee:

- Eftihia Asproдини, Associate Professor of Pharmacology (Supervisor)
- Anastasios Gerменis, Professor of Immunology
- Efthimios Dardiotis, Assistant Professor of Neurology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Pharmacology

Larissa, October, 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1. Επιληψία και επιληπτικοί σπασμοί	8
2. Αντιεπιληπτικά φάρμακα	12
3. Όξυκαρβαζεπίνη και Λικαρβαζεπίνη	15
4. Παρακολούθηση επιπέδων φαρμάκου - TDM	17
5. Παρακολούθηση επιπέδων λικαρβαζεπίνης	18
6. Χρωματογραφία	22
7. Πιστοποίηση μεθόδων.....	30
ΣΚΟΠΟΣ.....	34
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
Χημικές ενώσεις και αντιδραστήρια	35
Εξοπλισμός και χρωματογραφικές συνθήκες	35
Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων	36
Προκατεργασία δειγμάτων ορού	36
Πιστοποίηση της μεθόδου	37
Ανάκτηση	37
Γραμμικότητα των καμπύλης βαθμονόμησης και εύρος ανάλυσης	38
Ακρίβεια και επαναληψιμότητα	38
Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (low limit of quantitation, LLOQ) και όριο ανιχνευσιμότητας (limit of detection, LOD)	40
Δείγματα ασθενών	40
Στατιστική ανάλυση	40
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
Επιλογή εσωτερικού προτύπου	41
Πιστοποίηση της μεθόδου	41
Ειδικότητα	41
Ανάκτηση	44
Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης	47
Ακρίβεια και επαναληψιμότητα	48

Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (low limit of quantitation, LLOQ) και όριο ανιχνευσιμότητας (limit of detection, LOD)	49
Εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα ασθενών	50
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
4. ΠΗΓΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην Έφη και τον Ηλία,
για τη μύηση στην έρευνα
και την συντροφιά
στο δρόμο προς την απαρτίωση

Λάρισα, Οκτώβριος 2016

Βατίδης Γεώργιος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λικαρβαζεπίνη αποτελεί τον φαρμακολογικά ενεργό μεταβολίτη της οξυκαρβαζεπίνης, ενός αντιεπιληπτικού φαρμάκου που χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση της μερικής επιληψίας, αλλά έχει επίσης αποδειχθεί χρήσιμο στην αντιμετώπιση της διπολικής διαταραχής.

Σκοπός της εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας χαμηλού κόστους χρωματογραφικής μεθόδου με την απαιτούμενη ειδικότητα και ευαισθησία για την παρακολούθηση των επιπέδων λικαρβαζεπίνης στον ορό ασθενών που λαμβάνουν οξυκαρβαζεπίνη χωρίς να απαιτείται πολύπλοκη προκατεργασία δείγματος.

Δείγματα ορού επιληπτικών ασθενών ($n=13$) και δείγματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου υπεβλήθησαν σε απλή κατακρήμνιση πρωτεϊνών με μεθανόλη. Χρωματογραφικός διαχωρισμός παρατηρήθηκε σε 9' με στήλη C_{18} ανάστροφης φάσης και κινητή φάση ρυθμιστικού διαλύματος 50mM $NaH_2PO_4(H_2O)/CH_3CN$ (70/30, v/v, pH=4) διανεμημένης ισοκρατικά (0,8mL/min, 30°C). Η ανίχνευση έγινε στα 210nm.

Η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν γραμμική (συντελεστής γραμμικότητας=0,998) σε εύρος συγκεντρώσεων 0,5-50,0μg/mL. Το εύρος ανάκτησης ήταν 99,49-104,52% και το κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης 0,2μg/mL. Δεν παρατηρήθηκαν παρεμβολές μεταξύ της λικαρβαζεπίνης/εσωτερικού προτύπου και πλέον των 50, πιθανώς συγχωρηγούμενων, φαρμάκων που ελέγχθηκαν. Οι συγκεντρώσεις της λικαρβαζεπίνης στον ορό των ασθενών παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική ($p=0,02$) συσχέτιση (συντελεστής Pearson: 0,66) με την χορηγηθείσα δόση οξυκαρβαζεπίνης καθώς και με την βελτίωση των συμπτωμάτων τους.

Συμπερασματικά, αναπτύχθηκε απλή, ταχεία, χαμηλού κόστους και ευαίσθητη χρωματογραφική μέθοδος για την μέτρηση της λικαρβαζεπίνης στον ορό ασθενών με επιληψία. Η απουσία παρεμβολών από αντιεπιληπτικά, αντιψυχωσικά και άλλα συγχωρηγούμενα φάρμακα καθιστά την μέθοδο σημαντικό εργαλείο στην κλινική πράξη συμβάλλοντας στη βελτιστοποίηση της θεραπείας και την αποφυγή τοξικότητας.

Λέξεις κλειδιά: λικαρβαζεπίνη, υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, επιληψία, έλεγχος επιπέδων φαρμάκων, διαταραχές του συναισθήματος

ABSTRACT

Licarbazepine is the pharmacologically active metabolite of oxcarbazepine, a drug indicated for the treatment of partial seizures which has been also proved beneficial in the treatment of bipolar disorders.

The aim of the present study was to develop a simple, low-cost and reliable high-performance liquid chromatographic method coupled with ultraviolet detection for the determination of licarbazepine concentration in patient serum in the presence of other antiepileptic, antipsychotic and commonly co-prescribed drugs.

Sample preparation consisted of a single protein precipitation step with methanol. Chromatographic separation was achieved in approximately 9 min on a reversed-phase C₁₈ column using a mobile phase composed of 50 mM sodium phosphate buffer-acetonitrile (70/30, v/v, pH 4) delivered isocratically at 0.8 mL/min and 30°C. The detector was set at 210 nm.

The calibration curve was linear with regression coefficient 0.998 over the range 0.5-50.0 µg/mL. Coefficient of variation was less than 4.0% and bias less than 7.5%. Recovery ranged from 99.49-104.52% and the limit of quantification was 0.20 µg/mL. No interferences from the matrix or from antiepileptic, antipsychotic and commonly prescribed drugs were observed at the retention times of licarbazepine or the IS.

The method was applied to serum samples of patients under oxcarbazepine treatment (n=13) and proved to be a useful tool for the therapeutic drug monitoring of licarbazepine administered for the monotherapy or adjunctive treatment of seizures or affective disorders.

Keywords: Licarbazepine, high-performance liquid chromatography, therapeutic drug monitoring, epilepsy, affective disorders

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Επιληψία και επιληπτικοί σπασμοί

Η επιληψία αποτελεί την πιο συχνή νευρολογική διαταραχή παγκοσμίως. Υπολογίζεται ότι 50 εκατομμύρια άνθρωποι όλων των ηλικιών πάσχουν από επιληψία και πως μέχρι και 10% του πληθυσμού θα παρουσιάσει τουλάχιστον μία επιληπτική κρίση κάποια στιγμή στη ζωής του. Παρόλο που τα τελευταία χρόνια σημειώνεται σημαντική πρόοδος ως προς τη διάγνωση και αντιμετώπιση των διαταραχών που χαρακτηρίζονται από επιληπτικούς παροξυσμούς (κρίσεις), η κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που υπεισέρχονται στην παθογένεια της επιληψίας, γνωστή και ως επιληπτογένεση, παραμένει περιορισμένη. Ποσοστό της τάξης του 30% των ασθενών δεν ανταποκρίνεται στη φαρμακευτική αντιμετώπιση) (1) (2).

Το 2005 δύο οργανισμοί, η Διεθνής Ένωση κατά της Επιληψίας (ILAE: International League Against Epilepsy) και το Παγκόσμιο Γραφείο Επιληψίας (IBE: International Bureau for Epilepsy) συναίνεσαν για τον ορισμό των εννοιών *επιληπτική κρίση (epileptic seizure)* και *επιληψία (epilepsy)*

Ως *επιληπτική κρίση ή παροξυσμός (epileptic seizure)* ορίζεται ένα παροδικό επεισόδιο κλινικών σημείων ή/και συμπτωμάτων που οφείλονται σε υπέρμετρη ή και σύγχρονη ανώμαλη νευρωνική δραστηριότητα στον εγκέφαλο. (Εικόνα 1)

Ως *επιληψία (epilepsy, epileptic syndrome, epileptic disorder)* ορίζεται η εγκεφαλική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από εμμένουσα προδιάθεση εκδήλωσης επιληπτικών κρίσεων καθώς και από τις νευροβιολογικές, γνωστικές, ψυχολογικές και κοινωνικές επιπτώσεις πάνω στον ασθενή. Η διάγνωση της επιληψίας προϋποθέτει τουλάχιστον ένα επεισόδιο επιληπτικής κρίσης (3). Γίνεται λοιπόν σαφές ότι ο όρος επιληψία περιλαμβάνει ένα ευρύ σύνολο διαφορετικών νευρολογικών συνδρόμων. (1)

Το 2015 ειδική ομάδα εργασίας της ILAE δημοσιεύει ανανεωμένο ορισμό, σε μια προσπάθεια να συμπεριληφθούν ειδικές καταστάσεις ασθενών, σύμφωνα με τον οποίο η επιληψία ορίζεται πλέον ως η εγκεφαλική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από:

1. Τουλάχιστον δύο *μη προκλητές*¹ (ή *αντανεκλαστικές*²) *επιληπτικές κρίσεις* που συμβαίνουν με χρονική διαφορά μεγαλύτερη από 24 ώρες ή μια από την άλλη.

¹ *Μη προκλητές επιληπτικές κρίσεις (unprovoked seizures)* καλούνται τα επεισόδια που εμφανίζονται είτε απουσία πιθανής υποκείμενης κλινικής κατάστασης που να μπορεί να τα αιτιολογήσει είτε πέραν του χρονικού διαστήματος κατά το οποίο μία κρίση καλείται οξεία συμπτωματική.

2. Μία *μη προκλητή* (ή *αντανακλαστική*) *επιληπτική κρίση* που συνοδεύεται από υψηλή πιθανότητα περεταίρω κρίσεων μέσα στα επόμενα δέκα χρόνια. Η πιθανότητα πρέπει να είναι όση ο κίνδυνος επανεμφάνισης κρίσεων μετά από δύο *μη προκλητές επιληπτικές κρίσεις*.

3. Ήδη διαγνωσμένο επιληπτικό σύνδρομο (4)

Οι επιληπτικές κρίσεις είναι σύντομα επεισόδια ακούσιων σπασμών μέρους ή ολόκληρου του σώματος και μπορεί να συνοδεύονται από απώλεια συνείδησης και έλεγχου των σφιγκτήρων του εντέρου και της κύστης. Μπορεί να ποικίλουν από μυϊκά τινάγματα (*muscle jerks*) και διάλειψη προσοχής διάρκειας ελάχιστων δευτερολέπτων (που μπορεί και να διαφεύγουν της προσοχής) έως και παρατεταμένες συσπάσεις. Η συχνότητα των κρίσεων επίσης μπορεί να κυμαίνεται από 1 ανά έτος ή και λιγότερες έως και πολλαπλές κρίσεις ημερησίως.

Σχεδόν 80% των ανθρώπων που πάσχουν από επιληψία βρίσκονται στον αναπτυσσόμενο κόσμο τα 3/4 των οποίων δεν έχουν πρόσβαση στη θεραπεία. Το 2013, 116.000 θάνατοι αποδόθηκαν στη νόσο.

Η επιληψία είναι μια από τις αρχαιότερες νόσους που ανευρίσκονται σε καταγραφές. Η πρώτη περιγραφή της νόσου εντοπίζεται στη Μεσοποταμία σε κείμενο γραμμένο που χρονολογείται περίπου το 2.000 πΧ. Ο όρος προέρχεται από το ελληνικό ρήμα "επιλαμβάνομαι" δηλαδή παίρνω υπό τον έλεγχό μου, μιας και σύμφωνα με τις πεποιθήσεις

Οξείες συμπτωματικές επιληπτικές κρίσεις (*acute symptomatic seizures*) καλούνται τα επεισόδια που εμφανίζονται συνεπεία οξείας προσβολής του Κεντρικού Νευρικού συστήματος από μεταβολικό, τοξικό, δομικό, λοιμώδες ή φλεγμονώδες αίτιο. Συνήθως το χρονικό διάστημα ορίζεται εντός των πρώτων 7 ημερών από την προσβολή του ΚΝΣ, αν και μεγαλύτερα διαστήματα μπορεί να είναι αποδεκτά κατά περίπτωση. Κρίση που εμφανίζεται αφού ο ασθενής έχει σταθεροποιηθεί μπορεί να αποτελεί *μη προκλητή επιληπτική κρίση (unprovoked seizure)*. Στα αίτια συγκαταλέγονται η κρανιοεγκεφαλική κάκωση, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, όγκοι, εγκεφαλική υποξία, διαταραχές συγκέντρωσης γλυκόζης, νατρίου, ασβεστίου, μαγνησίου, ουρίας και κρεατινίνης στον ορό του ασθενούς, κατάχρηση αλκοόλ, και η ενδογενής ή εξωγενής αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος. Ναρκωτικές ουσίες όπως η κοκαΐνη, το crack, νορμεπεριδίνη, μεπεριδίνη, μεθακουαλόνη, γλουταριμίδη, μεθυλενεδι-οξυμεθαμφεταμίνη συνοδεύονται από υψηλή πιθανότητα πρόκλησης επιληπτικής κρίσης. Ψευδαισθησιογόνα, όπως η αγγελοσκόνη (PCP, Φαινκυκλιδίνη) παρουσιάζουν μέτρια συσχέτιση. Η ηρωίνη και η τετραϋδροκανναβινόλη παρουσιάζουν χαμηλή ή μηδενική συσχέτιση με επιληπτικές κρίσεις. Όροι όπως *προκλητές κρίσεις (provoked seizures)*, *αντιδραστικές (reactive)* ή *σχετιζόμενες με μια κατάσταση (situation related)* κρίσεις πρέπει να αποφεύγονται.

Ο διαχωρισμός σε οξείες συμπτωματικές επιληπτικές κρίσεις και σε μη προκλητές βασίζεται στη διαφορετική πρόγνωση, πιθανό κίνδυνο επανάληψης του επεισοδίου και θνησιμότητας μεταξύ των δύο. (43)

² **Αντανακλαστικές επιληπτικές κρίσεις (*Reflex Seizures*)** καλούνται τα επεισόδια που αντικειμενικά και με συνέπεια αποδεικνύεται ότι προκαλούνται από ένα συγκεκριμένο εξωγενές ερέθισμα ή δραστηριότητα του ασθενούς. Τα ερεθίσματα διακρίνονται σε στοιχειώδη (όπως φώτα που αναβοσβήνουν, ένα ξάφνιασμα ή ένας αμετάβλητος ήχος σταθερής τονικότητας) και περίπλοκα (όπως μια κλασική συμφωνία). (44)

της εποχής η επιληψία περιγράφεται ως κατάληψη του ανθρώπινου σώματος από δαίμονες (θείκές οντότητες), από όπου προκύπτει και η ονομασία "Ιερά Νόσος". Προκατάληψη και κοινωνικό στίγμα συνδέονται στενά με τη νόσο από την αρχαιότητα και σε ορισμένες χώρες ακολουθούν μέχρι και σήμερα τους ασθενείς και τις οικογένειες τους προκαλώντας διάφορα προβλήματα με ψυχοκοινωνικές προεκτάσεις. (2)

Η επιληψία οφείλεται είτε σε ανεξέλεγκτη διέγερση νευρώνων, είτε σε μη ικανοποιητική αναστολή. Κατά τη συντονισμένη εκπόλωση νευρώνων είναι δυνατόν να παρατηρηθούν αντικειμενικά σημεία επιληψίας όπως πχ μυϊκά τινάγματα (jerking), κινήσεις και απώλεια συνείδησης. Μπορεί όμως τα συμπτώματα να αποτελούν και υποκειμενικές εμπειρίες αντιληπτές μόνο από το άτομο που πάσχει όπως φοβίες ή περίεργες μυρωδιές. Η εμπειρία αυτή είναι άμεσα συνδεδεμένη με την περιοχή του εγκεφάλου που προσβάλλεται από τις κρίσεις.

Οι ασθενείς που πάσχουν από επιληψία παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενα επεισόδια κάποιου υπότυπου επιληψίας. Ιστορικά έχουν γίνει πολλές προσπάθειες κατηγοριοποίησης των τύπων επιληψίας. (Grand mal, petit mal).

Η πιο σύγχρονη κατηγοριοποίηση ξεκινά από την προσβεβλημένη περιοχή του εγκεφάλου:

Μερική ή Εστιακή επιληπτική κρίση (partial or focal seizure) καλείται ένα επεισόδιο όταν η προσβεβλημένη (affected) περιοχή του εγκεφάλου περιορίζεται σε έναν λοβό ή και ολόκληρο το ημισφαίριο. Ο όρος εστιακή τείνει να αντικατασταθεί τελείως από τον όρο μερική. Περεταίρω κατηγοριοποίηση διακρίνει τις μερικές επιληπτικές κρίσεις ανάλογα με το αν ο ασθενής διατηρεί τις αισθήσεις του κατά τη διάρκεια του επεισοδίου (*απλή εστιακή επιληψία*), ή εάν συνυπάρχουν διαταραχές του επιπέδου συνείδησης (*complex partial seizure*).

Απλές εστιακές επιληπτικές κρίσεις (simple partial seizure) η ανεξέλεγκτη νευρωνική δραστηριότητα περιορίζεται σε μικρή περιοχή του εγκεφάλου με αποτέλεσμα ο ασθενής να βιώνει παράξενες αισθητηριακές ψευδαισθήσεις (σαν να ακούει ή να νιώθει ότι γεύεται κάτι) ή τινάγματα (jerking movements) συγκεκριμένων μυϊκών ομάδων αυτών δηλαδή που επηρεάζονται από τη περιοχή που είναι υπεύθυνη για τη νεύρωση τους. Εάν τα τινάγματα που ξεκίνησαν από μια συγκεκριμένη μυϊκή ομάδα διαδοθούν σε παρακείμενους μύες υποδηλώνει την περεταίρω εμπλοκή νευρώνων και καλείται **Jacksonian march**. Συνήθως ο ασθενής διατηρεί το επίπεδο συνείδησης του, δηλαδή βρίσκεται σε εγρήγορση, έχει

εναισθησία (αντιλαμβάνεται ότι κάτι του συμβαίνει) και έχει ανάμνηση του περιστατικού στη συνέχεια.

Σύνθετες εστιακές επιληπτικές κρίσεις (*complex partial seizures*). Χαρακτηρίζονται από το ότι το επίπεδο επίγνωσης του ασθενή κυμαίνεται από διαταραγμένη απόκριση στα ερεθίσματα και αδυναμία ανάμνησης του περιστατικού έως την πλήρη απώλεια συνείδησης.

Γενικευμένη επιληπτική κρίση (*generalized seizure*) καλείται ένα επεισόδιο όπου η ανώμαλη ηλεκτρική δραστηριότητα εντοπίζεται και στα δυο εγκεφαλικά ημισφαίρια.

Σε ορισμένες περιπτώσεις η επιληπτική κρίση ξεκινά ως μερική επιληπτική κρίση σαν το πρωτεύον συμβάν/αρχικό γεγονός, αλλά γρήγορα εξελίσσεται σε γενικευμένη επιληπτική κρίση οπότε και καλείται **δευτερογενώς γενικευμένη επιληπτική κρίση (*secondary generalized seizure*)**.

Οι γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις διακρίνονται και αυτές σε υποκατηγορίες:

Τονικές γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις (Tonic): χαρακτηρίζονται από αιφνίδιας έναρξης έντονη σύσπαση όλων των μυών του σώματος γεγονός που συνήθως έχει σαν αποτέλεσμα την πτώση του ασθενούς χαρακτηριστικά προς τα πίσω.

