

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγήτρια Χ. Σπηλιοπούλου

ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΕΠΙΛΗΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ – ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ
ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Παναγιώτα Δ. Νικολάου

Χημικός

Αθήνα 2016

«Η έγκριση Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή γνώμων του συγγραφέα».

(Νόμος 5343/1932 άρθρον 202, παρ. 2)

ΕΘΝΙΚΟΝ ἤ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ· ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ;
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΑΣΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΕΕΙΝ.
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΖΟΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ
ΠΡΗΒΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΞΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ
ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΪΔΩ Η ΑΚΟΥΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-
ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ·
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ, Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΣΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ, ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ. ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΩΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ. ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑΝ, ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΘΗ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΩΣ ΑΥΤΟΣ ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ. ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΠΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΔΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ. ΕΙΣ ΘΕΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΟΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΩΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΑΡΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ, ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦ' ΟΣΟΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΞΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ· ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

Ημερομηνία κατάθεσης αίτησης εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής: 26/6/2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 3/11/2009

Ημερομηνία καθορισμού θέματος Διδακτορικής Διατριβής: 3/5/2010

Ημερομηνίες αλλαγής μελών Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 6/12/2010, 6/11/2015

Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 27/4/2016

Ημερομηνία παρουσίασης Διδακτορικής Διατριβής: 14/6/2016

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σ. Αθανασέλης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής (Επιβλέπων)

Χ. Σπηλιοπούλου, Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής

Ι. Παπουτσής, Επικ. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Α. Παπαβασιλείου, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής

Χ. Σπηλιοπούλου, Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής

Ν. Σιταράς, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής

Σ. Αθανασέλης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής

Μ.Στεφανίδου, Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής

Ι. Παπουτσής, Επικ. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής

Α. Ντονά, Επικ. Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής

Στους γονείς μου

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ονοματεπώνυμο: Παναγιώτα Νικολάου του Δημητρίου
Ημερομηνία και τόπος γέννησης: 20/09/1977, Αθήνα
Διεύθυνση κατοικίας: Άννης Μαρίας 24, Γλυκά Νερά 15354, Αττική
τηλ. επικοινωνίας: 2106657837, 2107462414, 6977529177
email: *panik@chem.uoa.gr*

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ

- 1992: Απολυτήριο Γυμνασίου με «Άριστα» (19⁹/₁₅).
- 1995: Απολυτήριο Λυκείου με «Άριστα» (19⁷/₁₀).
- 1995-2000: Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, βαθμός «Λίαν Καλώς».
- 1/6/2000-31/7/2000: Πρακτική άσκηση στο Γενικό Χημείο του Κράτους, στο Τμήμα Ναρκωτικών της Γ' Χημικής Υπηρεσίας Αθηνών.
- 2000-2003: Δίπλωμα Μεταπτυχιακών Σπουδών με ειδίκευση Αναλυτική Χημεία, Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, βαθμός «Άριστα».
- 2003-2008: Διδακτορική Διατριβή στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, βαθμός «Άριστα».
- 2009-2016: Διδακτορική Διατριβή στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Εκπαιδευτικά σεμινάρια

- 2003-2014: Παρακολούθηση 7 εκπαιδευτικών σεμιναρίων σε θέματα Αναλυτικής Χημείας και Τοξικολογίας

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά: Άριστη γνώση (Proficiency)

Ισπανικά: Πολύ καλή γνώση (Nivel Intermedio)

ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΕΡΓΟ

- 2003 έως σήμερα: Συμμετοχή στο κλινικοεργαστηριακό έργο του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, διενεργώντας:

- τοξικολογικές αναλύσεις στο πλαίσιο της Ιατροδικαστικής διερεύνησης Δικαστικών υποθέσεων (εγκληματικών ενεργειών, αυτοκτονιών, ατυχημάτων τροχαίων κ.α.) κατόπιν εντολής Δικαστικών ή Αστυνομικών αρχών.
- επείγουσες τοξικολογικές αναλύσεις βιολογικών υγρών νοσοκομειακών ασθενών στο πλαίσιο της διαφορικής διάγνωσης δηλητηριάσεων.
- παρακολούθηση της στάθμης φαρμάκων ασθενών υπό αγωγή.
- τοξικολογικές αναλύσεις βιολογικών υγρών τοξικομανών που παρακολουθούν ειδικά προγράμματα υποκατάστασης για τη διαπίστωση της συμμόρφωσής τους με αυτά.
- 2008 έως σήμερα: Στο πλαίσιο της Διαπίστευσης του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας με το ISO 17025/2005, εξουσιοδότηση για την εφαρμογή διαπιστευμένων και μη αναλυτικών μεθόδων στο Εργαστήριο, υπό την επιτήρηση και αξιολόγηση του Εθνικού Συστήματος Διαπίστευσης (ΕΣΥΔ).

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

- 2007-σήμερα: Ειδικά φροντιστηριακά μαθήματα Τοξικολογίας (Αρχές Τοξικολογικής Ανάλυσης και Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές) στους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Βιολογικού τμήματος, στο πλαίσιο της διδασκαλίας του μαθήματος «Μοριακή Φαρμακολογία-Τοξικολογία-Ιατρική Μικροβιολογία-Ιολογία» του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος: «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική».
- 2012-2013: Ειδικά κεφάλαια στο πλαίσιο του κατ' επιλογήν μαθήματος «Ναρκωτικά» της Ιατρικής Σχολής.
- 2012-σήμερα: Ειδικά φροντιστηριακά μαθήματα Κλινικής Τοξικολογίας στους φοιτητές του Φαρμακευτικού τμήματος.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- Εκπόνηση 63 επιστημονικών εργασιών που έχουν δημοσιευθεί στο διεθνή επιστημονικό τύπο (39) ή έχουν ανακοινωθεί σε επιστημονικά συνέδρια στην Ελλάδα και το εξωτερικό (24).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

1. **Nikolaou PD**, Papoutsis II, Atta-Politou J, Athanaselis SA, Spiliopoulou CA, Calokerinos AC, Maravelias CP, Validated method for the simultaneous determination of methadone and its main metabolites (EDDP and EMDP) in plasma

- of umbilical cord blood by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B* 2008; 867(2): 219-225.
2. **Nikolaou PD**, Papoutsis II, Maravelias CP, Spiliopoulou CA, Pistos CM, Calokerinos AC, Atta-Politou J, Development and validation of an EI-GC/MS method for the determination of methadone and its major metabolites (EDDP and EMDP) in human breast milk, *J Anal Toxicol.* 2008; 32(7): 478-484.
 3. **Nikolaou P**, Atta-Politou J, Papoutsis I, Athanaselis S, Spiliopoulou C, Maravelias C, The use of methadone in maintenance of opiate addicts (στα Ελληνικά), *Farmakeftiki* 2009 Jan-Mar; 22(I): 1-11.
 4. Papoutsis II, Athanaselis SA, **Nikolaou PD**, Pistos CM, Spiliopoulou CA, Maravelias CP, Development and validation of an GC-EI-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology, *J Pharm Biomed Anal* 2010; 52(4): 609-614.
 5. Papoutsis I, **Nikolaou P**, Athanaselis S, Stefanidou M, Pistos C, Spiliopoulou C, Maravelias C, Mass intoxication with *Datura innoxia*-case series and confirmation by analytical toxicology, *Clin Toxicol.* 2010; 48(2): 143-145.
 6. Papoutsis II, **Nikolaou PD**, Athanaselis SA, Pistos CM, Spiliopoulou CA, Maravelias CP, Development and validation of a highly sensitive GC/MS method for the determination of buprenorphine and nor-buprenorphine in blood, *J Pharm Biomed Anal* 2011; 54(3): 588-591.
 7. Papoutsis I, **Nikolaou P**, Athanaselis S, Pistos C, Maravelias C, Spiliopoulou C, A fully validated method for the determination of vardenafil in blood using gas chromatography/mass spectrometry, *J Mass Spectrom* 2011; 46(1):71-76.
 8. **Nikolaou P**, Papoutsis I, Athanaselis, Alevisopoulos G, Khraiwesh A, Pistos C, Spiliopoulou, Development and validation of a GC/MS method for the determination of tadalafil in whole blood, *J Pharm Biomed Anal* 2011; 56(3): 577-581.
 9. Khraiwesh A, Papoutsis I, **Nikolaou P**, Pistos C, Spiliopoulou C, Athanaselis S, Development and validation of an EI-GC/MS method for the determination of sertraline and its major metabolite desmethyl-sertraline in blood, *J Chromatogr B* 2011; 879(25): 2576-2582.
 10. Papoutsis I, **Nikolaou P**, Athanaselis S, Alevizopoulos G, Pistos C, Paraskevopoulou C, Spiliopoulou C, Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometric method for the determination of sildenafil and desmethyl-sildenafil in whole blood, *J Sep Sci* 2011; 34(21): 3037-3042.

11. **Nikolaou P**, Papoutsis I, Stefanidou M, Dona A, Maravelias C, Spiliopoulou C, Athanaselis S, Accidental poisoning after ingestion of “aphrodisiac” berries: diagnosis by analytical toxicology, *J Emerg Med* 2012; 42(6): 662-665.
12. Papoutsis I, **Nikolaou P**, Dona A, Pistos C, Stefanidou M, Spiliopoulou C, Athanaselis S, A validated GC-MS method for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in bile samples, *Forensic Toxicol* 2012; 30(1): 51-58.
13. Papoutsis I, **Nikolaou P**, Spiliopoulou C, Pistos C, Stefanidou M, Athanaselis S, A simple and sensitive GC/MS method for the determination of atropine during therapy of anticholinesterase poisoning in serum samples, *Drug Test Anal* 2012; 4(3-4): 229-234.
14. **Nikolaou P**, Papoutsis I, Athanaselis S, Pistos C, Dona A, Spiliopoulou C, Development and validation of a method for the determination of buprenorphine and norbuprenorphine in breast milk by gas chromatography-mass spectrometry, *Biomed Chromatogr* 2012; 26(3):358-362.
15. Papoutsis I, Mendonis M, **Nikolaou P**, Athanaselis S, Pistos C, Maravelias C, Spiliopoulou C, Development and validation of a simple GC-MS method for the simultaneous determination of 11 anticholinesterase pesticides in blood-Clinical and forensic toxicology applications, *J Forensic Sci* 2012; 57(3):806-812.
16. Papoutsis I, Khraiwesh A, **Nikolaou P**, Pistos C, Spiliopoulou C, Athanaselis S, A fully validated method for the simultaneous determination of 11 antidepressant drugs in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal* 2012; 70: 557-562.
17. Bruci Z, Papoutsis I, Athanaselis S, **Nikolaou P**, Pazari E, Spiliopoulou C, Vyshka G, First systematic evaluation of the potency of *Cannabis sativa* plants grown in Albania, *Forensic Sci Int*, 2012; 222(1-3): 40-46.
18. **Nikolaou P**, Papoutsis I, Dona A, Spiliopoulou C, Athanaselis S, Toxicological analysis of formalin-fixed or embalmed tissues: A review, *Forensic Sci Int*, 2013; 233(1-3): 312-319.
19. Papoutsis I, Rizopoulou A, **Nikolaou P**, Pistos C, Spiliopoulou C, Athanaselis S, A validated GC/MS method for the determination of amisulpride in whole blood, *J Chromatogr B*, 2014; 947-948: 111-116.

20. Papoutsis I, **Nikolaou P**, Pistos C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C, Athanaselis S, Stability of morphine, codeine and 6-acetyl-morphine in blood at different sampling conditions, *J Forensic Sci*, 2014; 59(2): 550-554.
21. Katselou M, Papoutsis I, **Nikolaou P**, Spiliopoulou C, Athanaselis S, A “Krokodil” emerges from the murky waters of addiction. Abuse trends of an old drug, *Life Sci*, 2014; 102(2): 81-87.
22. Papoutsis I, **Nikolaou P**, Spiliopoulou C, Athanaselis S. Different aspects of driving under the influence of benzodiazepines, *Med Sci Law*, 2016; 56(2): 159-160.
23. **Nikolaou P**, Athanaselis S, Papoutsis I, Dona A, Spiliopoulou C, Stefanidou M, Emergency issues of clandestine production of drugs. The case of “sisa”-homemade crystal meth in Greece, *J Forensic Toxicol Pharmacol*, 2014; 3(2): 1-3.
24. **Nikolaou P**, Papoutsis I, Dona A, Spiliopoulou C, Athanaselis S, Beware of 25C-NBOMe. An N-benzyl substituted phenethylamine, *J Forensic Toxicol Pharmacol*, 2014; 3(3): 1-6.
25. Katselou M, Papoutsis I, **Nikolaou P**, Spiliopoulou C, Athanaselis S, 5-(2-aminopropyl)indole: A new player in the drama of “legal highs” alerts the community, *Drug Alcohol Rev*, 2015; 34(1): 51-57.
26. **Nikolaou P**, Papoutsis I, Stefanidou M, Spiliopoulou C, Athanaselis S, 2C-I-NBOMe, an “N-bomb” that kills with “Smiles”. Toxicological and legislative aspects, *Drug Chem Toxicol*, 2015; 38(1): 113-119.
27. Papoutsis I, **Nikolaou P**, Stefanidou M, Spiliopoulou C, Athanaselis S, 25B-NBOMe and its precursor 2C-B. Modern trends, hidden dangers, *Forensic Toxicol*, 2015; 33: 1-11.
28. **Nikolaou P**, Papoutsis I, Dona A, Spiliopoulou C, Athanaselis S, Development and validation of a GC/MS method for the simultaneous determination of levetiracetam and lamotrigine in whole blood, *J Pharm Biomed Anal*, 2015; 102: 25-32.
29. **Nikolaou P**, Papoutsis I, Spiliopoulou C, Voudris C, Athanaselis S, A fully validated method for the determination of lacosamide in human plasma using gas chromatography with mass spectrometry. Application for therapeutic drug monitoring, *J Sep Sci*, 2015; 38(2): 260-266.
30. Katselou M, Papoutsis I, **Nikolaou P**, Spiliopoulou C, Athanselis S, AH-7921. The opioid list of new psychoactive substances is expanded, *Forensic Toxicol*, 2015; 33(2): 195-201.

31. Papoutsis I, Athanaselis S, **Nikolaou P**, Spiliopoulou C, Tsiola A, Stefanidou M. Postmortem hair analysis verifies heroin exposure and leads to a killer. *Austin J Forensic Sci Criminol*, 2015; 2(2): 1021-1023.
32. Papoutsis I, Khraiwesh A, **Nikolaou P**, Spiliopoulou C, Athanaselis S. Benzodiazepines and driving pharmacological and legal aspects, *Eur J Forensic Sci*, 2016; 3(1): 1-9.
33. Papoutsis I, **Nikolaou P**, Athanaselis S, Vardakou I, Spiliopoulou C, Stefanidou M. Fentanyl-related cases. The situation in Greece, *Eur J Forensic Sci*, 2016; 3(2): 1-5.
34. Katselou M, Papoutsis I, **Nikolaou P**, Spiliopoulou C, Athanaselis S. α -PVP (“flakka”). A new synthetic cathinone invades drug arena, *Forensic Toxicol*, 2016; 34(1): 41-50.
35. Katselou M, Papoutsis I, **Nikolaou P**, Spiliopoulou C, Athanaselis S. Old opioids, new concerns: the case of acetylfentanyl. *Forensic Toxicol*, Article in press.
36. Katselou M, Papoutsis I, **Nikolaou P**, Qammaz S, Spiliopoulou C, Athanaselis S. Fenethylamine (Captagon) abuse. Local problems from an old drug become universal. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, Article in press.
37. Stefanidou M, **Nikolaou P**, Papoutsis I, Athanaselis S, Spiliopoulou C. Carbon monoxide: A constant threat. *J J Foren Sci* 2016; 2(1): 1-3.
38. Stefanidou M, Athanaselis S, **Nikolaou P**, Papoutsis I, Vardakou I, Fountos I, Attapolitou J, Spiliopoulou C, Papadodima S. A case-report of chemical pneumonitis and burns from pressurized liquid ammonia. *J J Foren Sci* 2016; 2(2): 1-4.
39. Katselou M, Papoutsis I, **Nikolaou P**, Spiliopoulou C, Athanaselis S. Bioanalysis of antihistamines for clinical and forensic purposes. *Biomed Chromatogr*, Article in press.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η επιληψία είναι μία νόσος γνωστή από την αρχαιότητα και σήμερα αποτελεί μία από τις σχετικά πιο συχνές νόσους στον κόσμο, αφού υπολογίζεται ότι περίπου το 1% του πληθυσμού πάσχει από επιληψία, παρόλο που συχνά η πάθηση δεν εκδηλώνεται κλινικά. Το ποσοστό αυτό, το οποίο αυξάνεται, αντιστοιχεί κατά το μεγαλύτερο μέρος του σε παιδιά ηλικίας περίπου 6-15 χρονών. Η επιληψία οφείλεται σε χημικές ή δομικές διαταραχές που παρατηρούνται στο φλοιό του εγκεφάλου. Οι επιληπτικές κρίσεις εκδηλώνονται ως διαφορετικού τύπου διαταραχές που έχουν ως κοινό σημείο τους επαναλαμβανόμενους παροξυσμούς με αιφνίδια, υπέρμετρη και ανώμαλη εκφόρτιση εγκεφαλικών νευρώνων.

Οι επιληπτικές κρίσεις μπορούν να ελεγχθούν απόλυτα στο 50% περίπου των επιληπτικών ασθενών με την κατάλληλη αντιεπιληπτική αγωγή. Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα είναι μία ομάδα ουσιών που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην κλινική πράξη για την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης και της έντασης των επιληπτικών κρίσεων. Σήμερα, στον ελληνικό χώρο κυκλοφορούν κυρίως τα εξής αντιεπιληπτικά φάρμακα: αιθοσουξιμίδη, βαλπροϊκό οξύ, βιγκαμπατρίνη, γκαμπαπεντίνη, καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, πρεγκαμπαλίνη, τιαγκαμπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινυτοΐνη, ενώ κάποια από τα φάρμακα αυτά έχουν εγκριθεί από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων (ΕΟΦ) τα τελευταία χρόνια. Επίσης, ορισμένα από αυτά τα αντιεπιληπτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται στη θεραπευτική κι άλλων νοσολογικών καταστάσεων κυρίως του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Σκοπός της αντιεπιληπτικής θεραπευτικής αγωγής είναι ο έλεγχος των επιληπτικών κρίσεων με τη συνεχή διατήρηση δραστικών επιπέδων του φαρμάκου στο αίμα και κατ' επέκταση στον εγκεφαλικό ιστό. Τα φάρμακα που δρούν αποτελεσματικά στη μείωση των επιληπτικών κρίσεων, είτε αναστέλλουν την έναρξη της ηλεκτρικής εκφόρτισης στην εστία, είτε, συνηθέστερα, εμποδίζουν τη διάδοση της ανώμαλης ηλεκτρικής εκφόρτισης σε παρακείμενες περιοχές του εγκεφάλου. Η δόση και η συχνότητα της χορήγησης των αντιεπιληπτικών φαρμάκων καθαρίζονται από το χρόνο ημίσειας ζωής του κάθε φαρμάκου. Η εκτεταμένη χρήση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στη κάθε μέρα κλινική πράξη, καθώς και η ιδιαιτερότητα του κάθε ασθενή που βρίσκεται υπό αγωγή με αντιεπιληπτικά φάρμακα, επιβάλλει την παρακολούθηση των επιπέδων των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο αίμα ασθενών, τόσο σε επίπεδο ανταπόκρισης στη θεραπεία όσο και σε επίπεδο πρόληψης εμφάνισης τοξικών εκδηλώσεων. Επειδή τα αντιεπιληπτικά φάρμακα χορηγούνται για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα, κάποιες φορές ακόμη και ισοβίως, υπάρχει ο κίνδυνος εμφάνισης τοξικών εκδηλώσεων λόγω ενδεχόμενης αθροιστικής δράσης των

αντιεπιληπτικών φαρμάκων στον οργανισμό. Επομένως, η παρακολούθηση της στάθμης των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο αίμα ασθενών που είναι υπό αντιεπιληπτική αγωγή είναι απαραίτητη, ώστε αφενός να καθορίζεται επακριβώς το θεραπευτικό σχήμα που λαμβάνει ο ασθενής, συσχετιζόμενο πάντα με την κλινική του κατάσταση, και αφετέρου να επιτυγχάνεται η διατήρηση της στάθμης των φαρμάκων εντός των θεραπευτικών ορίων. Ορισμένοι ασθενείς μπορεί να συνεχίζουν να εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις παρόλο που οι συγκεντρώσεις του υπό αγωγή αντιεπιληπτικού φαρμάκου βρίσκεται εντός των θεραπευτικών ορίων, οπότε απαιτείται αλλαγή του αντιεπιληπτικού φαρμάκου ή προσθήκη δεύτερου φαρμάκου με πιθανή σχετική μείωση της δόσης του αρχικά χορηγηθέντος φαρμάκου. Επίσης, το ίδιο εφαρμόζεται σε περίπτωση εμφάνισης τοξικών συμπτωμάτων στον ασθενή. Τέλος, είναι συχνό φαινόμενο τα άτομα που λαμβάνουν αντιεπιληπτικά φάρμακα να λαμβάνουν παράλληλα και άλλα φάρμακα, που μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση αλληλεπιδράσεων. Επομένως, και σε αυτές τις περιπτώσεις πρέπει να γίνεται παρακολούθηση των επιπέδων των αντιεπιληπτικών φαρμάκων.

Ο προσδιορισμός των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο αίμα, στο πλάσμα ή στον ορό μπορεί να βοηθήσει ουσιαστικά τους κλινικούς γιατρούς στη διαχείριση και αντιμετώπιση των διαφόρων κλινικών προβλημάτων των ασθενών. Επιπλέον, η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο αίμα απαιτείται κατά την τοξικολογική διερεύνηση δικαστικών υποθέσεων που αφορούν άτομα που βρίσκονταν υπό αντιεπιληπτική αγωγή. Για του λόγους αυτούς, ο Καθηγητής κ. Σ. Αθανασέλης, μου ανέθεσε την εκπόνηση της παρούσας διατριβής με σκοπό την ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά, καθώς και την εφαρμογή τους στην Κλινική και Δικαστική Τοξικολογία. Η διατριβή εκπονήθηκε εξολοκλήρου στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ευχαριστώ θερμά τη Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Καθηγήτρια κα. Χ. Σπηλιοπούλου για την εμπιστοσύνη που έχει δείξει στο άτομο μου όλα αυτά τα χρόνια και την υποστήριξή της κατά την εκπόνηση κι αυτής της διατριβής.

Προς τον Επιβλέποντα Καθηγητή κ. Σ. Αθανασέλη, εκφράζω τις πιο εγκάρδιες ευχαριστίες μου, για την ανάθεση του θέματος και για την ουσιαστική καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής. Τον ευχαριστώ επίσης θερμά, για τις πολύτιμες συμβουλές, κατευθύνσεις και επισημάνσεις του κατά τη συγγραφή και διόρθωση επιστημονικών εργασιών όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήταν παράλειψη μου, να μην ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Κ. Μαραβέλια, που πριν τη συνταξιοδότησή του αποτελούσε μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τις πολύτιμες πάντα συμβουλές του σε ερευνητικό και προσωπικό επίπεδο.

Ευχαριστώ θερμά τον Επικ. Καθηγητή κ. Ι. Παπουτσή, για τη ουσιαστική βοήθεια και τη μεθοδικότητα, με τα οποία με βοήθησε να αντιμετωπίσω δυσκολίες κατά την εκπόνηση του πειραματικού μέρους της διατριβής.

Προς όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, εκφράζω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες για την αρμονική συνεργασία σε όλους τους τομείς αυτό το διάστημα.

Η εκπόνηση μιας διατριβής απαιτεί εκτός από επιστημονική κατάρτιση και ενδελεχή μελέτη, ψυχικά αποθέματα η ανανέωση των οποίων πραγματοποιείται από την στήριξη των δικών μας ανθρώπων. Για το λόγο αυτό, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένειά μου και τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου, για την ηθική υποστήριξη, τη συμπαράσταση, την κατανόηση και την υπομονή που έδειξαν σε όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Αθήνα, Απρίλιος 2016
Παναγιώτα Δ. Νικολάου

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Επιληψία	3
1.1. Εισαγωγή	3
1.2. Είδη επιληψίας	4
1.3. Αντιμετώπιση επιληψίας-Μηχανισμός δράσης αντιεπιληπτικών φαρμάκων	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Αντιεπιληπτικά φάρμακα	11
2.1. Εισαγωγή	11
2.2. Αιθοσουξιμίδη	11
2.3. Βαλπροϊκό Οξύ	14
2.4. Βιγκαμπατρίνη	17
2.5. Γκαμπαπεντίνη	20
2.6. Καρβαμαζεπίνη	23
2.7. Λακοσαμίδη	25
2.8. Λαμοτριγίνη	28
2.9. Λεβετιρακετάμη	30
2.10. Οξυκαρβαζεπίνη	33
2.11. Πρεγκαμπαλίνη	35
2.12. Τιαγκαμπίνη	38
2.13. Τοπιραμάτη	40
2.14. Φαινοβαρβιτάλη	43
2.15. Φαινυτοΐνη	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Προσδιορισμός αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά	51
3.1. Αναγκαιότητα ποσοτικού προσδιορισμού των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο πλαίσιο της Κλινικής και Δικαστικής Τοξικολογίας	51
3.2. Μη χρωματογραφικές μέθοδοι προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά	54
3.3. Τεχνικές Προκατεργασίας Δείγματος	55
3.3.1. Υγρό-υγρό εκχύλιση (liquid-liquid extraction, LLE)	58
3.3.2. Εκχύλιση στερεής φάσης (solid phase extraction, SPE)	59
3.4. Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές για τον Προσδιορισμό Αντιεπιληπτικών Φαρμάκων σε Βιολογικά Υλικά	60

3.4.1. Αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με διάφορους ανιχνευτές	61
3.4.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με διάφορους ανιχνευτές	67
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Οργανολογικός και Υλικοτεχνικός Εξοπλισμός	83
Παρασκευή Διαλυμάτων και Προτύπων Βιολογικών Δειγμάτων	
5.1. Αέριος χρωματογράφος συνδεδεμένος με φασματογράφο μαζών (GC/MS)	83
5.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός	83
5.3. Διαλύτες και αντιδραστήρια	84
5.4. Στήλες εκχύλισης	85
5.5. Βιολογικά υποστρώματα	85
5.6. Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης ουσιών αναφοράς	86
5.7. Παρασκευή διαλυμάτων	87
5.7.1. Αραιότερα διαλύματα παρακαταθήκης	87
5.7.2. Μικτά μεθανολικά διαλύματα εργασίας για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των αναλυτικών μεθόδων	88
5.7.3. Μικτά μεθανολικά διαλύματα εργασίας για την παρασκευή προτύπων δειγμάτων πλάσματος και ολικού αίματος	89
5.7.4. Μικτά διαλύματα εργασίας για τη μελέτη ειδικότητας των μεθόδων	91
5.7.5. Ρυθμιστικά διαλύματα	92
5.7.6. Διαλύματα έκλουσης των εκχυλίσεων στερεής φάσης	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Βελτιστοποίηση Χρωματογραφικής Ανάλυσης	95
6.1. Βελτιστοποίηση παραγωγοποίησης	95
6.2. Βελτιστοποίηση χρωματογραφικών συνθηκών	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Ανάπτυξη και Βελτιστοποίηση της Προκατεργασίας των Βιολογικών Δειγμάτων	107
7.1. Επιλογή εσωτερικών προτύπων	108
7.2. Δοκιμασίες ανάπτυξης της προκατεργασίας δειγμάτων ολικού αίματος	109
7.2.1. Υγρό-υγρό εκχύλιση εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος	110
7.2.2. Εκχύλιση στερεής φάσης εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος	115
7.2.3. Βελτιστοποίηση της προκατεργασίας δειγμάτων ολικού αίματος	121
7.3. Δοκιμασίες προκατεργασίας δειγμάτων πλάσματος	125

7.4. Τελικές μέθοδοι προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε πλάσμα και ολικό αίμα	126
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Πρωτόκολλο Επικύρωσης των Αναπτυχθέντων Μεθόδων Προσδιορισμού Αντιεπιληπτικών Φαρμάκων σε Ολικό Αίμα και Πλάσμα	131
8.1. Εισαγωγή	131
8.2. Εκλεκτικότητα της μεθόδου	131
8.3. Ειδικότητα της μεθόδου	132
8.4. Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου	132
8.5. Γραμμικότητα της μεθόδου	133
8.6. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης	133
8.7. Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου	134
8.8. Ορθότητα της μεθόδου, εντός της ημέρας και δια των ημερών	135
8.9. Απόλυτη ανάκτηση της μεθόδου	136
8.10. Ανθεκτικότητα της μεθόδου	136
8.11. Σταθερότητα εμβολιασμένων προτύπων βιολογικών δειγμάτων	138
8.12. Κριτήρια αποδοχής ανάλυσης δειγμάτων	138
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Επικύρωση της Αναπτυχθείσας Μεθόδου Προσδιορισμού Αλκαλικών Αντιεπιληπτικών Φαρμάκων σε Ολικό Αίμα	141
9.1. Εισαγωγή	141
9.2. Εκλεκτικότητα	141
9.3. Ειδικότητα	146
9.4. Προσδιορισμός κατώτατων ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)	146
9.5. Γραμμικότητα	152
9.6. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης	158
9.7. Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα	165
9.8. Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών	166
9.9. Απόλυτη ανάκτηση	180
9.10. Ανθεκτικότητα	182
9.11. Σταθερότητα εμβολιασμένων προτύπων δειγμάτων ολικού αίματος	183
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: Επικύρωση της Αναπτυχθείσας Μεθόδου Προσδιορισμού Όξινων και Επαμφοτεριζόντων Αντιεπιληπτικών Φαρμάκων σε Ολικό Αίμα	187
10.1. Εισαγωγή	187

10.2. Εκλεκτικότητα	187
10.3. Ειδικότητα	190
10.4. Προσδιορισμός κατώτατων ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)	190
10.5. Γραμμικότητα	194
10.6. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης	197
10.7. Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα	200
10.8. Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών	201
10.9. Απόλυτη ανάκτηση	208
10.10. Ανθεκτικότητα	209
10.11. Σταθερότητα εμβολιασμένων προτύπων δειγμάτων ολικού αίματος	209
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: Επικύρωση των Μεθόδων Προσδιορισμού Αντιεπιληπτικών Φαρμάκων στο Πλάσμα	213
11.1. Εισαγωγή	213
11.2. Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου για τον προσδιορισμό αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο πλάσμα	213
11.3. Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου για τον προσδιορισμό όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο πλάσμα	222
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12: Εφαρμογές των Αναπτυχθέντων Μεθόδων Προσδιορισμού των Αντιεπιληπτικών Φαρμάκων στην Κλινική και Δικαστική Τοξικολογία	229
12.1. Εισαγωγή	229
12.2. Εφαρμογές των αναπτυχθέντων μεθόδων προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων στην Κλινική Τοξικολογία σε δείγματα πλάσματος	229
12.3. Εφαρμογές των αναπτυχθέντων μεθόδων προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων στη Δικαστική Τοξικολογία σε μεταθανάτια δείγματα αίματος	234
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13: Συζήτηση	243
Περίληψη	251
Summary	253
Βιβλιογραφία	255

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΠΙΛΗΨΙΑ

1.1.Εισαγωγή

Η επιληψία είναι μία χρόνια πάθηση αρκετά διαδεδομένη στο γενικό πληθυσμό (περίπου 1%), σε άτομα όλων των ηλικιών και των δύο φύλων. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), υπολογίζεται ότι 50-70 εκατομμύρια άνθρωποι στον κόσμο υποφέρουν από κάποια μορφή επιληψίας και μάλιστα η νόσος είναι περισσότερο συνηθισμένη στις χώρες του τρίτου κόσμου επειδή τα αντιεπιληπτικά φάρμακα δεν είναι διαθέσιμα ή η διάθεσή τους είναι περιορισμένη [Schmidt και Schachter, 2014; Jones, 2016]. Η επιληψία δεν είναι μια ενιαία νοσολογική οντότητα, αλλά είναι ένα σύνολο διαφορετικών διαταραχών όπου εμφανίζονται επαναλαμβανόμενα επεισόδια επιληπτικής κρίσης, λόγω μιας υπάρχουσας δομικής ή λειτουργικής εγκεφαλικής βλάβης [Maguire και συν., 2012]. Η επιληπτική κρίση είναι ένα επεισόδιο ανώμαλης ηλεκτρικής δραστηριότητας σε κάποιο σημείο του εγκεφάλου, που αρχίζει όταν η χημική επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων διαταράσσεται για οποιοδήποτε λόγο, με αποτέλεσμα μια υπέρμετρη και ανώμαλη εκφόρτιση εγκεφαλικών νευρώνων [Clark και συν., 2012]. Οι εκφορτίσεις αυτές προκαλούν διαταραχές της κίνησης και της αντίληψης του χώρου, που είναι μικρής διάρκειας αλλά έχουν την τάση να επαναλαμβάνονται. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται είναι ανάλογα με την ανατομική θέση της ηλεκτρικής εκφόρτισης. Σε περίπτωση που συμμετέχει ο κινητικός φλοιός, οι επιληπτικές κρίσεις μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση σπασμών, που μπορεί να είναι κλονικοί (τρόμος στα άκρα), τονικοί (καθήλωση άκρων σε σύσπαση) ή μυοκλονικοί (τινάγματα), καθώς και γρήγορο ανοιγοκλείσιμο οφθαλμών ή βολβοστροφή και δυσκολία στην ομιλία. Εάν συμμετέχει ο βρεγματικός ή ο ινιακός φλοιός, μπορεί να εμφανιστούν αισθητικές, οπτικές, ακουστικές ή οσφρητικές διαταραχές [Sveinbjornsdottir και Duncan, 1993; Werhahn και συν., 2000; Pfaender και συν., 2004; Duncan, 2015]. Στον καθορισμό της βαρύτητας της νόσου λαμβάνονται υπόψη δύο ανεξάρτητοι μεταξύ τους παράγοντες, η ένταση των συμπτωμάτων και η συχνότητα εμφάνισης των επιληπτικών κρίσεων [Meinardi και συν., 1993].

Η νευρωνική εκφόρτιση που παρατηρείται στην επιληψία προκαλείται από την πυροδότηση μιας μικρής ομάδας νευρώνων που εντοπίζονται σε μία συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου, που ονομάζεται πρωτογενής εστία. Ανατομικά, αυτή η περιοχή μπορεί να εμφανίζεται απολύτως φυσιολογική. Συνήθως, δεν υπάρχει προσδιορισμένο αίτιο της επιληψίας, αν και οι εστιακές περιοχές που παρουσιάζουν λειτουργική ανωμαλία πιθανόν να δραστηριοποιούνται από μεταβολές στα αέρια του αίματος, στο pH, στους ηλεκτρολύτες ή στη διαθεσιμότητα της γλυκόζης [Uribe-Escamilla και συν., 2007; Kadam και συν., 2007; Clark και συν., 2012]. Επιληπτικές κρίσεις μπορεί επίσης να εμφανίσουν άτομα λόγω άλλων αιτιών όπως π.χ. μόνιμης νευρολογικής βλάβης που προκλήθηκε από υποξία, ουραιμία, εγκεφαλίτιδα ή δηλητηρίαση από φάρμακα, σοβαρού τραυματισμού στον εγκέφαλο μετά από τροχαίο ατύχημα ή πτώση εξ ύψους, λόγω αιμορραγικού εγκεφαλικού επεισοδίου ή εμφάνισης όγκου στον εγκέφαλο [Chen και συν., 2009; Kojovic και συν., 2011; Dijck και συν., 2012; Maschio, 2012; You και συν., 2012; Szaflarski και συν., 2014; Jones, 2016].

1.2.Είδη επιληψίας

Η επιληψία χαρακτηρίζεται ιδιοπαθής ή πρωτοπαθής όταν δεν εμφανίζεται συγκεκριμένο ανατομικό αίτιο που προκαλεί τις επιληπτικές κρίσεις, όπως ένα τραύμα ή ένα νεόπλασμα, αλλά μπορεί να προκληθούν λόγω μιας κληρονομικής ανωμαλίας του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η αντιεπιληπτική θεραπεία είναι χρόνια και συνήθως για ολόκληρη τη ζωή [Marini και συν., 2003; Panayiotopoulos, 2005].

Δευτεροπαθής επιληψία χαρακτηρίζεται η εκδήλωση επιληπτικών κρίσεων λόγω αναστρέψιμων ή αντιμετωπίσιμων διαταραχών όπως οι όγκοι, αιμάτωμα λόγω εγκεφαλικού επεισοδίου ή τραυματισμού της κεφαλής, η υπογλυκαιμία, οι λοιμώξεις των μηνίγγων ή η απότομη στέρηση αλκοόλ σε ένα αλκοολικό άτομο. Η αντιεπιληπτική αγωγή σε αυτές τις περιπτώσεις χορηγείται μέχρι να αντιμετωπιστεί η πρωταρχική αιτία που προκαλεί τις επιληπτικές κρίσεις. Οι επιληπτικές κρίσεις που ακολουθούν ένα εγκεφαλικό επεισόδιο ή έναν τραυματισμό του ΚΝΣ μπορεί να προκαλέσουν ανεπανόρθωτη βλάβη στο ΚΝΣ [Chen και συν., 2009; Maschio, 2012; You και συν., 2012; Szaflarski και συν., 2014; Jones, 2016].

Οι μορφές επιληψίας έχουν ταξινομηθεί σε δύο μεγάλες ομάδες, τη μερική ή εστιακή και τη γενικευμένη επιληψία. Η συμπτωματολογία κάθε τύπου επιληψίας εξαρτάται από την εντόπιση της νευρωνικής εκφόρτισης κι από το βαθμό εξάπλωσης της ηλεκτρικής διαταραχής σε άλλους εγκεφαλικούς νευρώνες [Panayiotopoulos, 2005].

Η μερική ή εστιακή επιληψία έχει εντοπισμένη έναρξη και οι κρίσεις της μπορεί να εξελιχθούν σε γενικευμένους τονικο-κλονικούς σπασμούς, και διαχωρίζεται σε απλή και σύνθετη. Στην απλή εστιακή επιληψία, οι επιληπτικές κρίσεις προκαλούνται από μία ομάδα υπερδραστήριων νευρώνων που παρουσιάζουν ανώμαλη ηλεκτρική δραστηριότητα και περιορίζονται σε μια μεμονωμένη εστία στον εγκέφαλο, ενώ η ηλεκτρική διαταραχή δεν εξαπλώνεται. Αυτό το είδος της επιληψίας μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι ασθενείς δεν παρουσιάζουν απώλεια συνείδησης και συχνά εμφανίζουν ανώμαλη κινητική δραστηριότητα σε ένα μόνο μέλος του σώματος ή σε μία ομάδα μυών που ελέγχεται από την περιοχή του ΚΝΣ που εμφανίζει τη διαταραχή, ενώ μπορεί να εμφανίσουν και αισθητικές διαταραχές. Στη σύνθετη εστιακή επιληψία, οι ασθενείς παρουσιάζουν σύνθετες ψευδαισθήσεις, νοητικές διαταραχές και απώλεια συνείδησης. Η κινητική δυσλειτουργία μπορεί να συμπεριλαμβάνει κινήσεις μάσησης, διάρροια και απώλεια ούρων. Το 80% των ατόμων με σύνθετη εστιακή επιληψία εμφανίζει τις πρώτες επιληπτικές κρίσεις σε ηλικία μικρότερη από 20 ετών [Panayiotopoulos, 2005; Clark και συν., 2012; Longmore και συν., 2014].

Στην γενικευμένη επιληψία, οι επιληπτικές κρίσεις ξεκινούν τοπικά αλλά γρήγορα εξαπλώνονται και προκαλούν ανώμαλη ηλεκτρική εκφόρτιση σε όλη την έκταση των δύο ημισφαιρίων του εγκεφάλου, που συνοδεύονται ή όχι από σπασμούς [Panayiotopoulos, 2005]. Οι ασθενείς αυτοί συνήθως παρουσιάζουν αμέσως απώλεια συνείδησης. Τα είδη γενικευμένης επιληψίας είναι η τονικοκλονική επιληψία (grand mal), η αφαιρετική (petit mal), η μυοκλονική επιληψία και η επιληπτική κατάσταση (status epilepticus) [Blumenfeld, 2005; Maguire και συν., 2012; <https://www.epilepsy.org.au/sites/default/files/Seizure%20Smart%20-%20Classification%20of%20Seizures.pdf>]. Στα είδη της γενικευμένης επιληψίας κατατάσσονται και οι πυρετικοί σπασμοί [Clark και συν., 2012].

Η τονικοκλονική επιληψία είναι η πιο συχνή και πιο δραματική μορφή επιληψίας, όπου οι επιληπτικές κρίσεις προκαλούν απώλεια συνείδησης που ακολουθείται από τονική δυσκαμψία των άκρων, τρόμο και κλονική φάση με

εκτίναξη των άκρων, ενώ μετά ακολουθεί μία περίοδος σύγχυσης και εξάντλησης [Bell και συν., 1997]. Στην αφαιρετική επιληψία, οι επιληπτικές κρίσεις περιλαμβάνουν αυτοματισμούς και μια σύντομη (10-45 δευτερόλεπτα), απότομη και αυτοπεριοριζόμενη απώλεια συνείδησης [Sadock και Sadock, 2011]. Ο ασθενής προσηλώνει το βλέμμα και ανοιγοκλείνει γρήγορα τα βλέφαρα για ένα διάστημα 3 έως 5 δευτερολέπτων. Το είδος αυτό εμφανίζεται συνήθως σε ασθενείς 3-5 ετών και διαρκεί μέχρι την εφηβεία [Clark και συν., 2012]. Στην μυοκλονική επιληψία, οι επιληπτικές κρίσεις περιλαμβάνουν σύντομα επεισόδια σύσπασης των μυών που μπορεί να επαναλαμβάνονται για αρκετά λεπτά. Οι μυοκλονικοί σπασμοί είναι σπάνιοι, εμφανίζονται σε οποιαδήποτε ηλικία και συχνά είναι το αποτέλεσμα μιας μόνιμης νευρολογικής βλάβης που προκλήθηκε από υποξία, ουραιμία, εγκεφαλίτιδα ή δηλητηρίαση από φάρμακα [Kojovic και συν., 2011; Dijck και συν., 2012]. Οι πυρετικοί σπασμοί είναι γενικευμένοι τονικοκλονικοί και μικρής διάρκειας, που εμφανίζονται συχνότερα σε μικρά παιδιά ηλικίας 3 μηνών έως 5 ετών, σε ασθένειες που συνοδεύονται από υψηλό πυρετό. Αν και μπορούν να τρομοκρατήσουν, είναι καλοήθεις και δεν προκαλούν θάνατο, νευρολογική βλάβη, τραυματισμό ή διαταραχές της μάθησης και σπάνια απαιτούν φαρμακευτική αντιμετώπιση [<http://www.health.vic.gov.au/edfactsheets/downloads/febrile-convulsions-in-children.pdf>; Hirtz, 1989; Clark και συν., 2012]. Η επιληπτική κατάσταση (status epilepticus) χαρακτηρίζεται από παρατεταμένο επεισόδιο σπασμών διάρκειας μεγαλύτερης των 30 λεπτών ή από διαδοχικά επεισόδια σπασμών μικρότερης διάρκειας, κατά τα μεσοδιαστήματα των οποίων δεν ανακτάται πλήρως το επίπεδο συνείδησης [Μπενέτου και Γιουρούκας, 2002].

1.3.Αντιμετώπιση επιληψίας-Μηχανισμός δράσης αντιεπιληπτικών φαρμάκων

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης της επιληψίας είναι η φαρμακοθεραπεία. Στη σημερινή εποχή υπάρχουν αρκετά αντιεπιληπτικά φάρμακα που μειώνουν ή εμποδίζουν την εμφάνιση επικίνδυνων επιληπτικών κρίσεων σε περίπου 70% των ασθενών. Συγκεκριμένα, στο 50% των επιληπτικών ασθενών μπορούν να ελεγχθούν απόλυτα οι επιληπτικές κρίσεις, ενώ τουλάχιστον στους μισούς από τους υπόλοιπους επιτυγχάνεται σημαντική βελτίωση της κατάστασής τους. Σκοπός της αντιεπιληπτικής θεραπευτικής αγωγής είναι ο έλεγχος των επιληπτικών κρίσεων με τη συνεχή διατήρηση δραστικών επιπέδων του φαρμάκου στο πλάσμα και

από εκεί στον εγκεφαλικό ιστό [Perucca, 2009; Schmidt και Schachter, 2014; Jones, 2016].

Τα φάρμακα που δρούν αποτελεσματικά στη μείωση των επιληπτικών κρίσεων, είτε αναστέλλουν την έναρξη της ηλεκτρικής εκφόρτισης στην εστία, είτε, συνηθέστερα, εμποδίζουν τη διάδοση της ανώμαλης ηλεκτρικής εκφόρτισης σε παρακείμενες περιοχές του εγκεφάλου. Συγκεκριμένα, τα αντιεπιληπτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται έχουν ποικίλους μηχανισμούς δράσης που περιλαμβάνουν καταστολή της ταχείας και υπερβολικής πυροδότησης των νευρώνων στις συνάψεις, ενεργοποίηση των υποδοχέων του διεγερτικού γλουταμινικού αμινοξέος ή παρεμπόδιση των υποδοχέων του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή GABA. Ορισμένα αντιεπιληπτικά αποκλείουν τους διαύλους ιόντων ασβεστίου, ενώ μερικά ενισχύουν τη δραστηριότητα των νευροδιαβιβαστών GABA [Faingold και Browning, 1987; MacDonald και Kelly, 1993; Davies, 1995; MacDonald και Kelly, 1995; Czapinski και συν., 2005; Sills, 2011; Conway και Henry, 2012; Rogawski και Cavazos, 2014; Jones, 2016].

Η επιλογή της φαρμακευτικής αντιεπιληπτικής αγωγής για την καταστολή ή τη μείωση της συχνότητας των επιληπτικών κρίσεων εξαρτάται από το είδος των επιληπτικών κρίσεων και την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Έτσι, οι τονικοκλονικές κρίσεις αντιμετωπίζονται διαφορετικά από τις αφαιρετικές κρίσεις. Διαφορετικά φάρμακα μπορεί να είναι εξίσου αποτελεσματικά και η επικινδυνότητα του φαρμάκου συχνά αποτελεί σοβαρό κριτήριο στην επιλογή της φαρμακευτικής αγωγής [Faingold και Browning, 1987; MacDonald και Kelly, 1993; Davies, 1995; MacDonald και Kelly, 1995; Czapinski και συν., 2005; Sills, 2011; Conway και Henry, 2012; Margolis και συν., 2014; Rogawski και Cavazos, 2014].

Η δόση και η συχνότητα χορήγησής των αντιεπιληπτικών φαρμάκων καθορίζονται από το χρόνο ημίσειας ζωής του καθενός. Αρχικά χορηγούνται μικρές δόσεις που στη συνέχεια αυξάνονται βαθμιαία μέχρι να ελεγχθούν οι κρίσεις ή να εμφανιστούν τοξικά φαινόμενα [Perucca, 2009].

Η ημερήσια ποσότητα του αντιεπιληπτικού φαρμάκου πρέπει να χορηγείται σε όσο το δυνατόν λιγότερες δόσεις, ώστε να είναι πιο εύκολο για τον ασθενή να εφαρμόζει το θεραπευτικό σχήμα. Τα περισσότερα αντιεπιληπτικά, όταν χορηγούνται σε ενδιάμεσες ημερήσιες δόσεις μπορεί να δίνονται δύο φορές την ημέρα. Αντιεπιληπτικά φάρμακα που έχουν μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής, όπως η φαινοβαρβιτάλη, μπορεί να χορηγούνται μόνο μια φορά ημερησίως πριν από την

κατάκλιση. Σε περίπτωση που απαιτούνται τα αντιεπιληπτικά να χορηγηθούν σε υψηλές ημερήσιες δόσεις προτιμάται η κατανομή τους σε 3 ή 4 δόσεις την ημέρα για να ελαχιστοποιηθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως η υπνηλία, που σχετίζονται με υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα. Κατά κανόνα τα μικρά παιδιά βιομετατρέπουν τα αντιεπιληπτικά φάρμακα ταχύτερα από τους ενήλικες και γι αυτό στα παιδιά πρέπει να χορηγούνται σε περισσότερες και μεγαλύτερες δόσεις ανά χιλιόγραμμο βάρους σώματος [Warner και συν., 1998; Perucca, 2005; Panayiotopoulos, 2010].

Η έναρξη της θεραπείας πρέπει να γίνεται κατά κανόνα με ένα αντιεπιληπτικό φάρμακο, που στις περισσότερες περιπτώσεις αρκεί για τον έλεγχο των επιληπτικών κρίσεων. Στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της αντιεπιληπτικής φαρμακευτικής αγωγής λαμβάνονται υπόψη οι επίδρασεις στην ένταση και στη συχνότητα εμφάνισης των κρίσεων [Meinardi και συν., 1993]. Αν η θεραπεία με ένα μόνο φάρμακο δεν είναι αποτελεσματική, μπορεί να προστεθεί κι ένα δεύτερο φάρμακο στο θεραπευτικό σχήμα. Η αλλαγή του θεραπευτικού σχήματος δικαιολογείται μόνο όταν οι κρίσεις συνεχίζονται παρά τις υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα του πρώτου φαρμάκου ή όταν εμφανιστούν σημεία τοξικότητας. Χρησιμοποίηση περισσότερων των δύο αντιεπιληπτικών φαρμάκων σπανίως είναι απαραίτητη [Cretin και Hirsch, 2010; Brodie και Sills, 2011; Brodie, 2015].

Η χορήγηση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων πρέπει να συνεχίζεται για τρία τουλάχιστον χρόνια από την εμφάνιση της τελευταίας κρίσης. Τυχόν παράταση της χορήγησης θα εξαρτηθεί από το είδος των κρίσεων, την ευκολία ή μη του ελέγχου τους και την ηλεκτροεγκεφαλογραφική εικόνα [Panayiotopoulos, 2010].

Ανεξαρτήτως πάντως από τα παραπάνω, διακοπή της θεραπείας επιβάλλεται 5 χρόνια μετά την τελευταία επιληπτική κρίση. Πιθανότητα υποτροπής υπάρχει στο 15% περίπου των περιπτώσεων. Απότομη διακοπή των αντιεπιληπτικών φαρμάκων ενέχει τον κίνδυνο επανεμφάνισης των επιληπτικών κρίσεων, που μπορεί να φθάσει μέχρι κατάσταση status epilepticus. Για τον λόγο αυτόν η διακοπή πρέπει να γίνεται βαθμιαίως σε διάστημα μηνών. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση αλλαγής από ένα αντιεπιληπτικό φάρμακο σε άλλο που πρέπει επίσης να γίνεται βαθμιαίως σε διάστημα εβδομάδων. Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα προκαλούν ενζυμική επαγωγή με αποτέλεσμα να ελαττώνουν τη δραστικότητα άλλων συγχρόνως χορηγουμένων φαρμάκων [Raymond, 2007; Hixson, 2010; Sander, 2015].

Στον άνθρωπο ο κίνδυνος πρόκλησης συγγενών ανωμαλιών του εμβρύου λόγω λήψης αντιεπιληπτικών φαρμάκων είναι πρακτικά μικρός. Τυχόν διακοπή της θεραπείας στη διάρκεια της κύησης θα προκαλέσει υποτροπή των κρίσεων, που η επίδρασή τους στο έμβρυο δεν είναι γνωστή και δεν μπορεί να υποστηριχθεί ότι είναι λιγότερο επιβλαβής από τη φαρμακευτική αγωγή. Γι' αυτό η αντιεπιληπτική αγωγή θα πρέπει να συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της κύησης [Dolk και McElhatton, 2002; Pennell, 2005; Hernandez-Díaz και συν., 2012].

Επιπλέον των αντιεπιληπτικών φαρμάκων έχουν δοκιμαστεί θεραπείες που περιλαμβάνουν νευροχειρουργικές επεμβάσεις (20-30% ασθενών βασανίζονται από επιληπτικές κρίσεις και η φαρμακοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική), εναλλακτικές δίαιτες (κετογόνος διαίτα), ψύξη του εγκεφάλου, μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων και αμφιλεγόμενη χρήση ιατρικής μαριχουάνας [Jones, 2016; Killestein, 2016; Reddy και Golub, 2016]. Η κετογόνος διαίτα χρησιμοποιείται ως εναλλακτικό μέσο βελτίωσης ή και εξάλειψης της φαρμακοανθεκτικής επιληψίας και είναι διαίτα πλούσια σε λιπαρά, επαρκής σε πρωτεΐνες και φτωχή σε υδατάνθρακες, η οποία έχει σχεδιαστεί για να μιμείται πολλές από τις βιοχημικές μεταβολές που συνδέονται με την παρατεταμένη νηστεία [Baranano και Hartman, 2008].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΤΙΕΠΙΛΗΠΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

2.1. Εισαγωγή

Στη σημερινή εποχή, τα αντιεπιληπτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται κυρίως στον Ελλαδικό χώρο και τα οποία μελετήθηκαν σε αυτή τη διδακτορική διατριβή είναι η αιθοσουξιμίδη, το βαλπροϊκό οξύ, η βιγκαμπατρίνη, η γκαμπαπεντίνη, η καρβαμαζεπίνη, η λακοσαμίδη, η λαμοτριγίνη, η λεβετιρακετάμη, η οξυκαρβαζεπίνη, η πρεγκαμπαλίνη, η τιαγκαμπίνη, η τοπιραμάτη, η φαινοβαρβιτάλη και η φαινυτοΐνη. Η χημική δομή των δεκατεσσάρων αντιεπιληπτικών φαρμάκων που μελετήθηκαν παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.1.

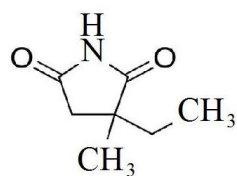
2.2. Αιθοσουξιμίδη

Η αιθοσουξιμίδη [(RS)-3-αιθυλ-3-μεθυλ-πυρολιδινό-2,5-δione] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα αντιεπιληπτικό φάρμακο που η χρήση του εγκρίθηκε το 1960 στην Ευρώπη για τη θεραπεία της επιληψίας ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα (<http://livertox.nih.gov/Ethosuximide.htm>). Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Zarontin (Ι.Φ.Ε.Τ. Α.Ε.) [Αιθοσουξιμίδη, Γαληνός]. Η αιθοσουξιμίδη ενδείκνυται κυρίως σε τυπικές αφαιρετικές κρίσεις ως μονοθεραπεία ή να συνδυαστεί με άλλο αντιεπιληπτικό φάρμακο. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της αιθοσουξιμιδης κυμαίνεται από 500 έως 2000 mg. Η αιθοσουξιμίδη αντενδείκνυται σε άτομα με υπερευαισθησία στα σουξινιμίδια [Tenney και Jain, 2014; Vajda και Eadie, 2014].

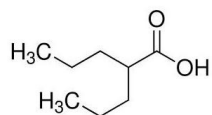
Ο μηχανισμός δράσης της αιθοσουξιμιδης περιλαμβάνει τον αποκλεισμό πρωτίστως των T-τύπου διαύλων ασβεστίου (Ca^{2+}) στους θαλαμικούς νευρώνες, και πιθανώς κι άλλων κατηγοριών διαύλων ιόντων [Patsalos 2005; Zamponi και συν., 2015].

Η αιθοσουξιμίδη απορροφάται πλήρως μετά την από του στόματος χορήγηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται σε 3-5 ώρες, ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μέσα σε 4 με 7 ημέρες [Martindale, 2007]. Το φάρμακο εμφανίζει καλή βιοδιαθεσιμότητα (95-100%) και γραμμική φαρμακοκινητική. Η αιθοσουξιμίδη

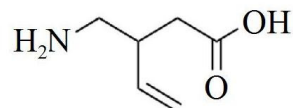
Σχήμα 2.1: Η χημική δομή των δεκατεσσάρων αντιεπιληπτικών φαρμάκων που μελετήθηκαν.



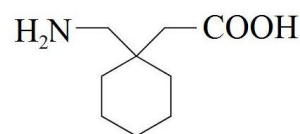
Αιθοσουξιμίδη



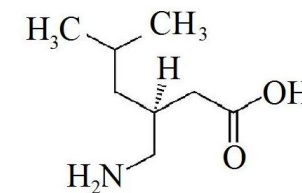
Βαλπροϊκό Οξύ



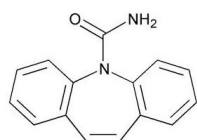
Βιγκαπατρίνη



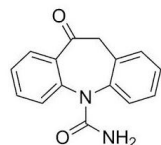
Γκαμπαπεντίνη



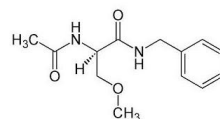
Πρεγκαμπαλίνη



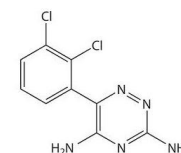
Καρβαμαζεπίνη



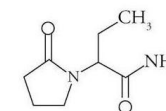
Οξυκαρβαζεπίνη



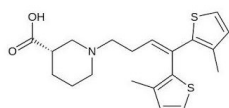
Λακοσαμίδη



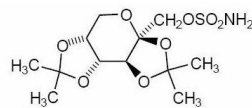
Λαμοτριγίνη



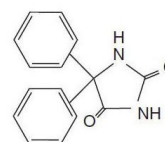
Λεβετιρακετάμη



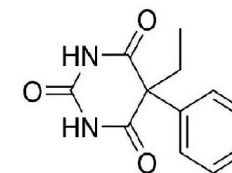
Τιαγκαμίνη



Τοπιραμάτη



Φαινυτοΐνη



Φαινοβαρβιτάλη

έχει όγκο κατανομής 0,7 L/kg και κατανέμεται σε όλο το σώμα, αλλά δεν συνδέεται σημαντικά με τις πρωτεΐνες του πλάσματος [Patsalos, 2005; Vajda και Eadie, 2014]. Η αιθοσουξιμίδη βιομετατρέπεται εκτενώς στο ήπαρ μέσω υδροξυλίωσης προς ένα κύριο μεταβολίτη, που είναι φαρμακολογικά αδρανής, και απεκκρίνεται στα ούρα κυρίως υπό τη μορφή του μεταβολίτη της, ελεύθερου ή συζευγμένου, και περίπου κατά 12 με 20% ως μητρική ουσία. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της αιθοσουξιμίδης είναι περίπου 40 έως 60 ώρες στους ενήλικες, ενώ στα παιδιά είναι περίπου 30 ώρες [Martindale, 2007; Vajda και Eadie, 2014]. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις της αιθοσουξιμίδης κυμαίνονται από 40 έως 100 µg/mL, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 µg/mL θεωρούνται τοξικές. Η αιθοσουξιμίδη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [Hiemke και συν., 2011; Davanzo και συν., 2013; http://www.globalrph.com/labs_drug_levels.htm].

Στις πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της αιθοσουξιμίδης περιλαμβάνονται γαστρική δυσφορία, ναυτία, έμετοι, ανορεξία, λόξυγγας, αλλά και διαταραχές από το ΚΝΣ, όπως υπνηλία, ζάλη, σύγχυση, αϋπνία, κεφαλαλγία, κόπωση, αταξία, κατάθλιψη και ευφορία. Σπανίως μπορεί να εμφανιστούν ψυχωσικές καταστάσεις, αντιδράσεις υπερευαισθησίας, λευκοπενία, ηωσινοφιλία, ακοκκιοκυτταραιμία, πολύμορφο ερύθημα, σύνδρομο Stevens-Johnson, ερυθματώδης λύκος, ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου είναι δοσοεξαρτώμενες [<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a682327.html>; http://www.emedicinehealth.com/drug-ethosuximide/article_em.htm; Αιθοσουξιμίδη, Γαληνός].

Η αιθοσουξιμίδη γενικώς δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα των άλλων αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο αίμα, αν και αυξάνει πιθανώς τα επίπεδα της φαινυτοΐνης στον ορό. Τα επίπεδα αιθοσουξιμίδης μπορεί είτε να αυξηθούν είτε να μειωθούν από το βαλπροϊκό οξύ, ενώ πιθανώς μειώνονται από την καρβαμαζεπίνη και την πριμιδόνη [Perruca, 2005; Martindale, 2007; Αιθοσουξιμίδη, Γαληνός].

Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τη χορήγηση της αιθοσουξιμίδης σε περίπτωση ηπατικής ή νεφρικής βλάβης, καθώς και περιοδικός έλεγχος της ηπατικής ή νεφρικής λειτουργίας. Επίσης, είναι δυνατόν να προκληθούν δυσκρασίες του αίματος και γι αυτό συνιστάται περιοδικός αιματολογικός έλεγχος [Αιθοσουξιμίδη, Γαληνός; http://www.emedicinehealth.com/drug-ethosuximide/article_em.htm].

2.3. Βαλπροϊκό Οξύ

Το βαλπροϊκό οξύ [2-προπυλοπενταοϊκό οξύ] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα παλιό αντιεπιληπτικό φάρμακο που εγκρίθηκε πρώτη φορά το 1978 από τον Food and Drug Administration (FDA) στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Depakine (Sanofi-Aventis A.E.B.E.) [Βαλπροϊκό Οξύ, Γαληνός]. Το βαλπροϊκό οξύ ενδείκνυται για τις γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις, τυπικές και άτυπες αφαιρέσεις (petit mal), για τις εστιακές επιληπτικές κρίσεις, καθώς και στη μυοκλονική επιληψία, και χορηγείται συμπληρωματικά με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα στην αντιμετώπιση ανθεκτικών στη θεραπεία μορφών επιληψίας. Επίσης, το βαλπροϊκό οξύ χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με αντιψυχωσικά φάρμακα για την αντιμετώπιση της οξείας μανίας επειδή έχει βρεθεί αποτελεσματικό στον έλεγχο της παρορμητικής, επιθετικής και αυτοκαταστροφικής συμπεριφοράς καθώς και της συναισθηματικής αστάθειας τόσο σε οργανικά εγκεφαλικά σύνδρομα, όσο και στη μεταιχμιακή και αντικοινωνική διαταραχή προσωπικότητας. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση του βαλπροϊκού οξέος και των αλάτων του είναι 20-30 mg/kg. Το βαλπροϊκό οξύ αντενδείκνυται σε ασθενείς με οξεία ή χρόνια ηπατίτιδα, ειδικά σε άτομα με προσωπικό ή οικογενειακό ιστορικό σοβαρής ηπατίτιδας που σχετίζεται με φάρμακα, καθώς και σε ηπατική πορφύρα [Βαλπροϊκό Οξύ, Γαληνός].

Ο μηχανισμός δράσης του βαλπροϊκού οξέος περιλαμβάνει:

- Ευόδωση της δραστηριότητας του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) μέσω ποικίλων μηχανισμών, όπως αγωνιστική δράση στους GABA-A και GABA-B υποδοχείς, αναστολή του καταβολισμού ή της επαναπρόσληψης του GABA, που σχετίζεται με τις αγχολυτικές του ιδιότητες.
- Μείωση της προσυναπτικής ντοπαμινεργικής δραστηριότητας που συνδέεται με την αντιμανιακή δράση του.
- Ρύθμιση της σεροτονινεργικής λειτουργίας και αύξηση των επιπέδων σεροτονίνης στον εξωκυττάριο χώρο που οδηγεί στον περιορισμό της επιθετικής, παρορμητικής, αυτοκαταστροφικής συμπεριφοράς σε ασθενείς με μεταιχμιακή ή αντικοινωνική διαταραχή προσωπικότητας.
- Αποκλεισμός των διαύλων νατρίου και αναστολή της εκπολωτικής δραστηριότητας των ιόντων νατρίου που σχετίζεται με τον περιορισμό της

επιληπτικής δραστηριότητας και αποτελεί υποκείμενο νευροφυσιολογικό μηχανισμό σταθεροποίησης της διάθεσης στη διπολική διαταραχή.

- Ανασταλτική δράση επί των T-τύπου διαύλων ασβεστίου που σχετίζεται με την αντιμανιακή δράση του.
- Πιθανή ρυθμιστική δράση σε ένα εξαρτώμενο από το ATP υποτύπο διαύλων καλίου που φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τη ρύθμιση της απελευθέρωσης της ντοπαμίνης.
- Ανασταλτική δράση, παρόμοια με το λίθιο (Li) στο σύστημα αδενυλικής κυκλάσης-cAMP και στο σύστημα φωσφολιπάση Cβ-τριφωσφατιδυλγλυκερόλης (IP3)/διακυλογλυκερόλης (DAG), τα οποία εμπλέκονται στη νοραδρενεργική και σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση, αντίστοιχα [Καρλοβασίτου και Στεργίου, 2009].

Το βαλπροϊκό οξύ και τα άλατά του απορροφώνται πλήρως και ταχέως μετά την από του στόματος χορήγηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται σε 0,5-2 ώρες με ταχείας αποδέσμευσης σκευάσματα και σε 3-8 ώρες με εντεροδιαλυτά δισκία, ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μέσα σε περίπου 2 με 4 ημέρες. Το φάρμακο εμφανίζει 100% βιοδιαθεσιμότητα που δεν επηρεάζεται από τη λήψη τροφής, ενώ σε περίπτωση που χορηγηθεί κατά τη διάρκεια ή μετά το φαγητό μειώνεται μόνο ο ρυθμός απορρόφησης. Το φάρμακο δεν κατανέμεται σε μεγάλο βαθμό σε όλο το σώμα, οπότε εμφανίζει μικρό όγκο κατανομής (0,15 L/kg), ενώ παρουσιάζει σημαντικού βαθμού (90%) σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ δόσης και συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα και διαφορετικού βαθμού διακύμανση κατά τη σταθεροποιημένη κατάσταση μεταξύ της συνολικής συγκέντρωσης βαλπροϊκού οξέος στο πλάσμα και αυτής του αδέσμευτου φαρμάκου [Ichimura και συν., 1985; Greenberg, 2003; Patsalos, 2005]. Το βαλπροϊκό οξύ βιομετατρέπεται εκτενώς στο ήπαρ με διάφορους πολύπλοκους τρόπους, που περιλαμβάνουν β και ω-οξείδωση μέσω των ισοενζύμων CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 και CYP2B6, και κατά ένα μεγάλο μέρος μέσω γλυκουρονιδοποίησης. Συνολικά 25 διαφορετικοί μεταβολίτες του βαλπροϊκού οξέος έχουν ταυτοποιηθεί, εκ των οποίων μερικοί είναι φαρμακολογικά δραστικοί. Το ίδιο το φάρμακο δεν επάγει τη βιομετατροπή του, ενώ φάρμακα που επάγουν τα ηπατικά ένζυμα μπορούν να την

επιταχύνουν. Το φάρμακο απεκκρίνεται στα ούρα κατά ένα μικρό ποσοστό 1-3% ως μητρική ουσία και σχεδόν πλήρως υπό την μορφή των μεταβολιτών του, ενώ ένα μικρό ποσοστό απεκκρίνεται στα κόπρανα και στον εκπνεόμενο αέρα. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του βαλπροϊκού οξέος σε μονοθεραπεία είναι 7-20 ώρες, που μπορεί να μειωθεί μέχρι δύο φορές από την παρουσία άλλων αντιεπιληπτικών φαρμάκων που επάγουν τα ηπατικά ένζυμα [Greenberg, 2003; Patsalos, 2005; Martindale, 2007]. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις του βαλπροϊκού οξέος κυμαίνονται από 40 έως 100 $\mu\text{g/mL}$, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 100 $\mu\text{g/mL}$ θεωρούνται τοξικές [http://www.globalrph.com/labs_drug_levels.htm; Hiemke και συν., 2011]. Το βαλπροϊκό οξύ διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται κατά ένα μικρό ποσοστό στο μητρικό γάλα [Martindale, 2007].

Στις πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης του βαλπροϊκού οξέος περιλαμβάνονται γαστρικός ερεθισμός, ναυτία, έμετοι (γι αυτό είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται εντεροδιαλυτά δισκία), απώλεια ή αύξηση του σωματικού βάρους. Σπανιότερα έχουν αναφερθεί υπνηλία, κεφαλαλγία, ζάλη, τρόμος, αταξία, δυσαρθρία, κώμα, παροδική αλωπεκία, θρομβοπενία, λευκοπενία και ηωσινοφιλία. Η ηπατική βλάβη που μπορεί να προκαλέσει είναι σοβαρή αλλά σπανιότατα μπορεί να είναι θανατηφόρα, ενώ σπανίως έχουν αναφερθεί παγκρεατίτιδα, υπεραμμονιαμία, υπεργλυκαιμία και διαταραχές κύκλου ή αμηνόρροια [Βαλπροϊκό Οξύ, Γαληνός; Valproic Acid, FDA, 2015].

Το βαλπροϊκό οξύ αλληλεπιδρά με άλλα συγχωρηγούμενα φάρμακα και μπορεί να ενισχύσει τη δράση των νευροληπτικών, αναστολέων της MAO, αντικαταθλιπτικών και βενζοδιαζεπινών, καθώς επίσης να επιτείνει την κατασταλτική δράση των ηρεμιστικών και του οιοπνεύματος. Το βαλπροϊκό οξύ μπορεί να αυξήσει τις συγκεντρώσεις άλλων αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο πλάσμα, όπως της φαινοβαρβιτάλης, της πριμιδόνης, της φαινυτοΐνης, της λαμοτριγίνης και ενός ενεργού μεταβολίτη της καρβαμαζεπίνης, και σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται μείωση της δόσης των φαρμάκων αυτών ακόμα και κατά το ήμισυ. Φάρμακα όπως η καρβαμαζεπίνη, η φαινυτοΐνη, η φαινοβαρβιτάλη, η μεφλοκίνη και οι καρμπαπενέμες μειώνουν τα επίπεδά του στο αίμα, ενώ φάρμακα με υψηλό βαθμό σύνδεσης με τις πρωτεΐνες, όπως η ασπιρίνη, η σιμετιδίνη, η ερυθρομυκίνη και η φελπιαμάτη αυξάνουν τα επίπεδά του στο αίμα. Σε περίπτωση συγχωρήγησης του με κλοναζεπάμη μπορεί να προκαλέσει status επιληπτικών αφαιρέσεων [Webster και συν., 1984; Glue και συν., 1997; Patsalos P, 2013; Βαλπροϊκό Οξύ, Γαληνός].

Το βαλπροϊκό οξύ πρέπει να χορηγείται καλύτερα μετά τα γεύματα, προς αποφυγή γαστρικών διαταραχών (εκτός εάν πρόκειται για εντεροδιαλυτά δισκία). Πριν την έναρξη της θεραπείας, ειδικά σε ασθενείς με ιστορικό ηπατικής νόσου, συνιστάται εργαστηριακός έλεγχος της ηπατικής λειτουργίας (κυρίως SGOT και αλκαλικής φωσφατάσης), που θα πρέπει να επαναλαμβάνεται κάθε μήνα για το πρώτο εξάμηνο της θεραπείας και κατά αραιότερα διαστήματα στη συνέχεια. Σε περίπτωση διαταραχής της ηπατικής λειτουργίας ή εάν παρουσιαστούν κλινικά σημεία ηπατοτοξικότητας (αδυναμία, αδιαθεσία, ανορεξία, λήθαργος, ίκτερος, έμετοι) επιβάλλεται άμεση διακοπή του φαρμάκου. Οι ασθενείς πριν την έναρξη και κατά τη διάρκεια της θεραπείας με βαλπροϊκό οξύ συνιστάται να υποβάλλονται σε εργαστηριακούς ελέγχους του αριθμού των αιμοπεταλίων και του χρόνου ροής και πήξης του αίματος. Ειδικά σε περιπτώσεις συγχορήγησης με φάρμακα που επηρεάζουν την πήξη του αίματος, απαιτείται προσοχή και λεπτομερής έλεγχος του χρόνου προθρομβίνης [Βαλπροϊκό Οξύ, Γαληνός; Valproic Acid, FDA, 2015].

2.4. Βιγκαπατρίνη

Η βιγκαπατρίνη [(RS)-4-αμινοεξ-5-ενοϊκό οξύ] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα δομικό ανάλογο του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή GABA που εγκρίθηκε για πρώτη φορά στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1989, και το 2009 από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής [Johannessen και συν., 2003; Mudiam και συν., 2012]. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Sabril (Sanofi-Aventis A.E.B.E.) [Βιγκαπατρίνη, Γαληνός].

Η βιγκαπατρίνη ενδείκνυται ως συμπληρωματική θεραπεία με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα σε ανθεκτική εστιακή επιληψία με ή χωρίς δευτερογενή γενίκευση, μόνον όταν όλοι οι άλλοι συνδυασμοί φαρμάκων αποδείχθηκαν ανεπαρκείς ή μη ανεκτοί, και ως μονοθεραπεία σε βρεφικούς σπασμούς (σύνδρομο West) που σε αυτές τις περιπτώσεις η θεραπεία πρέπει να καθορίζεται μόνο από ειδικούς στην επιληψία, στη νευρολογία ή στην παιδιατρική νευρολογία [Goa και Sorkin, 1993; Lehner και συν., 2007]. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της βιγκαπατρίνης κυμαίνεται από 1000 έως 3000 mg [Patsalos και Bourgeois, 2014].

Η βιγκαπατρίνη αν και είναι δομικό ανάλογο του GABA δε συνδέεται με τους υποδοχείς GABA, αλλά αναστέλλει μη αντιστρεπτά την τρανσαμινάση του GABA (ένζυμο καταβολισμού του GABA), που οδηγεί στην έμμεση αύξηση των

επιπέδων του GABA στον εγκέφαλο και τη μείωση της επιληπτικής δραστηριότητας [Preece και Jackson, 1994]. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η δραστηριότητα ορισμένων νευρικών κυττάρων στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό και κατά συνέπεια ελαττώνεται η απελευθέρωση άλλων νευροδιαβιβαστών οι οποίοι ευθύνονται για τον πόνο, την επιληψία και το άγχος. Η δράση αυτή της βιγκαμπατρίνης σχετίζεται με τις αγχολυτικές ιδιότητές της και χορηγείται σε ένα ευρύ φάσμα αγχωδών διαταραχών αν και υπάρχει αυξημένος κίνδυνος κατάθλιψης σε ασθενείς που λαμβάνουν βιγκαμπατρίνη [Leppick, 2001; Montgomery και Baldwin, 2006; Citrome, 2009; Nirogi και συν., 2009; Oertel και συν., 2009].

Η βιγκαμπατρίνη απορροφάται πλήρως μετά την από του στόματος χορήγηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται σε 1,5 ώρες, όπου το φαρμακολογικά ανενεργό R(-)-εναντιομερές εμφανίζεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα από ότι το φαρμακολογικά ενεργό S(+)-εναντιομερές. Τα δύο εναντιομερή πιθανώς εμφανίζουν διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα [Martindale, 2007]. Το φάρμακο εμφανίζει γραμμική φαρμακοκινητική, έχει όγκο κατανομής 1,1 L/kg και κατανέμεται σε όλο το σώμα, αλλά δε συνδέεται σημαντικά με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η βιγκαμπατρίνη βιομετατρέπεται απειροελάχιστα και απεκκρίνεται κατά 60-80% ως μητρική ουσία στα ούρα [Jiang και Shuguang, 1999; Cetin και Atmaca, 2004; Vermeij και Edelbroek, 2004; Gambelunghe και συν., 2005; Diaz και συν., 2008; Nagel και συν., 2009; Nirogi και συν., 2009; Oertel και συν., 2009]. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της βιγκαμπατρίνης έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται από 5 έως 8 ώρες [Martindale, 2007]. Οι θεραπευτικές δόσεις της βιγκαμπατρίνης καθορίζονται με βάση κυρίως τη συχνότητα των επιληπτικών κρίσεων και τις τοξικές συνέπειες. Οι προτεινόμενες θεραπευτικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα των ασθενών κυμαίνονται από 2,0 έως 10 µg/mL, ενώ αν και τοξικές συγκεντρώσεις δεν έχουν θεσπιστεί μπορεί να εμφάνιστούν τοξικές εκδηλώσεις σε ασθενείς με συγκεντρώσεις άνω των 20 µg/mL [Hiemke και συν., 2011; Newton και Maschio, 2015]. Η βιγκαμπατρίνη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [Martindale, 2007].

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της βιγκαμπατρίνης περιλαμβάνονται: βλάβες του οπτικού πεδίου στο 1/3 των ασθενών, θάμβος όρασης, διπλωπία, υπνηλία, κόπωση, διέγερση και ανησυχία στα παιδιά, κεφαλαλγία, αύξηση βάρους, τρόμος, οίδημα, ζάλη, παραισθήσεις, διαταραχές συγκέντρωσης και μνήμης, ανησυχία, επιθετικότητα, νευρική κατάσταση, ευερεθιστότητα,

κατάθλιψη, διαταραχές σκέψης, παρανοϊκές αντιδράσεις, ναυτία και υπογάστριο άλγος [Hawker and Astbury, 2008; Vigabatrin, FDA, 2013; Koul και συν., 2016].

Αξιόλογες αλληλεπιδράσεις της βιγκαμπατρίνης με άλλα φάρμακα δεν παρατηρούνται [Diaz και συν., 2008], παρόλα αυτά μειώνει τα επίπεδα φαινοτοϊνης στο πλάσμα μέσω ενός άγνωστου μέχρι σήμερα μηχανισμού [Alarcon και Valentin, 2012]. Η βιγκαμπατρίνη μπορεί να προκαλέσει κάποια μείωση στη μετρηθείσα δραστηριότητα της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT) (30 έως 100%) και σε μικρότερη έκταση στην ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST). Το φάρμακο μπορεί να αυξήσει την ποσότητα των αμινοξέων στα ούρα και να προκληθεί ψευδώς θετική δοκιμασία για συγκεκριμένες σπάνιες γενετικές μεταβολικές διαταραχές [http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/1999/199910053340/anx_3340_el.pdf].

Κατά τη μακροχρόνια χορήγηση του φαρμάκου απαιτείται προσοχή εξαιτίας των βλαβών που μπορεί να συμβούν με μεγάλη συχνότητα στα οπτικά πεδία και παρουσιάζονται συνήθως μετά από μήνες ή χρόνια από την έναρξη της θεραπείας. Ο βαθμός περιορισμού του οπτικού πεδίου μπορεί να είναι σοβαρός. Από τα διαθέσιμα στοιχεία προκύπτει ότι οι βλάβες των οπτικών πεδίων είναι μη αναστρέψιμες ακόμη και μετά από διακοπή της αγωγής. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες μπορούν να εντοπισθούν μόνο με συστηματική περιμετρία η οποία είναι δυνατή μόνο σε ασθενείς άνω των 9 ετών. Πριν από την έναρξη της αγωγής και σε 6μηνιαία διαστήματα καθ' όλη τη διάρκεια της θεραπείας, πρέπει να διεξάγεται εξέταση των οπτικών πεδίων. Οι ασθενείς πρέπει να καθοδηγούνται να αναφέρουν οποιοδήποτε πρόβλημα όρασης και συμπτώματα τα οποία μπορεί να συσχετίζονται με στένωση του οπτικού πεδίου. Η βιγκαμπατρίνη δεν πρέπει να χορηγείται σε ασθενείς με προϋπάρχουσα βλάβη των οπτικών πεδίων, ενώ θα πρέπει να αποφεύγεται η απότομη διακοπή της αγωγής. Προσοχή απαιτείται σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, με ιστορικό ψυχώσεων, κατάθλιψης, προβλημάτων συμπεριφοράς, και σε ηλικιωμένους. Η βιγκαμπατρίνη χορηγείται κατά την κύηση, μόνο εάν αυτό είναι σαφώς αναγκαίο και δε συνιστάται στη γαλουχία. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά την οδήγηση ή το χειρισμό μηχανημάτων ή τη διενέργεια επικίνδυνων εργασιών [Vigabatrin, FDA, 2013; Βιγκαμπατρίνη, Γαληνός; http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/1999/199910053340/anx_3340_el.pdf].

2.5. Γκαμπαπεντίνη

Η γκαμπαπεντίνη [1-(αμινομεθυλ)κυκλοεξανοξικό οξύ] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα λιπόφιλο δομικό ανάλογο του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή GABA που εγκρίθηκε το 1993 από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής [Johannessen και συν., 2003, Mudiam και συν., 2012]. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Neurontin (Pfizer Hellas A.E.) [Γκαμπαπεντίνη, Γαληνός]. Η γκαμπαπεντίνη ενδείκνυται ως συμπληρωματική θεραπεία σε εστιακές επιληπτικές κρίσεις με ή χωρίς δευτερογενή γενίκευση σε ενήλικες και παιδιά μεγαλύτερα των 6 ετών ή ως μονοθεραπεία σε ενήλικες και παιδιά μεγαλύτερα των 12 ετών, καθώς και στη θεραπεία του περιφερικού νευροπαθητικού πόνου (μεθερπητικής νευραλγίας, επώδυνης πολυνευροπάθειας και διαβητικής νευροπάθειας) σε ενήλικες άνω των 18 ετών [Goa και Sorkin, 1993; Lehner και συν., 2007, Citrome, 2009; Nirogi και συν., 2009; Oertel και συν., 2009; Johnson και συν., 2013]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αγχολυτικές ιδιότητες της γκαμπαπεντίνης σε ένα ευρύ φάσμα των αγχώδων διαταραχών. Ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα έχει δώσει η γκαμπαπεντίνη σε μεγάλες δόσεις για την αντιμετώπιση της κοινωνικής αγχώδους διαταραχής, ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με τους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (Selective Serotinine Reuptake Inhibitors, SSRIs) [Pande και συν., 1999; Blanco και συν., 2005; Citrome, 2009; Nirogi και συν., 2009; Oertel και συν., 2009; Berlin και συν., 2015]. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της γκαμπαπεντίνης κυμαίνεται από 300 έως 3600 mg [Backonja και Glanzman, 2003].

Η γκαμπαπεντίνη χρησιμοποιείται συμπληρωματικά για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων στέρησης από την αιθυλική αλκοόλη και τις βενζοδιαζεπίνες. Ιδιαίτερα όσον αφορά τη θεραπεία συμπτωμάτων στέρησης από τις βενζοδιαζεπίνες, έχει αποδειχθεί αποτελεσματική, αφού μειώνει τα συμπτώματα από το αυτόνομο νευρικό σύστημα και ομαλοποιεί τον ύπνο [Arana και Hyman, 2004; Καρλοβάσιτου και Στεργίου, 2009].

Ο μηχανισμός δράσης της γκαμπαπεντίνης δεν είναι πλήρως γνωστός [Petroff και συν., 1996; Gambelunghe και συν., 2005]. Η γκαμπαπεντίνη δεν αναστέλλει τον προσυναπτικό μεταφορέα επαναπρόσληψης του GABA, όπως η τιαγκαμπίνη. Επίσης, δεν αναστέλλει την τρανσαμινάση του GABA (ένζυμο καταβολισμού του GABA), όπως η βιγκαμπατρίνη και η πρεγκαμπαλίνη, που θα οδηγούσε σε αύξηση των

επιπέδων GABA και μείωση της επιληπτικής δραστηριότητας, αλλά ασκεί έμμεση γκαμπεργική και αντιγλουταμινική δράση μέσω σύνδεσης με την υπομονάδα α2-δ διαύλων Ca [Preece και Jackson, 1994; Taylor και συν., 1998; Shader και Greenblatt, 2003; Borrey και συν., 2005; Gambelunghe και συν., 2005; Montgomery και Baldwin, 2006]. Η σύνδεση της γκαμπαπεντίνης (όπως και της πρεγκαμπαλίνης) με την α2-δ υπομονάδα των ηλεκτροεξαρτώμενων διαύλων Ca των νευρώνων οδηγεί στην αναστολή της ροής των ιόντων Ca με αποτέλεσμα τη παρεμπόδιση της απελευθέρωσης διεγερτικών νευροδιαβιβαστών (κυρίως του γλουταμινικού) από τους προσυναπτικούς νευρώνες και την έμμεση αύξηση των επιπέδων του GABA στον εγκέφαλο. Η δράση αυτή σχετίζεται με τις αγχολυτικές ιδιότητες του φαρμάκου [Leppick, 2001; Montgomery και Baldwin, 2006].

Η γκαμπαπεντίνη απορροφάται πλήρως μετά την από του στόματος χορήγηση και οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται σε 1-3 ώρες, ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μέσα σε 1 με 2 ημέρες [Martindale, 2007]. Το φάρμακο εμφανίζει μη δοσοεξαρτώμενη βιοδιαθεσιμότητα και μη γραμμική φαρμακοκινητική (M.A. Clark, R.Finkel, J.A. Rey, K. Whalen, R.A. Harvey, Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology, 5th edition, 2012). Γενικά, η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό από άτομο σε άτομο κι ακόμα και στο ίδιο άτομο, λόγω της ιδιαίτερης δραστικής απορρόφησής της από το έντερο και την απέκκριση από τους νεφρούς [Ouellet και συν., 2001; Gambelunghe και συν., 2005]. Λόγω της διαφορετικής απορρόφησης του φαρμάκου από άτομο σε άτομο, ο καθορισμός του δοσολογικού σχήματος είναι αναγκαίος ειδικά σε ασθενείς με μειωμένη νεφρική λειτουργία [Harden, 1994; Gambelunghe και συν., 2005]. Η γκαμπαπεντίνη έχει όγκο κατανομής 0,6-0,8 L/kg και κατανέμεται σε όλο το σώμα, αλλά εμφανίζει μικρού βαθμού σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Το φάρμακο βιομετατρέπεται ελάχιστα και απεκκρίνεται σχεδόν πλήρως ως μητρική ουσία στα ούρα και το υπόλοιπο απεκκρίνεται μέσω των κοπράνων [Jiang και Shuguang, 1999; Cetin και Atmaca, 2004; Vermeij και Edelbroek, 2004; Gambelunghe και συν., 2005; Nagel και συν., 2009; Nirogi και συν., 2009; Oertel και συν., 2009]. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της γκαμπαπεντίνης είναι περίπου 5 με 7 ώρες [Martindale, 2007]. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις της γκαμπαπεντίνης κυμαίνονται από 2,0 έως 20 µg/mL, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 25 µg/mL θεωρούνται τοξικές [Hiemke και συν., 2011; https://www.healthcare.uiowa.edu/path_handbook/handbook/test298.html]. H

γκαμπαπεντίνη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [Martindale, 2007].

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της γκαμπαπεντίνης περιλαμβάνονται: υπνηλία, ζάλη, αταξία, σπασμοί, αίσθημα κόπωσης, κεφαλαλγία, νυσταγμός, διπλωπία, ναυτία, έμετος, οίδημα προσώπου, ίλιγγος, τρόμος, νευρική κατάσταση, ανορεξία, δυσπεψία, φαρυγγίτιδα, ρινίτιδα, εξάνθημα, δυσαρθρία, αμβλυωπία, πόνοι στο θώρακα, βήχας, διαταραχές μνήμης, σπανίως αύξηση τιμών ηπατικών ενζύμων, καθώς και συμπτώματα ψύχωσης και κατάθλιψης λίγο μετά την έναρξη της θεραπείας [Evrensel και Unsalver, 2015; Gabapentin, FDA, 2015; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25954794>].

Η γκαμπαπεντίνη εμφανίζει το πλεονέκτημα να απεκκρίνεται αναλλοίωτη από τους νεφρούς, να μη βιομετατρέπεται στο ήπαρ και κατά συνέπεια να μην παρουσιάζει πρακτικά αλληλεπιδράσεις με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα [Καζής, 1995]. Η απορρόφηση της γκαμπαπεντίνης από τον γαστρεντερικό σωλήνα μειώνεται από αντιόξινα που περιέχουν αργίλιο με μαγνήσιο, γι αυτό συνιστάται η γκαμπαπεντίνη να χορηγείται τουλάχιστον 2 ώρες μετά από τη χορήγηση τέτοιων αντιόξινων [Yagi και συν., 2012]. Η σιμετιδίνη έχει επίσης αναφερθεί ότι επηρεάζει τη νεφρική κάθαρση της γκαμπαπεντίνης [Martindale, 2007; Lal και συν., 2010]. Σε περίπτωση συγχορήγησης με μορφίνη ενισχύεται η αναλγητική δράσης της μορφίνης, οπότε χρειάζεται παρακολούθηση για σημεία καταστολής του ΚΝΣ και πιθανή μείωση των δόσεων των δύο φαρμάκων [Eckhardt και συν., 2000].