Μη-Τονικές γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις (Atonic): χαρακτηρίζονται από αιφνίδιας έναρξης χάλαση όλων των μυών του σώματος γεγονός που συνήθως έχει σαν χαρακτηριστικό αποτέλεσμα την πτώση του ασθενούς προς τα μπροστά.

Κλονικές γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις (Clonic): χαρακτηρίζονται από βίαιους μυϊκούς σπασμούς.

Τονικοκλονικές γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις (Tonic Clonic): είναι ο πιο συχνός τύπος επιληψίας με χαρακτηριστική έναρξη με μια τονική φάση όπου όλοι οι μύες συσπώνται, ακολουθούμενη από μία κλονική φάση ταχείας εναλλαγής σπασμών με χάλαση.

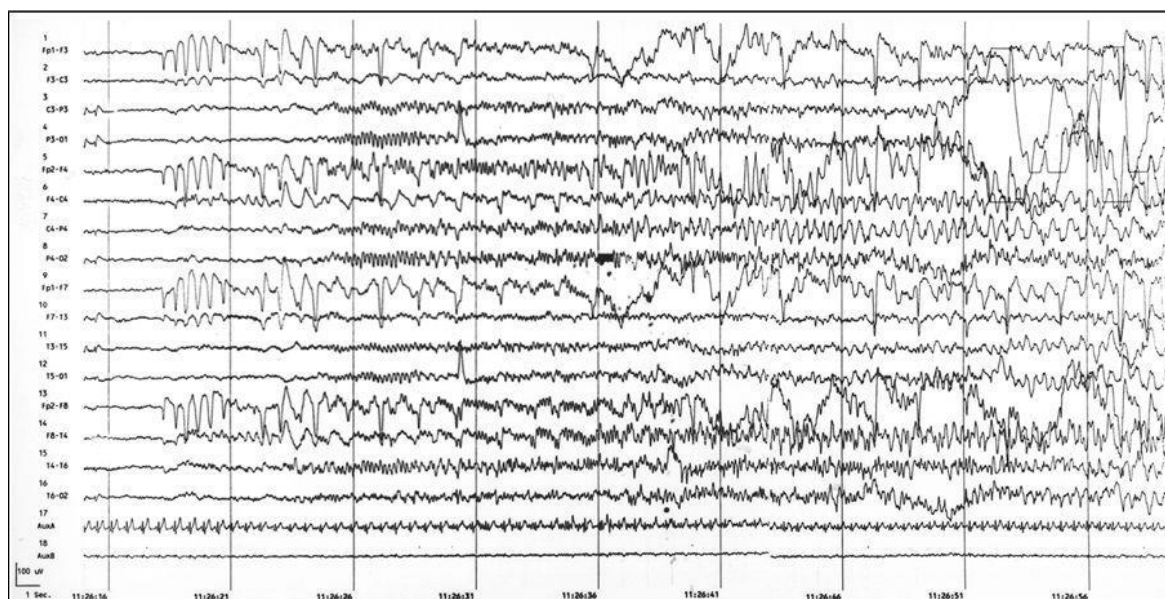
Μυοκλονικές γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις: χαρακτηρίζονται από λίγες έως παρά πολλές μικρές μυϊκές συσπάσεις (twitches) σε μικρό χρονικό διάστημα.

Αφαιρετικές γενικευμένες επιληπτικές κρίσεις: χαρακτηρίζονται από απώλεια και γρήγορη ανάκτηση συνείδησης συνήθως με ένα εκ των δύο αντικειμενικών σημείων: i) το άτομο «αφαιρέθηκε» ii) στροφή της κεφαλής αριστερά. Αν επί παραδείγματι ο ασθενής περπατά την ώρα μιας αφαιρετικής γενικευμένης επιληπτικής κρίσης θα σταματήσει απότομα.

Η επιληψία είναι μία χρόνια μη μεταδοτική νευρολογική διαταραχή. Στο 60% των επιληπτικών ασθενών τα αίτια της νόσου δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν και τότε πρόκειται

για *ιδιοπαθή επιληψία*. Όταν τα αίτια είναι γνωστά πρόκειται για *δευτερογενή ή συμπτωματική επιληψία* και μπορεί να οφείλεται σε προγεννητική ή περιγεννητική κάκωση, χαμηλό βάρος γέννησης, συγγενείς ανωμαλίες και γενετικές παθήσεις με συνοδές εγκεφαλικές δυσπλασίες, κρανιοεγκεφαλική κάκωση, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, εγκεφαλική υποξία, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, νευροκυστικέρκωση, εγκεφαλικός όγκος.

Η εκδήλωση μίας επιληπτικής κρίσης δεν ισοδυναμεί με διάγνωση επιληπτικού συνδρόμου. (5)



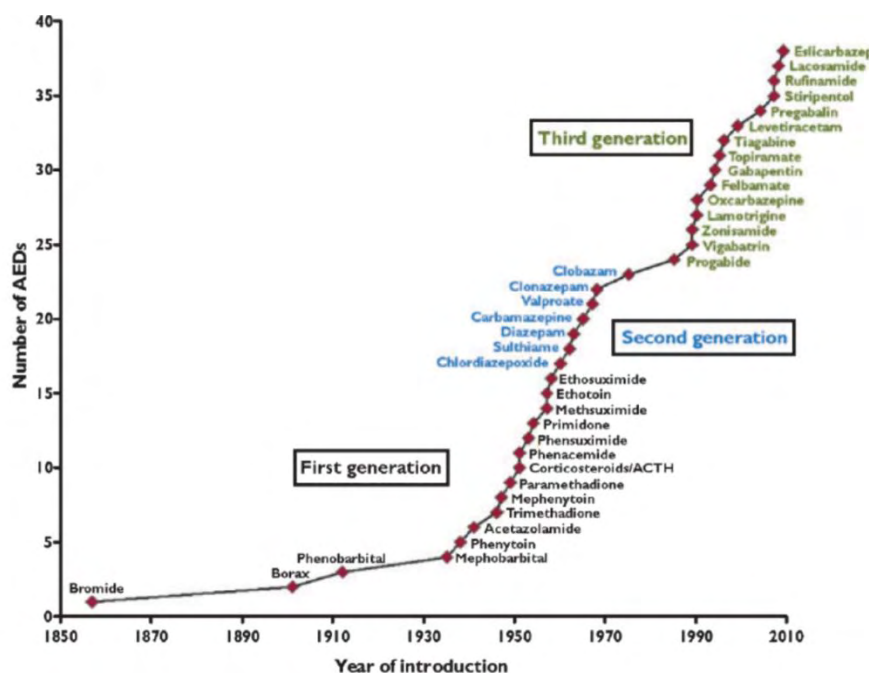
Εικόνα 1: Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα επιληπτικής δραστηριότητας αμφικροταφικής έναρξης.
Ανατύπωση από: CLINICAL FEATURES AND RELEVANCE OF ASSOCIATED HIPPOCAMPAL ATROPHY
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2000000600003

2. Αντιεπιληπτικά φάρμακα

Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα, γνωστά και ως αντισπασμωδικά, αποτελούν μια ευρεία ομάδα φαρμακευτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται για τη συμπτωματική αντιμετώπιση των επιληπτικών κρίσεων. Τα αντιεπιληπτικά καταστέλλουν την ανεξέλεγκτη νευρωνική δραστηριότητα ή/και περιορίζουν τη μετάδοσή της σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου. (6) Παρόλα αυτά, δεν φαίνεται να αναστέλλουν τη φυσική πορεία της νόσου ή να αποτρέπουν την ανάπτυξη της επιληψίας σε άτομα υψηλού κινδύνου πχ μετά από κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Αν και κάποιες μελέτες αναφέρουν ότι η αντισπασμωδική θεραπεία σχετίζεται με κίνδυνο μείωσης του δείκτη νοημοσύνης σε παιδιά, ο κίνδυνος αυτός

πρέπει να συνυπολογισθεί με την αυξημένη πιθανότητα θανάτου και τα καταστροφικά νευρολογικά επακόλουθα που συνοδεύουν τις κρίσεις. (7)

Το βρωμιούχο άλας (bromide) ήταν το πρώτο αντιεπιληπτικό που χρησιμοποιήθηκε το 1857 από τον βρετανό Charles Locock για την αντιμετώπιση γυναικών με "υστερική επιληψία" (πιθανότατα αυτό που σήμερα ονομάζουμε καταμήνια επιληψία). Προκαλεί ενδιαφέρον πως το βρωμιούχο άλας αν και αποτελεσματικό έναντι της επιληψίας προκαλούσε διαταραχές συμπεριφοράς που λανθασμένα οδήγησαν στην περιγραφή της "επιληπτικής προσωπικότητας". Το 1912 δοκιμάστηκε για πρώτη φορά η φαινοβαρβιτάλη η οποία πέρα από τις αντιεπιληπτικές της ιδιότητες εμφάνισε και ανεπιθύμητες ηρεμιστικές ενέργειες. Το 1930 η ανάπτυξη ζωικών πειραματικών μοντέλων οδήγησε στην ανακάλυψη της φαινοτοΐνης που διατηρούσε τις αντιεπιληπτικές ιδιότητες ενώ ταυτόχρονα δεν εμφάνιζε κατασταλτικές. Σειρά αντιεπιληπτικών παραγόντων έχουν ελεγχθεί και χρησιμοποιηθεί έκτοτε για τον περιορισμό των επιληπτικών κρίσεων με περισσότερο διαδεδομένη την καρβαμαζεπίνη και το βαλπροϊκό οξύ (Εικόνα 2). (8)



Εικόνα 2: Χρονοδιάγραμμα ανακάλυψης και ανάπτυξης αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Ανατύπωση από Loscher and Smidt, 2011.

Τα κλασσικά αντιεπιληπτικά φάρμακα δρουν αποκλείοντας τους τασεοευαίσθητους διαύλους νατρίου των νευρικών κυττάρων ή ενισχύοντας τη δράση του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή GABA, ενώ άλλα έχουν πολλαπλούς ή άγνωστους προς το παρόν στόχους. Στους μοριακούς στόχους των αντιεπιληπτικών περιλαμβάνονται επίσης υποδοχείς,

πρωτεΐνες μεταφορείς και η αμινοτρανσφεράση του GABA καθώς και τασεοευαίσθητοι δίαυλοι ασβεστίου και πρωτεΐνες των συναπτικών κυστιδίων. Τα αντιεπιληπτικά, με το να αποκλείουν τασεοευαίσθητους διαύλους μειώνουν την έκλυση τόσο του διεγερτικού νευροδιαβιβαστή γλυταμινικό οξύ, όσο και του GABA.

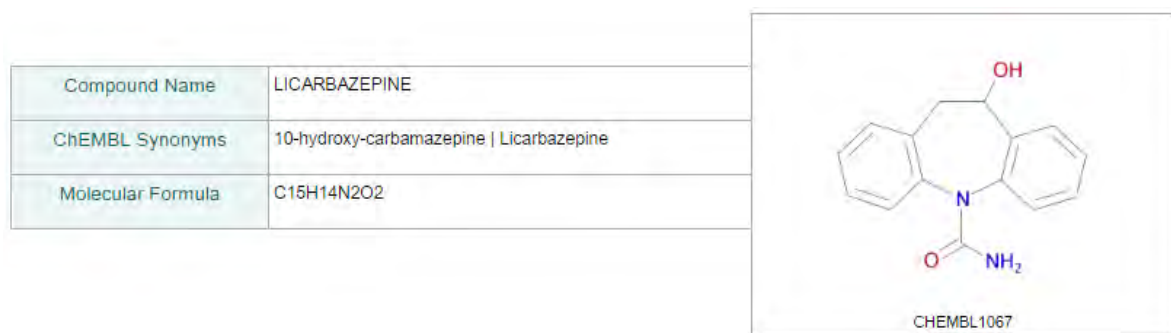
Η καθιερωμένη διαδικασία για την έγκριση νέων αντιεπιληπτικών φαρμάκων περιλαμβάνει την ένδειξη ότι το φάρμακο μειώνει τις επιληπτικές κρίσεις μια ομάδας ελέγχου όταν συγκρίνεται με εικονικό φάρμακο (placebo), ή ότι είναι αποτελεσματικότερο από κάποια ήδη καθιερωμένη θεραπεία. Μελέτες όπου η αποτελεσματικότητα ενός μόνο νέου πιθανού αντιεπιληπτικού παράγοντα (μονοθεραπεία) συγκρίνεται με εικονικό φάρμακο (placebo), αντιβαίνει στις αρχές της βιοϊατρικής ηθικής διότι επιληπτικά σύνδρομα που παραμένουν χωρίς αντιμετώπιση παρουσιάζουν σημαντική πιθανότητα θανάτου. Συνεπώς, η πλειονότητα των νέων φαρμάκων παίρνει έγκριση αρχικά ως συμπληρωματική θεραπεία. Κατά κύριο λόγο επιλέγονται ασθενείς με φαρμακοανθεκτική επιληψία ώστε να διερευνηθεί εάν το νέο φάρμακο συμβάλλει στον περιορισμό των κρίσεων.

Σύμφωνα με τις οδηγίες της Αμερικανικής Ακαδημίας Νευρολογίας (2004) σε ασθενείς με νεοεμφανιζόμενη επιληψία πρέπει να γίνεται έναρξη της αντιεπιληπτικής θεραπείας με καρβαμαζεπίνη, φαινοτοΐνη, βαλπροϊκό, φαινοβαβιτάλη ή νεότερα αντιεπιληπτικά φάρμακα όπως γκαμπαπεντίνη, λαμοτριγίνη, οξκαρβαζεπίνη ή τοπιραμάτη ανάλογα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ασθενούς. Τα νεότερα και παλαιότερα αντιεπιληπτικά είναι συγκρίσιμα ως προς τον περιορισμό των κρίσεων με τη διαφορά ότι τα νεότερα εμφανίζουν λιγότερες παρενέργειες. Στη νεοεμφανιζόμενη μερική επιληψία ενδείκνυται η χρήση γκαμπαπεντίνης, λαμοτριγίνης, οξυκαρβαζεπίμης ή τοπιραμάτης ως μονοθεραπεία.

Τα τελευταία χρόνια η χρήση των αντιεπιληπτικών παραγόντων ολοένα και αυξάνεται στην αντιμετώπιση ενός φάσματος νευροψυχιατρικών διαταραχών μετά την παρατήρηση ότι τα φάρμακα αυτά λειτουργούν και ως σταθεροποιητές συναισθήματος. Στις διαταραχές αυτές συμπεριλαμβάνονται η διπολική διαταραχή, η μεταιχμιακή διαταραχή προσωπικότητας και ο νευροπαθητικός πόνος. Επίσης, μελέτες αναφέρουν τη χρήση ορισμένων αντιεπιληπτικών φαρμάκων στη σχιζοφρένεια και τη σχιζοσυναισθηματική διαταραχή. (9) Έγκριση αντιεπιληπτικών φαρμάκων για την χρήση τους ως σταθεροποιητές συναισθήματος έχουν πάρει τα αντιεπιληπτικά καρβαμαζεπίνη, βαλπροϊκό οξύ, λαμοτριγίνη, πρεγκαμπαλίνη και γκαμπαπεντίνη. (10) Επιπλέον, ορισμένα αντιεπιληπτικά φάρμακα, πλέον των πέντε εγκεκριμένων, χρησιμοποιούνται ευρέως εκτός της επίσημης ένδειξής τους (off label) όπως είναι η οξυκαρβαζεπίνη με βάση κλινικές δημοσιευμένες παρατηρήσεις. (11)

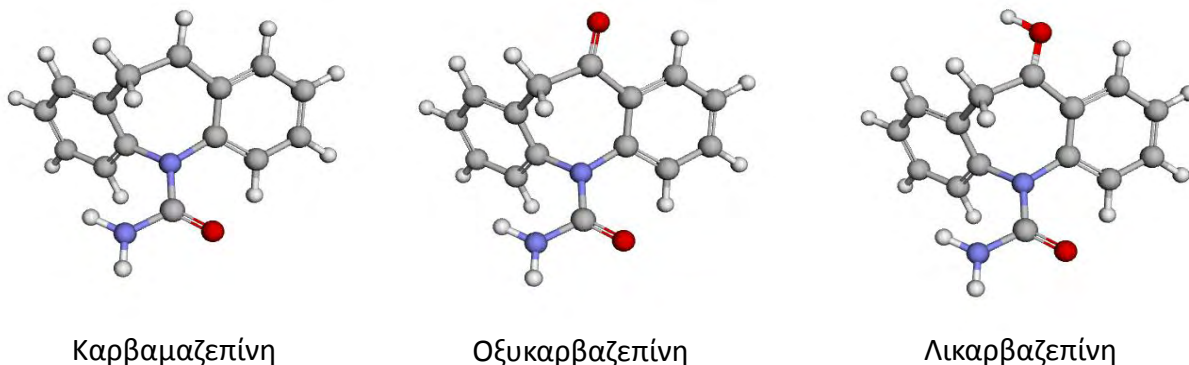
3. Οξυκαρβαζεπίνη και Λικαρβαζεπίνη

Η οξυκαρβαζεπίνη (10-υδροξυ-καρβαμαζεπίνη) είναι ένα 10-κετο παράγωγο της καρβαμαζεπίνης (Εικόνα 3, 4).



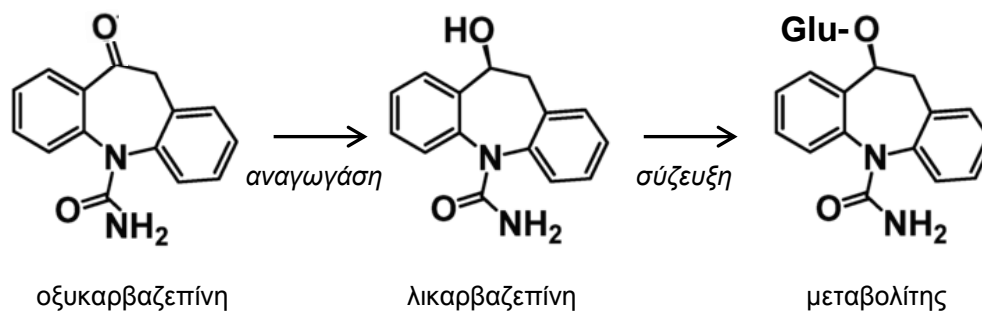
Εικόνα 3: Χημική ονομασία και δομή της λικαρβαζεπίνης. Ανατύπωση από Compound Report Card Compound Name&Classification www.ebi.ac.uk/chembl/dbcompound/inspect/CHEMBL1067

Η οξυκαρβαζεπίνη αποτελεί αντιεπιληπτικό φάρμακο τρίτης γενεάς και ενδείκνυται στη μονοθεραπεία ή τη συνδυασμένη θεραπεία των εστιακών επιληπτικών κρίσεων με ή χωρίς δευτερογενώς γενικευμένους τονικοκλονικούς σπασμούς τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες (12). Η σύνθεση της οξυκαρβαζεπίνης έγινε με αρχικό στόχο την μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών που παρατηρούνται μετά από αγωγή με καρβαμαζεπίνη (13) (14). Όπως συμβαίνει με τα περισσότερα αντισπασμωδικά φάρμακα, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τόσο η οξυκαρβαζεπίνη όσο και ο φαρμακολογικά ενεργός μεταβολίτης, η λικαρβαζεπίνη, εμφανίζουν την αντιεπιληπτική τους δράση παραμένει έως τώρα άγνωστος. Παρόλα αυτά θεωρείται ότι η δράση τους σχετίζεται με την αναστολή διαύλων Na^+ η οποία οδηγεί στην αναστολή των επαναλαμβανόμενων εκφορτίσεων, τη μείωση της συναπτικής δραστηριότητας και την μετάδοση επιληπτοειδών εκφορτίσεων στον εγκέφαλο (15).



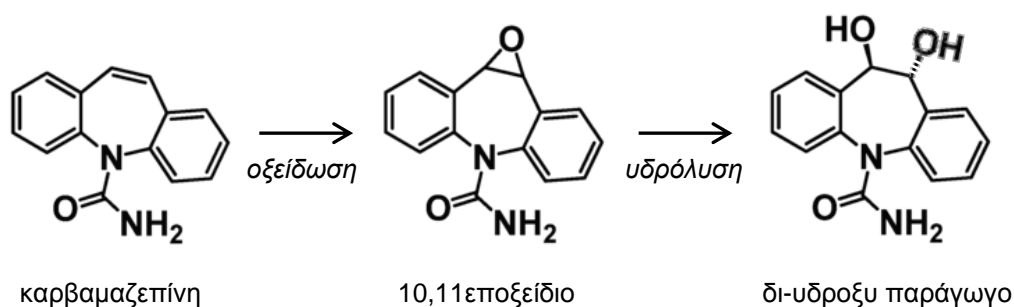
Εικόνα 4: Τρισδιάστατοι μοριακοί τύποι φαρμάκων. Ανατύπωση από www.drugbank.ca/structures/structures/metabolites/DBMET01408

Η φαρμακοκινητική της οξυκαρβαζεπίνης χαρακτηρίζεται από την εκτεταμένη και γρήγορη απορρόφηση μετά από χορήγησή της από το στόμα και την αναγωγή της, από μια μη-επαγώμενη αναγωγή, στο μονο-υδροξυ παράγωγό της, την λικαρβαζεπίνη (Εικόνα 5) (16). Ο μεταβολίτης αυτός αθροίζεται στον ορό και ουσιαστικά είναι υπεύθυνος για την αντιεπιληπτική δράση της οξυκαρβαζεπίνης (16) (17).



Εικόνα 5: Μεταβολισμός της οξυκαρβαζεπίνης.

Η οξυκαρβαζεπίνη και η λικαρβαζεπίνη χαρακτηρίζονται από περιορισμένη δυνατότητα επαγωγής ή αναστολής των ενζύμων του ήπατος, επομένως παρουσιάζουν λιγότερες αλληλεπιδράσεις με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα και λιγότερες παρενέργειες σε σχέση με το πρότυπο φάρμακο την καρβαμαζεπίνη της οποίας το δι-υδροξυ παράγωγο επάγει τα ένζυμα του ήπατος (Εικόνα 6) (18) (17). Εν τούτοις, μελέτες δείχνουν ότι η οξυκαρβαζεπίνη μειώνει την αποτελεσματικότητα των από του στόματος αντισυλληπτικών φαρμάκων καθώς επηρεάζει τον μεταβολισμό τους από το κυτόχρωμα CYP3A (19) (20). Επιπλέον, η κάθαρση της λικαρβαζεπίνης μειώνεται στους ηλικιωμένους και σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια ενώ αυξάνεται κατά την εγκυμοσύνη (17).



Εικόνα 6: Μεταβολισμός της καρβαμαζεπίνης.

4. Παρακολούθηση επιπέδων φαρμάκου - TDM

Η σύγχρονη θεραπεία της επιληψίας περιορίζεται στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων, δηλαδή τον περιορισμό των κρίσεων, κατά βάση με αντιεπιληπτικά φάρμακα. Παρόλα αυτά, ένας μεγάλος αριθμός των ασθενών δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία με πολλαπλές συνέπειες για τον ασθενή σε βιολογικό, ψυχολογικό και κοινωνικό επίπεδο. Σημαντικό εργαλείο στην προσπάθεια εξατομίκευσης της αντιεπιληπτικής θεραπείας είναι η παρακολούθηση επιπέδων των αντιεπιληπτικών φαρμάκων (Therapeutic Drug Monitoring, TDM).

Η παρακολούθηση της στάθμης των φαρμάκων είναι απαραίτητη ειδικότερα στις περιπτώσεις όπου:

- δεν μπορεί να προβλεφθεί η συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα μετά τη χορήγηση της δόσης
- το φάρμακο έχει στενό θεραπευτικό εύρος
- υπάρχουν αμφιβολίες για τη συμμόρφωση του ασθενούς (π.χ. ψυχοφάρμακα)
- χορηγούνται ταυτόχρονα περισσότερα του ενός φάρμακα που πιθανόν να είναι υπεύθυνα για την πρόκληση επαγωγής ή αναστολής των ενζύμων του ήπατος
- υπάρχουν γενετικές ιδιαιτερότητες οι οποίες οδηγούν σε μεταβολή του ρυθμού βιομετατροπής
- παρατηρείται νεφρική ή ηπατική δυσλειτουργία στον ασθενή
- υπάρχουν ειδικές συνθήκες (όπως εγκυμοσύνη)
- μη ανταπόκριση στην εφαρμοζόμενη αγωγή

Προκειμένου να αποφευχθούν οι παρενέργειες της οξυκαρβαζεπίνης και να βελτιστοποιηθεί η θεραπεία των ασθενών είναι σημαντικό να γίνεται συστηματική παρακολούθηση της στάθμης του φαρμάκου σε ασθενείς με επιληψία κυρίως υπό το πρίσμα ότι οι ασθενείς αυτοί απαιτούν συχνά μακροχρόνια θεραπεία με πολλαπλά φάρμακα αυξάνοντας την πιθανότητα αλληλεπιδράσεων. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι η παρακολούθηση της στάθμης φαρμάκων (therapeutic drug monitoring, TDM) αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο το οποίο επιτρέπει την εξατομίκευση της αντιεπιληπτικής θεραπείας σε ασθενείς ανάλογα με τις ανάγκες τους (21).

Η παρακολούθηση της στάθμης φαρμάκων συνδέεται στενά με την ανάπτυξη αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για τον καθορισμό της συγκέντρωσης τόσο των ίδιων των φαρμάκων όσο και των μεταβολιτών τους στο πλάσμα.

5. Παρακολούθηση επιπέδων λικαρβαζεπίνης

Διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι με ανίχνευση στο υπεριώδες (HPLC-UV) (22) (23) (24) (25) (26), ή με φασματογραφία μάζας (HPLC-MS-MS) (27) (28) (29) (30) (31) (32) έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να προσδιορισθεί η συγκέντρωση της λικαρβαζεπίνης στον ορό ασθενών είτε όταν αυτή είναι το μόνο φάρμακο προς προσδιορισμό, είτε όταν απαιτείται ταυτόχρονος προσδιορισμός με άλλα φάρμακα. Οι μέθοδοι αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Γενικώς, οι μέθοδοι που βασίζονται στη φασματογραφία μάζας (mass spectrometry, MS) χαρακτηρίζονται από σημαντικά πλεονεκτήματα όπως είναι η υψηλή ευαισθησία, ο μικρός χρόνος ανάλυσης και μικρός όγκος δείγματος. Παρόλα αυτά, περιλαμβάνουν εξεζητημένο εξοπλισμό υψηλού κόστους καθώς και ανάγκη για εξειδικευμένο προσωπικό (27) (32). Από την άλλη πλευρά, οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση υπεριώδους αποδεικνύονται καταλληλότερες στην παρακολούθηση της στάθμης φαρμάκων στην καθημερινή κλινική πράξη, καθώς περιλαμβάνουν λιγότερο δαπανηρό εξοπλισμό, δεν απαιτούν εξαιρετικά εκπαιδευμένο προσωπικό και παρέχουν επαρκή ευαισθησία και ειδικότητα για τον αξιόπιστο ποσοτικό προσδιορισμό του φαρμάκου. Κρίνονται λοιπόν καταλληλότερες για καθημερινή χρήση ιδίως σε περιφερικά νοσοκομεία ή κέντρα υγείας. Μερικές από τις μεθόδους που βασίζονται στην ανίχνευση υπεριώδους παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία αλλά απαιτούν πολύπλοκη προετοιμασία του δείγματος με τη χρήση εκχύλισης στερεής (23) (24) ή υγρής (22) φάσης ενώ, αντίθετα, άλλες περιλαμβάνουν απλούστερη προετοιμασία του δείγματος, όπως απλή κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, αλλά επιδεικνύουν χαμηλότερη ευαισθησία (25).

Ένα κοινό μειονέκτημα όλων των μεθόδων που εφαρμόζονται στον προσδιορισμό της λικαρβαζεπίνης σε ανθρώπινα δείγματα, είναι η έλλειψη ελέγχου για παρεμβολές από φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ασθενείς με συναισθηματικές διαταραχές. Πράγματι, πέραν της αντιεπιληπτικής της δράσης, η οξυκαρβαζεπίνη χρησιμοποιείται επίσης στην αντιμετώπιση της διπολικής διαταραχής, ενώ η χρήση της εξετάζεται στην μονοθεραπεία ή την συνδυασμένη θεραπεία των διαταραχών του συναισθήματος (33) παρόλο που πολλές μελέτες έχουν εξετάσει την χρωματογραφική παρεμβολή της λικαρβαζεπίνης με άλλα

αντιεπιληπτικά (23) (29) (30) (31) (32) (34) (35) (36) ή άλλα ευρέως χρησιμοποιούμενα (25) (34) (37) φάρμακα. Μία μόνο μελέτη (26) μέχρι τώρα έχει αναφέρει παρεμβολή των αντικαταθλιπτικών ή αντιψυχωτικών φαρμάκων που είναι πιθανόν να συγχωρηγούνται με την οξυκαρβαζεπίνη. Στη μελέτη αυτή όμως έχει ελεγχθεί μόνο ένα αντιεπιληπτικό, η καρβαμαζεπίνη, για πιθανές παρεμβολές ενώ δεν έχει ερευνηθεί η πιθανότητα παρεμβολών από συνηθέστατα συγχωρηγούμενα αντιεπιληπτικά φάρμακα όπως το βαλπροϊκό οξύ, η φαινυτοΐνη και η φαινοβαρβιτάλη. Επιπλέον πρόβλημα αυτής της μελέτης αποτελεί το γεγονός πως ο χρόνος έκλυσης της λικαρβαζεπίνης (11,09 min) δε διαφέρει από αυτόν την κλοζαπίνης (11,3 min). Η κλοζαπίνη αποτελεί φάρμακο εκλογής για την αντιμετώπιση της ανθεκτικής σχιζοφρένειας με ευρεία χρήση και στις λοιπές ψυχωσικές διαταραχές που συχνά συνοδεύονται ή/και συνοδεύουν διαταραχές του συναισθήματος. Συνεπώς, η ταυτόχρονη έκλυση κλοζαπίνης και λικαρβαζεπίνης καθιστά αδύνατο τον προσδιορισμό των επιπέδων λικαρβαζεπίνης στον ορό ασθενών που λαμβάνουν και τα δύο σκευάσματα.

Πίνακας 1: Μέθοδοι προσδιορισμού της λικαρβαζεπίνης με ανίχνευση στο υπεριώδες ή χρήση φασματομετρίας μάζας που ανευρίσκονται στη βιβλιογραφία συμπεριλαμβανομένης και της παρούσης μελέτης. Οι αριθμοί 1 - 49 αναφέρονται σε φάρμακα που έχουν ελεγχθεί για πιθανές χρωματογραφικές παρεμβολές.

Referer	Analysis method	Column	Detected drugs*	Licarbazepine Analytical Range-LLOQ (µg/mL)	Sample volume (µL)	Internal standard	Analysis time of licarbazepine (min)	Sample preparation	Control for interferences from other drugs
MS-based methods									
(27)	Gradient LC-MS/MS	C18	4, 6, 21-23, 30, 33, 34, 41, 43	0.4-60.0 (0.4)	10	diphenhydramine	4.22	Protein precipitation (acetonitrile)	no
(28)	Isocratic LC-MS/MS	C18	23, 30	0.0194-10.29 (0.0194)	300	imipramine	1.5	SPE	no
(29)	Gradient LC-APCI/MS	C18	4-6, 21, 23, 33, 34, 41, 45	0.5-40.0 (0.5)	100	² H ₁₀ -CBZ	8.26	SPE	13, 16, 23, 31, 38, 42, 45
(24)	Isocratic LC-MS/MS	C18	5, 23, 30	0.78-50.0 (5.4 ng/mL)	150	cyheptamide	2.5	SPE	no
(23)	Isocratic LC-MS/MS	C18	23, 30	0.04-10.5 (0.04)	100	d10-carbamazepine	3.5	LLE diethylether-dichloromethane	no
(30)	Gradient LC- APCI/MS	C8	23, 30	0.1-50.0 (0.1)	200	d3-trimipramine	5.8	LLE (diethylether-ethylacetate)	48
UV-based methods									
Present study (38)	Isocratic HPLC-UV	C18	23	0.50-50.0 (0.20)	100	acetanilide	7.5	-	Πινάκας 4; 52-58 Bio-Rad Lyphocheck
(22)	Isocratic HPLC-UV	C18	4-6, 21, 23, 30, 32-34, 37	0.15-80.0 (0.15)	500	ketoprofen	12.0	Protein precipitation (methanol) plus SPE	no
(34)	Isocratic HPLC-UV	Mono-lithic	4, 6, 13, 21, 23, 32, 34, 37, 45	0.9-53.1 (0.90)	100	5-ethyl-5-p-tolylbarbital acid	7.0	Protein precipitation (methanol)	49-51
(14)	Isocratic HPLC-UV	C18	4-6, 11, 23, 30	0.10-60.0 (0.10)	500	10,11-dihydrocarbamazepi	9.0	SPE	1, 2, 8, 10, 14, 15, 18-22, 26-28, 32, 36, 40, 41, 43, 44
(31)	Isocratic HPLC-UV	C18	23	1.0-50.0 (1.00)	100	5-ethyl-5-p-tolylbarbital acid	14.0	Protein precipitation (methanol)	39, 22, 13, 36, 37, 33, 4, 6 47, 49
(20)	Isocratic HPLC-UV	C18	5, 23, 30	1.0-25.0 (0.05)	500	bromazepam	13.18	LLE (methyl-tert-butyl)	no
(32)	Isocratic HPLC-UV	C18	21, 23, 30, 45	1.0-40.0 (0.50)	250	chloramphenicol	4.9	LLE (ethylacetate)	3, 4, 6, 9, 12
(25)	Isocratic HPLC-UV	C18	21, 13, 23	2.0-40.0 (1.00)	500	4-methylprimidone	4.5	Protein precipitation (acetonitrile)	4-6, 7, 9, 10, 12, 16, 23, 25, 29-31, 33, 36, 42, 43, 45, 46
(26)	Isocratic HPLC-UV	C6	21, 23, 30	5.0-40.0 (0.06)	100	none	11	on-line drug extraction – column switching	2, 4, 7, 8, 14, 20, 25, 29, 34, 40

*Βλ. υπόμνημα στην επόμενη σελίδα

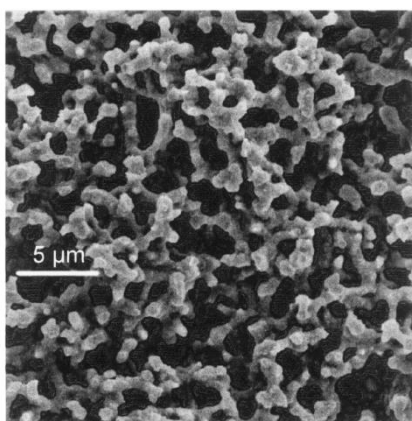
Υπόμνημα Πίνακα 1

1	Acetylsalicylic acid	18	Hydrochlorothiazide	35	Phenobarbital	52	Atorvastatin
2	Amitryptiline	19	Ibuprofen	36	Phenytoin	53	Ranitidine
3	Baclofen	20	Imipramine	37	Phenytoin metabolite	54	Pantoprazole
4	Carbamazepine	21	Ketoprofen	38	Pregabalin	55	Amoxicillin
5	Carbamazepine-10,11-diol	22	Lamotrigine	39	Primidone	56	Clavulanic
6	Carbamazepine-10,11-epoxide	23	Levetiracetam	40	Risperidone	57	Levosetirizine
7	Clobazam	24	Licarbazepine	41	Theophylline	58	Prednisolone
8	Clomipramine	25	Lorazepam	42	Tiagabine		
9	Clonazepam	26	Maprotiline	43	Topiramate		
10	Diazepam	27	Naproxen	44	Trazodone		
11	Eslicarbazepine acetate	28	Nicardipine	45	Valproate		
12	Ethosuximide	29	Nitrazepam	46	Vigapantin		
13	Felbamate	30	Norclobazam	47	Zonisamide		
14	Fluoxetine	31	Oxcarbazepine	48	Antiepileptics from patient serum		
15	Furosemide	32	Paracetamol	49	Commercial control MAS liquimmune		
16	Gabapentin	33	Pentobarbital	50	Lyphochek		
17	Clozapine	34	Antidementive drugs	51	Moni-Trol Controls		

6. Χρωματογραφία

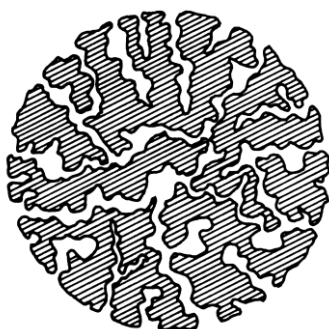
Το 1900 ο Ρώσος Mikhail Tsvet ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε τις αρχές της χρωματογραφίας και κατάφερε να διαχωρίσει τις χρωστικές των φυτών χλωροφύλλη, ξανθοφύλλη και καροτενοειδή από όπου και η τεχνική πήρε την ονομασία της.