Η απότομη διακοπή του φαρμάκου πρέπει να αποφεύγεται. Προσοχή κατά τη χορήγηση χρειάζεται όταν υπάρχει ιστορικό ψυχωσικών εκδηλώσεων, σε ηλικιωμένα άτομα, διαβητικούς και νεφροπαθείς (κάποιες φορές παρατηρείται ψευδώς θετική αντίδραση για πρωτεϊνουρία). Σε ασθενείς με μικτές επιληπτικές κρίσεις ενδέχεται να αυξηθούν οι αφαιρετικού τύπου κρίσεις και η γκαμπαπεντίνη δε θεωρείται αποτελεσματική στις αφαιρετικές κρίσεις. Σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια, απαιτείται προσαρμογή της δόσης, ενώ το φάρμακο πρέπει να αποφεύγεται να χορηγείται κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας. Επίσης, πρέπει να αποφεύγεται η οδήγηση και ο χειρισμός μηχανημάτων από άτομα που είναι υπό αγωγή με γκαμπαπεντίνη [Gabapentin, FDA, 2015; Γκαμπαπεντίνη, Γαληνός].

2.6. Καρβαμαζεπίνη

Η καρβαμαζεπίνη [5H-διβενζαπίνο-5-καρβοξαμίδιο] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα παράγωγο της διβενζαπίνης που ανήκει στην κατηγορία των αντιεπιληπτικών, νευροτρόπων και ψυχοτρόπων φαρμάκων. Η καρβαμαζεπίνη ανακαλύφθηκε το 1953 από τον Ελβετό χημικό Walter Schindler και κυκλοφόρησε πρώτη φορά στην αγορά το 1962. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Tegretol (Novartis Hellas A.E.B.E.) [Καρβαμαζεπίνη, Γαληνός]. Η καρβαμαζεπίνη ενδείκνυται για όλες τις μορφές εστιακής επιληψίας και τις τονικοκλονικές κρίσεις, καθώς επίσης στην αντιμετώπιση του πόνου των νεύρων όπως της διαβητικής νευροπάθειας, της ιδιοπαθούς νευραλγίας του τριδύμου και του γλωσσο-φαρυγγικού [Carbamazepine, FDA, 2014; Καρβαμαζεπίνη, Γαληνός]. Το φάρμακο έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων στέρησης από τις βενζοδιαζεπίνες [Ries και συν., 1989]. Η καρβαμαζεπίνη επίσης χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην πρόληψη κρίσεων στη διπολική διαταραχή. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της καρβαμαζεπίνης κυμαίνεται από 100 έως 1600 mg [Tolou-Ghamari και συν., 2013; Carbamazepine, FDA, 2014; Rahman και συν., 2014; Καρβαμαζεπίνη, Γαληνός]. Η καρβαμαζεπίνη αντενδείκνυται σε άτομα με υπερευαισθησία στα συγγενή ως προς τη δομή του φάρμακα, όπως τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, καθώς και σε περίπτωση ταυτόχρονης θεραπείας με αναστολείς της MAO, που πρέπει να παρεμβάλλεται διάστημα τουλάχιστον 14 ημερών ανάμεσα στις δύο θεραπείες [Leon, 2012; Carbamazepine, FDA, 2014].

Η καρβαμαζεπίνη βοηθά στον έλεγχο της διαβίβασης των μηνυμάτων από τον εγκέφαλο στους μύες. Ο κύριος μηχανισμός δράσης της καρβαμαζεπίνης περιλαμβάνει την ελάττωση της διάδοσης των ανώμαλων νευρωνικών ώσεων στον εγκέφαλο, αποκλείοντας τους τασεοελεγχόμενους διαύλους του νατρίου και αναστέλλοντας με τον τρόπο αυτό την παραγωγή των επαναληπτικών δυναμικών ενέργειας στην επιληπτική κρίση. Επίσης, η καρβαμαζεπίνη σταθεροποιεί τις υπερδιεγερμένες νευρικές μεμβράνες, αναστέλλει τις επαναλαμβανόμενες νευρωνικές απορρίψεις και προκαλεί μείωση των πολυσυναπτικών απαντήσεων και αποκλεισμό των μετατετανικών ενισχύσεων [Ambrosio και συν., 2002; http://www.novartis.com.au/PI_PDF/tgr.pdf].

Η καρβαμαζεπίνη απορροφάται αργά αλλά πλήρως μετά την από του στόματος χορήγηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις

του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται σε 4 με 8 ώρες [<http://emedicine.medscape.com/article/813654-overview>], ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μέσα σε περίπου 2 με 10 ημέρες [Bertilsson, 1978; http://www.globalrph.com/labs_drug_levels.htm]. Το φάρμακο έχει όγκο κατανομής 0,82-1,4 L/kg, κατανέμεται σε όλο το σώμα και συνδέεται κατά περίπου 75% με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η καρβαμαζεπίνη βιομετατρέπεται εκτενώς στο ήπαρ, ιδιαίτερα από το κυτόχρωμα P450 και τα ισοένζυμα CYP3A4 και CYP2C8. Ένας από τους κύριους μεταβολίτες της είναι η 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, που είναι επίσης φαρμακολογικά ενεργή. Η καρβαμαζεπίνη απεκκρίνεται στα ούρα σχεδόν πλήρως υπό τη μορφή των μεταβολιτών της και ένα μέρος απεκκρίνεται επίσης στα κόπρανα. Το ίδιο το φάρμακο επάγει τη βιομετατροπή του, οπότε εμφανίζει μη γραμμική φαρμακοκινητική και ο χρόνος ημίσειας ζωής του μπορεί να μειωθεί αρκετά μετά από επαναλαμβανόμενες δόσεις. Ο μέσος χρόνος ημίσειας ζωής της καρβαμαζεπίνης σε επαναλαμβανόμενες δόσεις είναι περίπου 5 με 26 ώρες σε ενήλικες, και σημαντικά μικρότερος σε παιδιά. Η βιομετατροπή της καρβαμαζεπίνης επάγεται αρκετά επίσης από φάρμακα που επάγουν τα ηπατικά μικροσωμικά ένζυμα. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις της καρβαμαζεπίνης κυμαίνονται από 4,0 έως 12 μg/mL, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 12 μg/mL θεωρούνται τοξικές. Η καρβαμαζεπίνη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [Hiemke και συν., 2011; Islam και συν., 2013; Tolou-Ghamari και συν., 2013; http://www.globalrph.com/labs_drug_levels.htm; Martindale, 2007].

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της καρβαμαζεπίνης περιλαμβάνουν: πεπτικές διαταραχές, όπως ξηροστομία, ναυτία, έμετοι, δυσκοιλιότητα, διάρροια, ανορεξία, χολοστατικός ίκτερος και ηπατίτιδα, υπνηλία, κεφαλαλγία, σύγχυση ή διέγερση, επανεμφάνιση ψυχωσικών διαταραχών, παραισθήσεις, ελάττωση της libido, κατάθλιψη, οπτικές διαταραχές, όπως διπλωπία και φωτοευαισθησία, αιματολογικές διαταραχές, όπως λευκοπενία, θρομβοπενία, ακοκκιοκυτταραιμία, απλαστική αναιμία, δερματικές εκδηλώσεις, όπως εξανθήματα, σύνδρομο Stevens-Johnson και τοξική επιδερμική νεκρόλυση, οίδημα, νεφρικές διαταραχές, υπονατριαιμία και διαταραχές του οστικού μεταβολισμού [Spiller, 2001; Strohscheer και Borasio, 2006; Stevens και Bannon, 2007; Carbamazepine, FDA, 2014; Καρβαμαζεπίνη, Γαληνός].

Η καρβαμαζεπίνη αλληλεπιδρά με άλλα φάρμακα και συγκεκριμένα μειώνει τα επίπεδα στο αίμα και τη δράση της αιθοσουξιμίδης, του βαλπροϊκού οξέος, της

κλοναζεπάμης, της κλοβαζάμης, της πριμιδόνης, της αλπραζολάμης, των κορτικοστεροειδών, της κυκλοσπορίνης, της διγοξίνης, της δοξουκυκλίνης, της φελοδιπίνης, της αλοπεριδόλης, της ιμιπραμίνης, της μεθαδόνης, των αντισυλληπτικών, της θεοφυλλίνης, της φελβαμάτης, της λαμοτριγίνης, της ζονισαμίδης, της τιαγκαμπίνης, της τοπιραμάτης, των τρικυκλικών αντικαταθλιπτικών φαρμάκων και της κλοζαπίνης. Το φάρμακο μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της φαινοβαρβιτάλης, να αυξομειώσει τα επίπεδα της φαινοτοΐνης και να επιταχύνει τη βιομετατροπή των κουμαρινικών αντιπηκτικών. Ορισμένα φάρμακα, όπως τα αντιβιοτικά μακρολίδια, η ισονιαζίδη, οι αζόλες, η τερβιναφίνη, η λοραταδίνη, η βεραπαμίλη, η διλτιαζέμη, η βιλοξαζίνη, η φλουοξετίνη, η φλουβοξαμίνη, η ακετοζολαμίδα, η δαναζόλη, η νικοτιναμίδα (σε υψηλή δοσολογία στους ενήλικες), πιθανώς η σιμετιδίνη και δεσιπραμίνη, μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα της καρβαμαζεπίνης στο πλάσμα και να έχουν ως αποτέλεσμα εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών [Webster και συν., 1984; Spina και συν., 1996; Steinborn, 2001; Patsalos, 2013; Καρβαμαζεπίνη, Γαληνός].

Προσοχή κατά τη χορήγηση της καρβαμαζεπίνης χρειάζεται σε οδηγούς ή χειριστές μηχανημάτων, καθώς και σε άτομα που βρίσκονται σε καταστάσεις που απαιτούν αυξημένη ετοιμότητα και εγρήγορση. Πριν την έναρξη της θεραπείας πρέπει να γίνεται πλήρης αιματολογικός έλεγχος, καθώς και έλεγχος της ηπατικής και νεφρικής λειτουργίας, οι οποίοι έλεγχοι θα πρέπει να επαναλαμβάνονται περιοδικά κατά τη διάρκεια της θεραπείας [Kaussner και συν., 2010; Carbamazepine, FDA, 2014; Καρβαμαζεπίνη, Γαληνός].

2.7. Λακοσαμίδα

Η λακοσαμίδα (lacosamide) [(R)-2-ακεταμιδο-N-βενζυλ-3-μεθοξυπροπιοναμίδιο] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα λειτουργικό αμινοξύ με αντιεπιληπτική δράση, που εγκρίθηκε το 2008 από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής [Hofler και Trinko, 2013; Martinez και συν., 2012]. Την ίδια χρονιά, η λακοσαμίδα κυκλοφόρησε και στην Ευρώπη ως αντιεπιληπτικό φάρμακο με το εμπορικό όνομα Vimpat (UCB Pharma S.A.) και χρησιμοποιείται ως συμπληρωματική θεραπεία σε ασθενείς 16 ετών και άνω με εστιακή επιληψία, με ή χωρίς δευτερογενή γενίκευση [Greenaway και συν., 2010; Sattler και συν., 2011; Martinez και συν., 2012]. Παρόλα αυτά, υπάρχουν λίγες δημοσιευμένες μελέτες που αναφέρουν ότι η λακοσαμίδα

χρησιμοποιείται σε παιδιά και νέους, ηλικίας 1-21 ετών, για την αντιμετώπιση ανθεκτικών επιληπτικών κρίσεων [Gavatha και συν., 2011, Guilhoto και συν., 2011; Heyman και συν., 2012; Rastogi και Ng, 2012]. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η συχνότητα των κρίσεων μειώνεται όπως συμβαίνει και με τους ενήλικες [Buck και Goodkim, 2012]. Το φάρμακο έχει αποδεικτεί ότι είναι επίσης αποτελεσματικό στη θεραπεία της επώδυνης διαβητικής νευροπάθειας [Beyreuther και συν., 2007; Martinez και συν., 2012]. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της λακοσαμίδης κυμαίνεται από 100 έως 800 mg [Ben-Menachem και συν., 2007; Sattler και συν., 2011]. Η λακοσαμίδα αντενδείκνυται σε περίπτωση κολποκοιλιακού αποκλεισμού 2^{ου} ή 3^{ου} βαθμού [Λακοσαμίδα, Γαληνός].

Η λακοσαμίδα εμφανίζει διπλό τρόπο δράσης:

- ενισχύει εκλεκτικά την βραδεία απενεργοποίηση των τασεοελεγχόμενων διαύλων νατρίου, με αποτέλεσμα τον έλεγχο και τη σταθεροποίηση των νευρωνικών μεμβρανών του εγκεφάλου οι οποίες παρουσιάζουν ευκολία στη διέγερση, και
- δεσμεύει μια πρωτεΐνη που ονομάζεται collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2), που σχετίζεται με τη διαμόρφωση της μετάδοσης του πόνου, επηρεάζοντας έτσι την εμφάνιση ή την πορεία της επιληψίας [Beyreuther και συν., 2007; Cross και Curran, 2009; Wymer και συν., 2009; Martinez και συν., 2012; Wolff και συν., 2012; Hofler και Trinkka, 2013].

Η λακοσαμίδα απορροφάται ταχέως και σχεδόν πλήρως μετά την από του στόματος χορήγηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο πλάσμα εμφανίζονται σε 1 με 4 ώρες, ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μέσα σε 3 ημέρες μετά από χορήγηση της λακοσαμίδης δύο φορές ημερησίως [Ben-Menachem και συν., 2007; Sattler και συν., 2011; http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000863/WC500050338.pdf]. Το φάρμακο εμφανίζει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα (περίπου 100%) [Koo και συν., 2011]. Η φαρμακοκινητική της λακοσαμίδης είναι γραμμική, ανάλογη της δόσης και σταθερή στο χρόνο, με χαμηλή διακύμανση στο ίδιο το άτομο ή μεταξύ διαφορετικών ατόμων. Η λακοσαμίδα έχει όγκο κατανομής περίπου 0,6 L/kg, κατανέμεται σε όλο το σώμα, αλλά συνδέεται ελάχιστα με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (<15%). Η λακοσαμίδα απεκκρίνεται κυρίως από τα ούρα ως μητρική ουσία κατά περίπου 40%, ενώ

βιομετατρέπεται περίπου κατά 20-30% σε ένα φαρμακολογικά ανενεργό μεταβολίτη, την Ο-δεσμεθυλο-λακοσαμίδα (O-desmethyl-lacosamide). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της λακοσαμίδης είναι περίπου 13 ώρες, ενώ οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις της στο πλάσμα κυμαίνονται από 1,0 έως 15 µg/mL, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20 µg/mL θεωρούνται τοξικές [Beyreuther και συν., 2007; Hiemke και συν., 2011]. Δεν υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες που να έχει διερευνηθεί εάν η λακοσαμίδα διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [Buck και Goodkim, 2012].

Οι πιο συχνά αναφερόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανισθούν στον ασθενή λόγω λήψης της λακοσαμίδης περιλαμβάνουν: ζάλη, κεφαλαλγία, κατάθλιψη, διαταραχή ισορροπίας, νοητικές διαταραχές, υπνηλία, τρόμος, νύσταγμος, ίλιγγος, διπλωπία, θαμπή όραση, ναυτία, έμετος, δυσκοιλιότητα, μετεωρισμός, κνησμός, εξασθένιση και κόπωση. Η λακοσαμίδα μπορεί επίσης να αυξήσει το διάστημα PR στο ηλεκτροκαρδιογράφημα. Οι περισσότερες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι συνήθως ήπιες έως μέτριας έντασης, είναι δόσοεξαρτώμενες και μπορούν να ανακουφισθούν με μείωση της δόσης. Επιπλέον, η συχνότητα και η βαρύτητα των ανεπιθύμητων ενεργειών από το ΚΝΣ και το γαστρεντερικό σύστημα υποχωρούν τις περισσότερες φορές με την πάροδο του χρόνου [Ben-Menachem και συν., 2007; Chung και συν., 2010; Buck και Goodkim, 2012].

Η λακοσαμίδα εμφανίζει χαμηλό δυναμικό αλληλεπίδρασης με άλλα φάρμακα και χρειάζεται προσοχή μόνο όταν χορηγείται σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με φαρμακευτικά προϊόντα τα οποία είναι γνωστό ότι σχετίζονται με παράταση του διαστήματος PR (π.χ. καρβαμαζεπίνη, λαμοτριγίνη, πρεγκαμπαλίνη), καθώς επίσης και σε ασθενείς που λαμβάνουν τάξης I αντιαρρυθμικά φάρμακα. Δεδομένου ότι η λακοσαμίδα έχει χαμηλό βαθμό σύνδεσης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (<15%), δεν θεωρείται πιθανόν να παρατηρηθούν κλινικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα λόγω ανταγωνισμού για τις περιοχές δέσμευσης στις πρωτεΐνες [Gavatha και συν., 2011]. Σε ταυτόχρονη λήψη φαρμάκων που είναι ισχυροί επαγωγοί του CYP3A4, όπως η ριφαμπικίνη, το υπερικό, η καρβαμαζεπίνη και η φαινοτοΐνη, παρατηρείται μέτρια μείωση των επιπέδων της λακοσαμίδης [Λακοσαμίδα, Γαληνός].

Προσοχή χρειάζεται σε ασθενείς που έχουν προβλήματα αγωγιμότητας ή λαμβάνουν φάρμακα που την επηρεάζουν, σε ασθενείς με βαριές καρδιοπάθειες ή ιστορικό εμφράγματος του μυοκαρδίου. Κατά τη διάρκεια θεραπείας με λακοσαμίδα

υπάρχει πιθανότητα αύξησης του κινδύνου αυτοκτονικού ιδεασμού που απαιτεί ψυχιατρική θεραπεία. Επειδή η λακοσαμίδα έχει στενό θεραπευτικό εύρος, χρειάζεται προσοχή κατά τη ρύθμιση της δόσης, ειδικά σε ασθενείς με καρδιολογικά προβλήματα, λόγω των πιθανών διαταραχών του ηλεκτροκαρδιογραφήματος [Ben-Menachem και συν., 2007; Cross και Curran, 2009; Halasz και συν., 2009; Kim και συν., 2012]. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων λακοσαμίδης στο αίμα και η εξατομίκευση του δοσολογικού σχήματος είναι χρήσιμα προκειμένου να αποφευχθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες λόγω υπερδοσολογίας με λακοσαμίδα [Patsalos και συν., 2008; Kim και συν., 2012].

2.8. Λαμοτριγίνη

Η λαμοτριγίνη (lamotrigine) [3,5-διαμινο-6-(2,3-διχλωροφαινυλ)-1,2,4-τριαζίνη] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα ευρέως φάσματος αντιεπιληπτικό φάρμακο της κατηγορίας των φαινυλοτρίαζινών που δεν έχει από χημικής απόψης σχέση με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα και η κυκλοφορία του εγκρίθηκε το 1994 από το Food and Drug Administration [Greiner και Haen, 2007; El-Enany και συν., 2010; <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/PediatricAdvisoryCommittee/UCM234474.pdf>]. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Lamictal (Glaxo Smith Kline A.E.B.E.) [Λαμοτριγίνη, Γαληνός]. Η λαμοτριγίνη χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία σε ενήλικες και παιδιά άνω των 12 ετών με απλές και σύνθετες εστιακές κρίσεις δευτερογενώς γενικευμένες και γενικευόμενες τονικοκλονικές κρίσεις ή ως συμπληρωματική θεραπεία σε ενήλικες και παιδιά άνω των 2 ετών με απλές και σύνθετες εστιακές επιληπτικές κρίσεις, καθώς και δευτερογενώς γενικευόμενες τονικοκλονικές κρίσεις. Το φάρμακο αυτό χρησιμοποιείται και στη θεραπεία συντήρησης της διπολικής διαταραχής μόνο σε ενήλικες άνω των 18 ετών, για να επιβραδύνει την εμφάνιση της καταθλιπτικής φάσης, καθώς και σε ασθενείς που λαμβάνουν αγωγή για οξέα επεισόδια διαταραχών της διάθεσης [Castel-Branco και συν., 2001; El-Enany και συν., 2010; Prabhavalakr και συν., 2015]. Η λαμοτριγίνη χρησιμοποιείται επίσης στην αντιμετώπιση των επιληπτικών κρίσεων του συνδρόμου Lennox-Gastaut, που είναι μία από τις πιο σοβαρές μορφές επιληψίας στα παιδιά [El-Enany και συν., 2010]. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της λαμοτριγίνης

είναι 200 mg. Η χορήγηση της λαμοτριγίνης αντενδείκνυται σε ασθενείς με ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια [Λαμοτριγίνη, Γαληνός].

Η λαμοτριγίνη αποτελεί έναν αναστολέα των ηλεκτροδυναμικών διαύλων νατρίου. Ο μηχανισμός δράσης του φαρμάκου περιλαμβάνει την αναστολή της επαναλαμβανόμενης μεταγωγής σήματος μέσω των νευρώνων και της απελευθέρωσης των διεγερτικών νευροδιαβιβαστών όπως του ασπαρτικού και του γλουταμινικού, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων [Barbosa και Midio, 2000; Castel-Branco και συν., 2001].

Η λαμοτριγίνη μετά την από του στόματος χορήγηση απορροφάται καλά από τον γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα επιτυγχάνονται περίπου 2,5 ώρες μετά τη χορήγηση, ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μέσα σε περίπου 4 με 6 ημέρες [<http://pathlabs.rlbuht.nhs.uk/lamotrigine.pdf>]. Το φάρμακο εμφανίζει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα (περίπου 100%) και γραμμική φαρμακοκινητική. Το φάρμακο έχει όγκο κατανομής 1,0-1,3 L/kg, κατανέμεται καλά στο σώμα και περίπου το 55% του φαρμάκου δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η λαμοτριγίνη βιομετατρέπεται εκτενώς στο ήπαρ και απεκκρίνεται μέσω της νεφρικής οδού συζευγμένη με γλυκουρονικό οξύ εμφανίζοντας πρώτης τάξης γραμμική κινητική με μία μικρή περίοδο αυτεπαγωγής [Barbosa και Midio, 2000]. Το ίδιο το φάρμακο επάγει ελαφρώς τη βιομετατροπή του [Martindale, 2007] και ο χρόνος ημίσειας ζωής του παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση (ο μέσος χρόνος ημίσειας ζωής είναι περίπου 33 ώρες), επηρεαζόμενος από τα υπόλοιπα συγχωρηγούμενα φάρμακα που αναστέλλουν ή επάγουν τα ηπατικά ένζυμα βιομετατροπής του φαρμάκου. Τα επίπεδα λαμοτριγίνης σε ορό και πλάσμα εμφανίζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των ατόμων σε οποιαδήποτε χορηγηθείσα δόση του φαρμάκου κυρίως εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων που εμφανίζονται με άλλα συγχωρηγούμενα αντιεπιληπτικά φάρμακα [Barbosa και Midio, 2000; Zufia και συν., 2009]. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις της λαμοτριγίνης στο πλάσμα ασθενών συνήθως κυμαίνονται από 3 έως 14 $\mu\text{g/mL}$ [Crocì και συν., 2001; Hiemke και συν., 2001]. Τοξικές εκδηλώσεις συνήθως εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 20 $\mu\text{g/mL}$ [Lamotrigine, Mayo Clinic]. Η λαμοτριγίνη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [Martindale, 2007].

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της λαμοτριγίνης περιλαμβάνονται: κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα που συχνά

συννοδεύεται από πυρετό, γριππώδες σύνδρομο, λεμφαδενοπάθεια, λευκοπενία, θρομβοπενία, διαταραχές της ηπατικής λειτουργίας, σύνδρομο Stevens-Johnson, διπλωπία, θάμβος όρασης, ζάλη, υπνηλία, ευερεθιστότητα, κεφαλαλγία, αστάθεια, πεπτικές διαταραχές, αρθραλγία και ραχιαλγία [Λαμοτριγίνη, Γαληνός; Kowski και συν., 2016].

Η λαμοτριγίνη μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα συγχωρηγούμενα φάρμακα. Συγκεκριμένα, η στάθμη της ελαττώνεται σε συγχορήγηση καρβαμαζεπίνης, φαινυτοΐνης και πριμιδόνης και αυξάνεται με το βαλπροϊκό οξύ και τα ανθελονοσιακά (χλωροκίνη). Τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, οι αναστολείς της MAO και αυτοί της επαναπρόσληψης σεροτονίνης ανταγωνίζονται τη δράση της [Λαμοτριγίνη, Γαληνός; Svalheim και συν., 2015].

Προσοχή κατά τη χορήγηση της λαμοτριγίνης χρειάζεται λόγω πιθανής εμφάνισης εξανθήματος, πυρετού ή γριππώδους συνδρόμου ή επιδείνωσης των επιληπτικών κρίσεων, οπότε χρειάζεται σε αυτές τις περιπτώσεις διακοπή της θεραπείας. Χρειάζεται παρακολούθηση της ηπατικής και νεφρικής λειτουργίας, καθώς και έλεγχος της πηκτικότητας και των έμμορφων συστατικών του αίματος. Η απότομη διακοπή της λαμοτριγίνης πρέπει να αποφεύγεται, εκτός εάν εμφανιστούν σοβαρές δερματικές αντιδράσεις [Λαμοτριγίνη, Γαληνός; Kowski και συν., 2016]. Το φάρμακο χορηγείται κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας μόνο σε απόλυτη ανάγκη. Αν και η λαμοτριγίνη δε συνιστάται κατά τη γαλουχία, σήμερα σύμφωνα με νεότερες μελέτες μπορεί να επιτραπεί δεδομένου ότι το βρέφος έχει εκτεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου κατά τη διάρκεια της κύησης [Dalili και συν., 2015]. Η οδήγηση και ο χειρισμός μηχανημάτων από άτομα που είναι υπό αγωγή με λαμοτριγίνη θα πρέπει να αποφεύγεται [Λαμοτριγίνη, Γαληνός; Kowski και συν., 2016].

2.9. Λεβετιρακετάμη

Η λεβετιρακετάμη (levetiracetam) [(S)-α-αιθυλο-2-οξο-1-πυρολιδίνη ακεταμίδιο] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα σχετικά νέο αντιεπιληπτικό φάρμακο που κυκλοφόρησε το 2008 στην Αμερική και στην Ευρώπη και το οποίο δεν έχει παρόμοια χημική δομή με άλλα παλαιότερα αντιεπιληπτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα [Patsalos, 2000; Blonk και συν., 2010]. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Keppra

(UCB Pharma S.A.) [Λεβετιρακετάμη, Γαληνός]. Η λεβετιρακετάμη χρησιμοποιείται ευρέως ως μονοθεραπεία σε βρέφη (1 μηνός έως 4 ετών), σε παιδιά και σε ασθενείς άνω των 16 ετών για την αντιμετώπιση εστιακών επιληπτικών κρίσεων με ή χωρίς δευτερογενή γενίκευση [Levetiracetam prescribing information, 2011; Maguire και συν., 2012; New και συν., 2016]. Η λεβετιρακετάμη μπορεί να χορηγηθεί και ως συμπληρωματική θεραπεία μαζί με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα για τη θεραπεία επιληπτικών κρίσεων εστιακής έναρξης με ή χωρίς γενίκευση, μυοκλονικών επιληπτικών κρίσεων σε ασθενείς ηλικίας άνω των 12 ετών με νεανική μυοκλονική επιληψία, καθώς και πρωτοπαθών γενικευμένων τονικοκλονικών σπασμών σε ασθενείς ηλικίας άνω των 12 ετών με ιδιοπαθή γενικευμένη επιληψία [Suresh και συν., 2015; ema.europa]. Επίσης, η λεβετιρακετάμη είναι χρήσιμη, μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, στη θεραπεία της διπολικής διαταραχής, της μανίας και της ημικρανίας (νευρολογικής φύσης) [Pucci και συν., 2004]. Η λεβετιρακετάμη είναι ιδιαίτερος χρήσιμη σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται σε θεραπείες με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα, σε ασθενείς που λαμβάνουν πολυφαρμακευτική θεραπεία και εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο να παρουσιάσουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαρμάκων, ή σε ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια [French, 2001]. Η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου είναι δόσοεξαρτώμενη και η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της λεβετιρακετάμης κυμαίνεται από 500 έως 5000 mg [Boon και συν., 2002; Patsalos 2005]. Το φάρμακο χορηγείται στην αρχή σε δύο δόσεις ημερησίως του 1 g και η δόση αυτή μπορεί να αυξηθεί κατά 1 g κάθε 4-6 εβδομάδες [Levetiracetam prescribing information, 2011]. Παρόλο που η λεβετιρακετάμη φαίνεται να είναι καλά ανεκτή στους ασθενείς, είναι δυνατόν να εμφανιστούν δυσμενείς επιδράσεις στον ασθενή κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η λεβετιρακετάμη αντενδείκνυται σε ασθενείς που εμφανίζουν υπερευαισθησία (αλλεργία) στο συγκεκριμένο φάρμακο ή σε άλλα πυρρολιδινικά παράγωγα, καθώς και κατά τη διάρκεια του θηλασμού. Λόγω της πρόσφατης σχετικά χρήσης της στη θεραπεία της επιληψίας, η φαρμακολογική και η τοξικολογική δράση της δεν έχει πλήρως μελετηθεί ακόμα, οπότε η παρακολούθηση των επιπέδων λεβετιρακετάμης σε ασθενείς που υπόκεινται σε θεραπεία με λεβετιρακετάμη συνιστάται και ειδικά σε παιδιά και ηλικιωμένους ασθενείς [Levetiracetam prescribing information, 2011].

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της λεβετιρακετάμης δεν είναι ακόμα σαφής, ωστόσο φαίνεται ότι παρεμβαίνει στη λειτουργία της πρωτεΐνης 2A των συναπτικών κυστιδίων, η οποία βρίσκεται στα διαστήματα μεταξύ των νευρών και συμμετέχει

στην απελευθέρωση χημικών διαβιβαστών από τα νευρικά κύτταρα, οπότε σταθεροποιεί την ηλεκτρική αγωγιμότητα στον εγκέφαλο και αποτρέπει έτσι τις επιληπτικές κρίσεις [www.ema.europa]. Η λεβετιρακετάμη επηρεάζει επίσης τα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό των νευρώνων μέσω μερικής αναστολής της ροής ιόντων ασβεστίου τύπου N, οπότε ελαττώνεται η απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από τα ενδοκυτταρικά αποθέματα των νευρώνων [Greiner-Sosanko και συν., 2007]. Επιπροσθέτως, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η λεβετιρακετάμη αναστρέφει μερικώς την ελάττωση της ροής των ιόντων διευκολυνόμενης από τους υποδοχείς GABA και γλυκίνης, ελάττωση η οποία προκαλείται από τον ψευδάργυρο και τις β-καρμπολίνες [Λεβετιρακετάμη, Γαληνός].

Η λεβετιρακετάμη μετά από την από του στόματος χορήγηση παρουσιάζει γρήγορη και σχεδόν πλήρη απορρόφηση (>95%) από το γαστρεντερικό σωλήνα. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται γρήγορα (μετά από 1,3 ώρες), ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μετά από 2 ημέρες. Η λεβετιρακετάμη έχει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα (περίπου 100%), γραμμική φαρμακοκινητική και δεσμεύεται ελάχιστα με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (<10%), οπότε δεν εμφανίζει αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα που συνδέονται με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η λεβετιρακετάμη υπόκειται σε μικρής σημασίας (<25%) βιομετατροπή στο ήπαρ που δεν περιλαμβάνει το κυτόχρωμα P450, όπως συμβαίνει με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα [Patsalos, 2000; Perucca, 2005; Jain και συν., 2006; Martindale 2007; Blonk και συν., 2010; Juenke και συν., 2011]. Ο όγκος κατανομής της λεβετιρακετάμης είναι 0,5-0,7 L/kg. Ποσοστό 66% της χορηγηθείσας δόσης απεκκρίνεται αμετάβλητο στα ούρα μέσω των νεφρών, ενώ το 24% της λεβετιρακετάμης υπόκειται σε ενζυματική υδρόλυση και παράγονται φαρμακολογικά μη δραστικοί μεταβολίτες οι οποίοι απεκκρίνονται επίσης μέσω των νεφρών στα ούρα. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της λεβετιρακετάμης είναι σχετικά μικρός (περίπου 6-8 ώρες). Η ολική κάθαρση του φαρμάκου εξαρτάται από τη λειτουργία των νεφρών και σε περιπτώσεις όπου ο ασθενής παρουσιάζει μειωμένη νεφρική λειτουργία συνιστάται παρακολούθηση των επιπέδων λεβετιρακετάμης στο πλάσμα του ασθενούς [Patsalos, 2000; Radtke, 2001; Patsalos, 2004; Jain και συν., 2006; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Smedt και συν., 2007]. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις της λεβετιρακετάμης κυμαίνονται από 10 έως 50 µg/mL [Patsalos, 2000; Pucci και συν., 2004], ενώ αν και τοξικές συγκεντρώσεις δεν έχουν θεσπιστεί μπορεί να εμφανίσουν τοξικές εκδηλώσεις σε ασθενείς με συγκεντρώσεις άνω των 100 µg/mL [Hiemke και

συν., 2011; Stepanova and Beran, 2014]. Η λεβετιρακετάμη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [Martindale, 2007].

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της λεβετιρακετάμης περιλαμβάνονται: υπνηλία, αδυναμία, ζάλη, σπανιότερα ίλιγγος, τρόμος, κατάθλιψη, συγκινησιακή αστάθεια, επιθετικότητα, αϋπνία, αταξία, αμνησία, ανορεξία, δυσπεψία, διάρροια, κεφαλαλγία, διπλωπία, εξάνθημα και ρινοφαρυγγίτιδα [Kowski και συν., 2016].

Η λεβετιρακετάμη δεν φαίνεται να εμφανίζει αλληλεπιδράσεις με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα και μόνο αντικαταθλιπτικά φάρμακα που ανταγωνίζονται την αντισπασμωδική της δράση εμφανίζουν αλληλεπιδράσεις με τη λεβετιρακετάμη [Perucca, 2005; Levetiracetam prescribing information, 2011].

Προσοχή κατά τη χορήγηση της λεβετιρακετάμης απαιτείται σε ασθενείς με ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια [New και συν., 2016]. Σύμφωνα με κλινικές μελέτες σε πειραματόζωα, η λεβετιρακετάμη μπορεί να βλάψει το έμβρυο οπότε χορηγείται σε εγκύους μόνο εάν κριθεί απαραίτητο. Επίσης, το φάρμακο επηρεάζει την ικανότητα οδήγησης και χειρισμού μηχανημάτων και γι αυτό απαιτείται προσοχή κατά τη χορήγησή του σε τέτοιες περιπτώσεις [Levetiracetam prescribing information, 2011; Λεβετιρακετάμη, Γαληνός].

2.10. Οξυκαρβαζεπίνη

Η οξυκαρβαζεπίνη [10,11-διωδρο-10-οξο-5H-διβενζαπίν-5-καρβοξαμίδιο] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα παράγωγο της διβενζαπίνης και συγγενής ουσία με την καρβαμαζεπίνη. Το φάρμακο ανακαλύφθηκε το 1965, ενώ η κυκλοφορία του εγκρίθηκε για πρώτη φορά στη Δανία το 1990 και το 2000 από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Trileptal (Novartis Hellas A.E.B.E.) [Οξυκαρβαζεπίνη, Γαληνός]. Η οξυκαρβαζεπίνη ενδείκνυται ως μονοθεραπεία ή συμπληρωματική θεραπεία σε εστιακούς επιληπτικούς σπασμούς με ή χωρίς δευτερογενώς γενικευμένους τονικοκλονικούς σπασμούς σε ενήλικες και παιδιά άνω των 6 ετών [Perucca, 2002; Kellinghaus και συν., 2014; Οξυκαρβαζεπίνη, Γαληνός]. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της οξυκαρβαζεπίνης κυμαίνεται από 600 έως 2400 mg [Buggy και συν., 2010].

Η οξυκαρβαζεπίνη δρα διατηρώντας υπό έλεγχο τα «υπερδιεγερμένα» κύτταρα του εγκεφάλου, μειώνοντας έτσι την συχνότητα των επιληπικών κρίσεων. Ο κύριος μηχανισμός δράσης της οξυκαρβαζεπίνης περιλαμβάνει αποκλεισμό των ταυσεοελεγχόμενων διαύλων νατρίου, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των υπερδιεγερμένων νευρωνικών μεμβρανών, αναστολή της επαναλαμβανόμενης νευρωνικής δραστηριότητας και ελάττωση της διάδοσης των συναπτικών ερεθισμάτων. Επιπλέον, στη δράση της οξυκαρβαζεπίνης συνεισφέρουν η αυξημένη αγωγιμότητα καλίου και η διαμόρφωση των υψηλής τάσης ενεργοποιημένων διαύλων ασβεστίου για τον αποκλεισμό των μετατετανικών ενισχύσεων [http://www.novartis.com.au/PI_PDF/tri.pdf].

Η οξυκαρβαζεπίνη απορροφάται πλήρως μετά την από του στόματος χορήγηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται σε 4 με 6 ώρες [Shorvon, 2010; <http://emedicine.medscape.com/article/813654-overview>], ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μέσα σε περίπου 2 με 3 ημέρες [http://www.novartis.com.au/PI_PDF/tri.pdf]. Η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου είναι υψηλή (95%) σε από του στόματος χορήγηση και ακολουθεί γραμμική φαρμακοκινητική. Το φάρμακο έχει όγκο κατανομής 0,67 L/kg και κατανέμεται σε όλο το σώμα, αλλά δε συνδέεται σημαντικά με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (κάτω από 40%). Η οξυκαρβαζεπίνη βιομετατρέπεται ταχέως και πλήρως στο ήπαρ σε ένα κύριο μεταβολίτη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, που είναι φαρμακολογικά ενεργός. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της οξυκαρβαζεπίνης και του μεταβολίτη της είναι περίπου 2 και 9 ώρες, αντίστοιχα, οπότε η κύρια αντιεπιληπτική δράση ασκείται από τον φαρμακολογικά ενεργό μεταβολίτη. Ο μεταβολίτης της κατανέμεται σε όλο το σώμα και συνδέεται κατά περίπου 40% με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η οξυκαρβαζεπίνη απεκκρίνεται στα ούρα κυρίως υπό τη μορφή των μεταβολιτών της και μόνο ένα μικρό ποσοστό 1% ως μητρική ουσία. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις αθροιστικά της οξυκαρβαζεπίνης και του κύριου μεταβολίτη της, κυμαίνονται από 10 έως 40 $\mu\text{g/mL}$, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 40 $\mu\text{g/mL}$ θεωρούνται τοξικές [Pegucca, 2002; Hiemke και συν., 2011; Kim και συν., 2012; Park και συν., 2012]. Η οξυκαρβαζεπίνη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [http://www.novartis.com.au/PI_PDF/tri.pdf; Martindale, 2007].

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της οξυκαρβαζεπίνης περιλαμβάνουν: κόπωση, ίλιγγο, ζάλη, υπνηλία,

διαταραχές μνήμης, συγκέντρωσης, ύπνου και όρασης, διπλωπία, παραισθήσεις, ψυχικές διαταραχές, όπως άγχος, κατάσταση σύγχυσης και κατάθλιψη, πεπτικές διαταραχές, όπως ναυτία, και έμετος, αντιδράσεις υπερευαισθησίας, όπως εξάνθημα και σύνδρομο Stevens-Johnson, αλωπεκία, ακμή, αιματολογικές διαταραχές, όπως λευκοπενία και θρομβοπενία, αύξηση των ηπατικών ενζύμων, και ενίοτε υπονατρία, και μείωση ωσμωτικότητας πλάσματος [Lin και συν., 2010; Oxcarbazepine, FDA, 2011; Οξυκαρβαζεπίνη, Γαληνός].

Η οξυκαρβαζεπίνη αλληλεπιδρά με φάρμακα που είναι αναστολείς της MAO, ενώ μπορεί να μειώσει τη δράση των αντισυλληπτικών φαρμάκων. Σε περίπτωση ταυτόχρονης χορήγησης άλλων αντιεπιληπτικών φαρμάκων που προκαλούν επαγωγή των ενζύμων, μπορεί να χρειασθεί τροποποίηση του δοσολογικού σχήματος, επειδή μπορεί να επιταχυνθεί η βιομετατροπή της οξυκαρβαζεπίνης [Perucca, 2002; Οξυκαρβαζεπίνη, Γαληνός].

Κατά τη διάρκεια θεραπείας με οξυκαρβαζεπίνη απαιτείται τακτικός έλεγχος του νατρίου του ορού, των έμμορφων στοιχείων του αίματος, της ηπατικής και της νεφρικής λειτουργίας. Σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια απαιτείται μείωση της δοσολογίας, ενώ το φάρμακο πρέπει να διακόπτεται εάν εμφανιστούν αντιδράσεις υπερευαισθησίας. Χρειάζεται παρακολούθηση του σωματικού βάρους καρδιοπαθών ασθενών και ιδιαίτερη προσοχή σε ασθενείς με διαταραχές της καρδιακής αγωγιμότητας. Κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας δε συνιστάται η χορήγηση οξυκαρβαζεπίνης, ενώ ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται σε οδηγούς και χειριστές μηχανημάτων λόγω της υπνηλίας που προκαλεί [Kaussner και συν., 2010; Oxcarbazepine, FDA, 2011; Οξυκαρβαζεπίνη, Γαληνός].

2.11. Πρεγκαμπαλίνη

Η πρεγκαμπαλίνη [(S)-3-(αμινομεθυλ)-5-μεθυλεξανοϊκό οξύ] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα δομικό ανάλογο του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή GABA που εγκρίθηκε το 2004 στην Ευρώπη και από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής [Johannessen και συν., 2003, Mudiam και συν., 2012]. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Lyrica (Pfizer A.E.) [Πρεγκαμπαλίνη, Γαληνός]. Η πρεγκαμπαλίνη ενδείκνυται ως συμπληρωματική θεραπεία σε ήδη χορηγούμενο σχήμα σε ασθενείς με εστιακές επιληπτικές κρίσεις (επιληπτικούς σπασμούς που ξεκινούν από ένα συγκεκριμένο τμήμα του εγκεφάλου)

οι οποίες δεν μπορούν να ελεγχθούν με την αρχική θεραπεία [Goa και Sorkin, 1993; Lehner και συν., 2007, Zhou και συν., 2012]. Η πρεγκαμπαλίνη χρησιμοποιείται επίσης στους ενήλικες για τη θεραπεία διαφόρων ψυχιατρικών νόσων, όπως σχιζοφρένεια και γενικευμένη αγχώδη διαταραχή, καθώς και για τον περιφερικό νευροπαθητικό πόνο, όπως ο πόνος των διαβητικών ασθενών ή των ασθενών που πάσχουν από έρπη ζωστήρα, και για τον κεντρικό νευροπαθητικό πόνο, όπως ο πόνος των ασθενών που πάσχουν από βλάβη στο νωτιαίο μυελό [Citrome, 2009; Nirogi και συν., 2009; Oertel και συν., 2009; Johnson και συν., 2013; http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000546/WC500046602.pdf; Πρεγκαμπαλίνη, Γαληνός]. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της πρεγκαμπαλίνης κυμαίνεται από 300 έως 1800 mg ανάλογα με το είδος της πάθησης για την οποία χρησιμοποιείται [http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000546/WC500046602.pdf].