Η χρωματογραφία είναι μια διαδικασία διαχωρισμού συστατικών ενός μείγματος χημικών ουσιών το οποίο οδηγείται διαμέσου δύο φάσεων εντός της χρωματογραφικής στήλης, τη στατική και την κινητή. (Εικόνα 7)



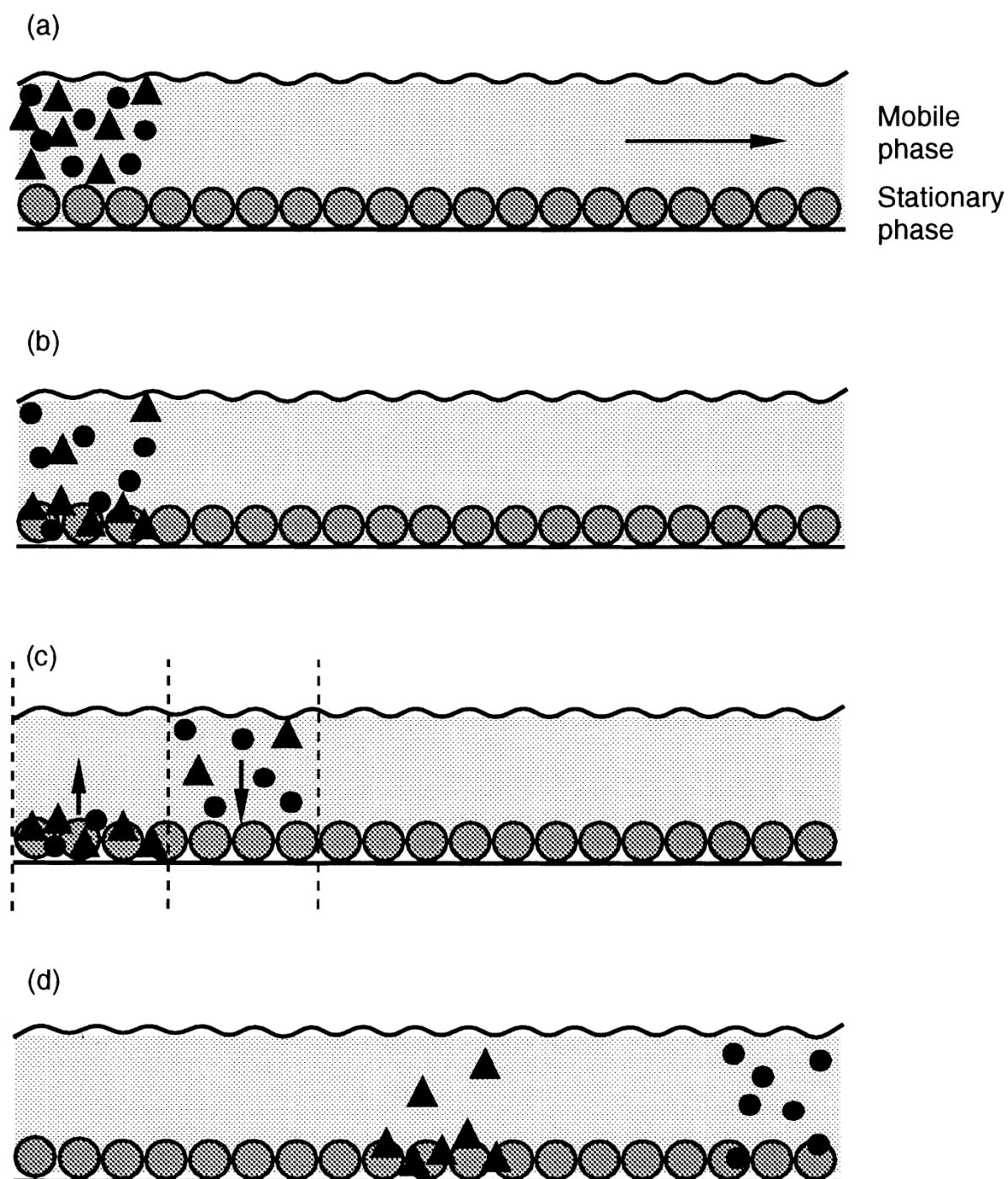
Εικόνα 7: Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία στατικής φάσης. Ανατύπωση από: Practical High Performance Liquid Chromatography, Veronica Meyer, 2004. (39)

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων της κάθε ουσίας με τις δύο φάσεις που οφείλεται στις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών. Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή, πορώδης ή να αποτελείται από μικρά σωματίδια ενεργού επιφανείας ενώ η κινητή φάση υγρή ή αέρια (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Πορώδης δομή σωματιδίου στατικής φάσης. Ανατύπωση από Practical High Performance Liquid Chromatography, Veronica Meyer, 2004. (39)

Μπορούμε να κατανοήσουμε καλύτερα τη χρωματογραφική στήλη εάν την αντιληφθούμε ως επαλληλία μικρότερων μονάδων γνωστών ως θεωρητικές πλάκες (theoretical plates). Το μείγμα προχωράει κατά μήκος της στατικής φάση όπου μια νέα κατάσταση ισορροπίας εγκαθίσταται σε κάθε επόμενη θεωρητική πλάκα. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, είναι δυνατόν να επιτευχθούν πιο σύνθετοι διαχωρισμοί (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Σχηματοποιημένη αναπαράσταση χρωματογραφικού διαχωρισμού. Ανατύπωση από Practical High Performance Liquid Chromatography, Veronica Meyer, 2004 (39)

Τύποι χρωματογραφικών μεθόδων

Ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης διακρίνονται διάφορα είδη χρωματογραφίας

- Χρωματογραφία στήλης
- Χρωματογραφία χάρτου
- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

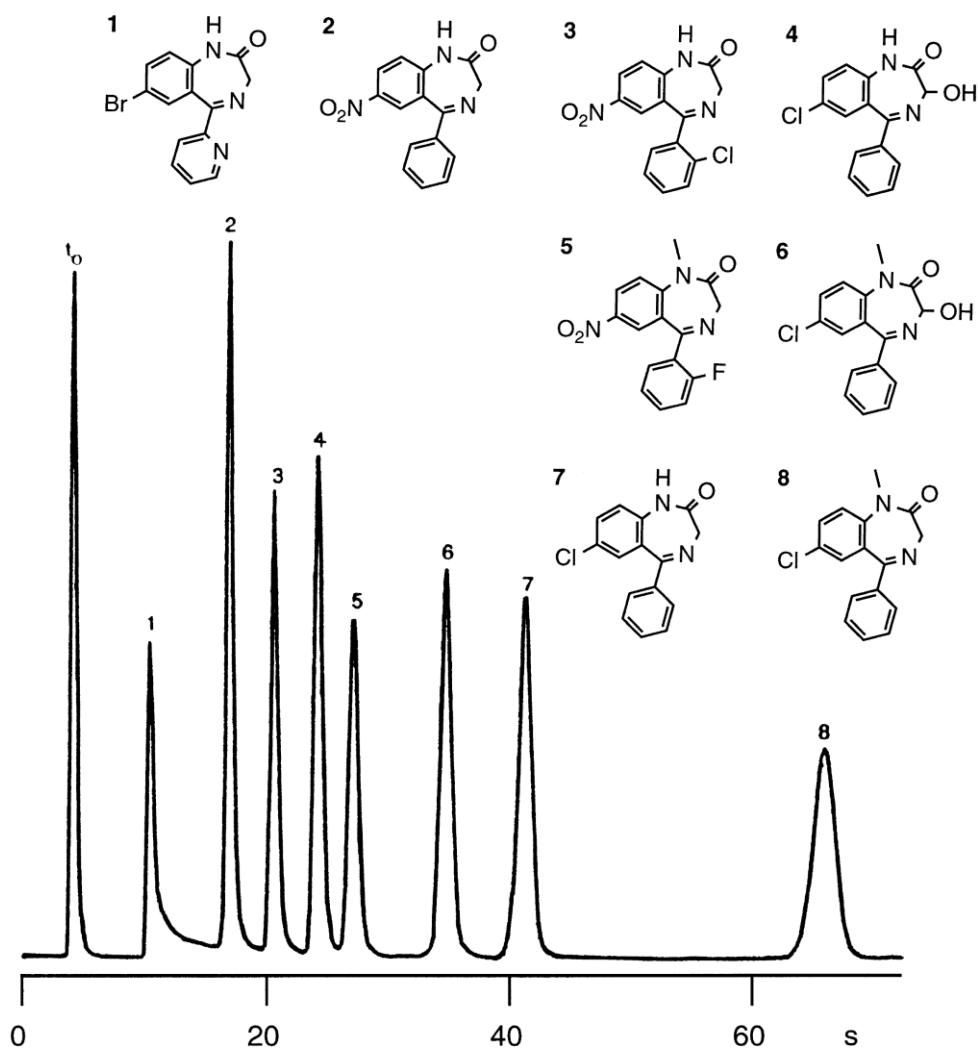
Ανάλογα με το είδος της κινητής φάσης διακρίνονται σε

- Υγρή χρωματογραφία (LC)
- Αέριος χρωματογραφία (GC)

Η υγρή χρωματογραφία μπορεί να διακριθεί σε

- Χρωματογραφία προσρόφησης
- Χρωματογραφία ανάστροφης φάσης
- Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής
- Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους
- Χρωματογραφία συγγένειας (affinity)

Μια ειδική κατηγορία χρωματογραφίας στήλης αποτελεί η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο διαχωρισμού μειγμάτων που περιέχουν μεγάλο αριθμό παρόμοιων προς ανάλυση χημικών ουσιών. Η εξαιρετική διαχωριστική της ικανότητα στηρίζεται στη χρήση πολύ μικρών σωματιδίων στη στατική φάση με αποτέλεσμα να απαιτείται υψηλή πίεση για τη διέλευση της κινητής φάσης διάμεσου της στήλης. Για το λόγο αυτό η κάποιες φορές η HPLC μπορεί να αναφέρεται ως high-pressure liquid chromatography - υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσεως. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC χρησιμοποιείται συχνά ως αναλυτική μέθοδος για την ανάπτυξη και πιστοποίηση δοκιμασιών προσδιορισμού φαρμακευτικών προϊόντων και ουσιών. Παρακάτω παρουσιάζεται ο διαχωρισμός μείγματος 8 βενζοδιαζεπινών σε 70 δευτερόλεπτα (Εικόνα 10). Το παράδειγμα αυτού του διαχωρισμού είναι ενδεικτικό της ικανότητας της HPLC να παρέχει ικανοποιητικό διαχωρισμό σε σύντομο χρονικό διάστημα. Χρωματογραφήματα σαν αυτό της Εικόνας 10 παρέχουν άμεσα ποσοτικές και ποιοτικές πληροφορίες. Κάθε ουσία διακρίνεται και χαρακτηριστικό χρόνο έκλουσης υπό σταθερές χρωματογραφικές συνθήκες.



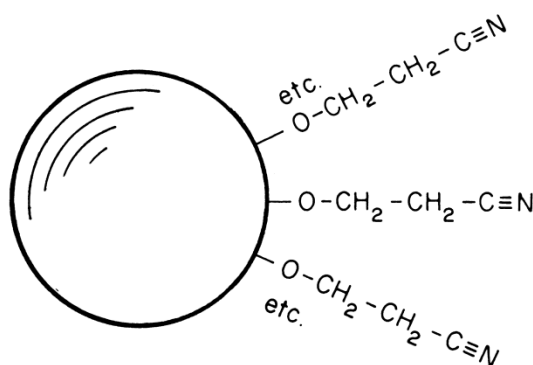
Εικόνα 10: Χρωματογραφικός διαχωρισμός οχτώ βενζοδιαζεπινών σε 70 δευτερόλεπτα. Με HPLC ανάστροφης φάσης. 1 βρωμαζεπάμη; 2 νιτραζεπάμη; 3 κλοναζεπάμη; 4 οξαζεπάμη; 5 φλουνιτραζεπάμη; 6 δροξυδιαζεπάμη; 7 δεσμεδιαζεπάμη; 8 διαζεπάμη Ανατύπωση από Practical High Performance Liquid Chromatography, Veronica Meyer, 2004. (29)

Τόσο το ύψος της κάθε κορυφής όσο και το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη είναι δηλωτικά της ποσότητας της κάθε ουσίας.

Πολυάριθμοι υπότυποι HPLC ανευρίσκονται στη βιβλιογραφία για το διαχωρισμό ουσιών διαφορετικής φύσεως. Στην κλασική HPLC χρησιμοποιείται ως στατική φάση ένα σχετικά πολικό υλικό, συχνότερα το πυρίτιο και λιγότερο συχνά ο άργιλος και το οξείδιο του μαγνησίου. Η κινητή φάση είναι σχετικά μη πολική. Στην κλασική HPLC τα πολικά συστατικά εκλούνται πιο αργά από τα μη πολικά.

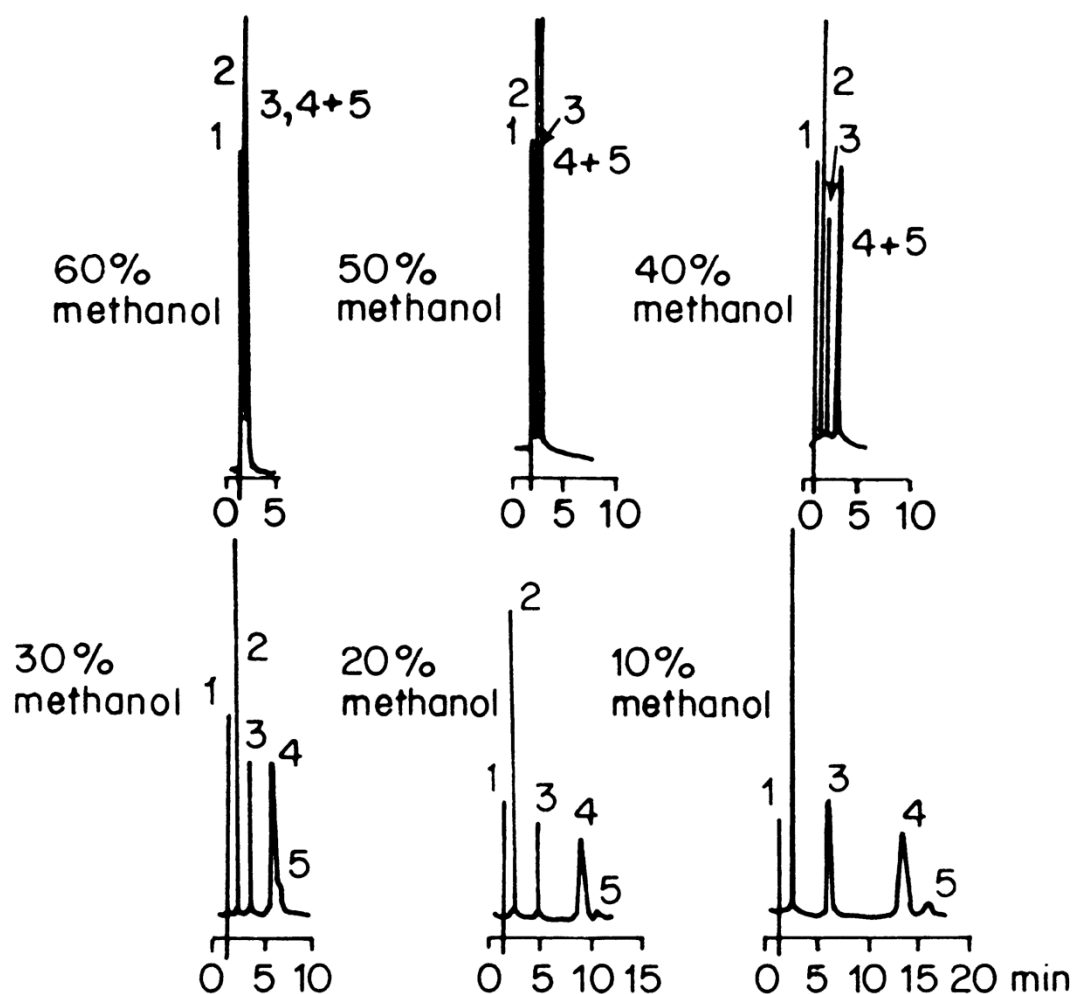
Σε αντίθεση με την κλασική HPLC, η HPLC αναστροφής φάσης χαρακτηρίζεται από έντονα μη πολική στατική φάση, ενώ η κινητική φάση είναι σχετικά πολική. Τα μη πολικά

συστατικά εκλούνται αργότερα από τα πολικά. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό του υδατικού διαλύτη στην κινητή φάση HPLC ανάστροφης φάσης, τόσο αυξάνεται ο χρόνος κατακράτησης. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στήλη HPLC ανάστροφης φάσης είναι το Octadecylsilane (ODS) όπου κανονικά αλκανία με 18 άτομα άνθρακα δεσμεύονται στην υδροξυλομάδα του πυριτίου της στατικής φάσης (Εικόνα: 11). Προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος με τη διαδικασία της HPLC ανάστροφης φάσης επιχειρούνται διάφορες χρωματογραφικές δοκιμές με διαφορετική κάθε φορά σύσταση της κινητής φάσης.



Εικόνα 11: Επιφάνεια σωματιδίου πλήρωσης χρωματογραφικής στήλης ανάστροφης φάσης όπου απεικονίζεται η πρόσδεση αλκανίων στις υδροξυλομάδες του πυριτίου. Ανατύπωση από Practical High Performance Liquid Chromatography, Veronica Meyer, 2004. (39)

Για να περιοριστεί ο αριθμός των χρωματογραφικών δοκιμών πρέπει να εξεταστούν οι παράγοντες εκείνοι που πιθανότατα θα επηρεάσουν περισσότερο τη μέθοδο, όπως για παράδειγμα η φύση του κάθε αναλύτη. Είναι σαφές πως οι παράμετροι της κινητής φάσης μπορούν να τροποποιηθούν πολύ ευκολότερα από αυτούς της στατικής όπως φαίνεται και στο παρακάτω παράδειγμα (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Η επίδραση της σύστασης της κινητής φάσης κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό στην HPLC ανάστροφης φάσης. Διαχωρισμός (2) βενζολίου, (3) χλωροβενζολίου, (4) διχλωροβενζολίου, (5) ιωδοβενζολίου, (1) μέτωπο διαλύτη. Ανατύπωση από Practical High Performance Liquid Chromatography, Veronica Meyer, 2004 (29)

Η θερμοκρασία

Η επίδραση της θερμοκρασίας στον χρωματογραφικό διαχωρισμό δεν είναι σαφής. Η θερμοκρασία της κινητής φάσης παίζει μικρό ρόλο στο διαχωρισμό των ουσιών. Αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί κατά κύριο λόγο σε αύξηση της απόδοσης της στήλης (επιτάχυνση της χρωματογραφικής ανάλυσης) λόγω μείωσης του ιξώδους της κινητής φάσης. Παρόλα αυτά, υπάρχει πιθανότητα η αύξηση της θερμοκρασίας να προκαλέσει μείωση της απόδοσης. Η διαχωριστική ικανότητα μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί αναλόγως. Συνεπώς, για τη βελτιστοποίηση του κάθε πειράματος η κατάλληλη θερμοκρασία πρέπει να διερευνάται. Ένα πλεονέκτημα της αύξησης της θερμοκρασίας είναι η μείωση του χρόνου ανάλυσης γιατί γίνεται δυνατή η χρήση υψηλότερων ρυθμών ροής της κινητής φάσης.

Το pH

Στη χρωματογραφία αναστροφής φάσης, όσο λιγότερο πολικό είναι ένα μόριο τόσο ο χρόνος κατακράτησης του αυξάνεται. Ο ιονισμός ενός μορίου που είναι οξύ ή βάση το καθιστά πολικότερο ειδικά αν η ουσία προηγουμένως ήταν μη φορτισμένη με αποτέλεσμα να παρουσιάζει από δεκαπλάσια μέχρι και εικοσαπλάσια μείωση του χρόνου έκλουσης.

Καθώς το pH αυξάνεται, τα οξέα χάνουν ένα κατιόν υδρογόνου, ιονίζονται και ο χρόνος κατακράτησης τους μειώνεται διότι αλληλεπιδρούν εντονότερα με την κινητή φάση. Καθώς το pH μειώνεται, οι βάσεις προσλαμβάνουν ένα κατιόν υδρογόνου, ιονίζονται και ο χρόνος κατακράτησης τους μειώνεται διότι αλληλεπιδρούν εντονότερα με την κινητή φάση.

Για τη σταθεροποίηση του pH της κινητής φάσης χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία πρέπει είναι της υψηλότερης δυνατών καθαρότητας και η συγκέντρωση τους μεγαλύτερη από 20 mM για να παρουσιάζουν ικανοποιητική ρυθμιστική ικανότητα. Η αποδοτικότερη τιμή του pH ανευρίσκεται με δοκιμές στην πράξη.

Ανιχνευτές

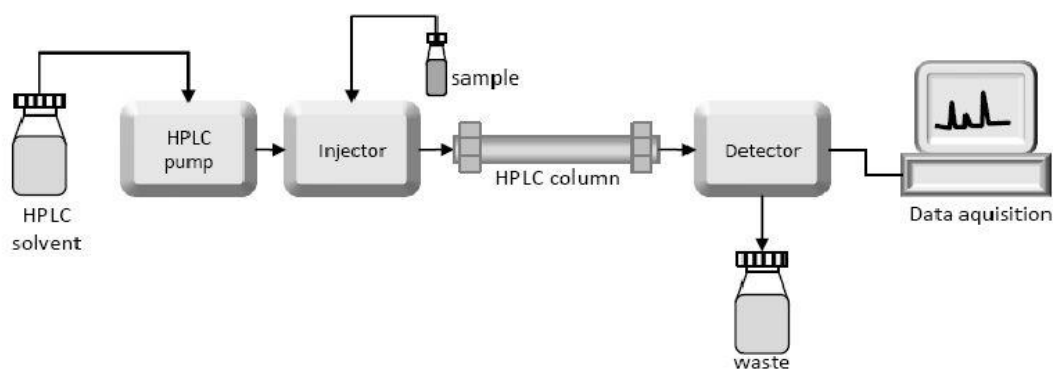
Ένας ανιχνευτής πρέπει να είναι ικανός να αναγνωρίζει πότε η ζώνη μια ουσίας εκλύεται από τη στήλη (Εικόνα 13). Για το λόγο αυτό, πρέπει να παρακολουθεί τις αλλαγές στη σύσταση της κινητής φάσης, να τις μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα και να τις μεταφέρει στον καταγραφέα ή την οθόνη του υπολογιστή. Εκεί το ηλεκτρικό σήμα εμφανίζεται ως

απόκλιση από τη βασική γραμμή. Ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας στην HPLC χρησιμοποιούνται διάφοροι ανιχνευτές όπως:

- Ανιχνευτές υπεριώδους UV
- Ανιχνευτές υπέρυθρου
- Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (refractive index)
- Ανιχνευτές φθορισμού (fluorescence)
- Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές
- Ανιχνευτές αγωγιμότητας
- Ανιχνευτές φασματοσκοπίας μάζας.