Η πρεγκαμπαλίνη έχει παρόμοια δομή με το νευροδιαβιβαστή GABA που παράγει ο ίδιος ο οργανισμός, με πολύ διαφορετικά όμως βιολογικά αποτελέσματα. Οι νευροδιαβιβαστές είναι χημικές ουσίες που επιτρέπουν την επικοινωνία μεταξύ των νευρικών κυττάρων. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της πρεγκαμπαλίνης δεν είναι εντελώς γνωστός, αλλά θεωρείται ότι επιδρά στον τρόπο με τον οποίο το ασβέστιο εισέρχεται στα νευρικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η πρεγκαμπαλίνη συνδέεται με την α2-δ υπομονάδα των ηλεκτροεξαρτώμενων διαύλων Ca των νευρώνων και οδηγεί στην αναστολή της ροής των ιόντων Ca με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της απελευθέρωσης διεγερτικών νευροδιαβιβαστών (κυρίως του γλουταμινικού) από τους προσυναπτικούς νευρώνες και την έμμεση αύξηση των επιπέδων του GABA στον εγκέφαλο [Preece και Jackson, 1994]. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η δραστηριότητα ορισμένων νευρικών κυττάρων στον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό και κατά συνέπεια ελαττώνεται η απελευθέρωση άλλων νευροδιαβιβαστών οι οποίοι ευθύνονται για τον πόνο, την επιληψία και το άγχος. Η δράση αυτή σχετίζεται με τις αγχολυτικές ιδιότητες της πρεγκαμπαλίνης [Leppick, 2001; Montgomery και Baldwin, 2006]. Η πρεγκαμπαλίνη έχει αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματική με τη βενλαφαζίνη, τη δουλοξετίνη, τα SSRI's παροξετίνη και σερτραλίνη και τις βενζοδιαζεπίνες για την αντιμετώπιση της γενικευμένης αγχώδους διαταραχής. Μάλιστα, παρουσιάζει πλεονέκτημα έναντι των αντικαταθλιπτικών εξαιτίας της ταχύτερης έναρξης δράσης (εντός μίας εβδομάδας) με την

πρεγκαμπαλίνη σε σχέση με τα αντικαταθλιπτικά (2-3 εβδομάδες). Επίσης στερείται των φαινομένων ανοχής και εξάρτησης που παρατηρούνται μετά από μακρόχρονη χορήγηση βενζοδιαζεπινών [Shader και Greenblatt 2003; Montgomery και Baldwin, 2006].

Η πρεγκαμπαλίνη απορροφάται πλήρως μετά την από του στόματος χορήγηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται σε 1,5 ώρες, ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μέσα σε 1 με 2 ημέρες [Martindale, 2007]. Το φάρμακο εμφανίζει περίπου 90% βιοδιαθεσιμότητα και γραμμική φαρμακοκινητική. Σε περίπτωση που χορηγηθεί μαζί με τροφή μειώνεται ο ρυθμός απορρόφησης, αλλά όχι η τελική απορρόφησή του. Το φάρμακο έχει όγκο κατανομής 0,5 L/kg και κατανέμεται σε όλο το σώμα, αλλά δεν συνδέεται με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η πρεγκαμπαλίνη βιομετατρέπεται απειροελάχιστα και απεκκρίνεται κατά 98% ως μητρική ουσία στα ούρα [Jiang και Shuguang, 1999; Cetin και Atmaca, 2004; Vermeij και Edelbroek, 2004; Gambelunghe και συν., 2005; Diaz και συν., 2008; Nagel και συν., 2009; Nirogi και συν., 2009; Oertel και συν., 2009]. Ο μέσος χρόνος ημίσειας ζωής της πρεγκαμπαλίνης είναι 6,3 ώρες [Martindale, 2007]. Λόγω της διαφορετικής απορρόφησης του φαρμάκου από άτομο σε άτομο, ο καθορισμός του δοσολογικού σχήματος είναι αναγκαίος ειδικά σε ασθενείς με μειωμένη νεφρική λειτουργία [Harden, 1994; Gambelunghe και συν., 2005]. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου σε ασθενείς που βρίσκονται σε σταθεροποιημένη κατάσταση και λαμβάνουν τις συνιστώμενες δόσεις είναι 2,0 μέχρι 5,0 µg/mL, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10 µg/mL θεωρούνται τοξικές [<http://www.childrensmn.org/manuals/lab/Chemistry/069676.pdf>; Hiemke και συν., 2011]. Η πρεγκαμπαλίνη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [Martindale, 2007].

Στις πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της πρεγκαμπαλίνης περιλαμβάνονται: ζάλη, υπνηλία, αταξία, δυσαρθρία, διαταραχές μνήμης, παραισθήσεις, ευφορική διάθεση, ευερεθιστότητα, μειωμένη libido, θαμπή όραση, διπλωπία, ίλιγγος, έμετοι, δυσκοιλιότητα, οιδήματα, μετεωρισμός και ξηροστομία. Οι λιγότερο συχνές περιλαμβάνουν: ανορεξία, ψευδαισθήσεις, διέγερση, κατάθλιψη, αϋπνία, διακυμάνσεις ψυχικής διάθεσης, ταχυκαρδία, συγκοπτικές κρίσεις, εξάψεις, δύσπνοια, σιελόρροια, διάρροια, εξανθήματα, ξηροφθαλμία, δακρύρροια, μείωση οπτικής οξύτητας, ίλιγγοι, γαστρο-

οισοφαγική παλινδρόμηση, διαταραχές γεύσης, ακράτεια ούρων, δυσουρία, μυαλγίες, αρθραλγίες, αλλεργικές αντιδράσεις, διαταραχές βάδισης, αύξηση σωματικού βάρους, αύξηση ηπατικών ενζύμων, υπογλυκαιμία ή υπεργλυκαιμία, και θρομβοπενία [Pregabalin, FDA, 2013].

Αξιόλογες αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα δεν έχουν αναφερθεί διότι βιομετατρέπεται απειροελάχιστα και απεκκρίνεται σχεδόν αμετάβλητη στα ούρα [Diaz και συν., 2008]. Προσοχή κατά τη χορήγηση της πρεγκαμπαλίνης χρειάζεται λόγω της ζάλης και της υπνηλίας που προκαλεί, οπότε υπάρχει κίνδυνος ατυχήματος κατά την οδήγηση και τον χειρισμό μηχανημάτων, καθώς και κίνδυνος επιδείνωσης ασθενών με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Το φάρμακο δεν πρέπει να χορηγείται σε ασθενείς με προβλήματα δυσανεξίας στη γαλακτόζη. Επίσης, κατά την απότομη διακοπή του φαρμάκου έχουν παρατηρηθεί φαινόμενα στέρησης (αϋπνία, νευρικότητα, κατάθλιψη κλπ.) και γι αυτό συνιστάται βαθμιαία διακοπή [Pregabalin, FDA, 2013]. Σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια συνιστάται μειωμένη δόση ανάλογα με το βαθμό του προβλήματος [Harden, 1994; Gambelunghe και συν., 2005].

2.12. Τιαγκαμπίνη

Η τιαγκαμπίνη [(R)-1[4,4-δισ(3-μεθυλοθειοφαιν-2-υλ)βουτ-3-ενυλ]πιπεριδινό-3-καρβοξυλικό οξύ] (Σχήμα 2.1.) είναι ένας ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας της πρόσληψης του GABA από τους νευρώνες. Το φάρμακο εγκρίθηκε για πρώτη φορά το 1997 από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και ενδείκνυται ως συμπληρωματική θεραπεία εστιακών κρίσεων σε ασθενείς ηλικίας άνω των 12 ετών, με ή χωρίς δευτερογενή γενίκευση εάν δεν ελέγχονται ικανοποιητικά με άλλα φάρμακα [Quinn, 2007]. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Gabitril (Teva Pharmaceuticals B.V.) [Τιαγκαμπίνη, Γαληνός]. Η τιαγκαμπίνη χρησιμοποιείται επίσης για την αντιμετώπιση του μετατραυματικού στρες, στο νευροπαθητικό πόνο, σε γενικευμένη αγχώδη διαταραχή, στη μανία καθώς και σε περιπτώσεις εθισμού σε κοκαΐνη [Novak και συν., 2001; Zwanger και συν., 2001; Schaller και συν., 2004; Hoffman, 2005; Winhusen και συν., 2005]. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της τιαγκαμπίνης σε ασθενείς που δεν λαμβάνουν φάρμακα-επαγωγείς των ηπατικών ενζύμων κυμαίνεται από 15 έως 30 mg, ενώ σε αυτούς που λαμβάνουν τέτοιου είδους φάρμακα από 30 έως 50 mg. Η τιαγκαμπίνη αντενδείκνυται σε γενικευμένη επιληψία, ιδιαίτερα στις ιδιοπαθείς μορφές με

αφαιρέσεις και στο σύνδρομο Lennox-Gastaut, καθώς και σε ασθενείς με βαριά ηπατική βλάβη [Lau και συν., 1997; <https://www.nice.org.uk/donotdo/adjunctive-treatment-in-children-young-people-and-adults-withlennox821lgastaut-syndromedo-not-offer-carbamazepine-gabapentin-oxcarbazepine-pregabalin-tiagabineor-vigabatrin>].

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της τιαγκαμπίνης δεν είναι πλήρως γνωστός, αλλά πιστεύεται ότι σχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων GABA στον εγκέφαλο, που είναι μείζων ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στον κεντρικό νευρικό σύστημα, οπότε διευκολύνει τη συναπτική νευρομεταβίβαση [Adkins και Noble, 1998; Vigo και Baldessarini, 2009].

Η τιαγκαμπίνη απορροφάται πλήρως μετά την από του στόματος χορήγηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται σε 45 λεπτά, ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μέσα σε 2 ημέρες [Martindale, 2007]. Το φάρμακο εμφανίζει περίπου 95% βιοδιαθεσιμότητα και γραμμική φαρμακοκινητική. Η απορρόφηση και η απέκκριση της τιαγκαμπίνης είναι γραμμική εντός του θεραπευτικού δοσολογικού σχήματος. Σε περίπτωση που χορηγηθεί μαζί με τροφή μειώνεται ο ρυθμός απορρόφησης, αλλά όχι η τελική απορρόφησή της. Το φάρμακο έχει όγκο κατανομής 0,74-0,85 L/kg, κατανέμεται σε όλο το σώμα και συνδέεται κατά 96% με τις πρωτεΐνες του πλάσματος [Ostergaard και συν., 1995; Gustavson και συν., 1997]. Η τιαγκαμπίνη βιομετατρέπεται εκτενώς στο ήπαρ και απεκκρίνεται υπό τη μορφή μεταβολιτών στα κόπρανα ή σε μικρότερο βαθμό στα ούρα, ενώ λιγότερο από 2% απεκκρίνεται ως μητρική ουσία. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της τιαγκαμπίνης κυμαίνεται από 7 έως 9 ώρες, παρόλο που μπορεί να μειωθεί σε 2 με 3 ώρες λόγω παρουσίας άλλων φαρμάκων που εντείνουν τη βιομετατροπή του φαρμάκου στο ήπαρ [Lau και συν., 1997; Martindale, 2007]. Συγκεκριμένα, η βιομετατροπή της τιαγκαμπίνης στο ήπαρ επιταγχύνεται από άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα που επάγουν τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, όπως η καρβαμαζεπίνη, η φαινυτοΐνη, η πριμιδόνη και η φαινοβαρβιτάλη, και τα επίπεδα της τιαγκαμπίνης στο πλάσμα ελαττώνονται μέχρι και τρεις φορές όταν χορηγούνται τα παραπάνω φάρμακα [Gustavson και συν., 1998; Patsalos, 2013]. Επίσης, τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, οι αναστολείς της MAO και επαναπρόσληψης σεροτονίνης ανταγωνίζονται τη δράση της τιαγκαμπίνης, ενώ τα ανθελονοσιακά φάρμακα όπως η χλωροκίνη και υδροχλωροκίνη επιτείνουν τη δράση του φαρμάκου [Martindale, 2007; Τιαγκαμπίνη,

Γαληνός]. Οι θεραπευτικές και οι τοξικές συγκεντρώσεις της τιαγκαμπίνης δεν έχουν ακόμη καθοριστεί, αλλά οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις του φαρμάκου που έχουν βρεθεί σε κλινικές μελέτες κυμαίνονται από 0,05 έως 0,20 µg/mL, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0,30 µg/mL θεωρούνται επικίνδυνες και ικανές να προκαλέσουν τοξικές εκδηλώσεις [<http://www.childrensmn.org/manuals/lab/Chemistry/179769.pdf>; Tiaft, 2004; Hiemke και συν., 2011]. Η τιαγκαμπίνη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [Martindale, 2007].

Στις πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της τιαγκαμπίνης περιλαμβάνονται υπνηλία, κόπωση, και ζάλη, ενώ σπανιότερα το άτομο μπορεί να εμφανίσει επιθετικότητα, νευρική κατάσταση, σύγχυση, ταχυκαρδία, τρόμο, βραδύτητα σκέψης, διάρροια, καταθλιπτική διάθεση και εκχυμώσεις [Tiagabine, FDA, 2010; Spiller και συν., 2016].

Προσοχή κατά τη χορήγηση απαιτείται επειδή υπάρχει κίνδυνος επιδείνωσης των αφαιρετικών κρίσεων σε γενικευμένη επιληψία. Η απότομη διακοπή του φαρμάκου ενδέχεται να προκαλέσει υποτροπή των κρίσεων. Σε ασθενείς με άγχος ή κατάθλιψη, υπάρχει κίνδυνος υποτροπής των εκδηλώσεων αυτών. Σε εμφάνιση εκχυμώσεων πρέπει να γίνεται έλεγχος αιμόστασης. Προσοχή χρειάζεται κατά τη χορήγηση της τιαγκαμπίνης σε οδηγούς ή χειριστές μηχανημάτων και σε ηλικιωμένους. Σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια ηπατική ανεπάρκεια απαιτείται μείωση της δόσης, ενώ το φάρμακο δε χορηγείται προληπτικώς κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας [Tiagabine, FDA, 2010].

2.13. Τοπιραμάτη

Η τοπιραμάτη [2,3:4,5-δισ-O-(1-μεθυλαιθυλιδενο)-β-D-φρουκτοπυρανόζη σουλφαμάτη] (Σχήμα 2.1.) ενδείκνυται ως μονοθεραπεία σε ενήλικες και παιδιά άνω των 6 ετών με εστιακές επιληπτικές κρίσεις με ή χωρίς δευτερογενείς γενικευμένες κρίσεις και πρωτογενείς γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις. Επίσης, χρησιμοποιείται ως συμπληρωματική θεραπεία σε ενήλικες και παιδιά άνω των 2 ετών με εστιακές επιληπτικές κρίσεις, με ή χωρίς δευτερογενή γενίκευση, ή πρωτογενείς γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις, καθώς και στη θεραπεία κρίσεων που συνδέονται με το σύνδρομο Lennox-Gastaut [Guerrreiro και συν., 1999; Topiramate, FDA, 2014]. Το φάρμακο εγκρίθηκε από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής πρώτη φορά το 1996 ως αντιεπιληπτικό φάρμακο

[Topiramate, FDA, 2014], στη συνέχεια το 2004 για την προφύλαξη της ημικρανίας σε ενήλικες (μόνο σε περιστατικά που παρουσιάζουν υψηλή συχνότητα σοβαρών και μακράς διάρκειας κρίσεων και δεν ανταποκρίνονται σε άλλα θεραπευτικά σχήματα) [Rothrock, 2012], και τέλος μετά το 2012 σε συνδυασμό με την φεντερμίνη κατά της παχυσαρκίας [Shin and Gadde, 2013]. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Topamac (Janssen-Cilag A.E.B.E.) [Τοπιραμάτη, Γαληνός]. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της τοπιραμάτης κυμαίνεται από 100 έως 500 mg [Τοπιραμάτη, Γαληνός; Topiramate, FDA, 2014].

Ο μηχανισμός δράσης της τοπιραμάτης είναι πολλαπλός αφού το φάρμακο μειώνει τη συχνότητα με την οποία δημιουργούνται δυναμικά ενεργείας όταν οι νευρώνες υπόκεινται σε επίμονη αποπόλωση, αυξάνει τη δράση του GABA σε μερικούς τύπους GABA υποδοχέων και ανταγωνίζεται, ασθενώς, τη διεγερτική δράση του γλουταμινικού οξέος στον AMPA υποδοχέα του [Perucca, 1997; Patsalos, 1999].

Η τοπιραμάτη απορροφάται πλήρως μετά την από του στόματος χορήγηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται σε 1-4 ώρες, ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μέσα σε περίπου 4 με 8 ημέρες [Patsalos, 2005]. Το φάρμακο εμφανίζει περίπου 81-95% βιοδιαθεσιμότητα, που δεν επηρεάζεται από τη λήψη τροφής, και γραμμική φαρμακοκινητική [Schneiderman, 1998]. Ο όγκος κατανομής της είναι 0,6-1,0 L/kg, και το φάρμακο κατανέμεται σε όλο το σώμα ενώ συνδέεται μόνο κατά 10% με τις πρωτεΐνες του πλάσματος [Patsalos, 2005]. Η τοπιραμάτη δε βιομετατρέπεται εκτενώς στο ήπαρ, ενώ οι έξι μεταβολίτες που έχουν βρεθεί εμφανίζουν μικρή ή καθόλου φαρμακολογική δράση. Το φάρμακο απεκκρίνεται ως μητρική ουσία μέσω των νεφρών κατά περίπου 50%. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της τοπιραμάτης είναι περίπου 20 έως 30 ώρες στους ενήλικες [Martindale, 2007]. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις της τοπιραμάτης κυμαίνονται από 2,0 έως 20 $\mu\text{g/mL}$, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 36 $\mu\text{g/mL}$ θεωρούνται τοξικές [<http://ltd.aruplab.com/Tests/Pub/0070390>]. Η τοπιραμάτη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [Martindale, 2007].

Στις πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της τοπιραμάτης περιλαμβάνονται σύγχυση, ζάλη, υπνηλία, νευρικότητα, αταξία, διαταραχές λόγου, ψυχοκινητική επιβράδυνση, διαταραχές συγκέντρωσης και μνήμης, προβλήματα ομιλίας και διάθεσης, κατάθλιψη,

παραισθήσεις, κόπωση, αδυναμία, διαταραχές όρασης, διπλωπία, νυσταγμός, διαταραχές γεύσης, πεπτικές διαταραχές, ανορεξία και ελάττωση βάρους, λευκοπενία [Shorvon, 1996; Mandal και συν., 2008; Topiramate, FDA, 2014].

Η τοπιραμάτη είναι ασθενής αναστολέας του ηπατικού ενζύμου CYP2C19 και ασθενής επαγωγέας του CYP3A, οπότε εμφανίζει μικρού βαθμού αύξηση της κάθαρσης φαρμάκων όπως της διγοξίνης, της ρισπεριδόνης και του λιθίου, και μικρού βαθμού μείωση της κάθαρσης φαρμάκων όπως της προπανολόλης, της αμιτριπτυλίνης, της νοτριπτυλίνης και της αλοπεριδόλης. Γενικώς, τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, οι αναστολείς της MAO και της επαναπρόσληψης σεροτονίνης ανταγωνίζονται τη δράση της τοπιραμάτης [Bourgeois, 1996]. Επίσης, η τοπιραμάτη εμφανίζει σημαντικές αλληλεπιδράσεις με άλλα αντιεπιληπτικά φάρμακα, όπως η καρβαμαζεπίνη, η οξυκαρβαζεπίνη, η φαινοβαρβιτάλη, η φαινυτοΐνη και η πριμιδόνη, που επάγουν τα ηπατικά ένζυμα, οπότε η βιομετατροπή της επιταγχύνεται και μειώνονται τα επίπεδά της κατά 40% στο πλάσμα του ασθενούς [Patsalos 2005; Martindale, 2007; Patsalos, 2013]. Έχει παρατηρηθεί ότι η τοπιραμάτη αυξάνει τα επίπεδα της φαινυτοΐνης, ενώ αυξάνει το μεταβολισμό των οιστρογόνων και της προγεστερόνης και μειώνει την αντισυλληπτική τους δράση [Τοπιραμάτη, Γαληνός].

Η απότομη διακοπή της τοπιραμάτης ενδέχεται να προκαλέσει επιδείνωση των κρίσεων. Προσοχή κατά τη χορήγηση του φαρμάκου χρειάζεται σε οδηγούς ή χειριστές μηχανημάτων, σε ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια, καθώς και με μέτρια ή σοβαρή νεφρική βλάβη όπου μπορεί να απαιτηθούν 10 έως 15 ημέρες για την επίτευξη της σταθεροποιημένης κατάστασης και η αρχική δόση πρέπει να είναι το ήμισυ της κανονικής. Ασθενείς με τάση για νεφρολιθίαση χρειάζονται ιδιαίτερα καλή ενυδάτωση. Η λήψη τοπιραμάτης έχει συσχετισθεί με οξεία εμφάνιση μυωπίας σχετιζόμενης με δευτερογενές γλαύκωμα κλειστής γωνίας. Σε περίπτωση που ο ασθενής εμφανίσει αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση απαιτείται εξέταση οφθαλμιάτρου, διακοπή του φαρμάκου και μείωση της ενδοφθάλμιας πίεσης. Κατά τη διάρκεια της κύησης, σταθμίζεται το αναμενόμενο όφελος σε σχέση με τους κινδύνους, ενώ το φάρμακο δεν πρέπει να χορηγείται κατά τη γαλουχία [Τοπιραμάτη, Γαληνός; Topiramate, FDA, 2014].

2.14. Φαινοβαρβιτάλη

Η φαινοβαρβιτάλη [5-αιθυλ-5-φαινυλ-1,3-διαζινανο-2,4,6-τριόνη ή 5-αιθυλ-5-φαινυλοβαρβιτουρικό οξύ] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα μακράς δράσης βαρβιτουρικό φάρμακο που χρησιμοποιείται συνηθέστερα για την αντισπασμωδική του δράση στη διαχείριση των τονικοκλονικών γενικευμένων ή εστιακών επιληπτικών κρίσεων και περιστασιακά ως ηρεμιστικό λόγω των κατασταλτικών-υπνωτικών του ιδιοτήτων [Pal, 2006; Brodie και Kwan, 2012; Pongaratne και συν., 2012; Trinkka και συν., 2015]. Το φάρμακο εγκρίθηκε και κυκλοφορεί στην αγορά από το 1912 ως κατασταλτικό και υπνωτικό φάρμακο, μέχρι τη δεκαετία του '60 που κυκλοφόρησαν οι βενζοδιαζεπίνες και αντικαταστάθηκε σε ένα βαθμό η χρήση του [Herranz και συν., 1984; <http://www.epilepsy.com/medications/phenobarbital>]. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Gardenal (Aventis A.E.B.E.) [Φαινοβαρβιτάλη, Γαληνός]. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της φαινοβαρβιτάλης κυμαίνεται από 100 έως 400 mg [Abramson, 1988]. Η φαινοβαρβιτάλη αντενδείκνυται σε οξεία διαλείπουσα πορφυρία [Lehne, 2013].

Η φαινοβαρβιτάλη αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς GABA-A, αυξάνοντας την συναπτική αναστολή, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της εξάπλωσης της επιληπτικής δραστηριότητας. Το φάρμακο επίσης αναστέλλει τους διαύλους ασβεστίου, με αποτέλεσμα τη μείωση της απελευθέρωσης των διεγερτικών νευροδιαβιβαστών. Οι κατασταλτικές-υπνωτικές ιδιότητες της φαινοβαρβιτάλης είναι πιθανώς αποτέλεσμα της δράσης της στο πολυσυναπτικό σύστημα ενεργοποίησης του δικτυωτού σχηματισμού που βρίσκεται στο μεσεγκέφαλο και ελέγχει τη διέγερση του ΚΝΣ. Προκαλεί ενίσχυση της δράσης της GABA ως προς την είσοδο του χλωρίου εντός του νευρώνα παρατείνοντας τη διάρκεια των ανοιγμάτων των διαύλων ιόντων χλωρίου [<http://www.drugbank.ca/drugs/db01174>; Czapinski και συν., 2005].

Η φαινοβαρβιτάλη απορροφάται πλήρως μετά την από του στόματος χορήγηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται σε 2 ώρες σε από του στόματος χορήγηση και σε 4 ώρες σε ενδομυϊκή χορήγηση, ενώ οι συγκεντρώσεις της σταθεροποιημένης κατάστασης επιτυγχάνονται μέσα σε περίπου 15 με 25 ημέρες [Touw και συν., 2000]. Η φαινοβαρβιτάλη εμφανίζει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα (περίπου 95%) και γραμμική φαρμακοκινητική [Dhillon και Korstrzewski, 2006]. Το φάρμακο έχει όγκο κατανομής 0,6-1,0 L/kg, κατανέμεται σε όλο το σώμα και συνδέεται κατά περίπου

45-60% με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Η φαινοβαρβιτάλη βιομετατρέπεται κατά ένα μέρος στο ήπαρ, ενώ περίπου το 50% του φαρμάκου απεκκρίνεται αμετάβλητο στα ούρα. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της φαινοβαρβιτάλης είναι περίπου 75-120 ώρες στους ενήλικες, αρκετά μεγαλύτερος στα νεογνά και μικρότερος στα παιδιά (40-70 ώρες) [Nelson και συν., 1982; Touw και συν., 2000; Marsot και συν., 2014]. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις της φαινοβαρβιτάλης κυμαίνονται από 15 έως 40 $\mu\text{g/mL}$, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 40 $\mu\text{g/mL}$ θεωρούνται τοξικές [http://www.globalrph.com/labs_drug_levels.htm; Martindale, 2007; Hiemke και συν., 2011]. Η φαινοβαρβιτάλη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα [Martindale, 2007].

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της φαινοβαρβιτάλης είναι κυρίως δόσοεξαρτώμενες και περιλαμβάνουν: ζάλη και υπνηλία (κυρίως τις πρωινές ώρες), σύγχυση (κυρίως σε ηλικιωμένα άτομα), επίδραση στις πνευματικές λειτουργίες, ευερεθιστότητα και υπερκινητικότητα (σε ένα ποσοστό παιδιών), μείωση φυλλικού οξέος με ή χωρίς μεγαλοβλαστική αναιμία, υπασβεστιασμία και οστεομαλάκυνση μετά από μακρά χρήση. Έχουν επίσης παρατηρηθεί σπανίως κάποιες αντιδράσεις υπερευαισθησίας όπως ερύθημα, ακοκκιοκυτταραιμία, απλαστική αναιμία, ίκτερος, ηπατίτιδα και σύνδρομο Stevens-Johnson. Σε περιπτώσεις χορήγησης φαινοβαρβιτάλης κατά τη διάρκεια της κύησης έχουν περιγραφεί σπάνια λυκόστομα και λαγόχειλος στο νεογνό, ενώ μερικές φορές διαταραχή της πηκτικότητας και εμφάνιση αιμορραγικής διάθεσης στο νεογέννητο, οπότε και συνιστάται προληπτική χορήγηση βιταμίνης K [Iivanainen και Savolainen, 1983; Herranz και συν., 1984; Muller και συν., 2000; Lehne, 2013].

Η φαινοβαρβιτάλη μπορεί να επιταχύνει τη βιομετατροπή της κορτιζόλης, της χολερυθρίνης, των κουμαρινικών αντιπηκτικών, της φαινυλοβουταζόνης, της διπυρόνης, της διγίτοξίνης, της γκριζεοφουλβίνης και των αντισυλληπτικών, με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων τους στο αίμα. Το φάρμακο μπορεί να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων και της δράσης της φαινυτοΐνης [Lockard και συν., 1976; Mehta και Ticku, 1988; Brodie, 1992; Moffa, 2010; Patsalos, 2013]. Η δικουμαρόλη και η φαινυλοβουταζόνη μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα της φαινοβαρβιτάλης στο αίμα, ενώ το βαλπροϊκό οξύ και πιθανώς και η καρβαμαζεπίνη μπορούν να τα αυξήσουν [Mehta και Ticku, 1988; Moffa, 2010].

Προσοχή κατά τη χορήγηση της φαινοβαρβιτάλης χρειάζεται σε οδηγούς ή χειριστές μηχανημάτων, σε ηλικιωμένους και σε ασθενείς με νεφρική ή ηπατική

ανεπάρκεια. Η φαινοβαρβιτάλη δεν πρέπει να χορηγείται κατά τη διάρκεια αντιπηκτικής αγωγής επειδή ανταγωνίζεται τη δράση των κουμαρινικών ή τα σκευάσματα αυτά θα πρέπει να χορηγούνται σε μεγαλύτερες δόσεις όπως και τα κορτικοστεροειδή. Η απότομη διακοπή του φαρμάκου σε άτομα που λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή μπορεί να προκαλέσει επικίνδυνες αιμορραγίες, καθώς και επιδείνωση των κρίσεων. Η συγχορήγηση με οινόπνευμα θα πρέπει να αποφεύγεται [Cary και συν., 1983; Muller και συν., 2000; Φαινοβαρβιτάλη, Γαληνός].

2.15. Φαινοτοΐνη

Η φαινοτοΐνη [5,5-διφαινυλμιδαζολιδινο-2,4-διόνη] (Σχήμα 2.1.) είναι ένα παλιό αντιεπιληπτικό φάρμακο που εγκρίθηκε πρώτη φορά το 1953 από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Το φάρμακο κυκλοφορεί στον Ελλαδικό χώρο κυρίως με την εμπορική ονομασία Epanutin (Pfizer Hellas A.E.) [Φαινοτοΐνη, Γαληνός]. Η φαινοτοΐνη ενδείκνυται για όλες τις μορφές εστιακής επιληψίας, για γενικευμένες τονικοκλονικές κρίσεις και στην πρόληψη ή θεραπεία των σπασμών που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια ή μετά από νευροχειρουργικές επεμβάσεις κρανίου, καθώς και στη θεραπεία διαφόρων ειδών νευραλγίας, όπως της νευραλγίας του τριδύμου που προκαλεί οξύ πόνο στο πρόσωπο. Η συνήθης ημερήσια θεραπευτική δόση της φαινοτοΐνης κυμαίνεται από 200 έως 1000 mg. Η φαινοτοΐνη αντενδείκνυται όταν υπάρχει ιστορικό υπερευαισθησίας σε άλλες υδαντοΐνες, σε ενδοαρτηριακή χορήγηση, και σε ενδοφλέβια χορήγηση λόγω φλεβοκομβικής βραδυκαρδίας, φλεβοκομβικού αποκλεισμού, κολλοκοιλιακού αποκλεισμού 2^{ου} και 3^{ου} βαθμού και συνδρόμου Adams-Stokes, καθώς και σε οξεία διαλείπουσα πορφυρία [Scheinfeld, 2003; Zivanovic και συν., 2004; Phenytoin, FDA, 2011].

Η φαινοτοΐνη φαίνεται ότι δρα στον κινητικό φλοιό, όπου αναστέλλεται η επέκταση των επιληπτικών παροξυσμών, και μειώνει τη μεγάλη δραστηριότητα των κέντρων των εγκεφαλικών στελεχών που ευθύνονται για την τονική φάση των επιληπτικών παροξυσμών grand mal. Συγκεκριμένα, η φαινοτοΐνη σταθεροποιεί τις μεμβράνες των νευρώνων ως προς την εκπόλωση, μειώνοντας την είσοδο των ιόντων νατρίου στους νευρώνες σε κατάσταση ηρεμίας ή κατά τη διάρκεια της εκπόλωσης. Επίσης, μειώνει την εισροή ιόντων ασβεστίου κατά τη διάρκεια της εκπόλωσης και καταστέλλει την επαναλαμβανόμενη πυροδότηση των νευρώνων [Rogawski και Loscher, 2004; Clark και συν., 2012].

Η φαινυτοΐνη απορροφάται αργά αλλά σχεδόν πλήρως μετά την από του στόματος χορήγηση από το γαστρεντερικό σωλήνα και οι μέγιστες συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα εμφανίζονται σε 3-9 ώρες. Οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου σε σταθεροποιημένη κατάσταση επιτυγχάνονται συνήθως μέσα σε περίπου 7 με 10 ημέρες [http://www.globalrph.com/labs_drug_levels.htm], ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρειαστούν μερικές εβδομάδες λόγω του ότι η φαινυτοΐνη αναστέλλει τη βιομετατροπή της [Martindale, 2007]. Το φάρμακο σε μεγάλο βαθμό είναι αδιάλυτο στο όξινο pH του στομάχου και απορροφάται κυρίως από το ανώτερο τμήμα του εντέρου. Ο ρυθμός απορρόφησης της φαινυτοΐνης ποικίλλει και θεωρείται ότι επηρεάζεται από την παρουσία τροφής [Rickens, 1979]. Η χορήγηση αλάτων ασβεστίου, είτε με τη μορφή τροφής είτε με τη μορφή αντιόξινων, μειώνει την απορρόφησή της και συνεπώς και τα επίπεδά της στο αίμα. Η απορρόφηση μετά από ενδομυϊκή χορήγηση είναι πιο αργή από αυτή από το γαστρεντερικό σωλήνα. Η φαινυτοΐνη βιομετατρέπεται εκτενώς στο ήπαρ σε φαρμακολογικά αδρανείς μεταβολίτες. Ο ρυθμός βιομετατροπής της, που εμφανίζει το φαινόμενο του γενετικού πολυμορφισμού και μπορεί να επηρεάζεται από φυλετικά χαρακτηριστικά, έχει αναφερθεί ότι αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της έμμηνου ρύσης, ενώ μειώνεται λόγω ηλικίας [Martindale, 2007]. Το φάρμακο εμφανίζει καλή βιοδιαθεσιμότητα και μη γραμμική φαρμακοκινητική κορεσμού. Η φαινυτοΐνη έχει όγκο κατανομής 0,75 L/kg, κατανέμεται ευρέως στο σώμα και συνδέεται κατά περίπου 90% με τις πρωτεΐνες του πλάσματος [Martindale, 2007]. Απεκκρίνεται κυρίως μέσω της χολής με τη μορφή αδρανών μεταβολιτών, οι οποίοι στη συνέχεια επαναρροφούνται από το έντερο και αποβάλλονται τελικά στα ούρα. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της φαινυτοΐνης εξαρτάται από τη δόση και κυμαίνεται από 7 έως 42 ώρες, ενώ ο μέσος χρόνος ημίσειας ζωής είναι περίπου 22 ώρες [Bergen, 2009; Phenytoin prescribing information; Phenytoin, FDA, 2011]. Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις της φαινυτοΐνης κυμαίνονται από 10 έως 20 $\mu\text{g/mL}$, ενώ συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20 $\mu\text{g/mL}$ θεωρούνται τοξικές [http://www.globalrph.com/labs_drug_levels.htm; Hiemke και συν., 2011; Phenytoin, FDA, 2011]. Η φαινυτοΐνη διαπερνά τον πλακούντα και απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα κατά ένα μικρό ποσοστό [Martindale, 2007].

Φαρμακολογικά δραστικό είναι μόνον το κλάσμα της φαινυτοΐνης που είναι «ελεύθερο», δηλαδή δεν έχει συνδεθεί με πρωτεΐνες. Υπό κανονικές συνθήκες η ισορροπία μεταξύ της «ελεύθερης», και της δεσμευμένης φαινυτοΐνης παραμένει

σχετικά σταθερή, γι' αυτό και η μέτρηση της ολικής φαινυτοΐνης, που ισούται με το άθροισμα της «ελεύθερης» και της δεσμευμένης είναι επαρκής για τη ρύθμιση των επιπέδων της. Όμως σε μερικές ασθένειες, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται και το ποσοστό της δραστικής «ελεύθερης» φαινυτοΐνης αυξάνει και ο ασθενής παρουσιάζει τοξικές παρενέργειες ακόμη και αν η συγκέντρωση της ολικής φαινυτοΐνης βρίσκεται εντός των θεραπευτικών ορίων. Σε αυτή την περίπτωση ίσως κριθεί σκόπιμη η μέτρηση της «ελεύθερης» φαινυτοΐνης [<http://www.iator.gr/2010/11/20/fainitoini/>]. Όταν η συγκέντρωση του φαρμάκου βρίσκεται εντός των θεραπευτικών ορίων, συνήθως δεν παρουσιάζονται παρενέργειες, όμως η δράση και η τοξικότητα του φαρμάκου ποικίλει από άνθρωπο σε άνθρωπο. Κάποια άτομα των οποίων τα επίπεδα της φαινυτοΐνης είναι στα χαμηλότερα θεραπευτικά όρια μπορεί να εμφανίσουν επιληπτικά επεισόδια, ενώ αντίθετα κάποια άλλα που τα επίπεδά τους βρίσκονται στα υψηλότερα θεραπευτικά όρια ίσως εμφανίσουν ανεπιθύμητες ενέργειες. Εφόσον η συγκέντρωση της φαινυτοΐνης βρίσκεται εντός των θεραπευτικών ορίων και ο ασθενής δεν έχει επιληπτικά επεισόδια ή παρενέργειες από το φάρμακο, η λαμβανόμενη δόση θεωρείται επαρκής. Οι ασθενείς δε θα πρέπει να διακόπτουν ή να αυξομειώνουν το χορηγούμενο φάρμακο χωρίς να προηγηθεί επικοινωνία με το γιατρό τους, γιατί μπορεί να αυξηθούν οι πιθανότητες ενός επιληπτικού επεισοδίου ή να επηρεαστεί η δράση άλλων φαρμάκων που λαμβάνουν. Η ρύθμιση της δόσης είναι εξατομικευμένη και αφορά κάθε άτομο ξεχωριστά. Ο καθορισμός της δοσολογίας που οδηγεί σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις και βέλτιστο φαρμακολογικό αποτέλεσμα προκύπτει μετά από στενή συνεργασία γιατρού και ασθενούς [<http://www.iator.gr/2010/11/20/fainitoini/>; [file:///C:/Users/user/Downloads/Applied_Clinical_Pharmacokinetics_-_2nd_ed-_Phenytoin%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/Applied_Clinical_Pharmacokinetics_-_2nd_ed-_Phenytoin%20(1).pdf)].

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν στον ασθενή λόγω λήψης της φαινυτοΐνης είναι κυρίως δοσοεξαρτώμενες και περιλαμβάνουν: αταξία, διπλωπία, νυσταγμός, δυσαρθρία, τρόμος, κεφαλαλγία, ζάλη, σύγχυση και αϋπνία. Το άτομο μπορεί να εμφανίσει ναυτία, έμετους, διάρροια ή δυσκοιλιότητα, χαρακτηριστική υπερτροφία ούλων ιδίως στα παιδιά (αναστρέψιμη), υπερτρίχωση (που τείνει να παραμείνει και μετά τη διακοπή), υπερασβεστιαμία, έλλειψη φυλλικού οξέος, μεγαλοβλαστική αναιμία, ανεπάρκεια βιταμίνης D, που μπορεί να προκαλέσει και οστεομαλάκυνση, περιφερική νευροπάθεια (αδυναμία ή μούδιασμα των άκρων), ακμή και οίδημα του προσώπου. Έχουν επίσης παρατηρηθεί ιδιοσυγκρασιακές

αντιδράσεις, όπως ερυθματώδη εξανθήματα μία έως δύο εβδομάδες μετά από την έναρξη της θεραπείας, σπανιότερα αποφολιδωτική δερματίτιδα ή πολύμορφο ερύθημα, μερικές φορές συνοδευόμενα από λεμφαδενοπάθεια, πυρετό και ηωσινοφιλία. Σε περιπτώσεις μυελοτοξικότητας, όπως εμφάνιση λευκοπενίας, ακοκκιοκυτταραιμίας και θρομβοπενίας, που είναι σοβαρές ή συνοδεύονται από συμπτώματα συνιστάται διακοπή του φαρμάκου. Έχουν αναφερθεί σπάνιες περιπτώσεις ηπατίτιδας, θυρεοειδίτιδας και οξείας υπεργλυκαιμίας, και ακόμα σπανιότερα λεμφαδενοπάθεια με ιστολογική εικόνα παρόμοια με κακήθες λέμφωμα [Iivanainen και Savolainen, 1983; Pillai και συν., 2005; Phenytoin, FDA, 2011; file:///C:/Users/user/Downloads/Applied_Clinical_Pharmacokinetics_-_2nd_ed-_Phenytoin%20(1).pdf].

Διάφορα φάρμακα ή συμπληρώματα που χορηγούνται χωρίς ιατρική συνταγή μπορεί να προκαλέσουν μεταβολή της δράσης και των επιπέδων της φαινυτοΐνης στο αίμα, γι αυτό οι ασθενείς πρέπει να ενημερώνουν το θεράποντα ιατρό σχετικά με τις ουσίες που λαμβάνουν. Αύξηση των επιπέδων και της δράσης της φαινυτοΐνης μπορούν να προκαλέσουν φάρμακα όπως φαινοβαρβιτάλη, χλωροδιαζεποξείδη, διαζεπάμη, δισουλφιδάμη, ισονιαζίδη, χλωραμφαινικόλη, οιστρογόνα, κουμαρινικά αντιπηκτικά (βαρφαρίνη), ομεπραζόλη, σιμετιδίνη, σουλφοναμίδες (τριμεθοπρίμη), φαινυλοβουταζόνη, τικλοπιδίνη, σαλικυλικά, τολβουταμίδη και βαλπροϊκό οξύ [Lockard και συν., 1976; Patsalos, 2013]. Το οινόπνευμα επίσης μπορεί να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων της φαινυτοΐνης. Η καρβαμαζεπίνη μπορεί είτε να αυξήσει είτε να μειώσει τα επίπεδα της φαινυτοΐνης. Η φαινυτοΐνη ελαττώνει τη δράση των κορτικοστεροειδών, της δακτυλίτιδας, της δοξυκυλίνης και των αντισυλληπτικών από του στόματος, ενώ αυξάνει τη δράση των θυρεοειδικών ορμονών και των κουμαρινικών αντιπηκτικών. Μείωση των επιπέδων της φαινυτοΐνης μπορεί να προκαλέσουν τα αντιόξινα, όταν λαμβάνονται ταυτόχρονα με τη φαινυτοΐνη, το φυλλικό οξύ, η ριφαμίνη και η μεθοτρεξάτη. Συγκεκριμένα, η φαινυτοΐνη αλληλεπιδρά με το φυλλικό οξύ ελαττώνοντας τη δράση του με κίνδυνο πρόκλησης μεγαλοβλαστικής αναιμίας, αλλά και το φυλλικό οξύ μειώνει τη δράση του φαρμάκου. Η φαινυτοΐνη επίσης αυξάνει την τοξικότητα της μεθοτρεξάτης [Zielinski και συν., 1985; Abajo, 1988; Brodie, 1992; Johannessen και Landmark, 2010; Φαινυτοΐνη, Γαληνός; <http://www.iator.gr/2010/11/20/fainitoini/>; Phenytoin, FDA, 2011].

Η ενδοφλέβια χορήγηση της φαινυτοΐνης πρέπει να γίνεται πάρα πολύ αργά για την αποφυγή διαταραχών του καρδιακού ρυθμού ή και collapses [Thimmisetty και συν., 2014]. Η φαινυτοΐνη δε διαλύεται σε κοινούς διαλύτες και καθιζάνει, οπότε δεν πρέπει να προστίθεται σε διαλύματα που προορίζονται για ενδοφλέβια έγχυση. Η θεραπεία δεν πρέπει να διακόπτεται κατά τη διάρκεια της κύησης, παρά τις αυξημένες πιθανότητες βλάβης του εμβρύου, επειδή η επιληπτική κατάσταση είναι σαφώς πιο επικίνδυνη και βλαπτική, και πρέπει να χορηγείται επίσης και βιταμίνη Κ για την πρόληψη διαταραχών πηκτικότητας στο νεογνό. Σε ασθενείς με νεφρική ή ηπατική ανεπάρκεια, καθώς και με λιποείδωση τύπου Vogt-Spielmeyer χορηγείται μικρότερη δόση του φαρμάκου λόγω μειωμένης ανοχής στο φάρμακο. Τα φαρμακευτικά προϊόντα φαινυτοΐνης εμφανίζουν διαφορές ως προς τη βιοδιαθεσιμότητα, οπότε σε περίπτωση αλλαγής τους απαιτείται προσοχή γιατί μπορούν να μεταβληθούν σημαντικά τα επίπεδά της στο αίμα [Φαινυτοΐνη, Γαληνός; Phenytoin, FDA, 2011].

Σε περιπτώσεις που ο ασθενής λαμβάνει και άλλα φάρμακα, όπως ασπιρίνη, ναπροξένη ή ιβουπροφαίνη, καθώς και όταν πάσχει από νεφρική ή ηπατική ανεπάρκεια και υποαλβουμιναιμία, μπορεί να αυξηθεί η «ελεύθερη» φαινυτοΐνη, οπότε πρέπει να γίνει μέτρηση όχι της ολικής αλλά της «ελεύθερης» φαινυτοΐνης [Bachmann και συν., 1986; <http://www.iator.gr/2010/11/20/fainitoini/>].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΕΠΙΛΗΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

3.1. Αναγκαιότητα ποσοτικού προσδιορισμού των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο πλαίσιο της Κλινικής και Δικαστικής Τοξικολογίας

Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως στην καθημερινή κλινική πράξη, για την αντιμετώπιση διαφόρων κλινικών καταστάσεων, όπως επιληψία, ψυχιατρικά νοσήματα, επώδυνες νόσοι κτλ. Τα συχνά προβλήματα όμως που δημιουργεί η ευρεία χρήση τους, καθιστούν αναγκαία την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους σε βιολογικά υγρά ατόμων υπό αντιεπιληπτική αγωγή κατά τη διερεύνηση περιστατικών Κλινικής και Δικαστικής Τοξικολογίας [Patsalos, 2003; Patsalos και συν., 2008].