Οι πιο κοινώς χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι οι ανιχνευτές υπεριώδους. Παρέχουν ικανοποιητική ευαισθησία με μεγάλο εύρος γραμμικής απόκρισης και δεν επηρεάζονται σημαντικά από τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καταγραφή ενώσεων που απορροφούν στο υπεριώδες ή το ορατό φως.

Κατά την ανίχνευση στο υπεριώδες, για την επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής ευαισθησίας, πρέπει να επιλέγεται το μέγιστο δυνατό μήκος κύματος (λ_{\max}) στο οποίο απορροφά η ουσία ώστε όλα τα στοιχεία του δείγματος που περιέχουν χρωμοφόρα να ανιχνεύονται. (39)



Εικόνα 13: Τυπικός εξοπλισμός χρωματογραφικής διάταξης. Ανατύπωση από <http://www.westonaprice.org>

7. Πιστοποίηση μεθόδων

Η πιστοποίηση των αναλυτικών μεθόδων είναι απαραίτητη για την επίτευξη αξιόπιστων φαρμακευτικών αναλύσεων και περιλαμβάνει σαφές πρωτόκολλο και τεκμηριωμένα αποδεικτικά στοιχεία που διασφαλίζουν πως η αναλυτική μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί είναι και η καταλληλότερη.

Ο Οργανισμός Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων των ΗΠΑ (FDA), η Φαρμακοποιία των ΗΠΑ (USP) καθώς και η Ευρωπαϊκή Υπηρεσία Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) αναφέρονται στις κατευθυντήριες οδηγίες για την πιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων που εισήχθησαν κατά τη Διεθνή Διάσκεψη για την Εναρμόνιση Τεχνικών Απαιτήσεων Φαρμακευτικών Ουσιών για Ανθρώπινη Χρήση (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use – ICH, 1990). Οι προτεινόμενες οδηγίες του FDA προϋποθέτουν ότι οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τεκμήρια για την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα την ειδικότητα και την ευαισθησία καθώς και άλλα χαρακτηριστικά όπως το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης, το όριο ανίχνευσης, τη γραμμικότητα των πρότυπων καμπυλών, το εύρος ανάλυσης και η σταθερότητα των διαλυμάτων.

Πριν την πιστοποίηση της μεθόδου πρέπει να διασφαλιστεί ότι ο εξοπλισμός συντηρείται επαρκώς, είναι βαθμονομημένος και κατάλληλα σχεδιασμένος για το συγκεκριμένο πείραμα.

Γραμμικότητα της μεθόδου

Η γραμμικότητα μιας μεθόδου για το εύρος της ανάλυσης είναι η ικανότητά της να παράγει αποτελέσματα ευθέως ανάλογα της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα. Η καταλληλότητα της καμπύλης καθορίζεται, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, από τις τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης (regression coefficient - r^2), το σημείο τομής με τον άξονα των y (y-intercept) και από τον επανυπολογισμό των δειγμάτων βαθμονόμησης μέσω της εξίσωσης γραμμικής παλινδρόμησης.

Επιλογή εσωτερικού προτύπου (ΕΠ)

Όταν πρόκειται να αναλυθεί δείγμα που απαιτεί προκατεργασία χρησιμοποιείται η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου (ΕΠ) για την τελική ποσοτικοποίηση του αναλύτη. Το

εσωτερικό πρότυπο είναι μια ουσία παρόμοιας δομής, αλλά χρωματογραφικά διακριτή από τον αναλύτη. Η χρήση του εσωτερικού προτύπου μειώνει τη πιθανότητα τυχαίου σφάλματος της μεθόδου.

Ειδικότητα

Η ειδικότητα μιας μεθόδου αναφέρεται στην ικανότητα της να προσδιορίζει ικανοποιητικά τη συγκέντρωση του αναλύτη εν τη παρουσία όλων των άλλων πιθανών συστατικών του δείγματος (έκδοχα, προϊόντα αποδόμησης, προσμίξεις από την ίδια τη διαδικασία). Η ειδικότητα της μεθόδου ελέγχεται για πιθανές παρεμβολές τόσο από το βιολογικό υπόστρωμα του δείγματος (ούρα, ολικό αίμα, ορός, πλάσμα - matrix) όσο και από άλλα πιθανώς συγχωρηγούμενα φάρμακα.

Ευαισθησία

Η ευαισθησία της μεθόδου ορίζεται ως η μικρότερη συγκέντρωση της ουσίας που μπορεί να προσδιοριστεί με τη συγκεκριμένη μέθοδο εντός συγκεκριμένων ορίων ακρίβειας και επαναληψιμότητας τα οποία έχουν καθοριστεί από διεθνείς συμβάσεις. Ένα μέτρο της ευαισθησίας της μεθόδου αποτελεί η γωνία κλίσης της καμπύλης βαθμονόμησης. Όσο περισσότερο ευαίσθητη είναι μια μέθοδος, τόσο μεγαλύτερη γωνία κλίσης παρουσιάζει η καμπύλη βαθμονόμησης.

Ακρίβεια

Η ακρίβεια (accuracy) χαρακτηρίζει τη μέθοδο όταν αυτή είναι σε θέση να αποδώσει τη σωστή τιμή για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη. Η ακρίβεια μιας αναλυτικής μεθόδου αναφέρεται στο πόσο αποκλίνουν οι μετρηθείσες τιμές από τις πραγματικές. Ο απλούστερος τρόπος προσδιορισμού της ακρίβειας μιας αναλυτικής μεθόδου επιτυγχάνεται με την μέτρηση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης και σύγκριση του αποτελέσματος με τη γνωστή τιμή.

Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα (precision) αποτελεί το μέτρο του βαθμού στον οποίο η αναλυτική μέθοδος είναι αναπαραγωγίσιμη και εκφράζεται με τον εκατοστιαίο συντελεστή μεταβλητότητας (CV% - coefficient of variation). Ο συντελεστής αυτός προσδιορίζεται με το κλάσμα της τυπικής απόκλισης των μετρήσεων προς τη μέση τιμή αυτών, επί εκατό

$$\% CV = \frac{SD}{mean} \times 100$$

που ισοδυναμεί με τη σχετική τυπική απόκλιση (RSD).

Με άλλα λόγια απεικονίζει το βαθμό ευκολίας του χειριστή να παράγει τα ίδια αποτελέσματα χρησιμοποιώντας τα ίδια υλικά, με την ίδια μέθοδο τόσο την ίδια μέρα (intra day - εντός σειράς) όσο και σε διαφορετικές μέρες (inter day – μεταξύ σειρών) χρησιμοποιώντας τον ίδιο εξοπλισμό και αντιδραστήρια.

Η επαναληψιμότητα εντός σειράς (**intra-day**) αναφέρεται στον έλεγχο της λειτουργίας της μεθόδου εντός μικρού χρονικού διαστήματος δηλαδή διακύμανση υπό τις ίδιες συνθήκες εντός της ημέρας.

Ο προσδιορισμός της ακρίβειας μεταξύ σειρών (**inter-day**) αναφέρεται στον έλεγχο της λειτουργίας της μεθόδου σε χρονικό διάστημα περισσότερων ημερών, συνυπολογίζοντας πιθανές διαφορές εντός του εργαστηρίου όπως πχ τυχαία γεγονότα, διαφορετικό προσωπικό κλπ.

Προκατεργασία δειγμάτων

Η προκατεργασία των δειγμάτων περιλαμβάνει διήθηση, εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), εκχύλιση υγρού – υγρού (LLE), κατακρήμνιση πρωτεϊνών και αφαλάτωση. Οι διαδικασίες εκχύλισης πρέπει να είναι σε θέση να επιτρέπουν ικανοποιητική ανάκτηση του αναλύτη από το δείγμα αλλά ταυτόχρονα να μην προκαλούν διάσπαση της ουσίας πχ μέσω οξείδωσης ή υδρόλυσης. Επίσης οι διαδικασίες εκχύλισης πρέπει να παρουσιάζουν υψηλό βαθμό επαναληψιμότητας της ανάκτησης μεταξύ αντιγράφων που έχουν υποστεί την ίδια επεξεργασία. Η προετοιμασία των χημικών ενώσεων αναφοράς πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μην αλλοιώνεται η δραστηκότητά τους. Εάν η μέθοδος περιλαμβάνει

πυκνά διαλύματα τότε πρέπει να πιστοποιείται ότι τα διαλύματα δεν αποδομούνται όσο παραμένουν αποθηκευμένα.

Συνοπτικά, η πιστοποίηση της μεθόδου περιλαμβάνει μια σειρά βημάτων που καθορίζονται από τη φύση του προς ανάλυση δείγματος και περιλαμβάνουν την επιλογή χρωματογραφικής στήλης και ανιχνευτή, τη διάλυση και εκχύλιση του δείγματος, τον καθαρισμό και φιλτράρισμα, επιλογή σύστασης κινητής φάσης καθώς και εάν πρόκειται για ισοκρατική ή βαθμιδωτή έκλυση. Στη συνέχεια η μέθοδος πρέπει να ελεγχθεί για τις παραμέτρους: ακρίβεια, επαναληψιμότητα, ειδικότητα, γραμμικότητα καμπυλών, εύρος ανάλυσης, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης, σταθερότητα αναλυτικών διαλυμάτων, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ICH. (40) (41)

ΣΚΟΠΟΣ

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας απλής, ταχείας, ευαίσθητης και αξιόπιστης αναλυτικής μεθόδου για την ποσοτικοποίηση της λικαρβαζεπίνης σε δείγματα ορού. Για τον σκοπό αυτό:

- αναπτύχθηκε χρωματογραφική μέθοδος απομόνωσης της λικαρβαζεπίνης
- η μέθοδος πιστοποιήθηκε ως προς την ειδικότητα, ευαισθησία, ακρίβεια και επαναληψιμότητα
- τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου βελτιστοποιήθηκαν με έλεγχο πιθανής παρεμβολής πολλών συχνά συγχωρηγούμενων φαρμάκων με τη λικαρβαζεπίνη
- πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα ασθενών υπό χρόνια αγωγή με οξυκαρβαζεπίνη

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Χημικές ενώσεις και αντιδραστήρια

Η λικαρβαζεπίνη αγοράσθηκε από την Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom). Η ακετανιλίδα αποτελεί ευγενική χορηγία του Καθηγητή κ. Α. Μπενάκη. Το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη ήταν καθαρότητας HPLC και αγοράσθηκαν από την Chem-LabNV (Zedelgem, Belgium). Το δισόξινο φωσφορικό νάτριο και το φωσφορικό οξύ ήταν αναλυτικής καθαρότητας και αποκτήθηκαν από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Germany). Σε όλη την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε νερό καθαρότητας HPLC (ειδικής αντίστασης 18 MΩ·cm). Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η ακετανιλίδα.

Εξοπλισμός και χρωματογραφικές συνθήκες

Η χρωματογραφική ανάλυση της λικαρβαζεπίνης και του εσωτερικού προτύπου (ΕΠ), της ακετανιλίδης, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αντλία τύπου Marathon III (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα) εξοπλισμένης με ανιχνευτή τύπου FASMA 500 UV-Vis (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα).

Το μήκος κύματος του ανιχνευτή καθορίστηκε στα 210 nm, και η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος ήταν τύπου Rheodyne 7125 (Rheodyne LLC, Rohnert Park, CA, USA) με βρόχο όγκου 20 µL.

Βασική προϋπόθεση για τον καθορισμό του μήκους κύματος της ανίχνευσης είναι να παρουσιάζουν ικανοποιητική απορρόφηση τόσο η προς ανάλυση ουσία όσο και το εσωτερικό πρότυπο και ταυτόχρονα να μην υπάρχουν παρεμβολές από το βιολογικό υπόστρωμα (matrix) ή τη κινητή φάση.

Ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφική στήλη τύπου Kromasil 100 C₁₈ (μέγεθος σωματιδίων 5µm, διαστάσεων 250×4,6 mm I.D.; MZ-

Analysentechnik, Mainz, Germany). Η διάσταση των πόρων σύμφωνα με τον κατασκευαστή είναι 100 Å (Ångström) που ισοδυναμεί με 0,01 μm.

Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης στους 30°C με την χρήση θερμοστάτη στήλης (Lab Alliance, State College, PA, US).

Η κινητή φάση αποτελούνταν από μείγμα 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου (pH 4.0)-ακετονιτριλίου, σε αναλογία όγκων 70/30 (v/v). Η κινητή φάση διηθήθηκε με συσκευή κενού Alltech (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA), και τη χρήση φίλτρου με διάσταση πόρων 0,2 μm. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ο διαλελυμένος στην κινητή φάση αέρας απομακρύνονταν συνεχώς με σύστημα απαέρωσης συνδεδεμένο εν σειρά με την λοιπή διάταξη (ERC Inc., Kawaguchi City, Japan). Η κινητή φάση διοχετεύονταν στη χρωματογραφική στήλη ισοκρατικά με ταχύτητα ροής 0,8 ml/min.

Για την πρόσληψη και ανάλυση των χρωματογραφικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Chrom&Spec (Ampersand Ltd, Moscow, Russia).

Προετοιμασία προτύπων διαλυμάτων

Πυκνά διαλύματα λικαρβαζεπίνης (1mg/mL) και ΕΠ (20μg/mL) παρασκευάστηκαν σε διάλυμα μεθανόλης 100% και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Πρότυπα διαλύματα ορού (matrix calibrators) παρασκευάστηκαν στις κατάλληλες συγκεντρώσεις για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης και του ποιοτικού ελέγχου με την προσθήκη πυκνού διαλύματος, κατάλληλα αραιωμένου, σε ορό υγιών εθελοντών που δεν περιείχε το φάρμακο.

Προκατεργασία δειγμάτων ορού

250 μL του διαλύματος ΕΠ (20 μg/ml) προστέθηκαν στάγδην σε δείγματα ορού όγκου 100 μL που προέρχονταν από ασθενείς υπό αγωγή με οξυκαρβαζεπίνη καθώς και σε πρότυπα δείγματα βαθμονόμησης (spiked calibrators) και δείγματα ποιοτικού ελέγχου.

Τα δείγματα ανακινήθηκαν ισχυρά (30"), αφέθηκαν σε ηρεμία (5') και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν (13,000 rpm, 10', 4°C). Τέλος, 20 μL από το υπερκείμενο υγρό εγχύθηκαν στην χρωματογραφική στήλη.

Πιστοποίηση της μεθόδου

Η απόδοση της μεθόδου ελέγχθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες περί Good Lab Practice του US Department of Health and Human Services for Food and Drug Administration, 1998 και αφορούσε στον έλεγχο της γραμμικότητας απόκρισης του ανιχνευτή, της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας των μετρήσεων, της ειδικότητας και της ευαισθησίας της μεθόδου (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Παράμετροι πιστοποίησης της μεθόδου σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες περί Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (Good Lab Practice).

Παράμετροι πιστοποίησης της μεθόδου.	
Ακρίβεια	Accuracy
Επαναληψιμότητα	Precision (Repeatability)
Ειδικότητα	Specificity
Γραμμικότητα απόκρισης ανιχνευτή	Linearity of detector response
Εύρος ανάλυσης	Analytical range
Όριο ανίχνευσης	Detection limit
Όριο ποσοτικοποίησης	Quantitation limit
Σταθερότητα αναλυτικών διαλυμάτων	Stability of analytical solutions

Ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση της λικαρβαζεπίνης καθορίσθηκε με την σύγκριση του εμβαδού της κορυφής που προήλθε από δείγματα ορού με προκαθορισμένες συγκεντρώσεις λικαρβαζεπίνης (2,5, 15,0 and 40,0 $\mu\text{g/mL}$) που αναλύθηκαν με την παρούσα μέθοδο και του εμβαδού της κορυφής από πρότυπα διαλύματα της λικαρβαζεπίνης στις αυτές συγκεντρώσεις. Μέθοδοι με αυξημένες ανακτήσεις ουσιών εξασφαλίζουν αυξημένη ευαισθησία στον προσδιορισμό της ουσίας.

Γραμμικότητα των καμπύλης βαθμονόμησης και εύρος ανάλυσης

Μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευάστηκε προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την γραμμική σχέση μεταξύ του εμβαδού της κορυφής της λικαρβαζεπίνης προς το εμβαδόν του ΕΠ [$E_{(\text{λικαρβαζεπίνης})}/E_{(\text{ΕΠ})}$] και της συγκέντρωσης του φαρμάκου στα δείγματα. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του ICH απαιτούνται τουλάχιστον 5 δείγματα βαθμονόμησης διαφορετικών συγκεντρώσεων που να καλύπτουν κατάλληλο εύρος τιμών που να υπερκαλύπτει το θεραπευτικό εύρος.

Τα δείγματα βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν με προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων φαρμάκου σε ορό ατόμου στο οποίο δεν είχε χορηγηθεί φάρμακο (blank matrix). Ως εκ τούτου, προέκυψαν επτά δείγματα βαθμονόμησης συγκεντρώσεων 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 20,0 και 50,0 $\mu\text{g/mL}$) καθένα από τα οποία αναλύθηκε εις διπλούν.

Στην πρότυπη καμπύλη εφαρμόστηκε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης. Η καταλληλότητα της καμπύλης καθορίζεται, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, από τις τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης (regression coefficient - r^2), σημείο τομής με τον άξονα των y (y -intercept) και από τον επανυπολογισμό των δειγμάτων βαθμονόμησης μέσω της εξίσωσης. (European Medicines Agency)

Ακρίβεια και επαναληψιμότητα

Τρία δείγματα ποιοτικού ελέγχου (quality control samples) με χαμηλή (2,5 $\mu\text{g/mL}$), μέτρια (15,0 $\mu\text{g/mL}$) και υψηλή (40,0 $\mu\text{g/mL}$) συγκέντρωση λικαρβαζεπίνης παρασκευάστηκαν μετά από προσθήκη κατάλληλα αραιωμένου πυκνού διαλύματος λικαρβαζεπίνης σε ορό ατόμου στο οποίο δεν είχε χορηγηθεί φάρμακο (spiked drug free serum samples).

Στην παρούσα μελέτη, η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα εντός σειράς (**intra-day**) ελέγχθηκε με πέντε αντίγραφα καθενός από τα τρία δείγματα ποιοτικού ελέγχου. Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα μεταξύ σειρών (**inter-day**) ελέγχθηκε με ένα αντίγραφο καθενός από τα τρία δείγματα ποιοτικού ελέγχου που αναλύθηκε σε πέντε διαφορετικές ημέρες.

Η συγκέντρωση κάθε δείγματος ποιοτικού ελέγχου υπολογίστηκε εκ νέου από την εξίσωση της γραμμικής παλινδρόμησης.

Η ακρίβεια της μεθόδου ορίσθηκε ως % απόκλιση (bias %) και υπολογίσθηκε από την εκατοστιαία διαφορά μεταξύ της μετρηθείσας έναντι της γνωστής συγκέντρωσης κάθε δείγματος σε σχέση με την γνωστή συγκέντρωση:

$$\% Bias = 100 \times \frac{\text{μετρηθείσα συγκέντρωση} - \text{γνωστή συγκέντρωση}}{\text{γνωστή συγκέντρωση}}$$

Η εκτροπή από την επαναληψιμότητα (**imprecision**) υπολογίστηκε από τον εκατοστιαίο συντελεστή διακύμανσης (% Coefficient of variation - CV%) βάσει του τύπου

$$\% CV = \frac{SD}{mean} \times 100$$

Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (low limit of quantitation, LLOQ) και όριο ανιχνευσιμότητας (limit of detection, LOD)

Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου καθορίστηκε ως η ελάχιστη ποσότητα φαρμάκου που μπορούσε να προσδιορισθεί σε δείγμα κατ' επανάληψη και ταυτόχρονα παρουσιάζει ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα (μεγαλύτερη του 80%, ή αλλιώς με απόκλιση <20%).

Το όριο ανιχνευσιμότητας περιγράφει τη μικρότερη δυνατή συγκέντρωση αναλύτη που μπορεί να εντοπιστεί σε ένα δείγμα και καθορίστηκε ως η συγκέντρωση του φαρμάκου με λόγο σήματος/θορύβου ίσο με 3.

Δείγματα ασθενών

Δείγματα αίματος ελήφθησαν από ασθενείς υπό αγωγή οξυκαρβαζεπίνης ως μέρους του θεραπευτικού τους πρωτοκόλλου.

Η μελέτη έλαβε έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής του Επιστημονικού Συμβουλίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας (αριθμός έγκρισης 250116/3834). Όλοι οι ασθενείς που συμμετείχαν στην μελέτη έδωσαν την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους. Το ερευνητικό πρωτόκολλο υλοποιήθηκε σύμφωνα με τη διακήρυξη της Παγκόσμιας Ιατρικής Εταιρείας στο Ελσίνκι σχετικά με ζητήματα ηθικής κατά την έρευνα σε ανθρώπους.

Η συλλογή των δειγμάτων αίματος έγινε σε σωληνάρια τύπου BDSSTII (BD, Plymouth, UK). Ο ορός που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη προήλθε από δείγματα αίματος που φυγοκεντρήθηκαν σε 3500 rpm για 10'. Τα δείγματα ορού τα οποία δεν αναλύθηκαν αμέσως αποθηκεύθηκαν στους -20 °C.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος SPSS (έκδοση 21.0). Η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης προσδιορίστηκε από ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης. Η συσχέτιση μεταξύ ημερήσιας δόσης οξυκαρβαζεπίνης και επιπέδων λικαρβαζεπίνης στον ορό ασθενών ελέγχθηκε βάσει του συντελεστή Pearson και οποιαδήποτε συσχέτιση με τιμή $p:0.05$ θεωρήθηκε σημαντική.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επιλογή εσωτερικού προτύπου

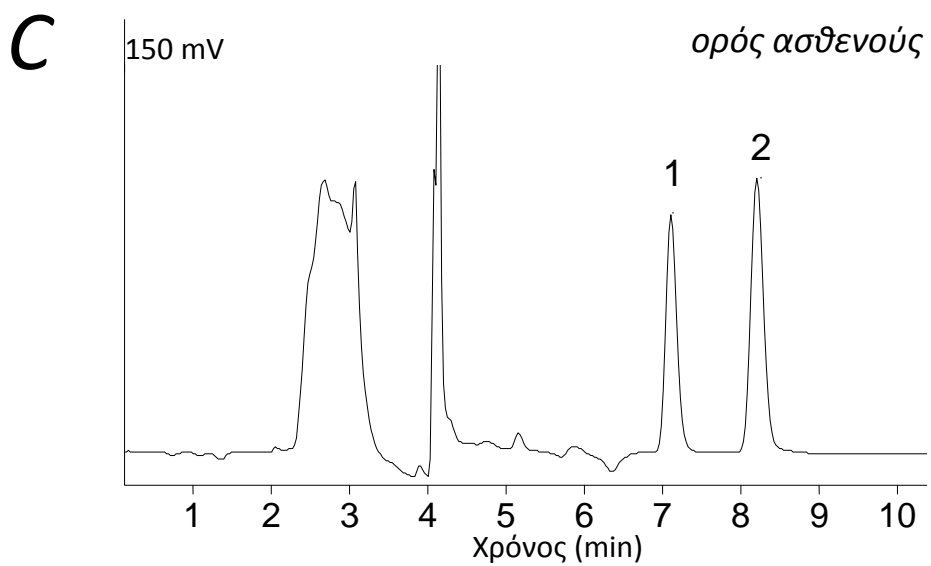
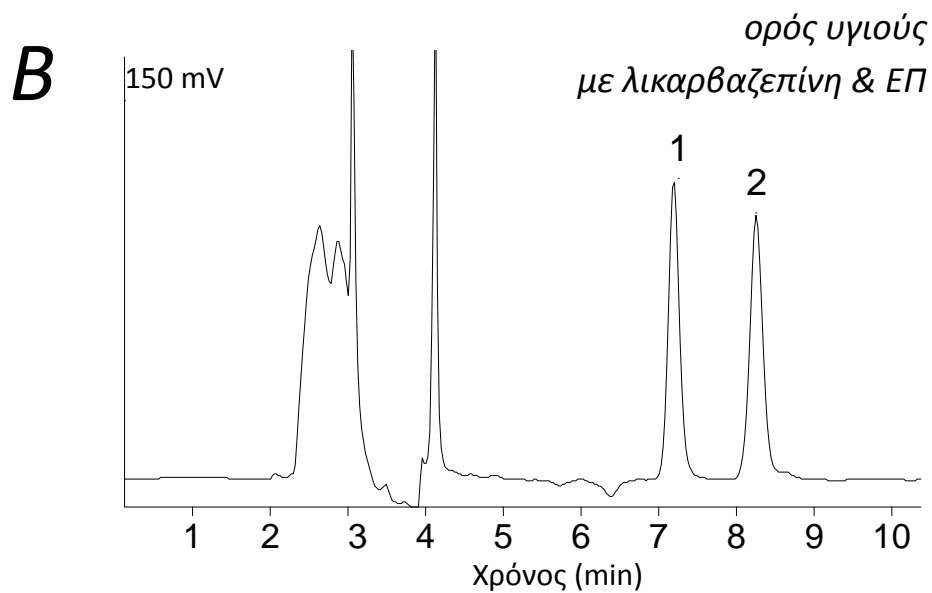
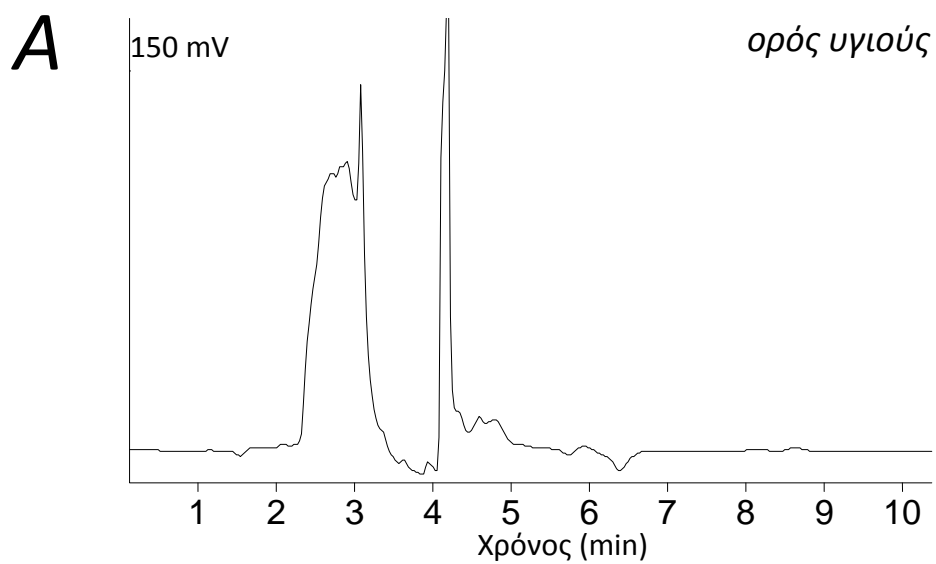
Διάφορες ουσίες ελέγχθηκαν για την πιθανότητα χρησιμοποίησής τους ως εσωτερικό πρότυπο όπως η αμινοφenaζόνη, η ακετανιλίδη, η δεξτρομεθορφάνη, η πεντοβαρβιτάλη και η βαρβιτάλη. Εξ αυτών επιλέχθηκε η χρήση της ακετανιλίδης ως εσωτερικό πρότυπο καθώς παρουσίασε τον καλύτερο διαχωρισμό σε σχέση με τη λικαρβαζεπίνη και τα άλλα πιθανώς συγχορηγούμενα φάρμακα. Ένας επιπλέον λόγος επιλογής της είναι το γεγονός πως η ουσία δεν αποτελεί φάρμακο και συνεπώς αποκλείεται η πιθανότητα συγχορήγησής της σε ασθενείς υπό αγωγή με οξυκαρβαζεπίνη.

Πιστοποίηση της μεθόδου

Ειδικότητα

Η ειδικότητα της μεθόδου καθορίστηκε από την ανάλυση δειγμάτων ορού που προήλθαν από υγιείς εθελοντές ($n=6$). Στην Εικόνα 14 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα από (Α) δείγμα ορού υγιούς εθελοντή (Β) δείγμα ορού υγιούς στο οποίο προστέθηκαν 20.0 $\mu\text{g/mL}$ λικαρβαζεπίνης και ΕΠ (spiked sample) και (Γ) ορός ασθενούς υπό θεραπεία με οξυκαρβαζεπίνη που συλλέχθηκε λίγο πριν τη χορήγηση της επόμενης δόσης (trough). Η λικαρβαζεπίνη και το ΕΠ ανιχνεύθηκαν στα $7,23 \pm 0,12$ min και στα $8,23 \pm 0,08$ min, αντίστοιχα ($n=40$). Δεν παρατηρήθηκε καμιά χρωματογραφική παρεμβολή από ενδογενή ουσία (Εικόνα:14 Α).

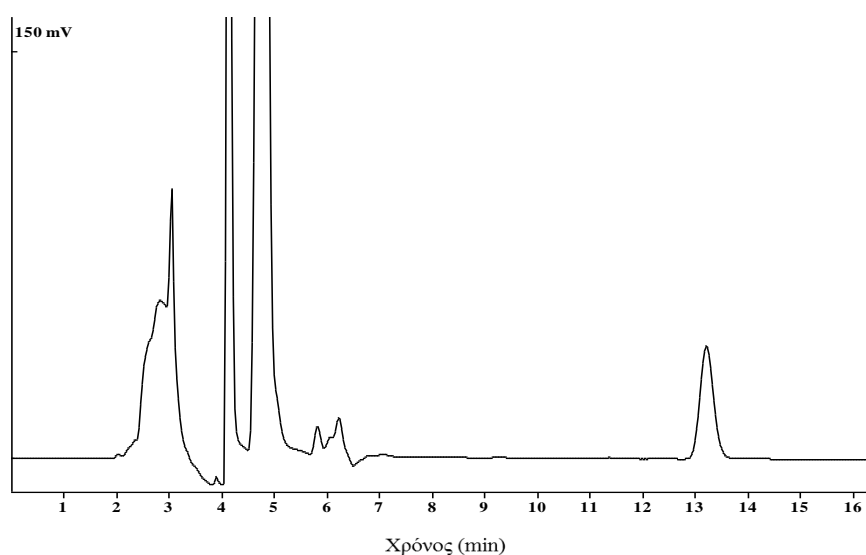
Εικόνα14: Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα HPLC: (Α) Ορός υγιούς ατόμου. (Β) Ορός υγιούς ατόμου στον οποίο προστέθηκαν λικαρβαζεπίνη (20 $\mu\text{g/mL}$) και το εσωτερικό πρότυπο (ΕΠ). (C) Ορός ασθενούς ο οποίος βρίσκεται υπό αγωγή με οξυκαρβαζεπίνη (3x600 mg ημερησίως). Η προσδιορισθείσα συγκέντρωση λικαρβαζεπίνης στον ορό του ασθενούς είναι 16,79 $\mu\text{g/mL}$. 1=λικαρβαζεπίνη, 2=ΕΠ (ακετανιλίδη, 20 $\mu\text{g/mL}$). (38)



Πιθανές χρωματογραφικές παρεμβολές από συχνά συγχρησιμοποιούμενα φάρμακα ελέγχθηκαν μετά από ανάλυση δείγματος ανθρώπινου ορού ελέγχου που περιείχε 40 δραστικές ουσίες (Bio-Rad Lymphocheck TDM) των συχνότερα συνταγογραφούμενων φαρμάκων όπως αντιεπιληπτικά, αντιβιοτικά, αντικαταθλιπτικά, ανοσοκατασταλτικά και διάφορα άλλα φάρμακα όπως ακεταμινοφαίνη, καφεΐνη και σαλικυλικά (Πίνακας 3). Χρωματογραφικές παρεμβολές δεν παρατηρήθηκαν στο χρόνο έκλουσης της λικαρβαζεπίνης και του ΕΠ (Εικόνα 15).

Πίνακας 3: Δείγμα ανθρώπινου ορού (BIORAD-Lyphocheck TDM) που περιέχονται 40 δραστικές των συχνότερα συνταγογραφούμενων φαρμάκων.

BIORAD: Lyphocheck® Therapeutic Drug Monitoring Control (TDM)			
Acetaminophen	Digoxin	Methotrexate	Quinidine
Amikacin	Disopyramide	N-Acetylprocainamide	Salicylate
Amiodarone	Estriol	(NAPA)	T3
Amitriptyline	Ethosuximide	Netilmicin	T4
Caffeine	Flecainide	Nortriptyline	Theophylline
Carbamazepine	Gentamicin	Phenobarbital	Tobramycin
Chloramphenicol	Haloperidol	Phenytoin	Tricyclic Antidepressants
Cortisol	Imipramine	Primidone	TSH
Cyclosporine	Lidocaine	Procainamide	Valproic Acid
Desipramine	Lithium	Propranolol	Vancomycin



Εικόνα 15: Χρωματογράφημα HPLC του BIORAD–Lyphocheck TDM που περιέχει 40 δραστικές ουσίες των συχνότερα συνταγογραφούμενων φαρμάκων (βλ. πίνακα 3). Δεν παρατηρούνται χρωματογραφικές παρεμβολές στα χρονικά σημεία έκλουσης της λικαρβαζεπίνης (7,23 min) και του ΕΠ ακετανιλίδης (8,23 min).

Εξετάσθηκαν, επίσης, 7 πρόσθετες ουσίες που δεν περιλαμβάνονταν στο πρότυπο δείγμα ελέγχου, τουτέστιν, ατορβαστατίνη, ρανιτιδίνη, παντοπραζόλη, λεβοσετιριζίνη, πρεδνιζολόνη και αμοξυκιλλίνη με κλαβουλανικό οξύ. Κανένα από τα φάρμακα αυτά δεν εκλούσθηκε στο χρονικό διάστημα από 4 έως 14 min και ως εκ τούτου δεν παρεμβαίνουν με τον χρόνο έκλουσης της λικαρβαζεπίνης και του ΕΠ.

Πλέον των ως άνω φαρμάκων, εξετάσθηκαν για χρωματογραφικές παρεμβολές 18 άλλα εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα που συνταγογραφούνται σε ασθενείς με διαταραχές του συναισθήματος. Στα φάρμακα αυτά περιλαμβάνονταν αντιψυχωσικά, αντικαταθλιπτικά και εκείνα τα αντιεπιληπτικά που έχουν εγκριθεί ως σταθεροποιητές του συναισθήματος στις συναισθηματικές διαταραχές (Πίνακας 4). Καμία από όλες τις ουσίες που ελέγχθηκαν δεν παρουσίασε χρωματογραφική παρεμβολή με την λικαρβαζεπίνη ή το ΕΠ. Οι ουσίες που παρουσίασαν χρόνο έκλουσης παρόμοιο με την λικαρβαζεπίνη ή το ΕΠ, ήταν η **παλιπεριδόνη** η οποία εκλούσθηκε στα 6,58 min (χρόνος έκλουσης πλησίον της λικαρβαζεπίνης) και η **ρισπεριδόνη** η οποία εκλούσθηκε στα 8,76 min (χρόνος έκλουσης πλησίον του ΕΠ). Η παλιπεριδόνη και η ρισπεριδόνη παρουσίασαν συντελεστές διαχωρισμού από τη λικαρβαζεπίνη ή το ΕΠ 2,96 και 1,47, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν επαρκή διαχωρισμό των φαρμάκων αυτών παρά την εγγύτητα των χρόνων έκλουσής τους με τη λικαρβαζεπίνη ή το ΕΠ. Τέλος, εξετάσθηκε η οξυκαρβαζεπίνη χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα και προσδιορίσθηκε ο χρόνος έκλουσής της στα 13,60 min (Εικόνα 16). Συνολικά ελέγχθηκαν χρωματογραφικές παρεμβολές από 65 συχνά συγχορηγούμενα φάρμακα.

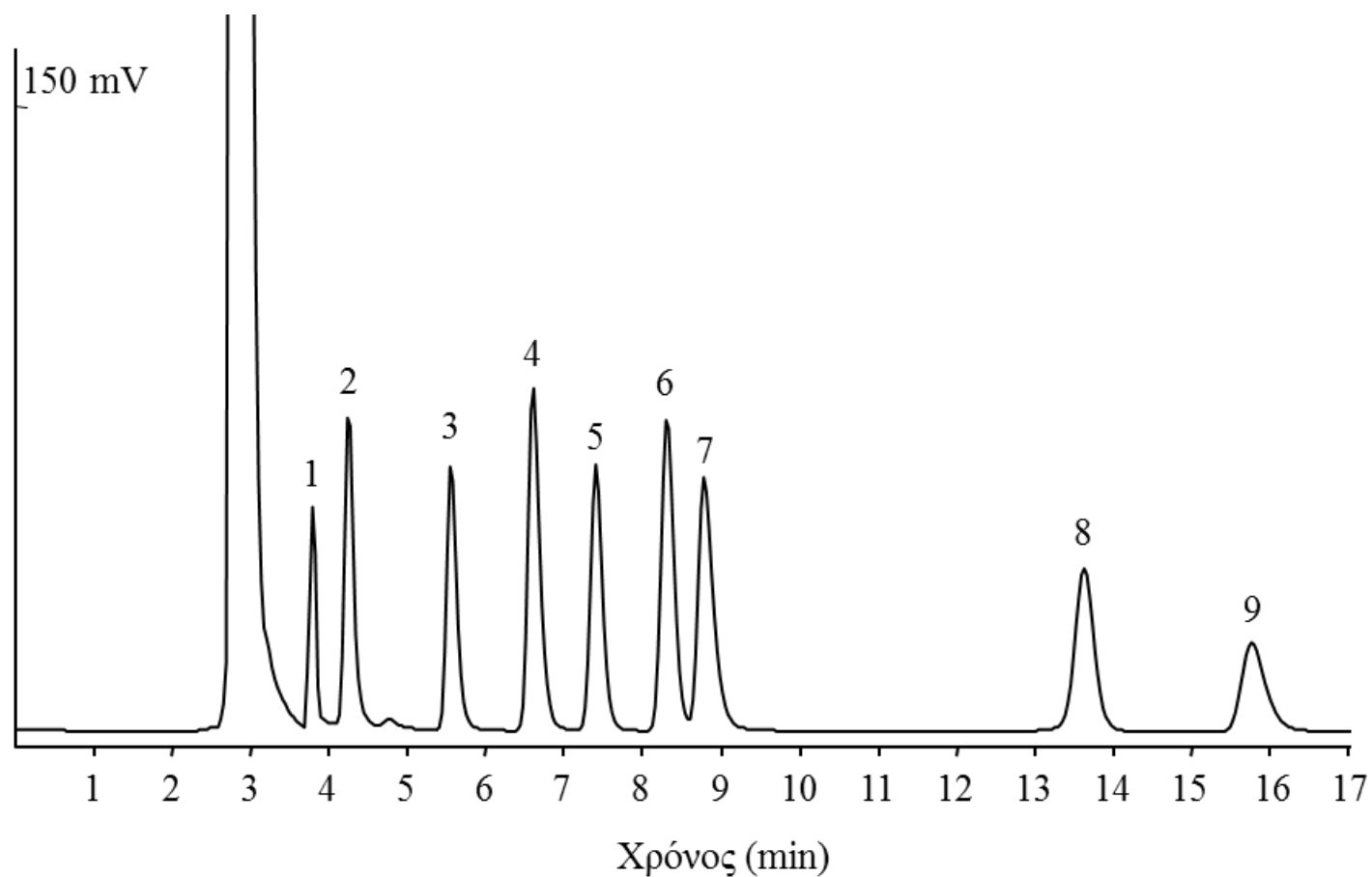
Ανάκτηση

Η ανάκτηση της λικαρβαζεπίνης από τα δείγματα ορού ήταν $104,52 \pm 7,09\%$ (2,5 µg/mL, n=9), $99,49 \pm 4,59\%$ (15,0 µg/mL, n=9) και $102,04 \pm 1,43$ (40,0 µg/mL, n=9). Ο μέσος όρος ανάκτησης του ΕΠ ήταν $99,46 \pm 2,59\%$ (n=27).