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της AGNP (Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie) που ισχύουν διεθνώς, οι συστάσεις για την παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων φαρμάκων κατατάσσονται σε τέσσερα επίπεδα και με βάση αυτά τα φάρμακα κατατάσσονται σε: «αυστηρώς συνιστώμενα» (strongly recommended), «συνιστώμενα» (recommended), «χρήσιμα» (useful) και «πιθανώς χρήσιμα» (potentially useful). Από τα υπό μελέτη αντιεπιληπτικά φάρμακα, η φαινοβαρβιτάλη και η φαινοτοΐνη κατατάσσονται στα «αυστηρώς συνιστώμενα», η αιθοσουξιμίδη, το βαλπροϊκό οξύ, η καρβαμαζεπίνη, η λαμοτριγίνη, η λεβετιρακετάμη, η οξυκαρβαζεπίνη και η τιαγκαμπίνη στα «συνιστώμενα», ενώ η γκαμπαπεντίνη, η πρεγκαμπαλίνη και η τοπιραμάτη στα «χρήσιμα» και μόνο η βιγκαπατρίνη στα «πιθανώς χρήσιμα» [Hiemke και συν., 2011].

Στο πλαίσιο της Κλινικής Τοξικολογίας, τέτοιου είδους προσδιορισμοί διενεργούνται συχνά για την παρακολούθηση των επιπέδων των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο αίμα/ορό/πλάσμα, με στόχο την εξατομίκευση του δοσολογικού σχήματος του ασθενή, διότι η συγκέντρωση του αντιεπιληπτικού φαρμάκου στο αίμα και όχι η δόση προσδιορίζει καλύτερα την ανταπόκριση στη θεραπεία. Η ιδιαιτερότητα του κάθε ασθενή καθιστά πολλές φορές αναγκαία την παρακολούθηση των επιπέδων των αντιεπιληπτικών φαρμάκων, είτε για τον έλεγχο της ανταπόκρισης στη θεραπεία, είτε για την πρόληψη εκδήλωσης τυχόν δοσοεξαρτώμενων

ανεπιθύμητων ενεργειών ή τοξικότητας. Η ταυτόχρονη κλινική αξιολόγηση των ασθενών είναι απαραίτητη προκειμένου οι θεράποντες ιατροί να επανακαθορίσουν το δοσολογικό σχήμα και να επιτευχθεί το βέλτιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα [Patsalos, 2003; Pucci και συν., 2004; Zufia και συν., 2009; Zufia και συν., 2010; Kim και συν., 2012; Rani και Malik, 2012]. Έτσι, ο ποσοτικός προσδιορισμός των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο αίμα ασθενών υπό αντίστοιχη αγωγή κρίνεται συχνά απαραίτητος σε περιπτώσεις:

- ασθενών που δεν ανταποκρίνονται σε συνήθεις θεραπευτικές δόσεις των αντιεπιληπτικών φαρμάκων και συνεχίζουν να εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις,
- ασθενών που εμφανίζουν τοξικές εκδηλώσεις κατά την έναρξη ή τη διάρκεια της αντιεπιληπτικής θεραπείας,
- ασθενών που λαμβάνουν πολυφαρμακευτική αγωγή και τα υπόλοιπα φάρμακα (αντιεπιληπτικά ή μη) μπορούν να επηρεάσουν τη βιομετατροπή των αντιεπιληπτικών φαρμάκων με τελικό αποτέλεσμα τον επηρεασμό των επιπέδων τους,
- ασθενών που παρουσιάζουν μειωμένη ηπατική ή νεφρική λειτουργία,
- ασθενών που βρίσκονται σε ειδικές καταστάσεις, όπως κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης,
- ασθενών για τους οποίους υπάρχει η υπόνοια μη σωστής λήψης της αντιεπιληπτικής αγωγής και απαιτείται ο έλεγχος συμμόρφωσής τους,
- αντιεπιληπτικών φαρμάκων που δεν ακολουθούν γραμμική κινητική ως προς τη βιομετατροπή τους αλλά κινητική κορεσμού, οπότε μικρή αλλαγή στη δόση πιθανόν να οδηγήσει σε τοξικές συγκεντρώσεις, καθώς και
- αντιεπιληπτικών φαρμάκων με μικρό θεραπευτικό εύρος [Johannessen και συν., 2003; Shader και Greenblatt, 2003; Patsalos, 2003; Patsalos και συν., 2008; Johannessen και Landmark, 2010].

Επιπλέον, η εκτεταμένη χρήση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων έχει ως αποτέλεσμα την αναγκαιότητα της ταυτοποίησης και του ποσοτικού προσδιορισμού τους κατά την τοξικολογική ανάλυση στο πλαίσιο της διερεύνησης δικαστικών υποθέσεων, όπως τροχαία και άλλα ατυχήματα (π.χ. πτώση εξ' ύψους, πνιγμός εντός ύδατος, ιατρικό λάθος, τυχαία λήψη κτλ.), περιστατικά αυτοκτονίας ή εγκληματικής

ενέργειας, καθώς και περιστατικά αιφνίδιων θανάτων που σχετίζονται με άτομα που λάμβαναν αντιεπιληπτικά φάρμακα.

Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα, όπως αναγράφεται και στο φύλλο οδηγιών χρήση τους, είναι δυνατόν να μειώσουν τα αντανακλαστικά του ατόμου και να επηρεάσουν την ικανότητα οδήγησης του ατόμου. Επομένως, σε τροχαία ατυχήματα και ατυχήματα ή θανάτους που μπορεί να οφείλονται σε μειωμένα αντανακλαστικά, είναι επιβεβλημένος ο έλεγχος της παρουσίας αντιεπιληπτικών φαρμάκων κατά την τοξικολογική ανάλυση των βιολογικών υλικών. Επίσης, ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανιχνευθέντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων μπορεί να δώσει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τις συνθήκες ενός ατυχήματος. Έτσι, εάν η συγκέντρωση του αντιεπιληπτικού φαρμάκου βρεθεί χαμηλότερη των θεραπευτικών, το άτομο μπορεί να εμφάνισε κάποια επιληπτική κρίση πριν το ατύχημα που πιθανώς να συντέλεσε στην πρόκληση του ατυχήματος.

Σε περίπτωση απόπειρας αυτοκτονίας με λήψη κάποιου αντιεπιληπτικού φαρμάκου, προσδιορίζεται ποιοτικά και ποσοτικά το φάρμακο. Επιπλέον είναι χρήσιμο να προσδιοριστούν και άλλες ουσίες ή φάρμακα, κυρίως με κατασταλτική δράση, που πιθανά έχουν ληφθεί ταυτόχρονα, όπως οινόπνευμα, βαρβιτουρικά, βενζοδιαζεπινικά παράγωγα που μπορεί να παρουσιάζουν δυναμική συνέργεια με το προσδιοριζόμενο αντιεπιληπτικό φάρμακο, η οποία μπορεί να αποβεί ακόμα και μοιραία για το άτομο.

Έτσι, η ευρεία διάδοση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων και η εκτεταμένη καθημερινή τους χρήση στην κλινική πράξη κατέστησε απαραίτητη την ανάπτυξη και εφαρμογή διάφορων μεθοδολογιών, χρωματογραφικών ή μη, για τον προσδιορισμό τους σε διάφορα βιολογικά υλικά με σκοπό την πληρέστερη διερεύνηση περιστατικών Κλινικού ή Δικαστικού ενδιαφέροντος. Οι χρωματογραφικές αυτές μέθοδοι περιλαμβάνουν τις αναλυτικές τεχνικές της αέριας ή της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με διάφορους τύπους ανιχνευτών [Πίνακες 3.1. και 3.2.]. Οι μη χρωματογραφικές μέθοδοι που έχουν δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό ορισμένων αντιεπιληπτικών φαρμάκων είναι κυρίως ανοσοχημικές [Heim και συν., 1979; Walker και Hill, 1983; Stewart και Bottorff, 1986; Colbert, 1992; Meatherall και Krahn, 1995; Su και συν., 2000; Roberts και συν., 2001; Frank και συν., 2002; Parant και συν., 2003; Datta και συν., 2005; Dasgupta και Datta, 2005; Wilimowska και συν., 2005; Tutor-Crespo και συν., 2007; Yang και συν., 2007; Westley και Morris, 2008; Chung και συν., 2010;

Dasgupta και συν., 2010; Calisto και συν., 2011; Juenke και συν., 2011; Reineks και συν., 2011; Dalaklioglu, 2013; Dasgupta και συν., 2013; Huang και συν., 2014].

3.2. Μη χρωματογραφικές μέθοδοι προσδιορισμού αντεπιληπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται μια σειρά από μη χρωματογραφικές μεθόδους για τον προσδιορισμό αντεπιληπτικών φαρμάκων σε ούρα, αίμα, ορό ή πλάσμα. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως για κλινικούς σκοπούς για την παρακολούθηση των επιπέδων των αντεπιληπτικών φαρμάκων (TDM) ή σε φαρμακοκινητικές μελέτες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τέτοιες μέθοδοι χρησιμοποιούνται και στο πλαίσιο επείγουσών τοξικολογικών εξετάσεων που διενεργούνται κατά τη διερεύνηση περιστατικών Κλινικής και Δικαστικής Τοξικολογίας. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται για τον προκαταρκτικό έλεγχο αγνώστων δειγμάτων, αποτελούν μόνο ένδειξη και όχι απόδειξη της παρουσίας σ' αυτά αντεπιληπτικών φαρμάκων.

Η κύρια κατηγορία των μη χρωματογραφικών μεθόδων προσδιορισμού των αντεπιληπτικών φαρμάκων είναι ανοσοχημικές μέθοδοι που περιλαμβάνουν:

1. ενζυμικούς ανοσοπροσδιορισμούς (EIA, π.χ. EMIT), [Colbert, 1992; Meatherall και Krahm, 1995; Roberts και συν., 2001; Frank και συν., 2002; Parant και συν., 2003; Tutor-Crespo και συν., 2007; Westley και Morris, 2008; Chung και συν., 2010; Dasgupta και συν., 2010; Juenke και συν., 2011; Reineks και συν., 2011],
2. ενζυμικούς ανοσοπροσροφητικούς προσδιορισμούς (ELISA) [Su και συν., 2000; Calisto και συν., 2011],
3. ανοσοπροσδιορισμούς πολωμένου φθορισμού (FPIA) [Walker και Hill, 1983; Stewart και Bottorff, 1986; Datta και συν., 2005; Dasgupta και Datta, 2005; Wilimowska και συν., 2005; Dasgupta και συν., 2013; Huang και συν., 2014],
4. ανοσοαντιδράσεις δότη κλωνοποιημένου ενζύμου (CEDIA) [Yang και συν., 2007; Dalaklioglu, 2013]
5. ραδιοανοσοχημικούς προσδιορισμούς (RIA) [Heim και συν., 1979].

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι πλεονεκτούν ως προς το μικρό χρόνο ανάλυσης που απαιτείται για την εφαρμογή τους, όμως μειονεκτούν καθώς παρουσιάζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλες ουσίες, με αποτέλεσμα να έχουν παρατηρηθεί

ψευδώς θετικά αποτελέσματα για την παρουσία αντιεπιληπτικών φαρμάκων [Dasgupta και Wahed, 2014]. Επίσης, οι μέθοδοι αυτές έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν τόσο αντιεπιληπτικά φάρμακα όσο και ορισμένους μεταβολίτες τους, οπότε η ευαισθησία τους δεν εξαρτάται μόνο από τη διασταυρούμενη δραστηριότητα των αντισωμάτων με τα αντιεπιληπτικά φάρμακα, αλλά και με τους μεταβολίτες τους που συνυπάρχουν στο βιολογικό υλικό. Έτσι, το αποτέλεσμα που λαμβάνεται αντιπροσωπεύει όχι μόνο τη μητρική ουσία, αλλά το άθροισμα αυτής και των μεταβολιτών της, δυσχεραίνοντας έτσι την κλινική ερμηνεία του αποτελέσματος [Datta και συν., 2005; Dasgupta και Datta, 2005; Dasgupta και Wahed, 2014].

Τα περισσότερα kit για τον προκαταρκτικό έλεγχο αντιεπιληπτικών φαρμάκων είναι κατάλληλα για δείγματα πλάσματος ή ορού [Frank και συν., 2002; Parant και συν., 2003; Tutor-Crespo, 2007; Yang και συν., 2007; Westley και Morris, 2011; Dasgupta και συν., 2010; Juenke και συν., 2011; Reineks και συν., 2011; Dasgupta και συν., 2013; Huang και συν., 2014]. Ο προκαταρκτικός έλεγχος για την παρουσία αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα απαιτεί προηγουμένως μια υγρό-υγρό εκχύλιση του αίματος με κάποιο οργανικό διαλύτη [Wilimowska και συν., 2005; Dalaklioglu και συν., 2013].

3.3. Τεχνικές Προκατεργασίας Δείγματος

Τα βιολογικά υλικά που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων είναι το ολικό αίμα [Speed και συν., 2000; Levine και συν., 2004; Levine και συν., 2010; Liu και συν., 2011; Middleton και συν., 2011; Sorensen, 2011; Dahl και συν., 2012], οι κηλίδες αίματος [Kolokouri και συν., 2010; Luo και συν., 2013; Ikeda και συν., 2014], ο ορός [Vermeij και συν., 1994; Wolf και συν., 1994; Fraser και συν., 1995; Lensmeyer και συν., 1997; Watelle και συν., 1997; Hallbach και συν., 1997; Van Lente και Gatautis, 1998; Jiang και Li, 1999; Kushnir και συν., 1999; Chollet και συν., 2000; Torra και συν., 2000; Croci και συν., 2001; Vermeij και Edelbroek, 2004; Berry και Millington, 2005; Borrey και συν., 2005; Gambelunghe και συν., 2005; Bahrami και Kiani, 2006; Bahrami και Mohammadi, 2006; Guo και συν., 2007; Vermeij και Edelbroek, 2007; Brunetto και συν., 2009; Oertel και συν., 2009; Amini και συν., 2010; Greenaway και συν., 2010; Mendu και Soldin, 2010; Greenaway και συν., 2011; Sattler και συν., 2011; Tai και συν., 2011; Lionetto και συν., 2012; Martinez και συν., 2012], το πλάσμα [Horning

και συν., 1977; Schramm και συν., 1993; Forssblad και συν., 1996; Watelle και συν., 1997; Kamal και συν., 1999; Kushnir και συν., 1999; Matar και συν., 1999; Barbosa και Midio, 2000; Isoherranen και συν., 2000; Castel-Branco και συν., 2001; Croci και συν., 2001; Erturk και συν., 2001; Ifa και συν., 2001; Queiroz και συν., 2002; Sghendo και συν., 2002; Zhu και Neirinck, 2002; Juenke και συν., 2003; Krivanek και συν., 2003; Cetin και Atmaca, 2004; Pucci και συν., 2004; Berry και Millington, 2005; Cotin και συν., 2005; Martens-Lobenhoffer και Bode-Boger, 2005; Chung και συν., 2006; Jain και συν., 2006; Ji και συν., 2006; Ramakrishna και συν., 2006; Sagirli και συν., 2006; Franco και συν., 2007; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Guo και συν., 2007; Jalalizadeh και συν., 2007; Lehner και συν., 2007; Park και συν., 2007; Matar, 2008; Subramanian και συν., 2008; Nirogi και συν., 2009; Wattananat και Akarawut, 2009; Zufia και συν., 2009; Bhatt και συν., 2010; Bronk και συν., 2010; El-Enany και συν., 2010; Mendu και Soldin, 2010; Mercolini και συν., 2010; Zufia και συν., 2010; Antonilli και συν., 2011; Hotha και συν., 2012; Juenke και συν., 2011; Kestelyn και συν., 2011; Kim και συν., 2011; Colins και Janis, 2012, Kim και συν., 2012; Rani και Malik, 2012; Shah και συν., 2012; Shibata και συν., 2012; Yagi και συν., 2012; Kostic και συν., 2013], τα ούρα [Isoherranen και συν., 2000; Erturk και συν., 2001; Sghendo και συν., 2002; Cetin και Atmaca, 2004; Sagirli και συν., 2006; Helstley και συν., 2011; Dahl και συν., 2012; Mudiam και συν., 2012; Rani και Malik, 2012; Yagi και συν., 2012], το σάλιο ή στοματικό υγρό [Horning και συν., 1977; Guo και συν., 2007; Pujadas και συν., 2007; Greenaway και συν., 2011], το μητρικό γάλα [Kristensen και συν., 2006], και σπανιότερα το ήπαρ ή άλλοι ιστοί [Speed και συν., 2000; Castel-Branco και συν., 2001; Levine και συν., 2004; Zhang και συν., 2008; Levine και συν., 2010].

Τα ούρα είναι το βιολογικό υλικό που προτιμάται για την ανίχνευση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε μία τοξικολογική ανάλυση, λόγω της εύκολης δειγματοληψίας και κατεργασίας του συγκεκριμένου βιολογικού υλικού, λόγω έλλειψης πρωτεϊνών. Κάθε φάρμακο βρίσκεται συνήθως σε υψηλότερη συγκέντρωση στα ούρα από ό,τι στο αίμα ή στα άλλα βιολογικά υλικά, καθώς επίσης στα ούρα ανιχνεύονται και οι μεταβολίτες. Παρόλα αυτά, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των αντιεπιληπτικών φαρμάκων διενεργείται συνήθως στο ολικό αίμα, στο πλάσμα ή στον ορό, επειδή η συγκέντρωση της ουσίας στο αίμα σχετίζεται άμεσα με την κλινική εικόνα του ασθενή.

Πριν την εφαρμογή χρωματογραφικών μεθόδων ανάλυσης, απαιτείται η απομόνωση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων από τα συστατικά του βιολογικού υλικού. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως με:

1. υγρό-υγρό εκχύλιση (liquid-liquid extraction, LLE),
2. εκχύλιση στερεής φάσης (solid phase extraction, SPE).

Πολλές φορές η προκατεργασία του βιολογικού δείγματος περιλαμβάνει μόνο καταβύθιση των πρωτεϊνών [Hallbach και συν., 1997; Chollet και συν., 2000; Erturk και συν., 2001; Ifa και συν., 2001; Krivanek και συν., 2003; Cetin και Atmaca, 2004; Vermeij και Edelbroek, 2004; Berry και Millington, 2005; Borrey και συν., 2005; Contin και συν., 2005; Martens-Lobenhoffer και Bode-Boger, 2005; Bahrami και Mohammadi, 2006; Chung και συν., 2006; Ji και συν., 2006; Ramakrishna και συν., 2006; Franco και συν., 2007; Guo και συν., 2007; Jalalizadeh και συν., 2007; Park και συν., 2007; Oertel και συν., 2009; Wattananat και Akarawut, 2009; Blonk και συν., 2010; Mendu και Soldin, 2010; Antonilli και συν., 2011; Kestelyn και συν., 2011; Kim και συν., 2011; Liu και συν., 2011; Sattler και συν., 2011; Sorensen, 2011; Dahl και συν., 2012; Kim και συν., 2012; Lionetto και συν., 2012; Martinez και συν., 2012; Shibata και συν., 2012; Hakkinen και συν., 2014]. Η καταβύθιση των πρωτεϊνών γίνεται κυρίως με χρήση κάποιου οργανικού διαλύτη, όπως μεθανόλη [Erturk και συν., 2001; Cetin και Atmaca, 2004; Blonk και συν., 2010; Kestelyn και συν., 2011; Sorensen, 2011; Shibata και συν., 2012], ακετονιτρίλιο [Chollet και συν., 2000; Ifa και συν., 2001; Krivanek και συν., 2003; Berry και Millington, 2005; Borrey και συν., 2005; Contin και συν., 2005; Gambelunghe και συν., 2005; Martens-Lobenhoffer και Bode-Boger, 2005; Bahrami και Mohammadi, 2006; Chung και συν., 2006; Ji και συν., 2006; Ramakrishna και συν., 2006; Franco και συν., 2007; Guo και συν., 2007; Jalalizadeh και συν., 2007; Lehner και συν., 2007; Park και συν., 2007; Oertel και συν., 2009; Wattananat και Akarawut, 2009; Mendu και Soldin, 2010; Antonilli και συν., 2011; Kim και συν., 2011; Liu και συν., 2011; Kim και συν., 2012; Lionetto και συν., 2012; Martinez και συν., 2012] ή μίγμα ακετονιτριλίου και μεθανόλης [Sattler και συν., 2011; Dahl και συν., 2012], κάποιου οξέος όπως υπερχλωρικό [Jiang και Li, 1999; Greenaway και συν., 2011] ή τριχλωροξικό οξύ [Castel-Branco και συν., 2001; Hakkinen και συν., 2014] ή κάποιου ρυθμιστικού διαλύματος όπως βορικών [Vermeij και Edelbroek, 2004]. Ο σκοπός της καταβύθισης είναι η αποδέσμευση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων που συνδέονται με τις πρωτεΐνες, καθώς επίσης η απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το δείγμα. Η παρουσία πρωτεϊνών στο δείγμα

δυσχεραίνει τη χρωματογραφική ανάλυση και καταπονεί το χρωματογραφικό σύστημα. Μερικές φορές το στάδιο της καταβύθισης των πρωτεϊνών προηγείται της εκχύλισης, ως ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού του βιολογικού δείγματος κατά το οποίο απομακρύνονται ενδογενή συστατικά του [Castel-Branco και συν., 2001; Gambelunghe και συν., 2005; Lehner και συν., 2007]. Στην περίπτωση που ακολουθεί εκχύλιση στερεής φάσης, η διέλευση του δείγματος από την στήλη εκχύλισης διευκολύνεται σημαντικά [Gambelunghe και συν., 2005; Lehner και συν., 2007].

Οι μέθοδοι προσδιορισμού που περιλαμβάνουν εκχύλιση στερεής φάσης παρουσιάζουν ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με αυτές που εφαρμόζουν διαδικασίες υγρό-υγρό εκχύλισης, όσον αφορά την εκλεκτικότητα, την αναπαραγωγιμότητα, τον όγκο των χρησιμοποιούμενων διαλυτών, τη δυνατότητα αυτοματοποίησης και κυρίως την παραλαβή καθαρότερων δειγμάτων, με αποτέλεσμα λιγότερη επιβάρυνση των αναλυτικών οργάνων, χρωματογραφήματα με λιγότερο θόρυβο υποστρώματος και καλύτερα διαχωρισμένες κορυφές.

Μετά το στάδιο της εκχύλισης και της απομόνωσης των αντιεπιληπτικών φαρμάκων ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη εκχύλισης ή έκλουσης και παραλαβή των ουσιών με κάποιον άλλον συνήθως διαλύτη. Ο διαλύτης τελικής παραλαβής και έγχυσης στο όργανο ανάλυσης επιλέγεται με βάση τη διαλυτότητα των υπό εξέταση ουσιών σ' αυτόν και ποικίλει ανάλογα με την αναλυτική μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ουσίας.

Σε λίγες περιπτώσεις δεν απαιτείται προηγούμενη διαδικασία απομόνωσης, αλλά πραγματοποιείται απ' ευθείας έγχυση του βιολογικού υγρού στο χρωματογραφικό σύστημα, όπως συμβαίνει σε ορισμένες μεθόδους HPLC, γεγονός που μειώνει πολύ το χρόνο ανάλυσης του δείγματος [Crocì και συν., 2001]. Η τεχνική αυτή όμως δεν μπορεί να εφαρμοστεί στην αναλυτική τεχνική της αέριας χρωματογραφίας.

3.3.1. Υγρό-υγρό εκχύλιση (liquid-liquid extraction, LLE)

Οι διαλύτες ή τα μίγματα διαλυτών που έχουν κυρίως χρησιμοποιηθεί σε δημοσιευμένες εργασίες για την υγρό-υγρό εκχύλιση για την απομόνωση των υπό μελέτη αντιεπιληπτικών φαρμάκων είναι οξικός αιθυλεστέρας [Fraser και συν., 1995; Forssblad και συν., 1996; Barbosa και Midio, 2000; Castel-Branco και συν., 2001; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Hotha και συν., 2012; Kostic και συν., 2013],

διαιθυλαιθέρας [Kamal και συν., 1999; Matar και συν., 1999; Sghendo και συν., 2002], διχλωρομεθάνιο [Greiner-Sosanko και συν., 2007], χλωροφόρμιο [Levine και συν., 2004; Levine και συν., 2010] και οξικός βουτυλεστέρας [Wатель και συν., 1997]. Τα ποσοστά απόλυτης ανάκτησης των δημοσιευμένων μεθόδων αέριας ή υγρής χρωματογραφίας που περιλαμβάνουν υγρό-υγρό εκχύλιση καθώς και η συνοπτική περιγραφή τους παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.1 και 3.2.

Οι εκχυλίσεις για τα αντιεπιληπτικά φάρμακα με αλκαλικές ιδιότητες (αλκαλικά αντιεπιληπτικά) συνήθως πραγματοποιούνται σε αλκαλικό περιβάλλον (pH 9-11) με τη χρήση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος ή αλκαλοποίηση του δείγματος με προσθήκη σταγόνων ισχυρής βάσης. Οι τιμές των ανακτήσεων των αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων με τους διάφορους διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί κυμαίνονται από 71 έως 106%. Οι εκχυλίσεις για τα αντιεπιληπτικά φάρμακα με τις όξινες ή επαμφοτερίζουσες ιδιότητες (όξινα ή επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά) συνήθως πραγματοποιούνται σε όξινο ή ουδέτερο περιβάλλον (pH 4-7) με τη χρήση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος ή οξίνιση του δείγματος με προσθήκη σταγόνων ισχυρού οξέος. Οι τιμές των ανακτήσεων των όξινων ή επαμφοτερίζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων με τους διάφορους διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί κυμαίνονται από 70 έως 90% [Πίνακας 3.1, Πίνακας 3.2].

3.3.2. Εκχύλιση στερεής φάσης (solid phase extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεής φάσης περιλαμβάνει τη χρήση στηλών διάφορων τύπων ανάλογα με τη χημική συμπεριφορά των προσδιοριζόμενων αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Στήλες εκχύλισης μη πολικές [Vermeij και Edelbroek, 1994; Lensmeyer και συν., 1997; Isoherranen και συν., 2000; Torra και συν., 2000; Pucci και συν., 2004; Jain και συν., 2006; Greiner και Haen και συν., 2007; Vermeij και Edelbroek, 2007; Matar, 2008; Subramanian και συν., 2008; Brunetto και συν., 2009; Zufia και συν., 2009; Bhatt και συν., 2010; Zufia και συν., 2010; Tai και συν., 2011] ή μικτής φάσης (μη πολικές και ισχυρής ιοντικής δράσης) [Speed και συν., 2000] είναι αυτές που κυρίως χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων με αλκαλικές ιδιότητες από τα συστατικά των βιολογικών υλικών. Στην περίπτωση που πρόκειται για αντιεπιληπτικά φάρμακα με όξινες ή επαμφοτερίζουσες ιδιότητες χρησιμοποιούνται συνήθως στήλες εκχύλισης μη πολικές [Wolf και συν., 1996; Kushnir και συν., 1999; Zhu και Neirinck, 2002; Gambelunghe και συν., 2005; Sagirli

και συν., 2006] ή μικτής φάσης (μη πολικές και ισχυρής ιοντικής δράσης) [Van Lente και Gatautis, 1998; Pujadas και συν., 2007; Yu και συν., 2012; Mercolini και συν., 2010]. Οι στήλες εκχύλισης στερεής φάσης πριν την εφαρμογή του βιολογικού δείγματος χρειάζονται ενεργοποίηση, που γίνεται συνήθως, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με διαδοχική εφαρμογή μεθανόλης και νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος (ίδιο με αυτό που έχει χρησιμοποιηθεί για την αραίωση του βιολογικού δείγματος). Στη συνέχεια αφού εφαρμοστεί το βιολογικό δείγμα στη στήλη, πραγματοποιείται μια διαδικασία καθαρισμού με διαδοχικές πλύσεις με νερό ή/και ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλου pH. Έτσι, χρησιμοποιούνται όξινα ρυθμιστικά διαλύματα (π.χ. ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 4) ή αραιό διάλυμα οξέος (π.χ. οξικό ή υδροχλωρικό οξύ) για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα. Για τα όξινα ή επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά χρησιμοποιούνται αλκαλικά ρυθμιστικά διαλύματα (π.χ. ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 9) ή αραιό διάλυμα βάσεως. Οι πλύσεις ολοκληρώνονται με τη χρήση ενός πολικού οργανικού διαλύτη, συνήθως μεθανόλης. Τέλος, πραγματοποιείται έκλουση των προσδιοριζόμενων ουσιών συνήθως με μίγμα διαλυτών. Συνοπτικά στοιχεία ενδεικτικών εκχυλίσεων στερεής φάσης που έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση των υπό μελέτη αντιεπιληπτικών φαρμάκων από βιολογικά υλικά παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.1 και 3.2. Οι τιμές των ανακτήσεων των αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων με τους διάφορους διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί κυμαίνονται από 60 έως 158%. Οι τιμές των ανακτήσεων των όξινων ή επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών με τους διάφορους διαλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί κυμαίνονται από 42 έως 102%.

3.4. Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές για τον Προσδιορισμό Αντιεπιληπτικών Φαρμάκων σε Βιολογικά Υλικά

Ένα πλήθος μεθόδων προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε διάφορα βιολογικά υλικά έχουν δημοσιευθεί. Οι δύο σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές που κυρίως χρησιμοποιούνται είναι η αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC) σε συνδυασμό με φασματογραφία μαζών (mass spectrometry, MS) [Πίνακας 3.1.], καθώς και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high-performance liquid chromatography, HPLC) σε συνδυασμό με διάφορους τύπους ανιχνευτών, όπως ανιχνευτή υπεριώδους (UV), συστοιχίας διόδων (diode-array detector, DAD) και φασματογράφο μαζών (MS) ή συζευγμένο φασματογράφο μαζών (MS-MS) [Πίνακας

3.2.]. Ο συνδυασμός αέριας (GC) ή υγρής χρωματογραφίας (LC) με συζευγμένη φασματογραφία μαζών (MS-MS) αποτελεί σημαντική εναλλακτική λύση στα αναλυτικά προβλήματα των τοξικολογικών εργαστηρίων. Σε αυτή την περίπτωση, οι μέθοδοι διαθέτουν υψηλή ειδικότητα και χαμηλά όρια ανίχνευσης, όμως απαιτείται υψηλό κόστος για την αγορά και συντήρηση αυτών των οργάνων, με αποτέλεσμα τέτοιου είδους χρωματογραφικά συστήματα να μην είναι πάντα διαθέσιμα σε τοξικολογικά εργαστήρια ρουτίνας και να διατίθενται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς.

3.4.1. Αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με διάφορους ανιχνευτές

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά, κυρίως σε συνδυασμό με ανιχνευτή φασματογράφου μαζών (MS) [Horning και συν., 1977; Wolf και συν., 1996; Hallbach και συν., 1997; Van Lente και Gatautis, 1998; Kushnir και συν., 1999; Speed και συν., 2000; Sghendo και συν., 2002; Borrey και συν., 2005; Lehner και συν., 2007; Pujadas και συν., 2007; Mudiam και συν., 2012; Rani και Malik, 2012; Yu και συν., 2012; Ikeda και συν., 2014] ή συζευγμένο φασματογράφο μαζών (MS/MS) [Isoherranen και συν., 2000; Gambelunghe και συν., 2005], καθώς και με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD) [Vermeij και Edelbroek, 1994; Watele και συν., 1997; Levine και συν., 2004; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Levine και συν., 2010]. Συνοπτικά στοιχεία ενδεικτικών δημοσιευμένων χρωματογραφικών μεθόδων για τον προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

Οι μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματογράφο μαζών (GC-MS) είναι πολύ διαδεδομένες σε τοξικολογικά εργαστήρια. Οι χρησιμοποιούμενες τεχνικές ιοντισμού αποδίδουν ικανοποιητική θραυσματοποίηση των μορίων, η οποία σε συνδυασμό με το χρόνο ανάσχεσης, πληρούν τα απαιτούμενα ελάχιστα κριτήρια, που προτείνονται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2002/657/EK για την ταυτοποίηση μιας ουσίας, απαιτούνται 4 μονάδες ταυτοποίησης που συνήθως συμπληρώνονται από το χρόνο ανάσχεσης (1 μονάδα), το μητρικό ιόν της ουσίας (1 μονάδα) και το κάθε επιπλέον θραύσμα (1,5 μονάδα). Μέθοδοι GC-MS χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο για την ταυτοποίηση όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά. Στον Πίνακα 3.1. παρουσιάζονται στοιχεία ενδεικτικών μεθόδων που έχουν εφαρμοστεί με βάση την

αναλυτική τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματογράφο μαζών, για τον προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε διάφορα βιολογικά υλικά.

Στα συστήματα αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται γενικά τριχοειδείς στήλες. Το υλικό πλήρωσης της στήλης, που αποτελεί τη στατική φάση, μπορεί να είναι μη πολικό (π.χ. 100% διμεθυλοπολυσιλοξάνιο) [Wolf και συν., 1996; Queiroz και συν., 2002; Pujadas και συν., 2007] ή ασθενώς πολικό (π.χ. 5% φαινυλομεθυλοπολυσιλοξάνιο) [Van Lente και Gatautis, 1998; Kushnir και συν., 1999; Speed και συν., 2000; Borrey και συν., 2005; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Lehner και συν., 2007; Mudiam και συν., 2012; Yu και συν., 2012; Ikeda και συν., 2014]. Στις περισσότερες GC-MS μεθόδους εφαρμόζεται θερμοκρασιακό πρόγραμμα ενός ή περισσότερων σταδίων αύξησης της θερμοκρασίας της στήλης. Το κατάλληλο θερμοκρασιακό πρόγραμμα είναι απαραίτητο και ανάλογο της στήλης που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των υπό προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων από τα ενδογενή συστατικά του βιολογικού δείγματος που έχουν συνεκχυλιστεί.

Σε πολλές δημοσιευμένες μεθόδους με την αναλυτική τεχνική της αέριας χρωματογραφίας κατά την ανάλυση αντιεπιληπτικών φαρμάκων εφαρμόζεται ένα επιπλέον στάδιο, που γίνεται παραγωγοποίηση των μορίων. Το στάδιο αυτό εφαρμόζεται λόγω της χημικής δομής των αντιεπιληπτικών φαρμάκων που είναι ουσίες με πλευρικές λειτουργικές ομάδες. Οι λειτουργικές αυτές ομάδες καθορίζουν τη διέλευση και τον τρόπο έκλουσης των μορίων από τη χρωματογραφική στήλη. Λόγω αυτής της δομής τους, πολλά αντιεπιληπτικά φάρμακα εμφανίζουν μη οξείες και συμμετρικές χρωματογραφικές κορυφές, παρουσιάζοντας «ουρά» (tailing), κατά την έκλουσή τους από τη στήλη. Έτσι, προκύπτουν σημαντικά προβλήματα στο διαχωρισμό και στην ολοκλήρωση των κορυφών. Η παραγωγοποίηση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων αφορά τις λειτουργικές ομάδες του κάθε μορίου και αποσκοπεί στη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των υπό μελέτη ουσιών, αφού παράλληλα αυξάνεται η πτητικότητα και η θερμοανθεκτικότητά τους. Επιπλέον, με την αλλαγή του μορίου και την αύξηση του μοριακού του βάρους, η θραυσματοποίηση που πραγματοποιείται έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πιο χαρακτηριστικών θραυσμάτων με μεγαλύτερη ιοντική μάζα. Έτσι τελικά, το στάδιο της παραγωγοποίησης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας, της εκλεκτικότητας και της ειδικότητας της μεθόδου.

Τα κύρια αντιδραστήρια παραγωγοποίησης που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι:

- N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) [Gambelunghe και συν., 2005; Lehner και συν., 2007; Pujadas και συν., 2007; Ikeda και συν., 2014],
- N-methyl-N-tert-butyldimethylsilyl-trifluoroacetamide (MTBSTFA) με 1% tert-butyldimethylsilylchloride (TBDMSCl) [Wolf και συν., 1996; Kushnir και συν., 1999],
- Iodobutane [Speed και συν., 2000],
- Trimethylanilinium hydroxide (TMAH) [Levine και συν., 2004], και
- N-trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) [Borrey και συν., 2005].

Πίνακας 3.1. Ενδεικτικές μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε διάφορα βιολογικά υλικά.

Βιβλιογραφία	Αντιεπιληπτικά φάρμακα	Βιολογικό υλικό	Προκατεργασία δείγματος	Χρωματογραφική Στήλη	Ανιχνευτής	LOD/LOQ (μg/mL)	% Ανάκτηση	Δυναμικό εύρος (μg/mL)	Εσωτερικό πρότυπο
Horning και συν., 1977	Αιθοσουξιμίδη Πριμιδόνη Φαινυτοΐνη Φαινοβαρβιτάλη	Πλάσμα Σάλιο	LLE (οξικός αιθυλεστέρας) BSTFA	Gas Chrom Q 1% SE-30 column packed	MS	-/-	---	2,2-26,5 0,33-3,0	Φαινυτοΐνη-C13 Φαινοβαρβιτάλη-C13
Schramm και συν., 1993	Βγκαμπαπεντίνη	Πλάσμα	---	Chirasil-Val	Thermionic detector	-/1,0	---	1,0-200	---
Vermeij και Edelbroek, 1994	Λεβετιρακετάμη	Ορός	SPE (C18)	DB-FFAP megabore	NPD	0,29	97	0-30	α-μεθυλ-5,5,-δμεθυλ-2-οξο-1-πυρολιδίνη
Wolf και συν., 1996	Γκαμπαπεντίνη	Ορός	SPE (C18) MTBSTFA με 1% TBDMCS	HP-1 (100% methyl silicone megabore capillary)	MS	0,2/0,5	46-57	0,5-30,0	Ανάλογο γκαμπαπεντίνης (1-αμινομεθυλ-1-κυκλοεπτολ)οξικό οξύ
Wattle και συν., 1997	Λαμοτριγίνη	Ορός Πλάσμα	LLE (βουτυλικός αιθυλεστέρας)	HP-5 column	NPD	0,15	---	0,13-10,40	πρασζεπάμη
Hallbach και συν., 1997	Λαμοτριγίνη Καρβαμαζεπίνη Καρβαμαζεπίνη-εποξείδιο	Ορός	καταβύθιση πρωτεϊνών	HP-5 column	MS	---	---	---	---
Van Lente και Gatautis, 1998	Γκαμπαπεντίνη	ορός	SPE (Bond-Elut SCX)	HP 5% diphenylpolysiloxane-95% dimethylpolysiloxane	MS	0,05/-	101,6	έως 40	Ανάλογο γκαμπαπεντίνης (1-αμινομεθυλ-1-κυκλοεπτολ)οξικό οξύ
Kushnir και συν., 1999	Γκαμπαπεντίνη	Ορός Πλάσμα	SPE (C18) MTBSTFA με 1% TBDMCS	RTX-5MS column	MS	0,1/1,0	71-76	1-35	Ανάλογο γκαμπαπεντίνης
Isoherranen και συν., 2000	Λεβετιρακετάμη	Πλάσμα και ούρα σκύλου	SPE (C18)	Chiral cyclodextrin capillary	MS/MS (ion trap)	---	---	---	N-dimethylvalproyl glucinamide
Speed και	Αιθοσουξιμίδη	Αίμα	SPE (Bond Elut)	Fused-silica	MS	-/10	60	10-300	φαινυτοΐνη-d10

συν., 2000	Βαλπροϊκό οξύ Καρβαμαζεπίνη Πριμιδόνη Φαινυτοΐνη Φαινοβαρβιτόνη	Ήπαρ	Certify) Ιωδοβουτάνιο TMAH	capillary with cross-linked 5% phenyl- methylsiloxane		-5 -0,5 -0,5 -0,5 -0,5	42 158 49 66 91	5-800 0,5-60 0,5-80 0,5-60 0,5-240	βαλπροϊκό οξύ-d4 καρβαμαζεπίνη-d10 πριμιδόνη-d5 φαινοβαρβιτόνη-d5
Queiroz και συν., 2002	Λαμοτριγίνη Καρβαμαζεπίνη Πριμιδόνη Φαινυτοΐνη Φαινοβαρβιτάλη	Πλάσμα	SPME	DB-1 column	Thermionic detector	-0,20	---	0,20-10,0	Νιτροζεπάμη
Sghendo και συν., 2002	Αιθοσουλζιμίδη	Πλάσμα Ούρα	LLE (διαιθυλαιθέρας)	Chiral fused-silica capillary	MS	-2,5	95,3-100,4 93,8-103,6	10-250 5-300	α, α-διμεθυλ-β- μεθυλσουλκινιμίδιο
Levine και συν., 2004	Οξυκαρβαζεπίνη	Αίμα Ιστοί	Chem Elut CH ₃ Cl, TMAH		NPD	-2,5	---	2,5-40	Κυκλοπεντοβαρβιτάλη
Borrey και συν., 2005	Βηγκαμπατερίνη Γκαμπατεντίνη	Ορός	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN) TMSH	VF-5MS	MS	-2,0		5-80 5-30	Κυκλοβαρβιτάλη
Gambelunghe και συν., 2005	Γκαμπατεντίνη	Ορός	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN) SPE (C18) MSTFA	CP-SIL 8CB-MS	MS/MS	0,1/-	90	1-9	χωρίς
Greiner- Sosanko και συν., 2007	Λεβετιρακετάμη	πλάσμα	LLE (CH ₂ Cl ₂)	HP-5MS	NPD	0,5/1,5	---	2,5-45	Χλωραμφενικόλη
Lehner και συν., 2007	Γκαμπατεντίνη	Πλάσμα αλόγου	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN) SPE, MSTFA	Zerbon ZB-5MS	MS	0,0076/0,0 17	53-65	0,05-3,0	γ-αμινοβουτυρικό οξύ- d2
Pujadas και συν., 2007	Βαλπροϊκό οξύ Γκαμπατεντίνη	Στοιματικό υγρό	SPE (Bond Elut Certify) MSTFA	Methylsilicone capillary Ultra 1	MS	0,0062/0,0 189	<20	---	Μορφίνη-d3
Levine και συν., 2010	Λεβετιρακετάμη Υδροξυκαρβαζεπίνη Τοπιραμάτη	Αίμα Ιστοί	Chem Elut	DB-5 column	NPD	-2,0	---	2,0-20	Κυκλοπεντοβαρβιτάλη
Mudiam και	Πρεγκαμπαλίνη	Ούρα	SPME	Elite-5MS	MS	0,019/0,06	≥83	0,08-0,8	---

συν., 2012	Φαρμακευτικά σκευάσματα	capillary		3				
Rani και Malik, 2012	Καρβαμαζεπίνη Οξυκαρβαζεπίνη Φαινυτοΐνη	SPME	HP-5 column	MS	0,0020-0,0029 ng/mL /0,060-0,088 ng/mL	69,92-99,38	0,0001-0,5 ng/mL	---
Yu και συν., 2012	Νερό	SPE (Strata X) Pentafluorobenzyl ation	DB-5MS	MS	1/3 15/45 5/15 4/12	95 55 110 96	---	Βαλπροϊκό οξύ-C13 φαίνυτοΐνη-d10 φαίνοβαρβιτάλη-d5 γκαμπαπεντίνη-d4
Ikeda και συν., 2014	Κηλίδες αίματος	MSTFA	DB-5MS	MS	-/10,0 -/0,5	95-107 105-118	10-200 0,5-10	

3.4.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με διάφορους ανιχνευτές

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υλικά, σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους (UV) [Vermeij και Edelbroek, 1994; Fraser και συν., 1995; Forssblad και συν., 1996; Lensmeyer και συν., 1997; Kamal και συν., 1999; Matar και συν., 1999; Barbosa και Midio, 2000; Torra και συν., 2000; Croci και συν., 2001; Zhu και Neirinck, 2002; Juenke και συν., 2003; Cetin και Atmaca, 2004; Rao και συν., 2004; Berry και Millington, 2005; Contin και συν., 2005; Martens-Lobenhoffer και Bode-Boger, 2005; Emani και συν., 2006; Sagirli και συν., 2006; Ciavarella και συν., 2007; Franco και συν., 2007; Greiner και Haen, 2007; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Jalalizadeh και συν., 2007; Brunetto και συν., 2009; Amini και συν., 2010; Kestelyn και συν., 2011; Martinez και συν., 2012; Rani και Malik, 2012] φθορισμού (FLD) [Jiang και Li, 1999; Chollet και συν., 2000; Erturk και συν., 2001; Krivanek και συν., 2003; Vermeij και Edelbroek, 2004; Bahrami και Kiani, 2006; Bahrami και Mohammadi, 2006; Chung και συν., 2006; Ulu και Kel, 2011; Yagi και συν., 2012], συστοιχίας διόδων (DAD) [Pucci και συν., 2004; Kristensen και συν., 2006; Vermeij και Edelbroek, 2007; Zufia και συν., 2009; Greenaway και συν., 2010; Mercolini και συν., 2010; Zufia και συν., 2010; Antonilli και συν., 2011; Greenaway και συν., 2011] και φασματογράφου μαζών (MS) [Sattler και συν., 2011] ή συζευγμένο φασματογράφο μαζών (MS/MS) [Ifa και συν., 2001; Jain και συν., 2006; Ji και συν., 2006; Ramakrishna και συν., 2006; Guo και συν., 2007; Park και συν., 2007; Matar, 2008, Subramanian και συν., 2008; Zhang και συν., 2008; Nirogi και συν., 2009; Oertel και συν., 2009; Warrananat και Akarawut, 2009; Bhatt και συν., 2010; Blonk και συν., 2010; Kolokouri και συν., 2010; Mendu και Soldin, 2010; Antonilli και συν., 2011; Heltsley και συν., 2011; Hotha και συν., 2012; Juenke και συν., 2011; Kim και συν., 2011; Liu και συν., 2011; Middleton και συν., 2011; Sorensen και συν., 2011; Tai και συν., 2011; Collins και Jain, 2012; Dahl και συν., 2012; Kim και συν., 2012; Lionetto και συν., 2012; Shibata και συν., 2012; Kostic και συν., 2013; Luo και συν., 2013; Hakkinen και συν., 2014]. Συνοπτικά στοιχεία ορισμένων τέτοιων δημοσιευμένων μεθόδων για τον προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Οι ανιχνευτές UV, FLD και DAD χρησιμοποιούνταν κυρίως παλαιότερα, αλλά υστερούσαν κάποιες φορές ως προς την ευαισθησία που προσέφεραν. Επίσης, γενικά οι ανιχνευτές UV, FLD και DAD, μειονεκτούν ως προς την εκλεκτικότητα και την ειδικότητα που προσφέρουν. Παράλληλα, η προσδιοριζόμενη ουσία θα πρέπει να εκλύεται κατά προτίμηση σε μεγάλο σχετικά χρόνο, έτσι ώστε να μην υπάρχουν παρεμποδίσεις από τα συστατικά του βιολογικού υλικού που δεν απομακρύνθηκαν και εκλύονται συνήθως νωρίς, αυξάνοντας έτσι τον απαιτούμενο χρόνο ανάλυσης. Τα τελευταία χρόνια, η υγρή χρωματογραφία συνδέεται με ανιχνευτή MS [Sattler και συν., 2011] ή κυρίως με MS-MS [Ifa και συν., 2001; Jain και συν., 2006; Ji και συν., 2006; Ramakrishna και συν., 2006; Guo και συν., 2007; Park και συν., 2007; Matar, 2008, Subramanian και συν., 2008; Zhang και συν., 2008; Nirogi και συν., 2009; Oertel και συν., 2009; Warrananat και Akarawut, 2009; Bhatt και συν., 2010; Blonk και συν., 2010; Kolokouri και συν., 2010; Mendu και Soldin, 2010; Antonilli και συν., 2011; Heltsley και συν., 2011; Hotha και συν., 2012; Juenke και συν., 2011; Kim και συν., 2011; Liu και συν., 2011; Middleton και συν., 2011; Sorensen και συν., 2011; Tai και συν., 2011; Collins και Jain, 2012; Dahl και συν., 2012; Kim και συν., 2012; Lionetto και συν., 2012; Shibata και συν., 2012; Kostic και συν., 2013; Luo και συν., 2013; Hakkinen και συν., 2014]. Στην περίπτωση χρήσης ανιχνευτών MS (που δεν είναι ιδιαίτερα συχνή) η ταυτοποίηση των υπό προσδιορισμό ουσιών με βάση τις 4 απαιτούμενες μονάδες ταυτοποίησης, δεν είναι πάντοτε εφικτή. Έτσι, πολλές φορές η ταυτοποίηση πραγματοποιείται με βάση το μητρικό ιόν της κάθε ουσίας, λόγω της μη θραυσματοποίησης του μορίου σε συστήματα LC-MS. Στην περίπτωση χρήσης ανιχνευτών MS-MS, προβλήματα ταυτοποίησης συνήθως δεν αντιμετωπίζονται, αφού τα κριτήρια ταυτοποίησης πληρούνται. Οι μέθοδοι αυτές διαθέτουν υψηλή ειδικότητα και χαμηλά όρια ανίχνευσης, μειονέκτημα όμως αποτελεί το υψηλό κόστος για την αγορά και τη συντήρηση του οργάνου.