Πίνακας 4. Χρόνος κατακράτησης και παράγοντες διαχωρισμού αντισπασμωδικών, αντιψυχωσικών και αντικαταθλιπτικών φαρμάκων που εξετάστηκαν για χρωματογραφικές παρεμβολές με τη λικαρβαζεπίνη (χρόνος κατακράτησης λικαρβαζεπίνης 7.23 ± 0.12 min) ή με το ΕΠ (χρόνος κατακράτησης ΕΠ 8.23 ± 0.08 min).

Drug	Retention time	Resolution factor
1. Alprazolam	ND	
2. Aripiprazole	ND	
3. Bromazepam	ND	
4. Chlorpromazine	ND	
5. Citalopram	ND	
6. Clozapine	15.73	17.17
7. Diazepam	ND	
8. Fluoxetine	ND	
9. Lamotrigine	5.54	7.36
10. Levetiracetam	3.78	16.55
11. Lorazepam	ND	
12. Olanzapine	4.24	13.23
13. Oxcarbazepine	13.60	14.15
14. Paliperidone	6.58	2.96
15. Pregabalin	ND	
16. Risperidone	8.76	1.47
17. Sertraline	ND	
18. Quetiapine	ND	

ND: Μη ανιχνεύσιμο υπό τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας μελέτης. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε μέχρι το 16^ο λεπτό.



Εικόνα 16: Αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα HPLC προτύπου μείγματος φαρμάκων (αντιεπιληπτικά, αντιψυχωσικά και αντικαταθλιπτικά) τα οποία ελέγχθηκαν για χρωματογραφική παρεμβολή με τη λικαρβαζεπίνη ή το ΕΠ. 1=λεβετιρακετάμη; 2=ολανζαπίνη; 3=λαμοτριγίνη; 4=παλιπεριδόνη; 5=λικαρβαζεπίνη; 6=ακετανιλίδη; 7=ρισπεριδόνη; 8=οξυκαρβαζεπίνη; 9=κλοζαπίνη.

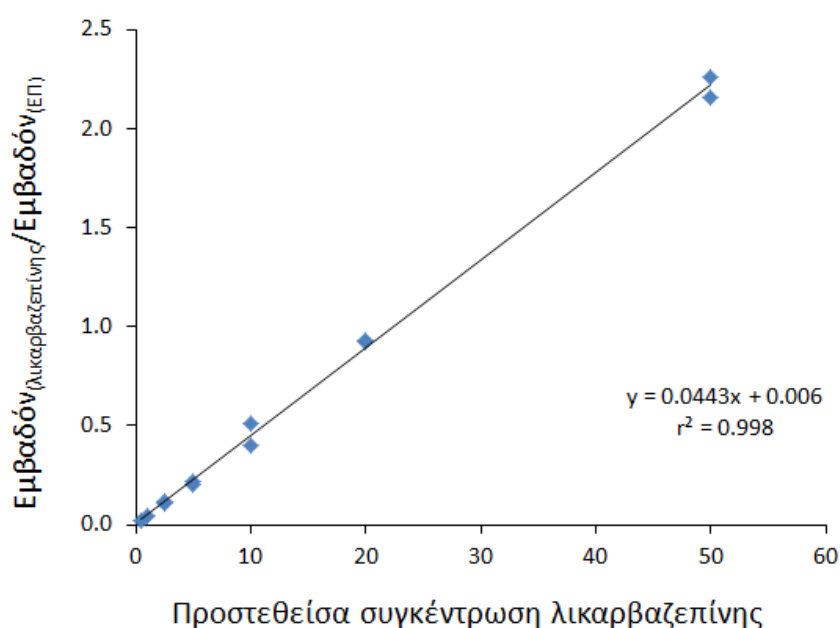
Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης

Η καμπύλη βαθμονόμησης της λικαρβαζεπίνης παρουσίασε γραμμικότητα στο εύρος συγκεντρώσεων 0,5 - 50,0 µg/mL, περιγράφονταν από την εξίσωση

$$y=(0,0443\pm0,00064)x+(0,006\pm0,0138)$$

και είχε σημείο τομής με τον άξονα των y το οποίο δεν διέφερε σημαντικά από το μηδέν ($p=0,674$) (Εικόνα 17).

Ο συντελεστής συσχέτισης (r^2) ήταν 0,998 υποδηλώνοντας άριστη γραμμική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων και της απόκρισης του μηχανήματος στο συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων.



Εικόνα 17: Καμπύλη βαθμονόμησης της λικαρβαζεπίνης.

Η συγκέντρωση των δειγμάτων βαθμονόμησης υπολογίσθηκε εκ νέου σύμφωνα με τις οδηγίες που έχουν τεθεί από την Ευρωπαϊκή Ιατρική Ένωση σχετικά με την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων χρησιμοποιώντας την προαναφερθείσα εξίσωση. Η απόκλισή τους δεν ξεπερνούσε το 13,37% (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα των δειγμάτων βαθμονόμησης της λικαρβαζεπίνης (v=2).

Συγκέντρωση προτύπου διαλύματος ορού ($\mu\text{g/mL}$)	Μετρηθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%)	Bias (%)
0,50	0,45	13,37	-9,46
1,00	0,98	11,38	-2,03
2,00	1,87	4,43	-6,53
5,00	4,70	5,44	-6,31
10,00	10,60	3,46	5,74
20,00	20,90	0,92	4,28
50,00	49,80	3,46	-0,63

Ακρίβεια και επαναληψιμότητα

Τα αποτελέσματα της επικύρωσης της μεθόδου για δείγματα εντός σειράς (intra-day, v=5) και μεταξύ των σειρών (inter-day, v=5) παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Η μέθοδος ήταν αναπαραγώγιμη με συντελεστές απόκλισης <3,55% για το δείγμα ποιοτικού ελέγχου μικρής συγκέντρωσης και <2,35% για τα δείγματα μεσαίας και μεγάλης συγκέντρωσης. Οι τιμές απόκλισης, σε όλες τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν, ήταν μεταξύ -4,30% και 7,20%.

Πίνακας 6. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα εντός- και μεταξύ σειρών των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου.

Συγκέντρωση (μg/mL)		CV %	Bias %
Προσθεθείσα	Μετρηθείσα		
Εντός σειράς (intra-day, ν=5)			
2,5	2,65	2,86	6,00
15,00	14,43	1,51	-3,80
40,00	38,69	1,12	-3,27
Μεταξύ σειρών (inter-day, ν=5)			
2,5	2,68	3,55	7,20
15,00	14,41	2,35	-3,93
40,00	38,28	1,33	-4,30

Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (low limit of quantitation, LLOQ) και όριο ανιχνευσιμότητας (limit of detection, LOD)

Το ελάχιστο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) ήταν 0,20 μg/mL με απόκλιση (bias) 16,79% και συντελεστή απόκλισης (CV) 8,73% (v=8).

Το κατώτατο όριο ανιχνευσιμότητας (LOD) ορίστηκε στο τριπλάσιο του λόγου $\frac{\text{σήματος}}{\text{θορύβου}}$ και ήταν $0,0182 \pm 0,0026$ μg/mL (v=4).

Εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα ασθενών

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε κατά την παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε σε δείγματα ορού ασθενών. Η συγκέντρωση της λικαρβαζεπίνης προσδιορίστηκε σε δείγματα ορού ασθενών υπό αγωγή με οξυκαρβαζεπίνη είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα (Πίνακας 7).

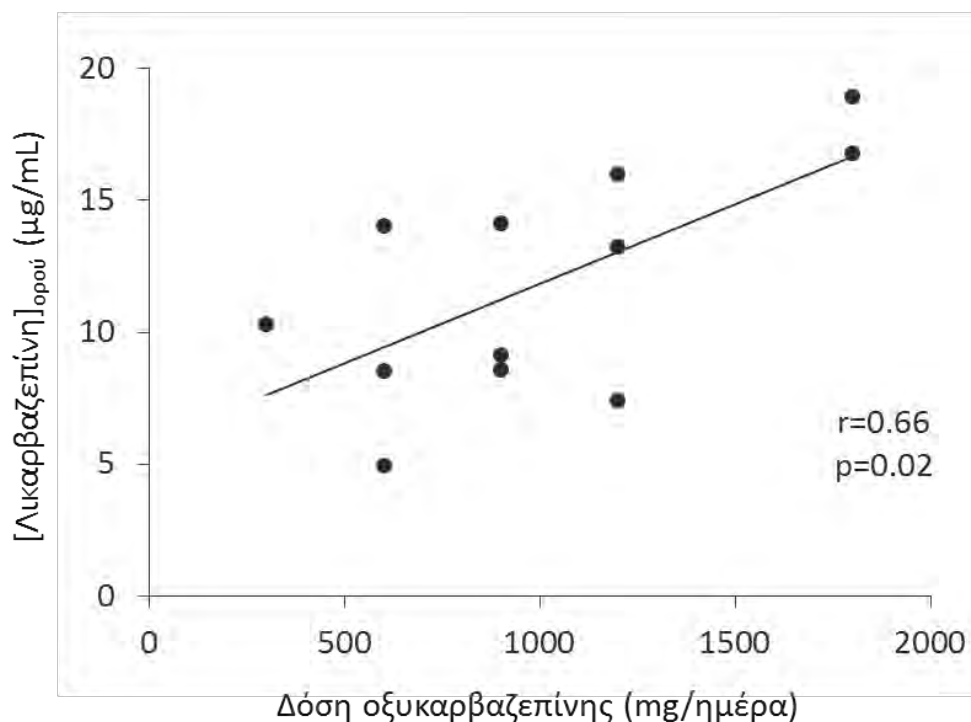
Ο μέσος όρος των δόσεων της χορηγηθείσας οξυκαρβαζεπίνης ήταν 929 mg/ημερησίως με εύρος που κυμαίνονταν από 600-1800 mg. Το εύρος δόσεων οξυκαρβαζεπίνης που ελάμβαναν οι ασθενείς που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη εμπίπτει σε αυτό που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία χορηγείται σε ασθενείς με επιληψία (300-2700 mg) ή ασθενείς με διαταραχές του συναισθήματος (600-2400 mg) (13). Αξίζει να σημειωθεί ότι ένα δείγμα ελήφθη από παιδιατρικό ασθενή που βρισκόταν υπό αγωγή με 30 mg/kg οξυκαρβαζεπίνης ημερησίως (Πίνακας 7). Οι συγκεντρώσεις λικαρβαζεπίνης που μετρήθηκαν με την παρούσα μέθοδο κυμαίνονταν από 4,94-18,92 µg/mL (Πίνακας 7).

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των χορηγηθεισών δόσεων του φαρμάκου με τις μετρηθείσες συγκεντρώσεις στον ορό των ασθενών. Από την Εικόνα 18 προκύπτει ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ της ημερήσιας χορηγηθείσας δόσης οξυκαρβαζεπίνης και της συγκέντρωσης του ενεργού μεταβολίτη λικαρβαζεπίνη που προσδιορίστηκε στον ορό ασθενών με την παρούσα μέθοδο. Η συσχέτιση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική (συντελεστής Pearson: 0,66; $p < 0,05$) παρά την μεγάλη διασπορά των τιμών η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί σε δειγματοληψία εκτός των συνιστώμενων χρονικών ορίων (trough).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα δυσχέρειας καθορισμού κατάλληλου δοσολογικού σχήματος στην αντιμετώπιση ασθενών υπό αγωγή με οξυκαρβαζεπίνη περιγράφεται στην Εικόνα 19. Μετά από μη ικανοποιητική ανταπόκριση της ασθενούς (ασθενής No 11, Πίνακας 7) στην καρβαμαζεπίνη για τον περιορισμό των κρίσεων, η αγωγή τροποποιήθηκε αρχικά σε βαλπροϊκό οξύ και κατόπιν σε οξυκαρβαζεπίνη ως ασφαλέστερης επιλογής στην προοπτική πιθανής κύησης. Από τον προσδιορισμό επιπέδων του ενεργού μεταβολίτη της οξυκαρβαζεπίνης τη λικαρβαζεπίνη προέκυψε ότι η συγκέντρωση της λικαρβαζεπίνης στον ορό της ασθενούς (13,27 µg/mL) εμπίπτει εντός του θεραπευτικού εύρους του φαρμάκου (3-35 µg/mL) (21).

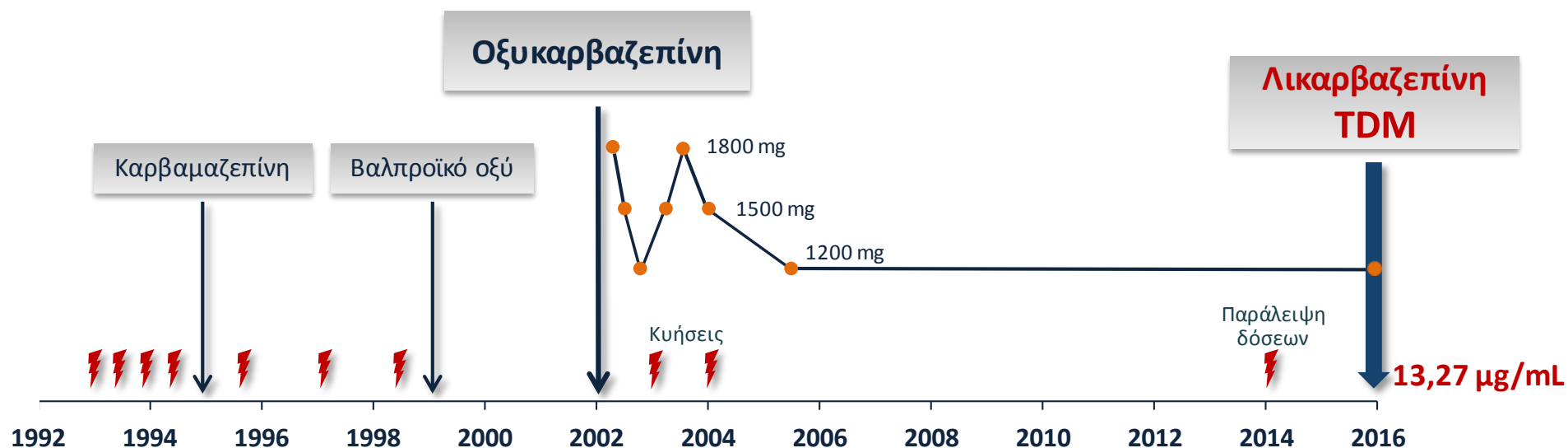
Πίνακας 7. Συγκεντρώσεις λικαρβαζεπίνης προσδιορισθείσες σε δείγματα ορού ασθενών που βρίσκονται υπό αγωγή με οξυκαρβαζεπίνη και έχουν αναλυθεί με τη μέθοδο HPLC-UV που αναπτύχθηκε στην παρούσα μελέτη.

Ασθενής	Φύλο	Ηλικία	Δόση οξυκαρβαζεπίνης (mg)	Δοσολογικό σχήμα οξυκαρβαζεπίνης	Συνολική δόση Οξυκαρβαζεπίνης (mg)	Προσδιορισθείσα [Λικαρβαζεπίνη] (μg/mL)	Συγχορηγούμενα φάρμακα
1	Α	12	30mg/kg	1-0-1	78	14,06	
2	Γ	76	300	0-0-1	300	10,29	παντοπραζόλη, πρεδνιζολόνη, ατορβαστατίνη
3	Α	68	300	1-0-1	600	8,52	ατορβαστατίνη,σαλικυλικά
4	Γ	70	600	0-0,5-0,5	600	14,06	T4
5	Γ	43	600	1-0-1	600	4,94	
6	Α	41	300	1-1-1	900	9,12	διαζεπάμη, αλοπεριδόλη
7	Γ	19	300	1-0-2	900	8,58	
8	Α	45	300	1-1-1	900	14,15	διαζεπάμη
9	Γ	59	600	1-0-1	1200	7,43	αμοξυκιλίνη/κλαβουλανικόξύ, βρωμαζεπάμη, ατορβαστατίνη, T4, ρανιτιδίνη, παντοπραζόλη, λεβοσετιριζίνη, πρεδνιζολόνη
10	Α	35	600	1-0-1	1200	16,02	βαλπροϊκό, σιταλοπράμη, κουετϊαπίνη
11	Γ	44	600	0-0,5-1,5	1200	13,27	T4, κορτιζόλη, παντοπραζόλη
12	Α	34	600	1-1-1	1800	16,79	
13	Α	56	600	1-1-1	1800	18,92	



Εικόνα 18: Συσχέτιση μεταξύ της χορηγηθείσας δόσης οξυκαρβαμαζεπίνης και της συγκέντρωσης του ενεργού μεταβολίτη λυκαρβαζεπίνη που προσδιορίστηκε στον ορό ασθενών χρησιμοποιώντας την παρούσα μέθοδο. Οι συγκεντρώσεις της λυκαρβαζεπίνης στον ορό των ασθενών παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την χορηγηθείσα δόση οξυκαρβαζεπίνης (συντελεστής Pearson: 0,66, $p=0,02$).

Για ένα μεγάλο διάστημα (έτη 2002-2006), κατά το οποίο ο προσδιορισμός των επιπέδων φαρμάκου στο αίμα της ασθενούς δεν ήταν διαθέσιμος, απαιτήθηκαν πολλαπλές τροποποιήσεις της αγωγής έως την ανεύρεση της κατάλληλης δόσης για τον έλεγχο των κρίσεων. Επομένως, είναι πιθανό ότι ο προσδιορισμός των επιπέδων φαρμάκου στο αίμα της ασθενούς θα μπορούσε να οδηγήσει σε πιο άμεσο και αποτελεσματικό έλεγχο των κρίσεων και περιορισμό σημαντικού οικονομικού και ψυχικού κόστους της ασθενούς.



Εικόνα 19. Η παρακολούθηση επιπέδων λικαρβαζεπίνης (TDM) για τη βελτιστοποίηση της αγωγής με οξυκαρβαζεπίνη. Παρουσιάζεται η πορεία νόσου ασθενούς με επιληψία (πίνακας 4, ασθενής 11) όπου επισημαίνεται η δυσκολία ανεύρεσης βέλτιστου δοσολογικού σχήματος στην αντιεπιληπτική αγωγή με οξυκαρβαζεπίνη (έτη 2002-2006). Η θεραπεία με οξυκαρβαζεπίνη συνετέλεσε ώστε η ασθενής να παραμείνει ελεύθερη κρίσεων για χρονικό διάστημα πλέον της δεκαετίας (εξαιρουμένου επεισοδίου που αποδόθηκε σε παράλειψη δόσεων) [(38) τροποποιημένη].

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην ως τώρα βιβλιογραφία ανευρίσκονται διάφορες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας όπως LC-MS και LC-UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό του φαρμακολογικά ενεργού μεταβολίτη της οξυκαρβαζεπίνης, τη λικαρβαζεπίνη, στον ορό ασθενών. Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε μια απλή, εύχρηστη και ακριβής μέθοδος HPLC-UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό της λικαρβαζεπίνης. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα ορού ασθενών που βρίσκονταν υπό αγωγή με οξυκαρβαζεπίνη. Στόχος ήταν η εφαρμογή της αναπτυχθείσας μεθόδου στην καθημερινή ιατρική πρακτική ως εξέταση ρουτίνας. Σημαντική προϋπόθεση για την παρακολούθηση επιπέδων ενός φαρμάκου για θεραπευτικούς σκοπούς (TDM), στο πλαίσιο ενός κλινικού εργαστηρίου, είναι η ανάπτυξη αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων με σύντομο χρόνο ανάλυσης δείγματος, απλές χρωματογραφικές συνθήκες και περιορισμένες απαιτήσεις στην χρήση οργάνων εργαστηρίου.

Με βάση τα παραπάνω, η μέθοδος που αναπτύχθηκε περιλαμβάνει ισοκρατική έκλουση των προς ανάλυση ουσιών, ανίχνευσή τους στο υπεριώδες καθώς και απλή επεξεργασία δείγματος ορού ασθενών με κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Με τον τρόπο αυτό, παρακάμψαμε προβλήματα που προκύπτουν από την χρήση πολυπλοκότερου εξοπλισμού, όπως είναι αυτός του LC-MS/MS, ο οποίος απαιτεί υψηλά εκπαιδευμένο προσωπικό και συνεπάγεται σημαντικό κόστος για ένα κλινικό εργαστήριο που διεξάγει τακτικά TDM αναλύσεις.

Η εν λόγω μέθοδος επέδειξε ικανοποιητική ειδικότητα, όπως υποδηλώνεται από την ανάλυση πρότυπων δειγμάτων ορού τα οποία περιείχαν περισσότερα από 40 συχνά συνταγογραφούμενα και πιθανώς συγχωρηγούμενα με την οξυκαρβαζεπίνη φάρμακα τα οποία ελέγχθηκαν για τυχόν χρωματογραφικές παρεμβολές. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψιν τον πιθανό ρόλο της οξυκαρβαζεπίνης στην αντιμετώπιση των συναισθηματικών διαταραχών (13) (14) (17), η ειδικότητα της μεθόδου διερευνήθηκε περαιτέρω με την ανάλυση φαρμάκων που χορηγούνται συχνά σε ψυχιατρικούς ασθενείς, όπως είναι οι βενζοδιαζεπίνες, τα αντικαταθλιπτικά και τα αντιψυχωσικά (Πίνακας 2). Καμία παρεμβολή δεν παρουσιάστηκε μεταξύ λικαρβαζεπίνης, εσωτερικού προτύπου και των συνολικά 65 φαρμάκων που ελέγχθηκαν, γεγονός που υποδηλώνει πως η παρούσα μέθοδος είναι κατάλληλη για τακτικό έλεγχο ορού ψυχιατρικών ασθενών που βρίσκονται υπό αγωγή με οξυκαρβαζεπίνη.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συμπεριλαμβάνονται η χρήση δείγματος ορού μικρού όγκου (100μL) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της λικαρβαζεπίνης εντός ενός κλινικά

αποδεκτού εύρους τιμών αναφοράς καθώς και η απλή επεξεργασία του δείγματος με κατακρήμνιση πρωτεϊνών. Ο μικρός όγκος δείγματος που απαιτείται, καθιστά τη μέθοδο κατάλληλη όχι μόνο για τακτική TDM ανάλυση των ενηλίκων αλλά και για παιδιατρικούς και ηλικιωμένους ασθενείς εκ των οποίων λήψη μεγαλύτερης ποσότητας αίματος μπορεί να μην είναι εύκολη. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η χρήση μικρού όγκου δείγματος (100 μL) και προκατεργασία του με απλή κατακρήμνιση πρωτεϊνών (25). Εν αντιθέσει, όμως, με την παρούσα μελέτη, στην οποία το LLOQ ορίζεται στα 0,2 $\mu\text{g/mL}$, το LLOQ της προαναφερθείσας μελέτης ορίζεται στο 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (25). Προκαλεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε παλαιότερες μελέτες που χρησιμοποιούσαν δείγμα ορού μεγαλύτερου όγκου (500 μL) το LLOQ ήταν συγκρίσιμο με αυτό της παρούσας μελέτης που ορίστηκε στα 0,20 $\mu\text{g/mL}$ (24) (35). Μεταξύ των πιο πρόσφατων δημοσιεύσεων, δύο μέθοδοι παρουσίασαν χαμηλότερο ή συγκρίσιμο LLOQ με αυτό της παρούσας μελέτης. Μολαταύτα, η αυξημένη ευαισθησία στις μεθόδους αυτές επετεύχθη εις βάρος της ευκολίας της μεθόδου καθώς χρησιμοποιήθηκε δείγμα μεγάλου όγκου (500 μL) και απαιτούνταν πολυπλοκότερες τεχνικές εκχύλισης όπως για παράδειγμα η εκχύλιση υγρού/υγρού ή στερεού/υγρού (22) (23).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο η ακετανιλίδη, μια ευρέως διαθέσιμη και χαμηλού κόστους ουσία, της οποίας το σημαντικό πλεονέκτημα ότι δεν συνιστά φάρμακο και συνεπώς αποκλείεται η πιθανότητα συγχωρήγησης της με την οξυκαρβαζεπίνη. Εν αντιθέσει, προηγούμενες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει ως εσωτερικό πρότυπο 4-μεθυλ-πριμιδόνη (35), βρωμαζεπάμη (22), 5-αιθυλ-5-παρατολυλο βαρβιτουρικό οξύ (25), διυδρο-καρβαμαζεπίνη (23) ή κετοπροφαίνη (24), δηλαδή φάρμακα, μερικά εκ των οποίων, θα μπορούσαν να προκαλέσουν παρεμβολές στην χρωματογραφική μελέτη της οξυκαρβαζεπίνης.

Οι χρωματογραφικές συνθήκες της παρούσας μελέτης επέτρεψαν συνολικό χρόνο ανάλυσης της λικαρβαζεπίνης συγκρίσιμο (23) ή και μικρότερο (22) (24) (25) από άλλες μεθόδους βασισμένες στην ανίχνευση στο υπεριώδες (Πίνακας 1). Βέβαια, υπάρχουν και άλλες μελέτες οι οποίες βασίζονται, επίσης, στην ανίχνευση στο υπεριώδες και παρουσιάζουν μικρότερο συνολικό χρόνο ανάλυσης της λικαρβαζεπίνης σε σύγκριση με αυτόν της παρούσας μελέτης (34) (35) (36).

Αξίζει να αναφερθεί ότι η παρούσα μελέτη διεύρυνε σημαντικά το φάσμα των αντιεπιληπτικών φαρμάκων τα οποία η μέθοδος μπορεί να διαχωρίσει, επιτρέποντας έτσι τον προσδιορισμό της λικαρβαζεπίνης δίχως παρεμβολές. Λαμβάνοντας υπόψη τον πιθανό ρόλο της οξυκαρβαζεπίνης στην αντιμετώπιση συναισθηματικών διαταραχών (13) (37) (33), η

παρούσα μελέτη εστιάζει στην επαυξημένη ειδικότητα της μεθόδου, όχι μόνο έναντι συχνά συγχωρηγούμενων φαρμάκων, αλλά και έναντι αντιψυχωσικών φαρμάκων.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται μία μόνο μελέτη HPLC-UV προσδιορισμού λικαρβαζεπίνης σε ανθρώπινο ορό όπου ελέγχονται πιθανές παρεμβολές από αντιψυχωσικά φάρμακα (26). Στη μελέτη αυτή όμως έχει ελεγχθεί μόνο ένα αντιεπιληπτικό για πιθανές παρεμβολές ενώ Στη μελέτη αυτή όμως έχει ελεγχθεί μόνο ένα αντιεπιληπτικό, η καρβαμαζεπίνη, για πιθανές παρεμβολές ενώ δεν έχει ερευνηθεί η πιθανότητα παρεμβολών από συνηθέστατα συγχωρηγούμενα αντιεπιληπτικά φάρμακα όπως το βαλπροϊκό οξύ, η φαινυτοΐνη και η φαινοβαρβιτάλη. Επιπλέον πρόβλημα αυτής της μελέτης αποτελεί το γεγονός πως ο χρόνος έκλουσης της λικαρβαζεπίνης (11,09 min) δε διαφέρει από αυτόν την κλοζαπίνης (11,3 min). Η κλοζαπίνη αποτελεί φάρμακο εκλογής για την αντιμετώπιση της ανθεκτικής σχιζοφρένειας με ευρεία χρήση και στις λοιπές ψυχωσικές διαταραχές που συχνά συνοδεύονται ή/και συνοδεύουν διαταραχές του συναισθήματος. Συνεπώς, η ταυτόχρονη έκλυση κλοζαπίνης και λικαρβαζεπίνης καθιστά αδύνατο τον προσδιορισμό των επιπέδων λικαρβαζεπίνης στον ορό ασθενών που λαμβάνουν και τα δύο σκευάσματα. Η παρούσα μελέτη επιτυγχάνει ικανοποιητικό διαχωρισμό έκλουσης της κλοζαπίνης (15,8 min) και της λικαρβαζεπίνης (7,23 min) καθώς και του εσωτερικού προτύπου ακετανιλίδης (8,23 min) διευρύνοντας έτσι τη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου ακόμα και σε ασθενείς που λαμβάνουν τον εν λόγω αντιψυχωσικό παράγοντα.

Μια από τις κύριες προκλήσεις στην αντιμετώπιση της επιληψίας, παραμένει η εγκαθίδρυση του κατάλληλου θεραπευτικού εύρους των χορηγούμενων φαρμάκων. Το εύρος ανάλυσης της παρούσας μεθόδου (0,50-50,00 µg/mL) υπερκαλύπτει το εύρος τιμών αναφοράς της λικαρβαζεπίνης στον ορό επιληπτικών ασθενών που ισχύει σήμερα και είναι 3-35 µg/mL (21). Συνεπώς, η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε, μπορεί να συμβάλλει στην εγκαθίδρυση «εξατομικευμένων τιμών αναφοράς», όταν υπάρχουν υποψίες μη συμμόρφωσης ασθενούς, καθώς και σε καταστάσεις όπου μεταβολές στη φαρμακοκινητική είναι αναμενόμενες όπως στα παιδιά, τους ηλικιωμένους, στην εγκυμοσύνη, σε ηπατοπαθείς, νεφροπαθείς, καθώς και σε περιπτώσεις αλληλεπίδρασης φαρμάκων.

Συμπερασματικά, αναπτύχθηκε και πιστοποιήθηκε μία ισοκρατική μέθοδος χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης με ανίχνευση στο υπεριώδες για τον προσδιορισμό της λικαρβαζεπίνης στον ορό των ασθενών. Η εν λόγω μέθοδος χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική ειδικότητα, ακρίβεια, επαναληψιμότητα και ευαισθησία και στερείται αλληλεπιδράσεων με αντιεπιληπτικά, αντιψυχωσικά ή άλλα συχνά χορηγούμενα φάρμακα. Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως ως εξέταση ρουτίνας για τον προσδιορισμό της

λικαρβαζεπίνης, διότι δεν απαιτεί πολύπλοκο εξοπλισμό ή ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό συνιστώντας έτσι ένα σημαντικό εργαλείο για την ταχεία και αξιόπιστη παρακολούθηση επιπέδων λικαρβαζεπίνης για θεραπευτικούς σκοπούς σε επιληπτικούς και ψυχιατρικούς ασθενείς υπό χρόνια αγωγή με οξυκαρβαζεπίνη, είτε ως μονοθεραπεία ή ως συμπληρωματική θεραπεία.

4. ΠΗΓΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Bernard S. Chang M.D., Daniel H. Lowenstein M.D.** N Engl J Med 2003; 349:1257-1266 September 25, 2003 DOI: 10.1056/NEJMra022308.
2. **WHO, "Epilepsy Fact sheet".** "Epilepsy Fact sheet". WHO. Updated February 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>. [Ηλεκτρονικό]
3. **ILAE, IBE.** Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46 (4):470–472, 2005 Blackwell Publishing, Inc. C 2005 International League Against Epilepsy Special Article *Epileptic Seizures and Epilepsy*.
4. **ILAE official Report.** A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4)475–482, 2014 doi 10.1111/epi.12550.
5. **Desai, Rishi.** <https://open.osmosis.org/> Video explanation reviewed by Rishi Desai MD, PhD.
6. **McLean MJ, Macdonald RL.** Sodium valproate, but not ethosuximide, produces use-and voltage-dependent limitation of high frequency repetitive firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986 Jun;237(3):1001-11.
7. **Loring DW, Meador KJ.** Cognitive side effects of antiepileptic drugs in children. *Neurology.* 2004 Mar 23;62(6):872-7. .
8. **Eadie, MJ και Bladin, PF.** A Disease Once Sacred. A History of the Medical Understanding of Epilepsy. *Epilepsy Research.* 2001, 248 pp.
9. **Keck PE Jr, McElroy SL, Strakowski SM.** Anticonvulsants and antipsychotics in the treatment of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry.* 1998;59 Suppl 6:74-81.
10. **Kaufman, K R.** Antiepileptic drugs in the treatment of psychiatric disorders. *Epilepsy & Behavior.* 2011, Τόμ. 21, σσ. 1-11.
11. **Ghaemi SN, Berv DA, Klugman J, Rosenquist KJ, Hsu DJ.** Oxcarbazepine treatment of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry.* 2003 Aug;64(8):943-5.
12. **Beydoun A, Kutluay E.** Oxcarbazepine. *Expert Opin Pharmacother.* 2002 Jan; 3(1):59-71.
13. **Musenga A, Saracino M-A, Sani G, Raggi A.** Antipsychotic and antiepileptic drugs in bipolar disorder: the importance of therapeutic drug monitoring. *Curr Med Chem* 2009; 16:1463-81. .
14. **Patsalos PN, Berry DJ.** Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs by use of saliva. *Ther Drug Monit* 2013; 35:4-29.
15. **Kalis MM, Huff NA.** Oxcarbazepine, an antiepileptic agent. *Clin Ther.* 2001 May; 23(5):680-700; discussion 645.
16. **May TW, Korn-Merker E, Rambeck B.** Clinical pharmacokinetics of oxcarbazepine, *Clin Pharmacokinet* 2003;42:1023-1042.
17. **Krasowski, MD.** Therapeutic drug monitoring of the newer anti-epilepsy medications. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010; 3:1909-35.

18. **Flesch, G.** Overview of the clinical pharmacokinetics of oxcarbazepine. *Clin Drug Investig* 2004;24:185-203.
19. **Klostervskov Jensen P, Saano V, Haring P, Svenstrup B, Menge GP.** Possible interaction between oxcarbazepine and an oral contraceptive. *Epilepsia* 1992; 33:1149-52.
20. **Fattore C, Cipolla G, Gatti G, Limido GL, Sturm Y, Bernasconi C, et al.** Induction of ethinylestradiol and levonorgestrel metabolism by oxcarbazepine in healthy women. *Epilepsia* 1999; 40:783-7.
21. **Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BF, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, et al.** Antiepileptic drugs-best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE commission on therapeutic strategies. *Epilepsia* 2008; 49:1239-76.
22. **Kimiskidis V, Spanakis M, Niopas I, Kazis D, Gabrieli C, Kanaze FI, et al.** Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for the determination of oxcarbazepine and its main metabolites in human plasma and cerebrospinal fluid and its application to pharmacokinetic study. *J Pharm Biom Anal* 2007; 43.
23. **Fortuna A, Sousa J, Alves G, Falcao A, Soares-da-Silva P.** Development and validation of an HPLC-UV method for the simultaneous quantification of carbamazepine, oxcarbazepine, eslicarbazepine acetate and their main metabolites in human plasma. *Anal Bio.*
24. **Serralheiro A, Alves G, Fortuna A, Rocha M, Falcao A.** First HPLC-UV method for the rapid and simultaneous quantification of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, 10,11-trans-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine.
25. **Hunek C, Burgyan M, Wang S.** Measurement of 10,11-dihydro-10-hydroxy-carbamazepine in serum and plasma by high-performance liquid chromatography. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46:1429-33.
26. **Greiner C, Haen E.** Development of a simple column-switching high-performance liquid chromatography (HPLC) method for rapid and simultaneous routine serum monitoring of lamotrigine, oxcarbazepine and 10-monohydroxycarbamazepine (MHD). 2007, *Tóμ.* 1;854(1-2):338-44.
27. **de Sousa Maia MB, do Nascimento DF, Martins IL, Cunha AN, de Lima FE, Bezerra FA, et al.** Simultaneous quantitative analysis of oxcarbazepine and 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45:304-11.
28. **Paglia G, D'Apolito O, Garofalo D, Scarano C, Corso G.** Development and validation of a LC/MS/MS method for simultaneous quantification of oxcarbazepine and its main metabolites in human serum. *J Chromatogr B* 2007; 860:153–9.
29. **Yin L, Wang T, Shi M, Zhang Y, Zhao X, Yang Y, et al.** Simultaneous determination of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionization and its appli.

30. **Bhatt M, Shah S, Shivprakash.** Rapid ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of oxcarbazepine and its metabolite in human plasma. *Biomed Chromatogr* 2011; 25:751-9.
31. **Subramanian M, Birnbaum AK, Rimmel RP.** High-speed simultaneous determination of nine antiepileptic drugs using liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2008; 30:347-56.
32. **Maurer HH, Kratzsch C, Weber AA, Peters FT, Kraeme T.** Validated assay for quantification of oxcarbazepine and its active dihydrometabolite 10-hydroxycarbazepine in plasma by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrom.
33. **Misdrahi D, Tournier M, T. Droulout, A. Grolleau, K. Titier, M. Molimard, H. Verdoux.** Efficiency and safety of oxcarbazepine in mood disorders: a naturalistic study exploring the interest of plasma dosages. *Eur. Psychiatry* 23 (2008) 409-412.
34. **Greiner-Sosanko E, Giannoutsos S, Lower DR, Virji MA, Krasowski MD.** Drug monitoring: simultaneous analysis of lamotrigine, oxcarbazepine, 10-hydroxycarbazepine, and zonisamide by HPLC-UV and a rapid GC method using anitrogen-phosphorus detector for 1. *J Chromatogr Sci.* 2007, Τόμ. 45, 9.
35. **Contin M, Balboni M, Callegati E, Candella C, Albani F, Riva R, et al.** Simultaneous liquid chromatographic determination of lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr B* 2005; 828:1.
36. **Heideloff C, Bunch DR, Wang S.** A novel HPLC method for quantification of 10 antiepileptic drugs or metabolites in serum/plasma using a monolithic column. *Ther. Drug Monit.* 32(2010) 102-106.
37. **Hellewell, JS.** Oxcarbazepine (Trileptal) in the treatment of bipolar disorders: a review of efficacy and tolerability. *J Affect Disord* 2002; 72:S23-34.
38. **Begas E, Tsakalof A, Dardiotis E, Vatidis GE, Kouvaras E and Asproдини EK.** Development and validation of a reversed-phase HPLC method for therapeutic drug monitoring of licarbazepine in serum of patients under oxcarbazepine treatment. *submitted*.
39. **Meyer, Veronica.** *Practical High Performance Liquid Chromatography*. 4th. 2004.
40. **Shabir, G A.** A Practical Approach to Validation of HPLC Methods Under Current Good Manufacturing Practices. *Journal of Validation Technology*. 2004.
41. **Shabir, G A.** HPLC Method Development and Validation for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Technology Europe*. 2004.
42. **Souppart C, Eng C, Gardin A, Greig G, Balez S, Batard Y, et al.** Pharmacokinetics of licarbazepine in healthy volunteers: single and multiple oral doses and effect of food. *J Clin Pharmacol* 2008;48:563-9. .
43. **Beghi E, Carpio A, Forsgren L, Hesdorffer DC, Malmgren K, Sander JW, Tomson T.** Recommendation for a definition of acute symptomatic seizure. *Epilepsia*. 51(4):671-5., 2010 Apr;.

44. **Blume WT, Lüders HO, Mizrahi E, Tassinari C, van Emde Boas W, Engel J Jr.** Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task. *Epilepsia*. 2001 Sep;42(9):1212-8.
45. **Ichikawa J, Dai J, Meltzer HY.** Lithium differs from anticonvulsant moodstabilizers in prefrontal cortical and accumbal dopamine release: role of 5-HT(1A) receptor agonism.