Πίνακας 3.2. Ενδεικτικοί μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε διάφορα βιολογικά υλικά.

Βιβλιογραφία	Αντιεπιληπτικά φάρμακα	Βιολογικό υλικό	Προκατεργασία δείγματος	Χρωματογραφική Στήλη	Ανιχνευτής	LOD/LOQ (µg/mL)	% Ανάκτηση	Δυναμικό εύρος (µg/mL)	Εσωτερικό πρότυπο
Vermeij και Edelbroek, 1994	Λεβετιρακετάμη	Ορός	SPE (C18)	Reversed phase Spherisorb 30DS2	UV (205 nm)	0,36	97	0-30	α-μεθυλ-5,5,- διμεθυλ-2- οξο-1- πυρολιδίνη
Fraser και συν., 1995	Λαμοτριγίνη	Ορός	LLE (οξικός αιθυλεστέρας)	RP-8	UV (306nm)	-/-	---	---	BW725C78
Forsblad και συν., 1996	Λαμοτριγίνη	Πλάσμα	LLE (οξικός αιθυλεστέρας)	Nucleosil C18	UV (270nm)	-/-	98	0-15	χωρίς
Lensmeyer και συν., 1997	Λαμοτριγίνη Φαινυτοΐνη Καρβαμαζεπίνη Εποξείδιο καρβαμαζεπίνης	Ορός	SPE (C8)	Zorbax Stable Bond cyanopropyl	UV (214)	0,15/0,35	96-110	0,75-20,5	cyheptamide
Jiang και Li, 1999	Γκαμπαπεντίνη	Ορός	Καταβύθιση πρωτεϊνών (υπεργλωρικό οξύ)	Supelco LC-8DS column	Fluorescence detector	0,01/0,06	100	2,0-10,0	(1- αμινομεθυλ- 1- κυκλοεπυλ) οξικό οξύ
Kamal και συν., 1999	Αιθοσουξιμίδη Καρβαμαζεπίνη Καρβαμαζεπίνη- διόλη Εποξείδιο- καρβαμαζεπίνη Λαμοτριγίνη Πριμιδόνη Φαινυτοΐνη Φαινοβαρβιτάλη	Πλάσμα	LLE (αιθέρας)	Supelcosil LC-18 stainless steel	UV (220nm)	0,2	88,3-106,1	20-200 2-30 0,5-15 0,5-15 0,5-15 2-40 2-40 2-60	9- υδροξυμεθυλ -10- καρβαμυλακ ριδανιο

Matar και συν., 1999	Αιθοσουζιμίδη Πριμιδόνη Λαμοτριγίνη Φαινοβαρβιτάλη Φαινυτοΐνη Καρβαμαζεπίνη Καρβαμαζεπίνη- διόλη Καρβαμαζεπίνη- εποξείδιο	Πλάσμα	LLE (αιθέρας)	Supelcosil LC-18	UV (220 nm)	0,2/	70,7-104,4	20-200 2-40 2-60 0,5-15 2-40 2-30 0,5-15 0,5-15	9- υδροξυμεθυλ- 10- καρβαμυλακ- ριδανιο
Barbosa και Midio, 2000	Λαμοτριγίνη	Πλάσμα	LLE (οξικός αιθυλεστέρας)	Supelcosil LC-18	UV (306 nm)	0,19/0,58 μmol/L	86,14	0,78-46,95 μmol/L	BW725C
Chollet και συν., 2000	Βιγκαπατρίνη Γκαμπαπεντίνη	Ορός	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Nucleosil C18 100-5	Fluorescence detector	0,6/2,0 0,1/1,0	---	2,0-40,0 1,0-26,0	1- αμινομεθυλ- 1- κυκλοεπυλό- ξικό οξύ
Torra και συν., 2000	Λαμοτριγίνη	Ορός	SPE (Oasis, HLB)	7-micromsystems C18	UV (210nm)	-/0,2	90	0,2-20	butalbital
Castel-Branco και συν., 2001	Λαμοτριγίνη	Πλάσμα Εγκέφαλος	Καταβύθιση πρωτεϊνών (TFAA), LLE (οξικός αιθυλεστέρας)	HP-5 column		0,008/0,1 0,023/0,1	---	0,1-15 0,1-5,0	---
Croci και συν., 2001	Λαμοτριγίνη	Πλάσμα Ορός	Direct injection	Internal Surface Reversed Phase (ISRP)	UV (330 nm)	0,05/0,1	---	0,1-20,0	3,5-diamino- (6-methoxy phenyl)1,2,4- triazine
Erturk και συν., 2001	Βιγκαπατρίνη	Πλάσμα Ούρα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (MeOH)	Shim-Pack column	Fluorescence detector	0,1/0,2	70,83- 88,27 86,0-91,4	0,2-20,0 1,0-15,0	ασπαρτάμη
Ifa και συν.,	Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα	Καταβύθιση	D4-613 Shodex	MS/MS	-/0,05	---	0,05-10,0	ακεταμινοφα

2001				πρωτεϊνών (ACN)	RS pack column					ίνη
Zhu και Neirinck, 2002	Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα	SPE Bond Elut C18	Hypersil HyPurity Elite C18 column	UV	-/0,03	81,6	0,03-10,0	μπακλοφαίνη	
Juenke και συν., 2003	Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Luna TM 5μm phenyl-hexyl, Phenomenex	UV	-/1,0	---	1,0-60,0	3-amino-2-naphtholic acid	
Krivanek και συν., 2003	Βιγκαμπατρίνη Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	μBondapak C18 column	Fluorescence detector	0,3/5,0	98 92	5,0-40,0	ε-amino-n-caproic acid	
Cetin και Atmaca, 2004	Βιγκαμπατρίνη	Πλάσμα Ούρα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (MeOH)	Shim-Pack CLS-ODS	UV	0,5/0,8	81,07 83,05	0,8-30,0	tranexamic	
Pucci και συν., 2004	Λεβετιρακετάμη	Πλάσμα	SPE (Oasis, HLB)	ResElut C8	DAD	0,375/1,250	80-90	5-100	αδενοσίνη	
Rao και συν., 2004	Λεβετιρακετάμη	Φαρμακευτικά σκευάσματα	---	Chiralpak AD-H	UV (205 nm)	0,90/2,25	93,5-104,1	2,25-90,00	---	
Vermeij και Edelbroek, 2004	Βιγκαμπατρίνη Γκαμπαπεντίνη Πρεγκαμπαλίνη	Ορός	Καταβύθιση πρωτεϊνών (borate buffer)	Altima 3C18	Fluorescence detector	-/0,090 -/0,281 -/0,173	100	0-62 0-63 0-40	DL-2-amino-pentanoic acid	
Berry και Millington, 2005	Πρεγκαμπαλίνη	Πλάσμα Ορός	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Hypersil 5 MOS analytic column	UV	---	---	---	PD 403609	
Contin και συν., 2005	Λαμοτριγίνη Μεταβολίτης οξυκαρβαζεπίνης Φελβαμάτη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Synergi Hydro-RP	UV (210 nm)	0,5/1,0 1,0/2,0 5,0/10,0	100-104	1-20 2-40 10-120	4-methylprimidone	
Martens-Lobenhoffer και Bode-	Λεβετιρακετάμη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Porous graphitic carbon	UV (205nm)	0,1/1,0	98,6	1-75	αδενοσίνη	

Boger, 2005	Γκαμπαπεντίνη	Ορός	LLE (9-fluorenylmethyl chloroformate)	Shimpack CLC-C18	Fluorescence detector	0,01/0,03	90	0,03-20,0	azithromycin
Bahrami και Kiani, 2006	Γκαμπαπεντίνη	Ορός	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Shimpack CLC-C18	Fluorescence detector	0,0003/0,002	100	0,002-15,0	αμλοδιπίνη
Chung και συν., 2006	Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Phenyl-hexyl column	Fluorescence detector	0,04M/0,2M	99,6-101,6	0,2-8,0M	2-methoxynaphthalene
Emami και συν., 2006	Λαμοτριγίνη	Δισκία	---	C18 μ-Bondapak	UV (210 nm)	---	---	---	---
Jain και συν. 2006	Λεβετιρακετάμη	Πλάσμα	SPE (Oasis, HLB)	Thermo Electron Betasil C18	MS/MS	0,125/0,5	79,95	0,5-50	Κλοναζεπάμη
Ji και συν., 2006	Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Atlantis HILIC silica	MS/MS	-/0,05	98,5-99,0	0,05-10,0	μετορφίνη
Kristensen και συν., 2006	Γκαμπαπεντίνη	Γάλα	---	---	Fluorescence detector	---	---	---	---
Ramakrishna και συν., 2006	Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Waters Symmetry C18	MS/MS	0,01/0,04	75,3	0,04-10,0	1,1-cyclohexane diacetic acid monoxide
Sagirlı και συν., 2006	Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα Ούρα	SPE (C18)	Phenomenex C18	UV	0,02/0,05 0,05/0,10	72,21 72,73	0,1-10	μπακλοφαίνη
Ciavarella και συν., 2007	Γκαμπαπεντίνη	Drug products	---	---	UV	---	---	---	---
Franco και συν., 2007	Βιγκαμπατρίνη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Chiralcel-ODR	UV	-/0,5	94-96	0,5-40	1-αμινομεθυλ-1-κυκλοεπτυλοξικό οξύ

Greiner και Haen, 2007	Λαμοτριγίνη Οξυκαρβαζεπίνη 10- Υδροξυκαρβαζεπίνη	Ορός	SPE (PerfectBond C-8)	Betasil C6	UV (215 nm)	0,01/0,03 0,02/0,06 0,03/0,09	95-107 97-120 101-103	0,03-5,0 0,06-10 0,09-1,0	---
Greiner-Sosanko και συν., 2007	Λαμοτριγίνη Οξυκαρβαζεπίνη 10- Υδροξυκαρβαζεπίνη Ζονισαμίδα	Ορός	LLE (οξικός αιθυλεστέρας)	Supelcosil LC-18	UV (230 nm, 270 nm)	0,15/1,0 0,25/1,0 0,15/1,0 0,75/1,0	95	1,0-30 1,0-30 1,0-40 1,0-40	Χλωραμφενί κόλη
Guo και συν., 2007	Λεβετιρακετάμη	Πλάσμα, ορός, σάλιο	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	C18	MS/MS	0,1/2,0	103-108	2,0-25	ritonavir
Jalalizadeh και συν., 2007	Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Nova-Pak C18	UV (360nm)	0,01/0,05	96-100	0,05-5	αμλοδιπίνη
Park και συν., 2007	Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Gemini C18	MS/MS	-/0,020	---	0,020-5,0	[(S)-(+)-α- aminocyclohexanecarboxylic acid hydrate
Vermeij και Edelbroek, 2007	Καρβαμαζεπίνη Λαμοτριγίνη Πριμιδόνη Υδροξυκαρβαζεπίνη Φαινοϋτίνη Φαινοβαρβιτάλη Ζονισαμίδα	Ορός	SPE (Oasis, HLB)	Alltima 3C18	DAD	0,008/0,014	92	0-21,6	5-ethyl-5- para-tolyl barbituric acid
Matar, 2008	Λεβετιρακετάμη	Πλάσμα	SPE (Oasis HLB)	Symmetry C18	MS/MS	-/1,0	91,7-93,4	1,0-40	αδενοσίνη
Subramanian και συν., 2008	Ζονισαμίδα Λαμοτριγίνη Τοπιραμίδα	Πλάσμα	SPE (Oasis HLB)	Smipack XR- ODS	MS/MS	---	88-96	---	---

συν., 2010			πρωτεϊνών (MeOH)	BEH C18						
El-Ehany και συν., 2010	Λαμοτριγίνη	Πλάσμα Διακία	---	---	Spectrofluorimetric detector	0,02/0,06	95	0,1-1,0	---	
Greenaway και συν., 2010	Λακοσαμίδα	Ορός	Καταβύθιση πρωτεϊνών	---	DAD	1 μmol/L		10-250 μmol/L	---	
Kolokouri και συν., 2010	Γκαμπαπεντίνη	Κηλίδες αιμάτος	---	YMC Silica	MS/MS	10	47,1-55,7	10-40	4-aminocyclohexane-carboxylic acid	
Mendu και Soldin, 2010	Λεβετιρακετάμη	Ορός Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Supelco C18	MS/MS	-/-	100	0-50	Ritonavir	
Mercolini και συν., 2010	Βιγκαμπατρίνη Γκαμπαπεντίνη Τοπιραμίδα	Πλάσμα	SPE (Oasis, MCX)	Hydro-RP	Fluorescence detector	0,3/1,0 0,1/0,2	95-96 92-94 94-96	1,0-100 0,2-50,0	Ισονιαζίδα	
Zufia και συν., 2010	Λεβετιρακετάμη	Πλάσμα	SPE (Oasis, HLB)	Teknokroma ODS C18	DAD (205nm)	-/0,535	90	0,53-107,0	UCB 17025	
Antonilli και συν., 2011	Λαμοτριγίνη Λεβετιρακετάμη Ζονισαμίδα	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	LichroCART- Purospher 100 RP-18	MS/MS DAD	1,3/3,7 2,25/6,85 1,2/3,7	---	0-50	---	
Heltsley και συν., 2011	Γκαμπαπεντίνη Πρεγκαμπαλίνη	Ούρα	---	Restek Pinnacle DB C18	MS/MS	-/2,5	---	2,5-1000	Γκαμπαπεντίνη-d4	
Hotha και συν., 2012	Λαμοτριγίνη	Πλάσμα	LLE (οξικός αιθυλεστέρας)	Discovery CN	MS/MS	0,0001	86,51- 89,15	0,0001-1,5	φλουκοναζόλη	
Greenaway και συν., 2011	Λακοσαμίδα	Ορός Σάλιο	Καταβύθιση πρωτεϊνών (υπερχλωρικό οξύ)	Hypersil BDS	DAD	-/0,25	---	0,25-5,0	---	
Juenke και	Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα	LLE	Acquity UPLC	MS/MS	0,5/1,0	93,8-102,6	1-150	3-amino-2-	

συν., 2011	Λεβευρακετάμη		(ACN:MeOH, 1:1, v/v)	HSS T3					naphthoic acid)
Kestelyn και συν., 2011	Λακοσαμίδη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (MeOH)	---	UV	---	---	0,5-12,5	---
Kim και συν., 2011	Βαλπροϊκό οξύ Γκαμπαπεντίνη Καρβαμαζεπίνη Εποξυκαρβαζεπίνη Λαμοτριγίνη Λεβευρακετάμη Οξυκαρβαζεπίνη Τοπιραμάτη Φαινυτοΐνη Ζονισαμίδη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Luna C18 column	MS/MS	---	87,2 65,3 94,6 93,7 93,7 87,2 93,7 95,7 89,8 96,5	1,2-60	Βαλπροϊκό οξύ-d6 Φαινυτοΐνη- d10
Liu και συν., 2011	Γκαμπαπεντίνη	Αίμα (ίππειο)	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	RP ACE C18	MS/MS	0,001/0,010		0,010-2,5	α- αμινοκυκλοε- ξαν- προπιονικό οξύ
Middleton και συν., 2011	Γκαμπαπεντίνη	Αίμα	----	---	MS/MS	---	---	---	---
Sattler και συν., 2011	Λακοσαμίδη	Ορός	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN:MeOH, 9:1, v/v)	---	MS	---	---	---	---
Sorensen, 2011	Λαμοτριγίνη Καρβαμαζεπίνη 10- υδροξυκαρβαζεπίνη Φαινυτοΐνη Φαινοβαρβιτάλη	Ολικό αίμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (MeOH)	Synergi Polar-RP	MS/MS	69/220 33/110 18/60 48/160 320/1100	92-93 91-93 94-96 92-94 94-97	---	3- acetamidoph enol

Tai et al, 2011	Λαμοτριγίνη Φαινοτοΐνη Φαινοβαρβιτάλη Τοπιραμίνη	Ορός	SPE (C18 Sep- Pak)	LUNA C18	MS/MS	0,1 0,8 13 0,2	99 97 100 99	---		Τοπιραμίνη- d12
Ulu και Kel, 2011	Γκαμπαπεντίνη	Κάψουλες	NBD-F	Inertsil C18	Fluorescen ce 458nm 521 nm	0,00085/0,0 0255	99,97- 101,90	0,005-0,050		mexiletine
Collins και Janis, 2012	Γκαμπαπεντίνη Καρβαμαζεπίνη Καρβαμαζεπίνη- 10,11-εποξείδιο Υδροξυκαρβαζεπίνη Λαμοτριγίνη Λεβετρακετάμη Οξυκαρβαζεπίνη Πρεγκαμπαλίνη	Πλάσμα	LLE (ACN:H ₂ O, 1:1, v/v)	Thermo Hypersil Prism RP	MS/MS	---	---			Παρακετίνη Μεθυλ- καρβοξαμίνη
Dahl και συν., 2012	Πρεγκαμπαλίνη	Αίμα Ούρα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN:MeOH, 85:15, v/v)	HSS T3 column	MS/MS	0,004/0,008	96-109 95-99	---		GHB-d6
Kim και συν., 2012	Λακοσαμίνη	Πλάσμα (απουραίο υ)	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	---	MS/MS	0,0003/-	---	0,0003-1		---
Lionetto και συν., 2012	Καρβαμαζεπίνη Οξυκαρβαζεπίνη Υδροξυκαρβαζεπίνη Εποξυκαρβαζεπίνη	Ορός	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	reversed-phase column (50 x 2.0 mm, Luna C18, 5 mM, 100- Å pore size)	MS/MS	-/0,08 -/0,03 -/0,08 -/0,03	≥98	0,08-50 0,03-20 0,08-50 0,03-20		Dansyl- norvaline
Martinez και συν., 2012	Λακοσαμίνη	Ορός (ίππειος)	Καταβύθιση πρωτεϊνών (ACN)	Luna C18, Phenomenex	UV	-/0,5	99	0,5-25,0		daidzein

Rani και Malik, 2012	Καρβαμαζεπίνη Οξυκαρβαζεπίνη Πριμιδόνη Φαινοτοΐνη Φαινοβαρβιτάλη	Πλάσμα Ούρα	SPE	Luna C18, Phenomenex	UV	-/0,132- 1,956 ng/mL	90	1-500 ng/mL	---
Shah και συν., 2012	Λακοσαμίδα	Πλάσμα (ορουραίο υ)	LLE	Hichrom C18	UV	-/0,025	---	0,025-10	---
Shibata και συν., 2012	Αιθοσουζιμίδη Βαλπροϊκό οξύ Βιγκαπατρίνη Γκαμπαπεντίνη Καρβαμαζεπίνη Λαμοτριγίνη Λεβετιρακετάμη Πριμιδόνη Τιαγκαμπίνη Τοπιραμίδα Φαινοτοΐνη Φαινοβαρβιτάλη Ζονισαμίδη	Πλάσμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (MeOH)	Acquity UPLC BEH C18	MS/MS	-/20,3 -/10,4 -/1,1 -/2,6 -/1,3 -/1,2 -/1,9 -/1,2 -/0,6 -/2,1 -/2,2 -/5,0 -/2,0	---	20,3-254 10,4-260 1,1-27,5 2,6-65,0 1,3-13,5 1,2-30,0 1,9-48,8 1,2-28,8 0,6-15,0 2,1-52,5 2,2-53,8 5,0-50,0 2,0-51,3	---
Yagi και συν., 2012	Γκαμπαπεντίνη	Πλάσμα Ούρα	4-fluoro-7-nitro- benzofurazan	Ultra-fine ODS	Fluorescen ce detector	-/0,05 -/10,0	---	0,05-10 10-1000	baclofen
Kostic και συν., 2013	Βιγκαπατρίνη Γκαμπαπεντίνη Πρεγκαμπαλίνη	Πλάσμα	LLE (οξικός αιθυλεστέρας)	Zorbax Eclipse XDB-C8 column	MS/MS	---	82,1 81,3 85,8	10,0-40,0	4-aminocyclohexanecarboxylic acid
Luo και συν., 2013	Λεβετιρακετάμη	Κηλίδες αίματος	---	---	MS/MS	---	---	0,067-60	---
Hakkinen και συν., 2014	Γκαμπαπεντίνη Πρεγκαμπαλίνη	Αίμα	Καταβύθιση πρωτεϊνών (TFFA)	---	MS/MS	---	---	---	---

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της Διδακτορικής αυτής Διατριβής που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών ήταν η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε πλάσμα και ολικό αίμα.

Στη μελέτη αυτή συμπεριλήφθηκαν τα δεκατέσσερα αντιεπιληπτικά φάρμακα που κυκλοφορούν κυρίως στον Ελλαδικό χώρο και είναι η αιθοσουξιμίδη, το βαλπροϊκό οξύ, η βιγκαμαπτρίνη, η γκαμπαπεντίνη, η καρβαμαζεπίνη, η λακοσαμίδη, η λαμοτριγίνη, η λεβετιρακετάμη, η οξυκαρβαζεπίνη, η πρεγκαμπαλίνη, η τιαγκαμπίνη, η τοπιραμάτη, η φαινοβαρβιτάλη και η φαινυτοΐνη, καθώς και δύο μεταβολίτες, η 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη και η 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη.

Οι προτεινόμενες από τη διεθνή βιβλιογραφία, σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπό μελέτη αντιεπιληπτικών φαρμάκων, σε διάφορα βιολογικά υλικά, είναι η αέρια και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό κυρίως με φασματογράφο μαζών. Στη συγκεκριμένη μελέτη προτιμήθηκε οι μέθοδοι του ταυτόχρονου προσδιορισμού των υπό μελέτη αντιεπιληπτικών φαρμάκων, να αναπτυχθούν με βάση την αναλυτική τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματογραφία μαζών, η οποία είναι μια αξιόπιστη αναλυτική τεχνική, αποτελεί βασικό εξοπλισμό κάθε κλινικού και δικαστικού τοξικολογικού εργαστηρίου και έχει ευρεία εφαρμοσιμότητα διεθνώς. Επίσης, αποτελεί τη βασική αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στο πλαίσιο των σύγχρονων απαιτήσεων της Αναλυτικής Τοξικολογίας, οι αναπτυσσόμενες μέθοδοι θα πρέπει να συνδυάζουν υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια, ειδικότητα και εκλεκτικότητα, σχετικά χαμηλό κόστος, σύντομο χρόνο ανάλυσης και να είναι εύκολα εφαρμόσιμες και αναπαραγώγιμες. Μέθοδοι που πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις θεωρούνται κατάλληλες για να ενταχθούν στη μεθοδολογία ενός δικαστικού και κλινικού τοξικολογικού εργαστηρίου που διενεργεί αναλύσεις κατά την καθημερινή πράξη στο πλαίσιο της διερεύνησης υποθέσεων κλινικού και δικαστικού ενδιαφέροντος, καθώς συνδυάζουν αξιοπιστία και ταχύτητα, και μπορούν

να χρησιμοποιηθούν στην επιτυχή και άμεση αντιμετώπιση των σχετικών περιστατικών.

Τέτοιες μέθοδοι μπορούν να βρουν εφαρμογές στο πλαίσιο επειγουσών τοξικολογικών εξετάσεων Κλινικής και Δικαστικής Τοξικολογίας όπως: α) η παρακολούθηση των επιπέδων αντιεπιληπτικών φαρμάκων με σκοπό την εξατομίκευση του δοσολογικού σχήματος της αντιεπιληπτικής αγωγής ασθενών, β) η διερεύνηση της τοξικότητας των αντιεπιληπτικών φαρμάκων, γ) σε μελέτες φαρμακοκινητικής τους, και δ) η διερεύνηση δικαστικών υποθέσεων που απαιτούν προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων, σε προθανάτια ή/και μεταθανάτια βιολογικά υγρά, ο οποίος σε αρκετές περιπτώσεις αφορά περισσότερα του ενός φάρμακα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΟΤΕΧΝΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για την ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση των μεθόδων προσδιορισμού των δεκατεσσάρων αντιεπιληπτικών φαρμάκων (αιθοσουξιμίδη, βαλπροϊκό οξύ, βιγκαπατρίνη, γκαμπαπεντίνη, καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, πρεγκαμπαλίνη, τιαγκαμπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινοτοΐνη) σε ολικό αίμα και πλάσμα χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος οργανολογικός και υλικοτεχνικός εξοπλισμός και παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα και πρότυπα βιολογικά δείγματα.

5.1. Αέριος χρωματογράφος συνδεδεμένος με φασματογράφο μαζών (GC/MS)

Το σύστημα GC/MS που χρησιμοποιήθηκε, περιελάμβανε:

1. Αέριο χρωματογράφο Shimadzu, GC-2010
2. Φασματογράφο μαζών Shimadzu, QP2010S
3. Αυτόματο δειγματολήπτη Shimadzu, AOC-20i
4. Αντλία Κενού, Edwards
5. Χρωματογραφική στήλη: Agilent DB-5MS, 30 m x 0,25 mm, i.d. 0,25 μ m.
6. Λογισμικό πρόγραμμα: GCMS Solutions της εταιρείας Shimadzu.

5.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε, είναι ο ακόλουθος:

1. Ατομικός αναδευτήρας περιδίνησης (Vortex), της εταιρείας Chiltren
2. Σύστημα εξάτμισης εννέα θέσεων συνδεδεμένο με άζωτο (Reacti-Vap), της εταιρείας PIERCE
3. Σύστημα εκχύλισης στερεής φάσης δέκα θέσεων, της εταιρείας Isolute
4. Συσκευή παρασκευής νερού καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck
5. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (2-20 μ L), της εταιρείας Thermo
6. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (20-200 μ L), της εταιρείας Thermo
7. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (200-1000 μ L), της εταιρείας Thermo
8. Ρύγχη πιπετών (2-200 μ L), της εταιρείας Thermo

9. Ρύγχη πιπετών (200-1000 μL), της εταιρείας Thermo
10. Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσεως, της εταιρείας SARSTEDT
11. Γυάλινοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
12. Γυάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
13. Γυάλινες βαθμονομημένες πιπέτες (1,00, 5,00 και 10,0 mL)
14. Ογκομετρικός κύλινδρος (100 mL)
15. Ψηφιακό πεχάμετρο, της εταιρείας Metrohm
16. Αναλυτικός ζυγός, της εταιρείας RADWAG
17. Φυγόκεντρος, της εταιρείας ALRESA

5.3. Διαλύτες και αντιδραστήρια

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, είναι:

1. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck
2. Μεθανόλη καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck
3. Ακετόνη καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck
4. Εξάνιο καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck
5. Οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck
6. Νερό καθαρότητας HPLC
7. Ισοπροπανόλη καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck
8. Διχλωρομεθάνιο αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Merck
9. Αμμωνία αναλυτικής καθαρότητας, περιεκτικότητας 25%, της εταιρείας Merck
10. Πυκνό οξικό οξύ (98%) καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck
11. Υδροχλωρικό οξύ αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Merck
12. Υδροξείδιο του νατρίου αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Ferak
13. Χλωριούχο αμμώνιο αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Serva
14. Διένυδρο, δισόξινο φωσφορικό νάτριο αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Merck
15. Διένυδρο, μονόξινο φωσφορικό νάτριο αναλυτικής καθαρότητας, της εταιρείας Merck.
16. Πενταφθοροπροπιονικός ανυδρίτης 99% (pentafluoropropionic anhydride, PFPA) της εταιρείας Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)

17. N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυν)-τριφθοροακεταμίδιο (N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, BSTFA) με 1% τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (trimethylchlorsilane, TMCS) της εταιρείας Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany),
18. N-μεθυλ-N-τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυν-τριφθοροακεταμίδιο (N-methyl-N-tert-butyltrimethylsilyl-trifluoroacetamide, MTBSTFA) με 1% τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυνχλωρίδιο (tert-butyltrimethylsilylchloride, TBDMSCl) της εταιρείας Fluka (Steinheim, Germany),
19. Επταφθοροβουτυρικός ανυδρίτης 99% (heptafluorobutyric anhydride, HFBA) της εταιρείας Fluka (Steinheim, Germany)
20. Τριφθοροξικό ανυδρίτη 99% (trifluoroacetic anhydride, TFAA) της εταιρείας Fluka (Steinheim, Germany),
21. Οξικός ανυδρίτης 97% (acetic anhydride) της εταιρείας Mallinckrodt (St. Louis, MO, USA)
22. Πυριδίνη 99.5% (pyridine) της εταιρείας Ferak (Berlin, Germany).

5.4. Στήλες εκχύλισης

Οι στήλες εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν:

1. Chem Elut (υγρό-υγρό εκχύλιση) της εταιρείας Agilent,
2. Absolut Nexus (εκχύλιση στερεής φάσης) της εταιρείας Agilent,
3. HF Bond Elut C18 (εκχύλιση στερεής φάσης) της εταιρείας Agilent
4. Bond Elut LRC Certify (εκχύλιση στερεής φάσης) της εταιρείας Agilent
5. HF Bond Elut LRC Certify II (εκχύλιση στερεής φάσης) της εταιρείας Agilent.

5.5. Βιολογικά υποστρώματα

Για την παρασκευή πρότυπων εμβολιασμένων δειγμάτων, ολικού αίματος και πλάσματος, χρησιμοποιήθηκαν μονάδες αίματος ή πλάσματος ελεύθερες φαρμάκων, διαφορετικών ομάδων αίματος, που προσφέρθηκαν από τις Μονάδες Αιμοδοσίας των Νοσοκομείων «Παιδών-Αγία Σοφία» και «Λαϊκό». Οι διαφορετικές μονάδες ανθρώπινου αίματος ή πλάσματος αναμίχθηκαν δημιουργώντας δεξαμενές αίματος και πλάσματος, αντίστοιχα (pooled drug free blood or plasma).

5.6. Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης ουσιών αναφοράς

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπες ουσίες αναφοράς (chemical reference standards) τα δεκατέσσερα υπό μελέτη αντιεπιληπτικά φάρμακα (αιθοσουξιμίδη, βαλπροϊκό οξύ, βιγκαμπατρίνη, γκαμπαπεντίνη, καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, πρεγκαμπαλίνη, τιαγκαμπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινυτοΐνη) και δύο μεταβολίτες (10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη). Η προμήθεια των πρότυπων ουσιών έγινε σε στερεά μορφή, καθαρότητας μεγαλύτερης ή ίσης του 99%, από την αντίστοιχη σε κάθε περίπτωση φαρμακευτική εταιρεία ή από την εταιρεία LGC Standards:

1. αιθοσουξιμίδη (Pfizer), καθαρότητας 99,8%
2. βαλπροϊκό οξύ (Sanofi-Aventis), καθαρότητας 99,3%
3. βιγκαμπατρίνη (Sanofi-Aventis), καθαρότητας 99,2%
4. γκαμπαπεντίνη (Pfizer), καθαρότητας 99,0%
5. καρβαμαζεπίνη (Novartis), καθαρότητας 99,9%
6. 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη (μεταβολίτης καρβαμαζεπίνης) (Novartis), καθαρότητας 99,8%
7. λακοσαμίδη (LGC Standards), καθαρότητας 99,8%
8. λαμοτριγίνη (LGC Standards), καθαρότητας 99,8%
9. λεβετιρακετάμη (Pharmathen), καθαρότητας 99,0%
10. οξυκαρβαζεπίνη (Novartis), καθαρότητας 99,9%
11. 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη (μεταβολίτης οξυκαρβαζεπίνης) (Novartis), καθαρότητας 99,8%
12. πρεγκαμπαλίνη (Pfizer), καθαρότητας 100%
13. τιαγκαμπίνη (Gerolymatos), καθαρότητας 100%
14. τοπιραμάτη (Janssen), καθαρότητας 99,8%
15. φαινοβαρβιτάλη (Sanofi-Aventis), καθαρότητας 99,8% και
16. φαινυτοΐνη (Pfizer), καθαρότητας 99,8%.

Για τα υπό μελέτη αντιεπιληπτικά φάρμακα που ήταν όλα σε στερεή μορφή, παρασκευάστηκαν πυκνά πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης ουσιών αναφοράς για το κάθε αντιεπιληπτικό φάρμακο ξεχωριστά, συγκέντρωσης 10,0 mg/mL σε μεθανόλη, ζυγίζοντας ορισμένη ποσότητα (περίπου 10 mg) από τη κάθε στερεή ουσία και διαλύοντάς την με τον κατάλληλο όγκο μεθανόλης, λαμβάνοντας υπόψη σε κάθε

περίπτωση την καθαρότητα της ουσίας. Ως μέσο διάλυσης επιλέχθηκε η μεθανόλη επειδή οι υπό μελέτη ουσίες διαλύονται σε αυτή και τα μεθανολικά διαλύματα που προέκυψαν είχαν άριστη σταθερότητα.

Οι πρότυπες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά πρότυπα προμηθεύτηκαν υπό τη μορφή προτύπων διαλυμάτων από την εταιρεία LGC Standards, στις παρακάτω συγκεντρώσεις (με καθαρότητα > 99,9%):

1. Πρότυπο διάλυμα λεβετιρακετάμης-d6 συγκέντρωσης 0,1 mg/mL σε μεθανόλη, και
2. Πρότυπο διάλυμα γκαμπαπεντίνης-d10 συγκέντρωσης 0,1 mg/mL σε μεθανόλη.

Οι πρότυπες ουσίες αναφοράς και τα πρότυπα διαλύματα ουσιών αναφοράς φυλάσσονταν σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας και μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναφερόταν στο πιστοποιητικό τους. Συγκεκριμένα, τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης των αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των αντίστοιχων εσωτερικών προτύπων φυλάσσονταν σε θερμοκρασία -20 °C.

5.7. Παρασκευή διαλυμάτων

Από τα πυκνά διαλύματα παρακαταθήκης (10,0 mg/mL) παρασκευάστηκαν αραιότερα διαλύματα παρακαταθήκης καθώς και διαλύματα εργασίας σε μεθανόλη, τα οποία μεταφέρονταν σε γυάλινα φιαλίδια σκούρου χρώματος και κατάλληλου όγκου, που έφεραν ετικέτες για την αναγραφή των στοιχείων τους. Τα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονταν σε συνθήκες σύμφωνες με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας των προτύπων ουσιών αναφοράς και χρησιμοποιούνταν μέχρι την ημερομηνία λήξης τους. Όλα τα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονταν εντός της ημέρας εργασίας.

5.7.1. Αραιότερα διαλύματα παρακαταθήκης

Τα αραιότερα διαλύματα παρακαταθήκης που παρασκευάστηκαν με 1:10 αραιώση των προτύπων διαλυμάτων ουσιών αναφοράς με μεθανόλη, είναι τα ακόλουθα:

1. Διάλυμα παρακαταθήκης αιθοσουξιμίδης, 1,00 mg/mL
2. Διάλυμα παρακαταθήκης βαλπροϊκού οξέος, 1,00 mg/mL
3. Διάλυμα παρακαταθήκης βιγκαπατρίνης, 1,00 mg/mL
4. Διάλυμα παρακαταθήκης γκαμπαπεντίνης, 1,00 mg/mL
5. Διάλυμα παρακαταθήκης καρβαμαζεπίνης, 1,00 mg/mL

6. Διάλυμα παρακαταθήκης του 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνης (μεταβολίτη καρβαμαζεπίνης), 1,00 mg/mL
7. Διάλυμα παρακαταθήκης λακοσαμίδης, 1,00 mg/mL
8. Διάλυμα παρακαταθήκης λαμοτριγίνης, 1,00 mg/mL
9. Διάλυμα παρακαταθήκης λεβετιρακετάμης, 1,00 mg/mL
10. Διάλυμα παρακαταθήκης οξυκαρβαζεπίνης, 1,00 mg/mL
11. Διάλυμα παρακαταθήκης της 10-υδροξυ-καρβαζεπίνης (μεταβολίτη οξυκαρβαζεπίνης), 1,00 mg/mL
12. Διάλυμα παρακαταθήκης πρεγκαμπαλίνης, 1,00 mg/mL
13. Διάλυμα παρακαταθήκης τιαγκαμπίνης, 1,00 mg/mL
14. Διάλυμα παρακαταθήκης τοπιραμάτης, 1,00 mg/mL
15. Διάλυμα παρακαταθήκης φαινοβαρβιτάλης, 1,00 mg/mL
16. Διάλυμα παρακαταθήκης φαινυτοΐνης, 1,00 mg/mL.

5.7.2. Μικτά μεθανολικά διαλύματα εργασίας για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των αναλυτικών μεθόδων

Κατά το στάδιο της ανάπτυξης και βελτιστοποίησης των μεθόδων προσδιορισμού, προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες δοκιμασίες για τον προσδιορισμό των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών της αναλυτικής τεχνικής και της τεχνικής προκατεργασίας των βιολογικών υλικών, παρασκευάστηκαν μικτά διαλύματα εργασίας:

- αιθοσουξιμίδης, βαλπροϊκού οξέος, βιγκαμπατρίνης, γκαμπαπεντίνης, καρβαμαζεπίνης, 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνης, λακοσαμίδης, λαμοτριγίνης, λεβετιρακετάμης, οξυκαρβαζεπίνης, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνης, πρεγκαμπαλίνης, τιαγκαμπίνης, τοπιραμάτης, φαινοβαρβιτάλης και φαινυτοΐνης (συγκέντρωσης 50,0 $\mu\text{g/mL}$) (διάλυμα A), με ανάμιξη 50 μL από το κάθε διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1,00 mg/mL και αραιώση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 1,0 mL.
- αιθοσουξιμίδης, καρβαμαζεπίνης, 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνης, λακοσαμίδης, λαμοτριγίνης, λεβετιρακετάμης, οξυκαρβαζεπίνης, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνης, τοπιραμάτης, φαινοβαρβιτάλης και φαινυτοΐνης (συγκέντρωσης 50,0 $\mu\text{g/mL}$) (διάλυμα A₁), με ανάμιξη 50 μL από το κάθε

διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1,00 mg/mL και αραιώση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 1,0 mL.

- βαλπροϊκού οξέος, βιγκαπατρίνης, γκαμπαπεντίνης, πρεγκαμπαλίνης και τιαγκαμπίνης (συγκέντρωσης 50,0 µg/mL) (διάλυμα A₂), με ανάμιξη 50 µL από το κάθε διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1,00 mg/mL και αραιώση με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 1,0 mL.

5.7.3. Μικτά μεθανολικά διαλύματα εργασίας για την παρασκευή προτύπων δειγμάτων πλάσματος και ολικού αίματος

Κατά το στάδιο της επικύρωσης των μεθόδων προσδιορισμού σε πλάσμα και ολικό αίμα παρασκευάστηκαν μικτά μεθανολικά διαλύματα εργασίας των υπό μελέτη ουσιών δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων, μίας χαμηλής (B1) και μίας υψηλής (B2). Τα διαλύματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή προτύπων βιολογικών δειγμάτων (πλάσματος και ολικού αίματος) βαθμονόμησης (calibration samples - Cal). Οι συγκεντρώσεις της κάθε ουσίας στα διαλύματα B1 και B2 παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.1. Για την παρασκευή προτύπων βιολογικών δειγμάτων (πλάσματος και ολικού αίματος) ελέγχου ποιότητας (quality control samples - QC) και ελέγχου σταθερότητας (stability samples - STB) των μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά διαλύματα B1' και B2' από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα βαθμονόμησης, τα οποία είχαν όμως ίδιες συγκεντρώσεις με τα B1 και B2, αντίστοιχα.

Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα διαλύματα εργασίας που παρασκευάστηκαν, οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό βιολογικών δειγμάτων πλάσματος ή ολικού αίματος όγκου 200 µL, καθώς και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις των προτύπων βιολογικών δειγμάτων που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.

Επιπλέον, παρασκευάστηκε μεθανολικό διάλυμα εργασίας εσωτερικού προτύπου συγκέντρωσης 5,0 µg/mL λεβετιρακετάμης-d6 (διάλυμα Γ₁) και γκαμπαπεντίνης-d10 (διάλυμα Γ₂), για τον εμβολιασμό των δειγμάτων βαθμονόμησης, ελέγχου ποιότητας, σταθερότητας και των άγνωστων δειγμάτων. Για την παρασκευή των διαλυμάτων Γ1 και Γ2, 50 µL από το αντίστοιχο διάλυμα συγκέντρωσης 100 µg/mL του κάθε εσωτερικού προτύπου αραιώνονταν με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου 1 mL.

Πίνακας 5.1. Παρασκευή προτύπων βιολογικών δειγμάτων (πλάσματος και ολικού αίματος) ανά ομάδα ουσιών για την βαθμονόμηση (calibration samples - Cal), τον έλεγχο ποιότητας (quality control samples - QC) και τον έλεγχο σταθερότητας των μεθόδων (stability samples - STB).

βιγκαμπατρίνη, γκαμπαπεντίνη, καρβαμαζεπίνη, 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδα, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, πρεγκαμπαλίνη, φαινοβαρβιτάλη, φαινυτοΐνη			
Όγκος εμβολιασμού (μL) σε 200 μL πλάσματος ή ολικού αίματος	Μικτό διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, μg/mL)	Τελική συγκέντρωση (μg/mL) προτύπου βιολογικού δείγματος	Κωδικός προτύπου βιολογικού δείγματος
20	B1 (5,0)	0,50	Cal1
40	B1 (5,0)	1,00	Cal2
60	B1 '(5,0)	1,50	QC1- STB
120	B1 (5,0)	3,00	Cal3
20	B2 (100,0)	10,0	Cal4
30	B2 '(100,0)	15,0	QC2
40	B2 (100,0)	20,0	Cal5
80	B2 '(100,0)	40,0	QC3- STB
100	B2 (100,0)	50,0	Cal6
αιθοσουξιμίδη, βαλπροϊκό οξύ, τοπιραμάτη			
Όγκος εμβολιασμού (μL) σε 200 μL πλάσματος ή ολικού αίματος	Μικτό διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, μg/mL)	Τελική Συγκέντρωση (μg/mL) Προτύπου βιολογικού δείγματος	Κωδικός προτύπου βιολογικού δείγματος
20	B1 (20,0)	2,00	Cal1
40	B1 (20,0)	4,00	Cal2
60	B1 (20,0)	6,00	QC1- STB
120	B1 (20,0)	12,0	Cal3
20	B2 (400,0)	40,0	Cal4
30	B2 '(400,0)	60,0	QC2

40	B2 (400,0)	80,0	Cal5
80	B2'(400,0)	160,0	QC3- STB
100	B2 (400,0)	200,0	Cal6
τιαγκαμπίνη			
Όγκος εμβολιασμού (μL) σε 200 μL πλάσματος ή ολικού αίματος	Μικτό διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, μg/mL)	Τελική Συγκέντρωση (μg/mL) Προτύπου βιολογικού δείγματος	Κωδικός προτύπου βιολογικού δείγματος
20	B1 (0,5)	0,50	Cal1
40	B1 (0,5)	1,00	Cal2
60	B1'(0,5)	1,50	QC1- STB
120	B1 (0,5)	3,00	Cal3
20	B2 (10,0)	10,0	Cal4
30	B2'(10,0)	15,0	QC2
40	B2 (10,0)	20,0	Cal5
80	B2'(10,0)	40,0	QC3- STB
100	B2 (10,0)	50,0	Cal6

5.7.4. Μικτά διαλύματα εργασίας για τη μελέτη ειδικότητας των μεθόδων

Κατά το στάδιο της επικύρωσης των μεθόδων προσδιορισμού των αντιεπιληπτικών φαρμάκων, σε πλάσμα και ολικό αίμα, πραγματοποιήθηκε μελέτη ειδικότητας των μεθόδων και χρησιμοποιήθηκαν μεθανολικά διαλύματα παρακαταθήκης φαρμάκων και ναρκωτικών ουσιών ή μεταβολιτών τους, που θα μπορούσαν να συνυπάρχουν με τα αντιεπιληπτικά φάρμακα στα υπό ανάλυση πραγματικά βιολογικά δείγματα. Τα διαλύματα παρακαταθήκης αλοπεριδόλης, αμιτρυπτιλίνης, βενλαφαζίνης, βιπεριδένης, ζολπιδέμης, κλοζαπίνης, κλομιπραμίνης, λεβομεπρομαζίνης, μιρταζαπίνης, ολανζαπίνης, παρακεταμόλης, σεφτραλίνης, σιταλοπράμης, μορφίνης, κωδεΐνης, 6-μονοακετυλομορφίνης, κοκαΐνης, βενζοϋλοεκγονίνης, μεθυλεστέρα της εκγονίνης, Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλης, 11-nor-Δ⁹-τετραϋδροκανναβινοϊκού οξέος, αλπραζολάμης, βρωμαζεπάμης, διαζεπάμης, νορδιαζεπάμης, οξαζεπάμης, 7-αμινοφλουνιτραζεπάμης, μιδαζολάμης, αμφεταμίνης, μεθαμφεταμίνης, MDMA, MDA, κεταμίνης και εφεδρίνης, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συγκέντρωσης 1,0 mg/mL σε μεθανόλη.

Παρασκευάστηκε μικτό μεθανολικό διάλυμα εργασίας των 34 παραπάνω ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/mL για την κάθε ουσία (διάλυμα Δ₁), με ανάμιξη 50 µL από το κάθε διάλυμα παρακαταθήκης, εξάτμιση μέχρι ξηρού με ρεύμα N₂ και ανασύσταση του διαλύματος με 500 µL μεθανόλης. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε μικτό διάλυμα εργασίας, συγκέντρωσης 20 µg/mL για την κάθε ουσία (διάλυμα Δ₂) με αραιώση 1:5 του διαλύματος Δ₁ με μεθανόλη.

5.7.5. Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν, ήταν τα ακόλουθα:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 4,0 (0,1 M): σε 80 mL απιοντισμένο νερό προστέθηκαν 570 µL πυκνό CH₃COOH και 1,6 mL KOH 1,0 M και συμπληρώθηκε ο όγκος μέχρι τα 100 mL με απιοντισμένο νερό. Το pH ρυθμίστηκε στο 4,0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων KOH 1,0 M.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,0 (0,1 M): 15,6 g NaH₂PO₄·2H₂O διαλύθηκαν σε 1 L απιοντισμένου νερού. Το pH ρυθμίστηκε στο 6,0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων NaOH 1,0 M.
3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,0 (0,1 M): 3,58 g NaH₂PO₄·2H₂O διαλύθηκαν σε 100 mL απιοντισμένου νερού (διάλυμα I) και σε άλλα 100 mL απιοντισμένου νερού διαλύθηκαν 3,54 g Na₂HPO₄·2H₂O (διάλυμα II). Αναμίχθηκαν 19,5 mL του διαλύματος I με 30,5 mL του διαλύματος II και συμπληρώθηκε ο όγκος μέχρι τα 100 mL με απιοντισμένο νερό. Το pH ρυθμίστηκε στο 7,0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων NaOH 1,0 M.
4. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 9,0 (0,5 M): 9,0 g Na₂HPO₄·2H₂O διαλύθηκαν με απιοντισμένο νερό μέχρις όγκου 100 mL. Το pH ρυθμίστηκε στο 9,0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων NaOH 1,0 M.
5. Ρυθμιστικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος / χλωριούχου καλίου pH 1,0 (0,2 M): σε κωνική φιάλη αναμίχθηκαν 50 mL KCl 0,2 M με 134 mL HCl 0,2 M. Το pH ρυθμίστηκε στο 1,0 με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και σταγόνων HCl 1,0 M.

5.7.6. Διαλύματα έκλουσης των εκχυλίσμων στερεής φάσης

Τα διαλύματα έκλουσης των εκχυλίσμων στερεής φάσης που χρησιμοποιήθηκαν, παρασκευάζονταν εντός της ημέρας και ανανεώνονταν κάθε φορά που νέα σειρά δειγμάτων αναλυόταν. Η ποσότητα των διαλυμάτων έκλουσης υπολογιζόταν έτσι ώστε να επαρκεί για ολόκληρη τη σειρά δειγμάτων ανάλυσης. Η παρασκευή όλων των διαλυμάτων έκλουσης γινόταν εντός απαγωγού και λίγο πριν τη χρήση τους για την έκλουση των προς ανάλυση ουσιών. Οι ποσότητες που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά, τροποποιούνταν ανάλογα με τον απαιτούμενο όγκο του διαλύματος έκλουσης για τον εκάστοτε αριθμό δειγμάτων ανάλυσης, με την αναλογία μεταξύ των διαλυτών να παραμένει σταθερή. Τα διαλύματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκχυλίσεις στερεής φάσης είναι τα ακόλουθα και παρασκευάζονταν ως εξής:

- διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη (85:15, v/v): σε 1,5 mL ισοπροπανόλης προσθέτονταν υπό ανάδευση 8,5 mL διχλωρομεθανίου.
- διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85:15:2, v/v/v): σε 1,5 mL ισοπροπανόλης προσθέτονταν υπό ανάδευση αρχικά 200 μ L αμμωνίας και στη συνέχεια 8,5 mL διχλωρομεθανίου.
- διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:οξικό οξύ (85:15:2, v/v/v): σε 1,5 mL ισοπροπανόλης προσθέτονταν υπό ανάδευση αρχικά 200 μ L οξικού οξέος και στη συνέχεια 8,5 mL διχλωρομεθανίου.
- εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (85:15, v/v): σε 1,5 mL οξικού αιθυλεστέρα προσθέτονταν υπό ανάδευση 8,5 mL εξανίου.
- εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας:αμμωνία, (85:15:2, v/v/v): σε 1,5 mL οξικού αιθυλεστέρα προσθέτονταν υπό ανάδευση αρχικά 200 μ L αμμωνίας και στη συνέχεια 8,5 mL εξανίου.
- εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας:οξικό οξύ, (85:15:2, v/v/v): σε 1,5 mL οξικού αιθυλεστέρα προσθέτονταν υπό ανάδευση αρχικά 200 μ L οξικού οξέος και στη συνέχεια 8,5 mL εξανίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

6.1. Βελτιστοποίηση παραγωγοποίησης

Τα δεκατέσσερα αντιεπιληπτικά φάρμακα και οι δύο μεταβολίτες που μελετήθηκαν είναι ουσίες που περιέχουν στο μόριο τους μία ή περισσότερες λειτουργικές ομάδες, όπως αμινομάδα ή καρβοξυλομάδα. Λόγω αυτής της δομής τους, κατά την ανάλυσή τους με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας εμφανίζουν μη οξείες και μη συμμετρικές χρωματογραφικές κορυφές, που έχει ως αποτέλεσμα η μέθοδος να εμφανίζει χαμηλή ευαισθησία, εκλεκτικότητα και ειδικότητα. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε η τεχνική της παραγωγοποίησης των ουσιών αυτών που αποσκοπεί στη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των υπό μελέτη ουσιών, αφού παράλληλα αυξάνεται η πτητικότητα και η θερμοανθεκτικότητά τους. Επιπλέον, με την αλλαγή του μορίου και την αύξηση του μοριακού του βάρους, η θραυσματοποίηση που πραγματοποιείται έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πιο χαρακτηριστικών θραυσμάτων με μεγαλύτερη ιοντική μάζα. Έτσι τελικά, το στάδιο της παραγωγοποίησης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας, της εκλεκτικότητας και της ειδικότητας της μεθόδου.

Στην παρούσα μελέτη δοκιμάστηκε η τεχνική παραγωγοποίησης με τη χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης και ελήφθησαν τα φάσματα μαζών των υπό προσδιορισμό ουσιών, με λειτουργία πλήρης σάρωσης ιόντων σε μια ευρεία περιοχή μαζών (m/z 50 έως 600). Σε κάθε δοκιμασία παραγωγοποίησης, έξι διαφορετικά διαλύματα ποσότητας 50 μL από το διάλυμα Α (συγκέντρωσης 50,0 $\mu\text{g/mL}$ για την κάθε ουσία) εξατμίζονταν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου. Γινόταν προσθήκη του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης και τα δείγματα παρέμεναν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ή σε αμμόλουτρο ρυθμισμένο στους 70°C. Τα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης που δοκιμάστηκαν και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. 50 μL πενταφθοροπροπιονικού ανυδρίτη (PFPA),
2. 30 μL N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλ)-τριφθοροακεταμιδίου (BSTFA) με 1% τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (TMCS) σε 30 μL ακετονιτρίλιο,
3. 30 μL N-μεθυλ-N-τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλ-τριφθοροακεταμιδίου (MTBSTFA) με 1% τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο (TBDMSCl) σε 30 μL ακετονιτρίλιο,

4. 50 μ L επταφθοροβουτυρικού ανυδρίτη 99% (HFBA),
5. 50 μ L τριφθοροξικού ανυδρίτη (TFAA),
6. μίγμα 30 μ L οξικού ανυδρίτη και 30 μ L πυριδίνης.

Στις περιπτώσεις 2 και 3 γινόταν απευθείας έγχυση του δείγματος (όγκου 1 μ L) στο χρωματογραφικό σύστημα μετά την αντίδραση παραγωγοποίησης, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις (1, 4-6) τα δείγματα εξατμίζονταν μέχρι ξηρού, ακολουθούσε ανασύσταση με 50 μ L οξικού αιθυλεστέρα και έγχυση 1 μ L του δείγματος στο χρωματογραφικό σύστημα.

Η επιλογή της τεχνικής της παραγωγοποίησης πραγματοποιήθηκε με κριτήρια την παραγωγοποίηση της πλειοψηφίας του συνόλου των υπό μελέτη αντιεπιληπτικών φαρμάκων, τη βελτίωση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των υπό προσδιορισμό ουσιών με μείωση της εμφάνισης «ουράς» στη χρωματογραφική κορυφή (tailing) και την αύξηση της ευαισθησίας των μεθόδων προσδιορισμού.

Η ακετυλίωση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων χρησιμοποιώντας μίγμα οξικού ανυδρίτη και πυριδίνης δεν πραγματοποιήθηκε σε πολλά από τα υπό εξέταση αντιεπιληπτικά σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν και γι αυτό απορρίφθηκε. Συγκεκριμένα, η αιθοσουξιμίδη, το βαλπροϊκό οξύ, η καρβαμαζεπίνη, η λεβετιρακετάμη και η φαινοβαρβιτάλη δεν παραγωγοποιούνται χρησιμοποιώντας μίγμα οξικού ανυδρίτη και πυριδίνης.

Η ακυλίωση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων με τη χρήση TFAA σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν επίσης απορρίφθηκε επειδή ακόμη και για τα αντιεπιληπτικά που παραγωγοποιούνταν με αυτό τον τρόπο, είχε πολύ μικρή απόδοση (<20%) και μεγάλη ποσότητα των ουσιών παρέμενε απαραγωγοποίητη, όπως η βιγκαπατρίνη, η γκαμπαπεντίνη, η καρβαμαζεπίνη και η οξυκαρβαζεπίνη.

Η ακυλίωση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων χρησιμοποιώντας PFPA ή HFBA σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν κρίθηκε ακατάλληλη επειδή ορισμένα αντιεπιληπτικά (αιθοσουξιμίδη, βαλπροϊκό οξύ, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινυτοΐνη) είτε δεν παραγωγοποιούνταν καθόλου, είτε η απόδοση της αντίδρασης ήταν χαμηλή <50% (γκαμπαπεντίνη, λαμοτριγίνη).

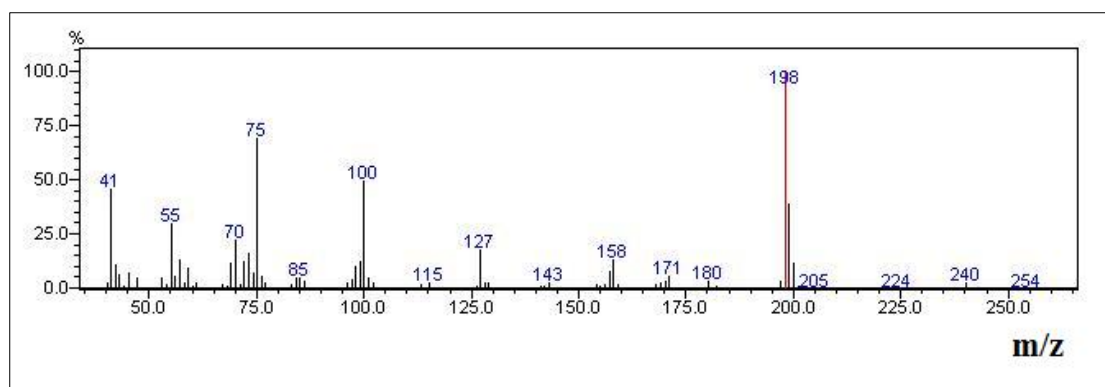
Η σιλανοποίηση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων και με τα δύο αντιδραστήρια που δοκιμάστηκαν (BSTFA με 1% TMCS και MTBSTFA με 1% TBDMSCI) παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα λόγω βελτίωσης της χρωματογραφικής συμπεριφοράς όλων των αντιεπιληπτικών και της αύξησης της ευαισθησίας της μεθόδου. Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως η σιλανοποίηση είναι περισσότερο

αποτελεσματική για τα υπό μελέτη αντιεπιληπτικά φάρμακα όταν πραγματοποιείται στους 70°C για 30 λεπτά και χρησιμοποιείται MTBSTFA με 1% TBDMSCl αντί BSTFA με 1% TMCS, καθότι οδηγούσε σε χαμηλότερα επίπεδα ανίχνευσης για τα περισσότερα αντιεπιληπτικά φάρμακα, όπως η αιθοσουξιμίδη, η βιγκαμπατρίνη, η καρβαμαζεπίνη, η λακοσαμίδη, η λαμοτριγίνη, η λεβετιρακετάμη, η οξυκαρβαζεπίνη, η πρεγκαμπαλίνη, η φαινοβαρβιτάλη και η φαινυτοΐνη. Έτσι, ως βέλτιστο αντιδραστήριο παραγωγοποίησης επιλέχθηκε το MTBSTFA με 1% TBDMSCl. Γι αυτό τον τρόπο παραγωγοποίησης δοκιμάστηκαν επιπλέον διαφορετικές θερμοκρασίες (25, 50, 70 και 90°C) και χρόνοι αντίδρασης (10, 20, 30, 40 και 60 λεπτά) και οι βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης βρέθηκαν ότι ήταν στους 70°C για 30 λεπτά. Χαμηλότερες τιμές από τις βέλτιστες συνθήκες για τη θερμοκρασία και το χρόνο της αντίδρασης είχαν ως αποτέλεσμα μείωση της απόδοσης της αντίδρασης σιλιανοποίησης, ενώ υψηλότερες τιμές δεν προσέφεραν κάποια επιπλέον βελτίωση.

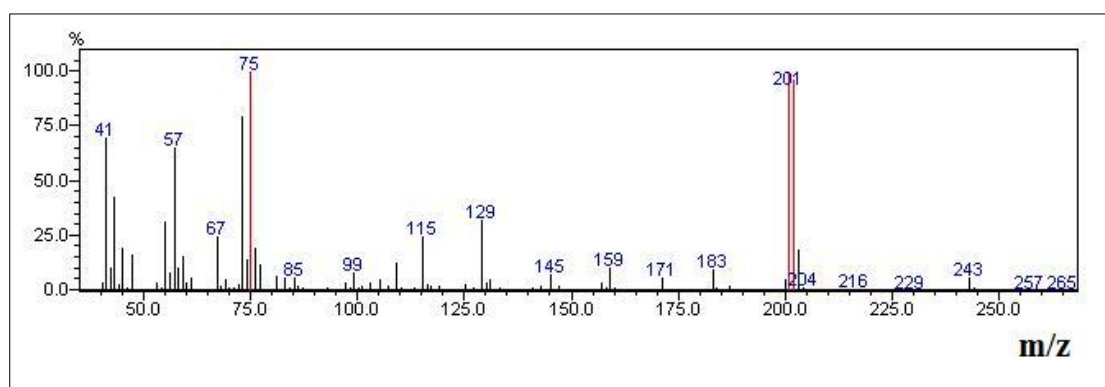
Τα φάσματα μαζών των δεκατεσσάρων αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών που μελετήθηκαν και που ελήφθησαν με ιοντισμό πρόσκρουσης ηλεκτρονίων μετά από την αντίδραση σιλιανοποίησης με MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε περιβάλλον ακετονιτριλίου, παρουσιάζονται στα Σχήματα 6.1 έως 6.16, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, όλες οι δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν με παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Selected Ion Monitoring, SIM) με επιλογή τριών θραυσμάτων ιόντων από τα φάσματα μαζών των σιλιανοποιημένων αυτών ουσιών, ώστε να εξασφαλίζεται καλύτερη ευαισθησία, ειδικότητα και εκλεκτικότητα των μεθόδων που αναπτύχθηκαν. Τα τρία θραύσματα ιόντων των σιλιανοποιημένων παραγώγων που επιλέχθηκαν για την ταυτοποίηση των υπό μελέτη αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των μεταβολιτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1. Τα θραύσματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό του κάθε αναλύτη έχουν έντονα σημειωθεί στον Πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1. Τα επιλεγμένα θραύσματα ιόντων των σιλανοποιημένων παραγώγων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της κάθε ουσίας.

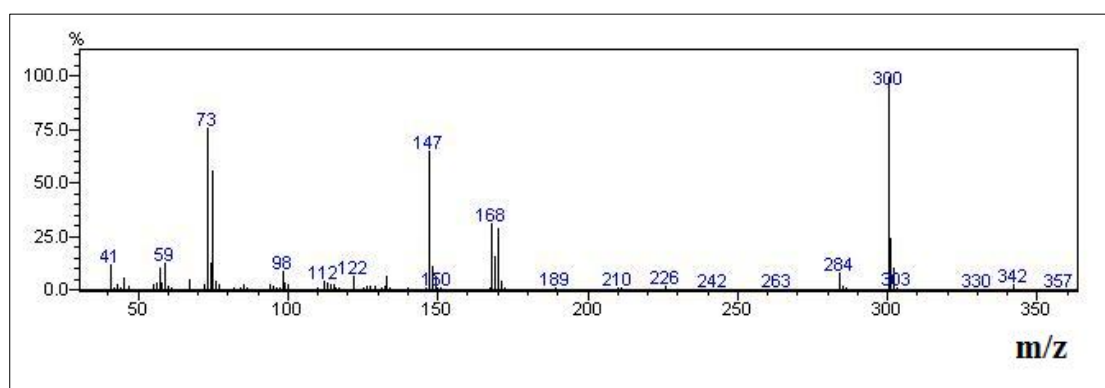
Αναλύτης	Θραύσματα ιόντων
αιθοσουξιμίδη-BD	198 , 100, 127
βαλπροϊκό οξύ-BD	201 , 129, 183
βιγκαμπατρίνη-BD	300 , 147, 168
γκαμπαπεντίνη-BD (artifact)	210 , 138, 254
καρβαμαζεπίνη-BD	193 , 165, 250
10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη- BD	193 , 323, 256
λακοσαμίδη-BD	91 , 248, 421
λαμοτριγίνη-BD	426 , 199, 172
λεβετιρακετάμη-BD	126 , 112, 227
οξυκαρβαζεπίνη-BD	323 , 266, 180
10-υδροξυ-καρβαζεπίνη-BD	194 , 268, 250
πρεγκαμπαλίνη-BD	330 , 147, 198
τιαγκαμπίνη-BD	256 , 111, 432
τοπιραμάτη-BD	438 , 243, 259
φαινοβαρβιτάλη-BD	403 , 100, 445
φαινυτοΐνη-BD	423 , 266, 165
λεβετιρακετάμη-d6-BD	132 , 115, 233
γκαμπαπεντίνη-d10-BD (artifact)	220 , 148, 264



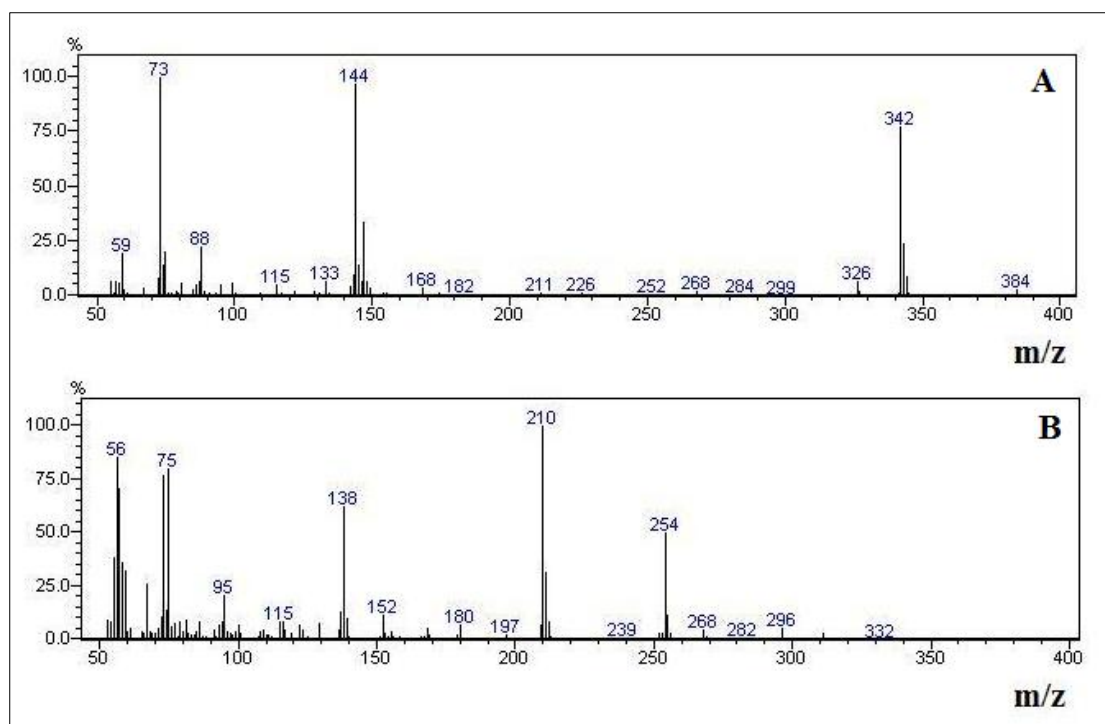
Σχήμα 6.1. Φάσμα μαζών της αιθοσουξιμίδης-BD.



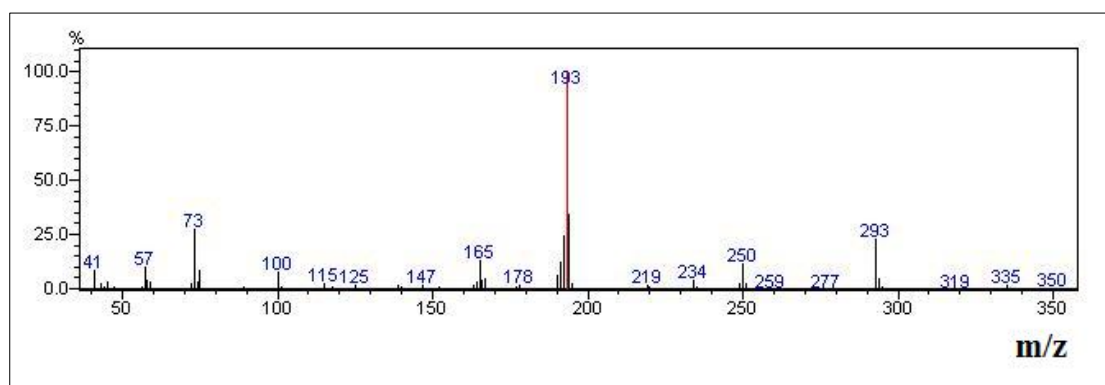
Σχήμα 6.2. Φάσμα μαζών του βαλπροϊκού οξέος-BD.



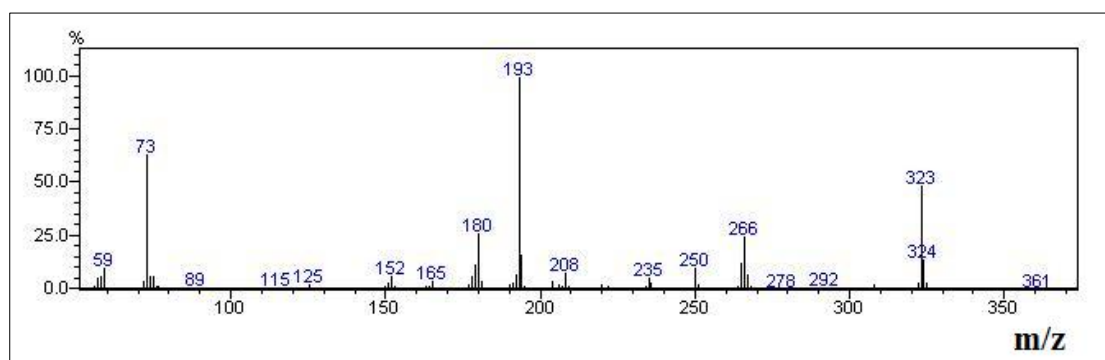
Σχήμα 6.3. Φάσμα μαζών της βιγκαπατρίνης-BD.



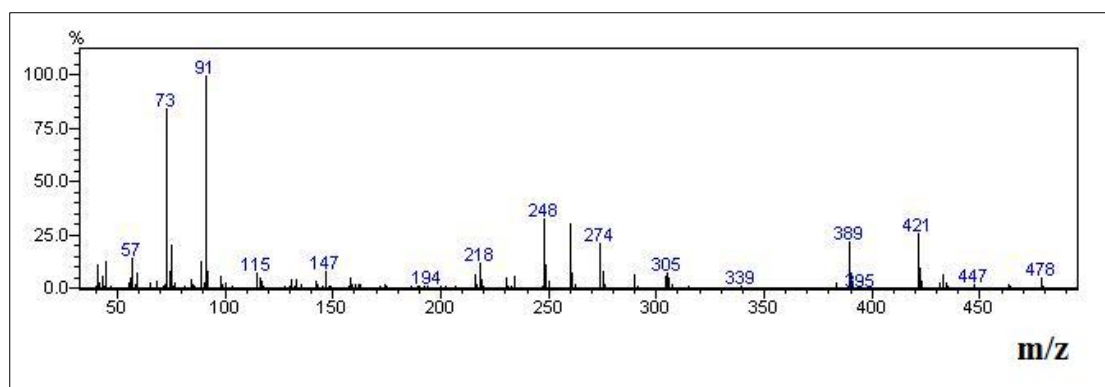
Σχήμα 6.4. Φάσμα μαζών Α) της γκαμπαπεντίνης-BD και Β) της γκαμπαπεντίνης-BD (artifact).



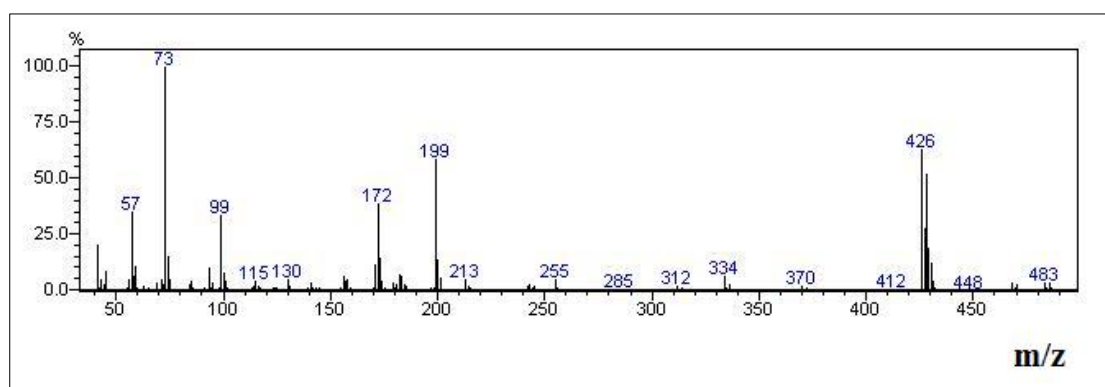
Σχήμα 6.5. Φάσμα μαζών της καρβαμαζεπίνης-BD.



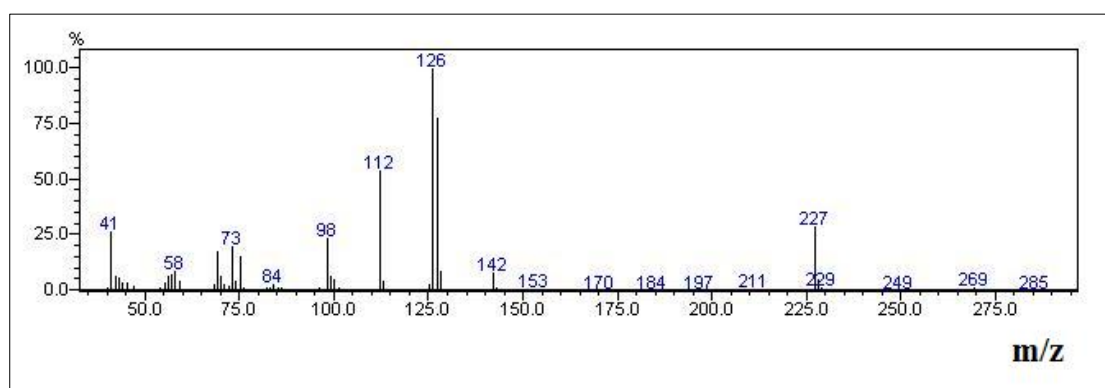
Σχήμα 6.6. Φάσμα μαζών της 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνης-BD.



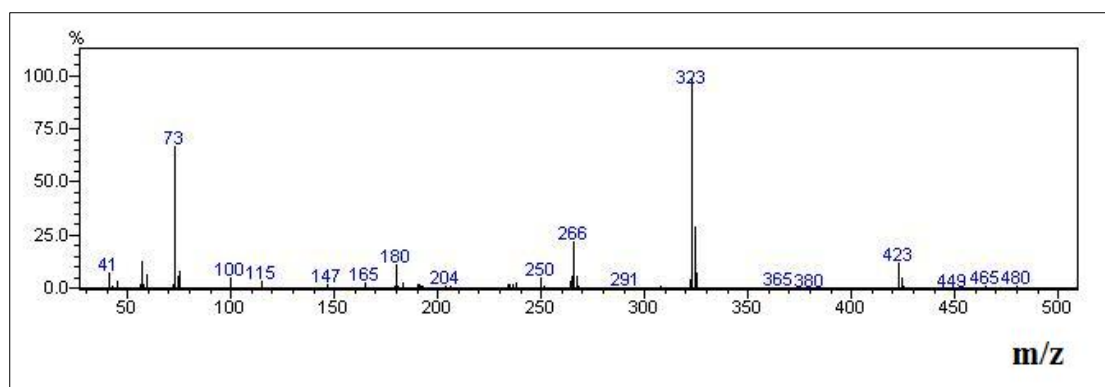
Σχήμα 6.7. Φάσμα μαζών της λακοσαμίδης-BD.



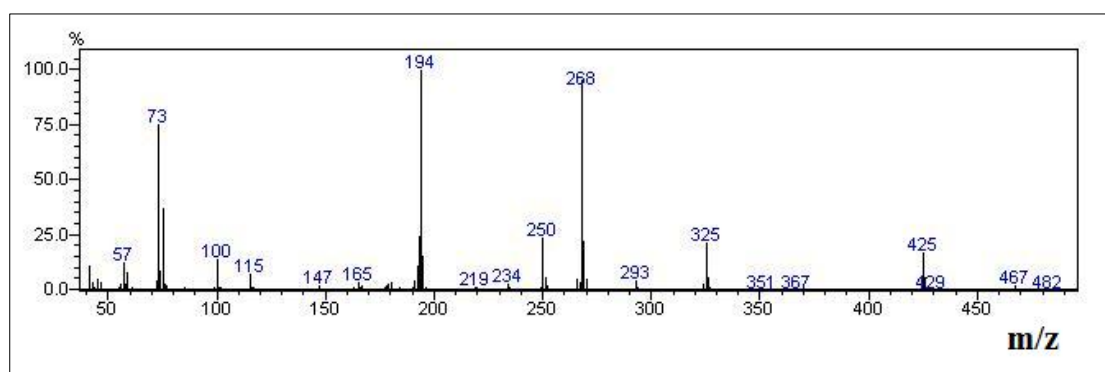
Σχήμα 6.8. Φάσμα μαζών της λαμοτριγίνης-BD.



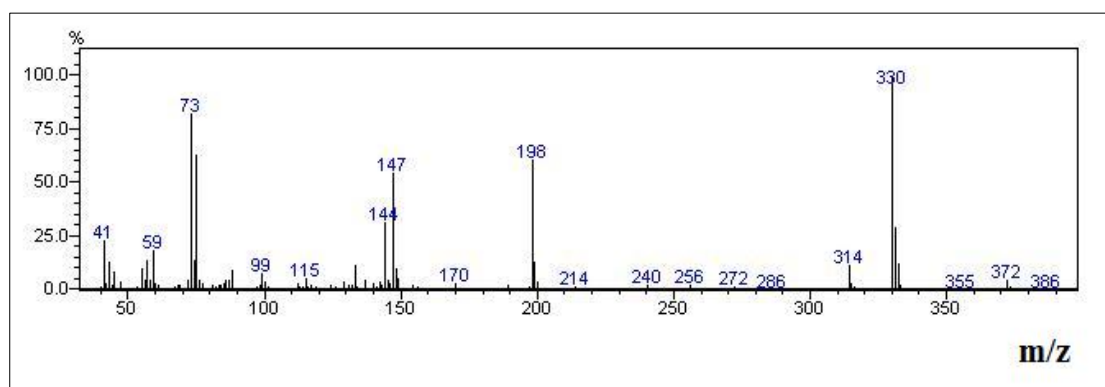
Σχήμα 6.9. Φάσμα μαζών της λεβετιρακετάμης-BD.



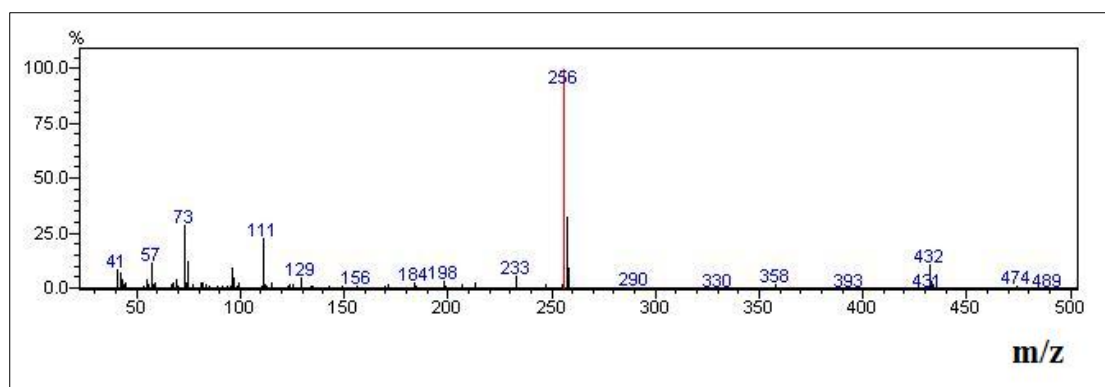
Σχήμα 6.10. Φάσμα μαζών της οξυκαρβαζεπίνης-BD.



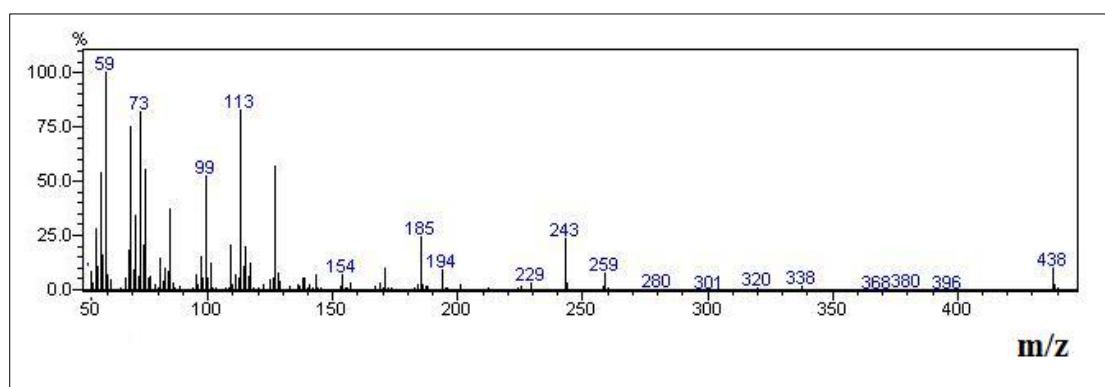
Σχήμα 6.11. Φάσμα μαζών της 10-υδροξυ-καρβαζεπίνης-BD.



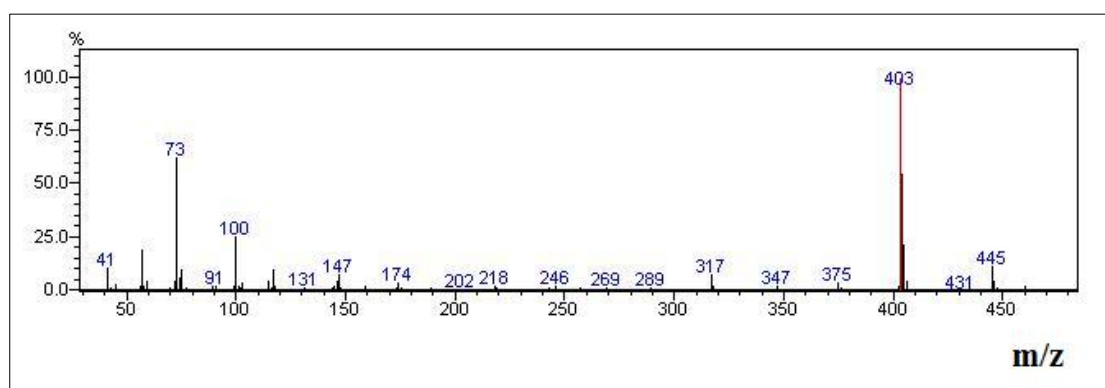
Σχήμα 6.12. Φάσμα μαζών της πρεγκαμπαλίνης-BD.



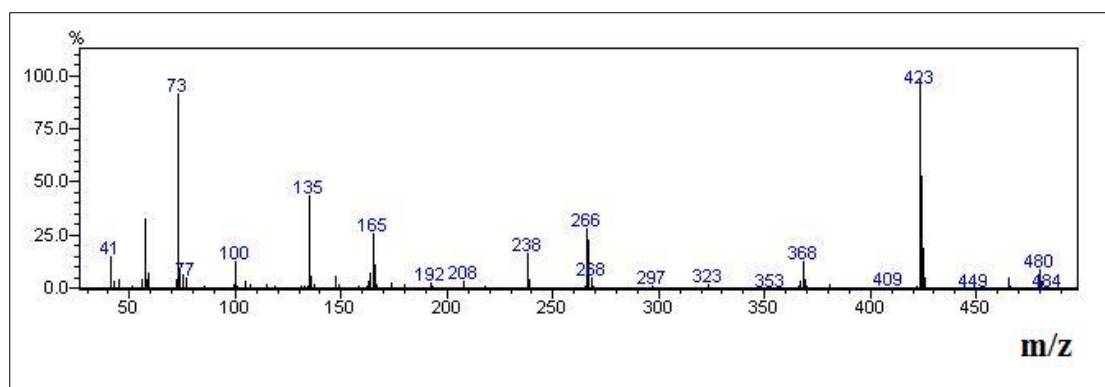
Σχήμα 6.13. Φάσμα μαζών της τιαγκαμπίνης-BD.



Σχήμα 6.14. Φάσμα μαζών της τοπιραμάτης-BD.



Σχήμα 6.15. Φάσμα μαζών της φαινοβαρβιτάλης-BD.



Σχήμα 6.16. Φάσμα μαζών της φαινυτοΐνης-BD.

6.2. Βελτιστοποίηση χρωματογραφικών συνθηκών

Κατά το στάδιο της ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της αναλυτικής τεχνικής για τον προσδιορισμό των δεκατεσσάρων αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών, χρησιμοποιήθηκε το μικτό μεθανολικό διάλυμα εργασίας Α, συγκέντρωσης 50,0 $\mu\text{g/mL}$ για την κάθε ουσία. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες προκειμένου να επιλεγούν οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.

Οι χρωματογραφικές συνθήκες που δύναται να επηρεάσουν τα αποτελέσματα μιας αέριας χρωματογραφικής ανάλυσης είναι η θερμοκρασία του σημείου έγχυσης και του ανιχνευτή, το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης (αρχική, ενδιάμεση και τελική θερμοκρασία, ο ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας) και η ροή του φέροντος αερίου. Η θερμοκρασία του σημείου έγχυσης πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε να γίνει άμεσα και πλήρως η εξάτμιση του δείγματος, αλλά όχι τόσο υψηλή που να προκαλέσει διάσπαση των υπό προσδιορισμό ουσιών που είναι θερμοευαίσθητες. Η βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας του ανιχνευτή, του θερμοκρασιακού προγράμματος της στήλης και της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου αποσκοπεί στην εξάλειψη τυχόν παρεμβολών στη γραμμή βάσης του χρωματογραφήματος και στη βελτίωση της μορφής των χρωματογραφικών κορυφών, με αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας, της εκλεκτικότητας και της ειδικότητας της μεθόδου. Για όλες τις παραπάνω χρωματογραφικές συνθήκες πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστές δοκιμασίες, διατηρώντας κάθε φορά τη βέλτιστη τιμή της προηγούμενης δοκιμασίας που προσδιορίστηκε, με κριτήριο το εμβαδόν των κορυφών των σιλανοποιημένων αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Σε κάθε δοκιμασία, έξι διαφορετικά διαλύματα όγκου 50

μL από το διάλυμα A (50,0 μg/mL), εξατμίζονταν μέχρι ξηρού, παραγωγοποιούνταν με 30 μL MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε περιβάλλον ακετονιτριλίου (30 μL) και γινόταν έγχυση 1 μL στο χρωματογραφικό σύστημα.

Οι τιμές που δοκιμάστηκαν για την κάθε παράμετρο παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2. Από τις δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν με χρήση σιλιανοποιημένων παραγώγων των υπό προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων για την επιλογή των χρωματογραφικών συνθηκών της μεθόδου προσδιορισμού των δεκατεσσάρων αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών, διαπιστώθηκε ότι οι βέλτιστες συνθήκες ήταν αυτές που παρουσιάζονται με έντονα γράμματα στον Πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2. Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου προσδιορισμού των δεκαέξι αναλυτών.

Χρωματογραφικές συνθήκες	
Θερμοκρασία σημείου έγχυσης	200, 220, 240 , 260, 280 °C
Θερμοκρασία ανιχνευτή	280, 290, 300 , 310, 320 °C
Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου	0,6 / 0,8 / 1,0 / 1,2 mL/min
Αρχική θερμοκρασία στήλης (παραμονή)	60, 70 ,80, 90, 100 °C (1 min)
Αρχικός ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας στήλης	10 , 20, 30, 40 °C/min
Ενδιάμεση θερμοκρασία στήλης (παραμονή)	100, 120 , 140 °C (0 min)
Τελικός ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας στήλης	10, 20, 30, 40 °C/min
Τελική θερμοκρασία στήλης (παραμονή)	280, 290, 300 , 310, 320 °C (7 min)

Οι παραπάνω χρωματογραφικές συνθήκες της μεθόδου προσδιορισμού των δεκατεσσάρων αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών, που επιλέχθηκαν ως βέλτιστες σε αυτό το στάδιο, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των κατεργασμένων βιολογικών δειγμάτων κατά τη διάρκεια της περαιτέρω ανάπτυξης, βελτιστοποίησης και επικύρωσης των μεθόδων προσδιορισμού τους σε ολικό αίμα και πλάσμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Στην ανάλυση βιολογικών υλικών το στάδιο της προκατεργασίας του βιολογικού δείγματος και της απομόνωσης των υπό προσδιορισμό ουσιών, είναι καθοριστικής και υψίστης σημασίας. Η επιτυχία της εφαρμογής μιας αναλυτικής μεθόδου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αποτελεσματικότητα της προκατεργασίας του δείγματος, όσον αφορά το διαχωρισμό των αναλυτών από τα ενδογενή συστατικά του βιολογικού υλικού.

Τα δεκατέσσερα αντιεπιληπτικά φάρμακα και οι δύο μεταβολίτες που μελετήθηκαν σε αυτή τη διατριβή είναι ουσίες που έχουν διαφορετική χημική συμπεριφορά. Ανάλογα με τις λειτουργικές ομάδες που περιέχουν στο μόριό τους διαχωρίστηκαν σε ουσίες που εμφανίζουν:

- αλκαλικές ιδιότητες (αλκαλικά αντιεπιληπτικά), δηλαδή φάρμακα που περιέχουν μία ή περισσότερες αμινομάδες (αιθοσουξιμίδη, καρβαμαζεπίνη, 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινυτοΐνη) στο μόριό τους,
- όξινες ιδιότητες (όξινα αντιεπιληπτικά), δηλαδή φάρμακα που περιέχουν μία καρβοξυλομάδα (βαλπροϊκό οξύ και τιαγκαμπίνη) στο μόριό τους, και
- επαμφοτερίζουσες ιδιότητες (επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά), δηλαδή φάρμακα που περιέχουν μία αμινομάδα και μία καρβοξυλομάδα (βιγκαπατρίνη, γκαμπαπεντίνη και πρεγκαμπαλίνη) στο μόριό τους.

Εξαιτίας της διαφορετικής χημικής συμπεριφοράς των υπό μελέτη αντιεπιληπτικών φαρμάκων επιλέχθηκε να αναπτυχθούν δύο μέθοδοι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό όσο το δυνατόν περισσότερων αντιεπιληπτικών σε ολικό αίμα και πλάσμα. Έτσι, αναπτύχθηκε μία μέθοδος για τα εννιά αλκαλικά αντιεπιληπτικά και τους δύο μεταβολίτες, και μία μέθοδος για τα δύο όξινα και τρία επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά.

Σε όλες τις δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν για την προκατεργασία των βιολογικών δειγμάτων γινόταν αρχικά καταβύθιση των πρωτεϊνών. Ο σκοπός της καταβύθισης είναι η αποδέσμευση των αντιεπιληπτικών φαρμάκων που συνδέονται

με τις πρωτεΐνες, και η απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το δείγμα. Το στάδιο της καταβύθισης των πρωτεϊνών προηγείται της εκχύλισης και είναι ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού του βιολογικού δείγματος κατά το οποίο απομακρύνονται ενδογενή συστατικά του, όπως είναι οι πρωτεΐνες [Castel-Branco και συν., 2001; Gambelunghe και συν., 2005; Lehner και συν., 2007]. Ως μέσο καταβύθισης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το ακετονιτρίλιο που αποτελεί το συνηθέστερο μέσο σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία σε μεθόδους προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε βιολογικά υγρά [Chollet και συν., 2000; Ifa και συν., 2001; Krivanek και συν., 2003; Berry και Millington, 2005; Borrey και συν., 2005; Contin και συν., 2005; Gambelunghe και συν., 2005; Martens-Lobenhoffer και Bode-Boger, 2005; Bahrami και Mohammadi, 2006; Chung και συν., 2006; Ji και συν., 2006; Ramakrishna και συν., 2006; Franco και συν., 2007; Guo και συν., 2007; Jalalizadeh και συν., 2007; Lehner και συν., 2007; Park και συν., 2007; Oertel και συν., 2009; Wattananat και Akarawut, 2009; Mendu και Soldin, 2010; Antonilli και συν., 2011; Kim και συν., 2011; Liu και συν., 2011; Kim και συν., 2012; Lionetto και συν., 2012; Martinez και συν., 2012].

7.1. Επιλογή εσωτερικών προτύπων

Στο πλαίσιο της ανάπτυξης και βελτιστοποίησης μιας μεθόδου προσδιορισμού περιλαμβάνεται και η επιλογή του κατάλληλου εσωτερικού προτύπου. Στις αναπτυχθείσες μεθόδους προσδιορισμού των δεκατεσσάρων αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών, υπήρχε η δυνατότητα λόγω του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή (φασματογράφος μαζών) να χρησιμοποιηθούν ως εσωτερικά πρότυπα δευτεριωμένες ουσίες ορισμένων ουσιών. Τα δευτεριωμένα παράγωγα των αναλυτών αποτελούν τα εσωτερικά πρότυπα επιλογής των μεθόδων προσδιορισμού τους, αφού διαφέρουν μόνο ως προς το μοριακό βάρος με την προσδιοριζόμενη ουσία, παρουσιάζουν την ίδια χημική συμπεριφορά με αυτή, με αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση των χαρακτηριστικών της μεθόδου, ενώ δεν μπορεί να περιέχονται σε πραγματικό βιολογικό δείγμα.

Εμπορικά υπήρχαν διαθέσιμα δευτεριωμένα παράγωγα συγκεκριμένων αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Λόγω του αρκετά υψηλού κόστους των δευτεριωμένων ουσιών, επιλέχθηκε η προμήθεια ενός μόνο δευτεριωμένου παραγώγου για την κάθε μέθοδο που αναπτύχθηκε. Για τη μέθοδο προσδιορισμού των αλκαλικών

αντιεπιληπτικών φαρμάκων επιλέχθηκε η λεβετιρακετάμη-d6, ενώ για τη μέθοδο προσδιορισμού των όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων χρησιμοποιήθηκε η γκαμπαπεντίνη-d10.

7.2. Δοκιμασίες ανάπτυξης της προκατεργασίας δειγμάτων ολικού αίματος

Στο στάδιο της ανάπτυξης των μεθόδων προσδιορισμού των αντιεπιληπτικών φαρμάκων πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες προκατεργασίας μόνο σε εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα ολικού αίματος και όχι πλάσματος, επειδή τα ενδογενή συστατικά του πλάσματος περιέχονται στο ολικό αίμα και μάλιστα το ολικό αίμα αποτελεί σαφώς πιο δύσκολο βιολογικό υπόστρωμα κατά την κατεργασία και την απομόνωση των υπό προσδιορισμό ουσιών από ότι το πλάσμα. Στο στάδιο αυτό της ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της προκατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων, βασικά κριτήρια ήταν η επιτυχής απομόνωση των αναλυτών και ο επιτυχής διαχωρισμός τους από τα ενδογενή συστατικά των υπό ανάλυση βιολογικών υλικών, με σκοπό καθαρότερα δείγματα έγχυσης στο χρωματογραφικό σύστημα. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες υγρό-υγρό εκχύλισης με χρήση οργανικών διαλυτών ή μιγμάτων τους, καθώς και εκχύλισης στερεής φάσης σε εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα ολικού αίματος.

Σε όλες τις δοκιμασίες ανάπτυξης της προκατεργασίας των δειγμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε αυτό το στάδιο, παρασκευάζονταν έξι εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα ολικού αίματος συγκέντρωσης 5,0 $\mu\text{g/mL}$ για όλα τα υπό προσδιορισμό αντιεπιληπτικά φάρμακα. Τα εμβολιασμένα δείγματα αίματος παρασκευάστηκαν με την προσθήκη 20 μL μικτού μεθανολικού διαλύματος εργασίας συγκέντρωσης 50,0 $\mu\text{g/mL}$ (διάλυμα A_1 για τα αλκαλικά και διάλυμα A_2 για τα όξινα και επαμφοτεριζόντα αντιεπιληπτικά) σε 200 μL ολικού αίματος. Γινόταν καταβύθιση πρωτεϊνών με προσθήκη 600 μL ακετονιτριλίου υπό ανάδευση, φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 λεπτά, παραλαβή της υπερκείμενης οργανικής στοιβάδας και εξάτμισή της υπό ρεύμα αζώτου μέχρι όγκου περίπου 200 μL . Στη συνέχεια, ρυθμιζόταν το pH του κάθε δείγματος ανάλογα με τον τρόπο εκχύλισης που θα εφαρμοζόταν, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος ή σταγόνων οξέος ή βάσεως, ακολουθούσε η προκατεργασία των βιολογικών δειγμάτων, γινόταν παραγωγοποίηση των αναλυτών με 30 μL MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε 30 μL ακετονιτριλίου στους 70 °C για 30 λεπτά και έγχυση 1 μL

στο χρωματογραφικό σύστημα. Παράλληλα, γινόταν εξάτμιση 20 μL από τα μικτά μεθανολικά διαλύματα A_1 και A_2 , και παραγωγοποίηση στις ίδιες συνθήκες. Τα πρότυπα αυτά παραγωγοποιημένα διαλύματα εγχέονταν απευθείας στο σύστημα GC/MS και χρησιμοποιούνταν για τον υπολογισμό της απόλυτης ανάκτησης.

Κριτήριο για την αξιολόγηση των τεχνικών προκατεργασίας που δοκιμάστηκαν στα δείγματα ολικού αίματος, αποτελούσε η απόλυτη ανάκτηση της μεθόδου για τον κάθε παραγωγοποιημένο αναλύτη. Ο υπολογισμός της απόλυτης ανάκτησης έγινε με βάση την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$\% \text{ Απόλυτη Ανάκτηση} = \frac{E_1}{E_2} \times 100$$

όπου:

E_1 είναι το εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε παραγωγοποιημένου αναλύτη μετά από την εκχύλιση του βιολογικού δείγματος και

E_2 είναι το εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε παραγωγοποιημένου αναλύτη, μετά από απευθείας έγχυση του παραγωγοποιημένου μικτού διαλύματος.

7.2.1. Υγρό-υγρό εκχύλιση εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος

Οι διαλύτες και τα μίγματα διαλυτών επιλέχθηκαν με βάση άρθρα της διεθνούς βιβλιογραφίας [Fraser και συν., 1995; Forssblad και συν., 1996; Barbosa και Midio, 2000; Castel-Branco και συν., 2001; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Hotha και συν., 2012; Kostic και συν., 2013] και μεθόδους που ήδη χρησιμοποιούνται στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας. Έτσι, δοκιμάστηκαν υγρό-υγρό εκχυλίσες με:

- οξικό αιθυλεστέρα
- διχλωρομεθάνιο
- εξάνιο:διχλωρομεθάνιο (3:1, v/v), (μίγμα 1)
- εξάνιο:οξικό αιθυλεστέρα (3:1, v/v), (μίγμα 2)
- εξάνιο:διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη (6:3:1, v/v/v), (μίγμα 3)
- εξάνιο:οξικό αιθυλεστέρα:ισοπροπανόλη (6:3:1, v/v/v), (μίγμα 4).

Επίσης, δοκιμάστηκαν οι στήλες Chem Elut, που αποτελούν μια εναλλακτική μορφή υγρό-υγρό εκχύλισης, με μίγμα διαλυτών έκλουσης διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη (9:1, v/v).

Κατά την εκχύλιση μίας ουσίας, αυτή θα πρέπει να βρίσκεται σε μη ιοντισμένη μορφή ώστε να απομονωθεί στην οργανική φάση, οπότε πρέπει το pH του δείγματος πριν την υγρό-υγρό εκχύλιση να ρυθμιστεί ανάλογα με την τιμή του pK_a της κάθε ουσίας. Τα υπό μελέτη αντιεπιληπτικά φάρμακα έχουν α) τιμές pK_a μεγαλύτερες από 7 (αλκαλικά αντιεπιληπτικά), β) δύο τιμές pK_a (επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά) μία μικρότερη και μία μεγαλύτερη από 7, και γ) τιμές pK_a μικρότερη από 7 (όξινα αντιεπιληπτικά).

Στις δοκιμασίες υγρό-υγρό εκχύλισης με διαλύτες και μίγματα διαλυτών, το pH του δείγματος (μετά τη διαδικασία καταβύθισης πρωτεϊνών) ρυθμιζόταν με προσθήκη 1-2 σταγόνων διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 1,0 M για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα και υδροχλωρικού οξέος 1,0 M για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά. Στη συνέχεια, προσθέτονταν υπό ανάδευση σε ατομικό αναδευτήρα περιδίνησης 1,0 mL από τον κάθε διαλύτη ή το μίγμα διαλυτών και συνεχιζόταν η ανάδευση για περίπου 5 λεπτά. Η ποσότητα όγκου του διαλύτη των υγρό-υγρό εκχυλίσεων επιλέχθηκε ώστε η οργανική στοιβάδα να είναι πενταπλάσια του όγκου του αίματος και να επιτυγχάνεται η βέλτιστη μεταφορά και απομόνωση των αναλυτών σε αυτήν. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 10 λεπτά για να γίνει διαχωρισμός των στοιβάδων, παραλαβή της οργανικής στοιβάδας, εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου, μέσα σε αμμόλουτρο που ήταν ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 40 °C, ανασύσταση των αναλυτών με 30 μ L ακετονιτριλίου και παραγωγοποίησή τους με 30 μ L MTBSTFA με 1% TBDMSCl στους 70 °C για 30 λεπτά.

Στη δοκιμασία υγρό-υγρό εκχύλισης με στήλες Chem Elut, 4,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος προσθέτονταν στο καταβυθισμένο δείγμα, γινόταν φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 5 λεπτά και εφαρμογή των δειγμάτων στη στήλη. Για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 9,0 (0,5 M), ενώ για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,0 (0,1 M). Μετά την πάροδο 5 λεπτών, πραγματοποιούνταν εις διπλούν έκλουση των αναλυτών με προσθήκη 6 + 6 mL μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη (9:1, v/v). Τέλος, γινόταν εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου, ανασύσταση των αναλυτών με 30 μ L ακετονιτριλίου και παραγωγοποίησή τους με 30 μ L MTBSTFA με 1% TBDMSCl στους 70 °C για 30 λεπτά.

Τα % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης των μεθόδων για τα δεκατέσσερα αντιεπιληπτικά φάρμακα και τους δύο μεταβολίτες με εφαρμογή υγρό-υγρό εκχύλισης σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1. % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης για τα δεκατέσσερα αντιεπιληπτικά φάρμακα και τους δύο μεταβολίτες με την τεχνική εκχύλισης υγρο-υγρό σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος.

Αλκαλικά Αντιεπιληπτικά Φάρμακα								
	οξικός αιθυλεστέρας	διγλωρομεθάνιο	εξάνιο: διγλωρομεθάνιο (3:1, v/v)	εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας (3:1, v/v)	διγλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη (9:1, v/v)	εξάνιο: διγλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη (6:3:1, v/v/v)	εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας: ισοπροπανόλη (6:3:1, v/v/v)	
αιθοσουξίμide	75	61	50	40	69	45	77	
λακοσαμίde	68	55	62	32	70	71	75	
λαμοτριγίνη	75	52	37	41	78	70	77	
λεβετιρακετάμη	50	58	34	45	73	47	65	
καρβαμαζεπίνη	80	89	79	83	97	93	92	
10,11-εποξειδιο- καρβαμαζεπίνη	83	82	75	85	70	85	74	
οξυκαρβαζεπίνη	72	75	78	81	82	83	86	
10-υδροξυ- καρβαζεπίνη	66	69	71	68	71	70	75	
τοπιραμάτη	61	58	67	63	73	71	75	
φαινοβαρβιτάλη	96	86	88	79	132	93	81	

φαινοτόπνη	47	60	51	57	63	54	62
Όξινα και Επαμφοτερίζοντα Αντιεπιληπτικά Φάρμακα							
	οξικός αιθυλεστέρας	διγλωρομεθάνιο	εξάνιο: διγλωρομεθάνιο (3:1, v/v)	εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας (3:1, v/v)	διγλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη (9:1, v/v)	εξάνιο: διγλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη (6:3:1, v/v/v)	εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας: ισοπροπανόλη (6:3:1, v/v/v)
βιγκαμπατρίνη	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
γκαμπαπεντίνη	13	<10	<10	<10	27	15	18
πρεγκαμπαλίνη	58	32	27	40	54	31	45
βαλπροϊκό οξύ	51	32	26	37	46	55	57
τιαγκαμπίνη	75	58	55	46	83	61	77

7.2.2. Εκχύλιση στερεής φάσης εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος

Οι στήλες εκχύλισης στερεής φάσης που δοκιμάστηκαν, με βάση τη σχετική διεθνή βιβλιογραφία [Vermeij και Edelbroek, 1994; Wolf και συν., 1996; Lensmeyer και συν., 1997; Van Lente και Gatautis, 1998; Kushnir και συν., 1999; Isoherranen και συν., 2000; Speed και συν., 2000; Torra και συν., 2000; Zhu και Neirinck, 2002; Pucci και συν., 2004; Gambelunghe και συν., 2005; Jain και συν., 2006; Sagirli και συν., 2006; Greiner και Haen και συν., 2007; Pujadas και συν., 2007; Vermeij και Edelbroek, 2007; Matar, 2008; Subramanian και συν., 2008; Brunetto και συν., 2009; Zufia και συν., 2009; Bhatt και συν., 2010; Mercolini και συν., 2010; Zufia και συν., 2010; Tai και συν., 2011; Yu και συν., 2012] και τη διαθεσιμότητά τους, ήταν:

- μικτού τύπου, κατιοανταλλακτικές / μη πολικές στήλες, συγκεκριμένα Bond Elut Certify της εταιρείας Agilent,
- μικτού τύπου, ανιοανταλλακτικές / μη πολικές στήλες, συγκεκριμένα Bond Elut Certify II της εταιρείας Agilent,
- μικτού τύπου, πολικές / μη πολικές στήλες, συγκεκριμένα Absolut Nexus LRC της εταιρείας Agilent, και
- μη πολικές / υδροφοβικές στήλες, συγκεκριμένα HF Bond Elut C18 της εταιρείας Agilent.

Στις δοκιμασίες ανάπτυξης της προκατεργασίας με εκχύλιση στερεής φάσης το pH του δείγματος ρυθμιζόταν με προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος ανάλογα με τις προδιαγραφές χρήσης της κάθε στήλης και τις χημικές ιδιότητες των υπό προσδιορισμό ουσιών, και στη συνέχεια ακολουθούσαν τα υπόλοιπα στάδια.

Στις δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν στήλες εκχύλισης στερεής φάσης τύπου Bond Elut Certify της εταιρείας Agilent, πραγματοποιούνταν τα παρακάτω στάδια:

- προσθήκη 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,1 M) pH 6,0 σε 200 μ L δείγματος (μετά τη διαδικασία καταβύθισης πρωτεϊνών) και φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 5 λεπτά πριν την εφαρμογή του στη στήλη,
- ενεργοποίηση των στηλών με εφαρμογή σε αυτές διαδοχικά, 2 mL μεθανόλης, 2 mL απιοντισμένου νερού και 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6,0,
- εφαρμογή του δείγματος στη στήλη,

- καθαρισμός με διαδοχική εφαρμογή 2 mL απιοντισμένου νερού, 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 4,0 και τέλος 3 mL μεθανόλης,
- εφαρμογή κενού για 10 λεπτά, και
- έκλουση των αναλυτών εις διπλούν με 1,5 + 1,5 mL μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85:15:2, v/v/v) για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα και μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:οξικό οξύ (85:15:2, v/v/v) για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά.

Στις δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν στήλες εκχύλισης στερεής φάσης τύπου Bond Elut Certify II της εταιρείας Agilent, πραγματοποιούνταν τα παρακάτω στάδια:

- προσθήκη 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,1 M) pH 7,0 σε 200 μ L δείγματος (μετά τη διαδικασία καταβύθισης πρωτεϊνών) και φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 5 λεπτά πριν την εφαρμογή του στη στήλη,
- ενεργοποίηση των στηλών με εφαρμογή σε αυτές διαδοχικά, 2 mL μεθανόλης και 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7,0,
- εφαρμογή του δείγματος στη στήλη,
- καθαρισμός με εφαρμογή 2 mL απιοντισμένου νερού,
- εφαρμογή κενού για 1 λεπτό,
- προσθήκη 100 μ L ακετόνης για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά ή 100 μ L εξανίου για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά,
- εφαρμογή κενού για 10 λεπτά, και
- έκλουση των αναλυτών εις διπλούν με 1,5 + 1,5 mL μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85:15:2, v/v/v) για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα και μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:οξικό οξύ (85:15:2, v/v/v) για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά.

Στις δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν στήλες εκχύλισης στερεής φάσης τύπου Absolut Nexus της εταιρείας Agilent, πραγματοποιούνταν τα παρακάτω στάδια:

- προσθήκη 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,1 M) pH 7,0 σε 200 μ L δείγματος (μετά τη διαδικασία καταβύθισης πρωτεϊνών) και φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 5 λεπτά πριν την εφαρμογή του στη στήλη,
- ενεργοποίηση των στηλών με εφαρμογή σε αυτές διαδοχικά, 2 mL μεθανόλης και 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,1 M) pH 7,0,

- εφαρμογή του δείγματος στη στήλη,
- καθαρισμός με εφαρμογή 2 mL απιοντισμένου νερού,
- εφαρμογή κενού για 1 λεπτό,
- προσθήκη 100 μ L ακετόνης για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά ή 100 μ L εξανίου για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά,
- εφαρμογή κενού για 10 λεπτά, και
- έκλουση των αναλυτών εις διπλούν με 1,5 + 1,5 mL μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85:15:2, v/v/v) για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα και μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:οξικό οξύ (85:15:2, v/v/v) για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά.

Στις δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν στήλες εκχύλισης στερεής φάσης τύπου HF Bond Elut C18 της εταιρείας Agilent, πραγματοποιούνταν τα παρακάτω στάδια:

- προσθήκη 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,1 M) pH 6,0 σε 200 μ L δείγματος (μετά τη διαδικασία καταβύθισης πρωτεϊνών) και φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 5 λεπτά πριν την εφαρμογή του στη στήλη,
- ενεργοποίηση των στηλών με εφαρμογή σε αυτές διαδοχικά, 2 mL μεθανόλης και 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0,1 M) pH 6,0,
- εφαρμογή του δείγματος στη στήλη,
- καθαρισμός με εφαρμογή 2 mL απιοντισμένου νερού,
- εφαρμογή κενού για 1 λεπτό,
- προσθήκη 100 μ L ακετόνης για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά ή 100 μ L εξανίου για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά,
- εφαρμογή κενού για 10 λεπτά, και
- έκλουση των αναλυτών εις διπλούν με 1,5 + 1,5 mL μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85:15:2, v/v/v) για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα και μίγματος διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:οξικό οξύ (85:15:2, v/v/v) για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά.

Σε όλες τις δοκιμασίες εκχύλισης στερεής φάσης, ακολουθούσε εξάτμιση των εκλουσμάτων μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου, μέσα σε αμμόλουτρο που ήταν ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 40 °C και παραγωγοποίηση των αναλυτών με τη προσθήκη 30 μ L ακετονιτριλίου και 30 μ L MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε θερμοκρασία 70°C για 30 λεπτά.

Τα % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης των μεθόδων για τα δεκατέσσερα αντιεπιληπτικά φάρμακα και τους δύο μεταβολίτες με εφαρμογή εκχύλισης στερεής φάσης σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2. % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης για τα αντιεπιληπτικά φάρμακα και τους μεταβολίτες με την τεχνική εκχύλισης στερεής φάσης σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος.

Αλκαλικά Αντιεπιληπτικά Φάρμακα					
	Bond Elut LRC Certify	Bond Elut LRC Certify II	HF Bond Elut LRC C18	Absolut Nexus LRC	
αιθοσουξίμηδη	36	25	81	72	
λακοσαμίδη	94	98	105	12	
λαμοτριγίνη	80	82	84	85	
λεβετιρακετάμη	42	47	93	33	
καρβαμαζεπίνη	87	74	90	81	
10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη	84	69	85	78	
οξυκαρβαζεπίνη	85	63	89	82	
10-υδροξυ-καρβαζεπίνη	76	64	87	87	
τοπιραμάτη	78	75	91	71	
φαινοβαρβιτάλη	73	80	81	77	
φαινυτοΐνη	87	98	101	79	
Όξινα και Επαμφοτερίζοντα Αντιεπιληπτικά Φάρμακα					
	Bond Elut LRC Certify	Bond Elut LRC Certify II	HF Bond Elut LRC C18	Absolut Nexus LRC	

βιγκαμπατρίνη	<10		<10	67		<10	
γκαμπαπεντίνη	55		81	73		26	
πρεγκαμπαλίνη	61		71	92		74	
βαλπροϊκό οξύ	22		17	55		53	
τιαγκαμπίνη	36		62	85		75	

7.2.3. Βελτιστοποίηση της προκατεργασίας δειγμάτων ολικού αίματος

Με βάση τα αποτελέσματα απόλυτης ανάκτησης που παρουσιάζονται στους Πίνακες 7.1. και 7.2., επιλέχθηκε η τεχνική της εκχύλισης στερεής φάσης με τις στήλες HF Bond Elut LRC C18 τόσο για τα αλκαλικά όσο και για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά φάρμακα.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της εκχύλισης στερεής φάσης με στήλες HF Bond Elut LRC C18 με δοκιμασίες για την επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται για ρύθμιση του pH και την ενεργοποίηση των στηλών εκχύλισης. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που δοκιμάστηκαν στη μέθοδο των αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων ήταν:

- ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,0 (0,1 M),
- ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,0 (0,1 M), και
- ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 9,0 (0,5 M).

Για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά δοκιμάστηκαν:

- ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,0 (0,1 M),
- ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 4,0 (0,1 M), και
- ρυθμιστικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος / χλωριούχου καλίου pH 1,0.

Με βάση τα αποτελέσματα απόλυτης ανάκτησης που ελήφθησαν, επιλέχθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6,0 (0,1 M) για τη μέθοδο προσδιορισμού των αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα, και το ρυθμιστικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος / χλωριούχου καλίου pH 1,0 για τη μέθοδο προσδιορισμού των όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών σε ολικό αίμα.

Σε όλες τις δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν για την προκατεργασία των δειγμάτων ολικού αίματος, οι τιμές της απόλυτης ανάκτησης του βαλπροϊκού οξέος παρουσίαζαν μεγάλες διακυμάνσεις στα έξι δείγματα της κάθε δοκιμασίας και ήταν παράλληλα χαμηλές (<60%). Αυτό οφείλεται στην πτητικότητα της ουσίας και σε απώλειά της κατά το στάδιο εξάτμισης του δείγματος πριν το στάδιο της παραγωγοποίησης. Για το λόγο αυτό, στη μέθοδο προσδιορισμού όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων επιλέχθηκε να μη γίνεται εξάτμιση του εκλούσματος, αλλά απευθείας παραγωγοποίηση 60 μ L του εκλούσματος με 30 μ L MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε θερμοκρασία 70°C για 30 λεπτά.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες για την επιλογή του μίγματος διαλυτών έκλουσης των αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Τα μίγματα και οι αναλογίες διαλυτών που δοκιμάστηκαν, ήταν:

- διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη (85:15, v/v), (μίγμα Α)
- διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85:15:2, v/v/v), (μίγμα Β)
- διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:οξικό οξύ (85:15:2, v/v/v), (μίγμα Γ)
- εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (85:15, v/v), (μίγμα Δ)
- εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας:αμμωνία (85:15:2, v/v/v), (μίγμα Ε)
- εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας: οξικό οξύ (85:15:2, v/v/v), (μίγμα ΣΤ)

Τα % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης των αναπτυχθέντων μεθόδων προσδιορισμού για τα αντιεπιληπτικά φάρμακα σε ολικό αίμα με τα διάφορα μίγματα διαλυτών έκλουσης κατά την εκχύλιση στερεής φάσης με στήλες HF Bond Elut LRC C18 παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.3. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα απόλυτης ανάκτησης, το μίγμα και η αναλογία διαλυτών που κρίθηκε καταλληλότερο για την έκλουση των αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων ήταν το μίγμα Β, δηλαδή, διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85:15:2, v/v/v), ενώ για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά ήταν το μίγμα Γ, δηλαδή, διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:οξικό οξύ (85:15:2, v/v/v).

Πίνακας 7.3. % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης των μεθόδων για τα αντιεπιληπτικά φάρμακα από δείγματα ολικού αίματος με διάφορα μίγματα διαλυτών έκλουσης κατά την εκχύλιση στερεής φάσης με στήλες HF Bond Elut LRC C18.

Αλκαλικά Αντιεπιληπτικά Φάρμακα								
	μίγμα Α	μίγμα Β	μίγμα Γ	μίγμα Δ	μίγμα Ε	μίγμα ΣΤ		
αιθοσουξίμide	45	81	31	39	45	31		
λακοσαμίde	22	105	25	61	68	5		
λαμοτριγίνη	39	84	36	36	45	10		
λεβετιρακετάμη	38	93	39	47	51	7		
καρβαμαζεπίνη	41	90	27	58	64	36		
10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη	44	85	22	49	53	27		
οξυκαρβαζεπίνη	39	89	33	66	80	51		
10-υδροξυ-καρβαζεπίνη	42	87	28	51	53	31		
τοπιραμάτη	51	91	40	65	71	27		
φαινοβαρβιτάλη	56	81	57	75	79	51		
φαινυτοΐνη	47	101	36	45	62	21		

Όξινα και Επαμφοτερίζοντα Αντιεπιληπτικά Φάρμακα							
	μήγμα Α	μήγμα Β	μήγμα Γ	μήγμα Δ	μήγμα Ε	μήγμα ΣΤ	
βιγκαμπατρίνη	<10	<10	83	<10	<10	<10	
γκαμπαπεντίνη	27	30	85	<10	<10	<10	
πρεγκαμπαλίνη	92	89	94	12	10	13	
βαλπροϊκό οξύ	35	28	95	<10	<10	13	
τιαγκαμπίνη	81	78	95	<10	<10	19	

- μήγμα Α: διγλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη (85:15, v/v)
- μήγμα Β: διγλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία (85:15:2, v/v/v)
- μήγμα Γ: διγλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:οξικό οξύ (85:15:2, v/v/v)
- μήγμα Δ: εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (85:15, v/v)
- μήγμα Ε: εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας:αμμωνία (85:15:2, v/v/v)
- μήγμα ΣΤ: εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας: οξικό οξύ (85:15:2, v/v/v)

7.3. Δοκιμασίες προκατεργασίας δειγμάτων πλάσματος

Στο στάδιο αυτό έγινε εφαρμογή των δύο αναπτυχθέντων μεθόδων προσδιορισμού των αλκαλικών, και των όξινων και επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε δείγματα πλάσματος. Το πλάσμα αποτελεί το βιολογικό υλικό επιλογής για τη μέτρηση επιπέδων φαρμάκων σε ασθενείς υπό αγωγή, καθώς η συγκέντρωση ενός φαρμάκου στο πλάσμα σχετίζεται για πολλά φάρμακα με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Για τον υπολογισμό της % απόλυτης ανάκτησης, όπως και στις δοκιμασίες σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος, γινόταν απευθείας έγχυση μικτών διαλυμάτων των παραγωγοποιημένων αναλυτών σε ακετονιτρίλιο αντίστοιχης συγκέντρωσης. Τα % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης των δύο μεθόδων που ελήφθησαν για κάθε αναλύτη από πρότυπα δείγματα πλάσματος με εκχύλιση στερεής φάσης με στήλες HF Bond Elut LRC C18 παρουσιάζονται στους Πίνακες 7.4 και 7.5.

Πίνακας 7.4. % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της αναπτυχθείσας μεθόδου για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα σε εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα πλάσματος.

Αναλύτης	% Απόλυτη Ανάκτηση
αιθοσουξιμίδη	85
λακοσαμίδη	102
λαμοτριγίνη	87
λεβετιρακετάμη	98
καρβαμαζεπίνη	95
10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη	85
οξυκαρβαζεπίνη	91
10-υδροξυ-καρβαζεπίνη	95
τοπιραμάτη	95
φαινοβαρβιτάλη	83
φαινυτοΐνη	96

Πίνακας 7.5. % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της αναπτυχθείσας μεθόδου για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά φάρμακα σε εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα πλάσματος.

Αναλύτης	% Απόλυτη Ανάκτηση
βιγκαμπατρίνη	87
γκαμπαπεντίνη	89
πρεγκαμπαλίνη	97
βαλπροϊκό οξύ	98
τιαγκαμπίνη	97

7.4. Τελικές μέθοδοι προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε πλάσμα και ολικό αίμα

Η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των μεθόδων προσδιορισμού τόσο των αλκαλικών όσο και των όξινων και επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων, στο ολικό αίμα και στο πλάσμα κατέληξε για την κάθε κατηγορία αντιεπιληπτικών σε μία κοινή μέθοδο και για τα δύο βιολογικά υλικά, με τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες και ίδια προκατεργασία των βιολογικών δειγμάτων. Τα δεκατέσσερα αντιεπιληπτικά φάρμακα και οι δύο μεταβολίτες, καθώς και τα εσωτερικά τους πρότυπα, λεβετιρακετάμη-d6 και γκαμπαπεντίνη-d10, απομονώθηκαν από τα δείγματα ολικού αίματος και πλάσματος με εκχύλιση στερεής φάσης χρησιμοποιώντας στήλες τύπου HF Bond Elut LRC C18 της εταιρίας Agilent καθώς και παραγωγοποίηση με MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε θερμοκρασία 70°C για 30 λεπτά. Οι δύο μέθοδοι εκχύλισης που αναπτύχθηκαν σε συνδυασμό με την αντίδραση παραγωγοποίησης κρίθηκαν κατάλληλες για τον προσδιορισμό των δύο ομάδων αντιεπιληπτικών φαρμάκων (% απόλυτη ανάκτηση >80%) τόσο σε δείγματα ολικού αίματος όσο και σε δείγματα πλάσματος.

Η διαδικασία προκατεργασίας που εφαρμόζόταν σε όλα τα δείγματα ολικού αίματος και πλάσματος (βαθμονόμησης, ποιοτικού ελέγχου, σταθερότητας και ασθενών) πραγματοποιούνταν σε απαγωγό και περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια:

A. Για τον προσδιορισμό των αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων:

- 1) Τοποθέτηση κατάλληλου αριθμού γυάλινων δοκιμαστικών σωλήνων και επισήμανση σύμφωνα με την ονομασία των δειγμάτων.
- 2) Προσθήκη σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 200 μL πλάσματος ή ολικού αίματος, με αυτόματη μηχανική πιπέτα.
- 3) Εμβολιασμός με μικτό μεθανολικό διάλυμα εργασίας αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων (για τα δείγματα βαθμονόμησης, ποιοτικού ελέγχου και σταθερότητας) χρησιμοποιώντας αυτόματη μηχανική πιπέτα (βλέπε Πίνακα 5.1.).
- 4) Προσθήκη 50 μL εσωτερικού προτύπου (λεβετιρακετάμη-d6) συγκέντρωσης 5,0 $\mu\text{g/mL}$ με αυτόματη μηχανική πιπέτα σε όλα τα δείγματα.
- 5) Προσθήκη 600 μL ακετονιτριλίου υπό ανάδευση, φυγοκέντρωση στις 2000 rpm για 5 λεπτά, παραλαβή της υπερκείμενης οργανικής στοιβάδας και εξάτμισή της υπό ρεύμα αζώτου μέχρι όγκου περίπου 200 μL .
- 6) Προσθήκη 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0,1M pH 6,0 στο δείγμα, ανάδευση του δείγματος για τουλάχιστον 1 λεπτό σε αναδευτήρα περιδίνησης (vortex), και φυγοκέντρωσή του στις 3000 στροφές για 5 λεπτά.
- 7) Ενεργοποίηση της στήλης με διαδοχική εφαρμογή 2 mL μεθανόλης και 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0,1M pH 6,0.
- 8) Εφαρμογή του δείγματος στη στήλη.
- 9) Έκπλυση της στήλης με 2 mL απιοντισμένο νερό.
- 10) Ξήρανση της στήλης υπό κενό ($> 10 \text{ mmHg}$) για 1 λεπτό.
- 11) Έκπλυση της στήλης με 100 μL ακετόνης.
- 12) Ξήρανση της στήλης υπό κενό ($> 10 \text{ mmHg}$) για 10 λεπτά.
- 13) Έκλουση των αναλύτων με τη προσθήκη εις διπλούν 1,5 mL προσφάτως παρασκευασμένου μίγματος διχλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη: NH_3 (85:15:2, o/o/o).
- 14) Εξάτμιση του εκλούσματος μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια παραμονή τους για 5 λεπτά υπό ρεύμα αζώτου και θερμοκρασία 40°C .
- 15) Παραγωγοποίηση με τη προσθήκη 30 μL ακετονιτριλίου και 30 μL MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε θερμοκρασία 70°C για 30 λεπτά.
- 16) Ψύξη των δειγμάτων, ανάδευση σε ατομικό αναδευτήρα περιδίνησης περίπου για 30 δευτερόλεπτα και μεταφορά σε φιαλίδια που περιείχαν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts). Τέλος, τοποθέτηση των φιαλιδίων στον αυτόματο

δειγματολήπτη και έγχυση όγκου 1 μL στο σύστημα GC/MS, με τις χρωματογραφικές συνθήκες του Πίνακα 7.6.

B. Για τον προσδιορισμό των όξινων και επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων:

- 1) Τοποθέτηση κατάλληλου αριθμού γυάλινων δοκιμαστικών σωλήνων και επισήμανση σύμφωνα με την ονομασία των δειγμάτων.
- 2) Προσθήκη σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 200 μL πλάσματος ή ολικού αίματος, με αυτόματη μηχανική πιπέτα.
- 3) Εμβολιασμός με μικτό μεθανολικό διάλυμα εργασίας όξινων και επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων (για τα δείγματα βαθμονόμησης, ποιοτικού ελέγχου και σταθερότητας) χρησιμοποιώντας αυτόματη μηχανική πιπέτα (βλέπε Πίνακα 5.1.).
- 4) Προσθήκη 50 μL εσωτερικού προτύπου (γκαμπαπεντίνη-d10) συγκέντρωσης 5,0 $\mu\text{g/mL}$ με αυτόματη μηχανική πιπέτα σε όλα τα δείγματα.
- 5) Προσθήκη 600 μL ακετονιτριλίου υπό ανάδευση, φυγοκέντρωση στις 2000 rpm για 5 λεπτά, παραλαβή της υπερκείμενης οργανικής στοιβάδας και εξάτμισή της μέχρι όγκου περίπου 200 μL υπό ρεύμα αζώτου.
- 6) Προσθήκη 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος pH 1,0 στο δείγμα, ανάδευση του δείγματος για τουλάχιστον 1 λεπτό σε αναδευτήρα περιδίνησης (vortex) και φυγοκέντρωσή του στις 3000 στροφές για 5 λεπτά.
- 7) Ενεργοποίηση της στήλης με διαδοχική εφαρμογή 2 mL μεθανόλης και 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 1,0.
- 8) Εφαρμογή του δείγματος στη στήλη.
- 9) Έκπλυση της στήλης με 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος pH 1,0.
- 10) Ξήρανση της στήλης υπό κενό ($> 10 \text{ mmHg}$) για 1 λεπτό.
- 11) Έκπλυση της στήλης με 100 μL εξανίου.
- 12) Ξήρανση της στήλης υπό κενό ($> 10 \text{ mmHg}$) για 10 λεπτά.
- 13) Έκλουση των αναλύτων με τη προσθήκη εις διπλούν 1,0 mL προσφάτως παρασκευασμένου μίγματος διχλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη:οξικό οξύ (85:15:2, o/o/o).
- 14) Παραγωγοποίηση 60 μL εκλούσματος με 30 μL MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε θερμοκρασία 70°C για 30 λεπτά.

15) Ψύξη των δειγμάτων, ανάδευση σε ατομικό αναδευτήρα περιδίνησης περίπου για 30 δευτερόλεπτα και μεταφορά σε φιαλίδια που περιείχαν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts). Τέλος, τοποθέτηση των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση όγκου 1 μL στο σύστημα GC/MS, με τις χρωματογραφικές συνθήκες του Πίνακα 7.6.

Πίνακας 7.6. Χρωματογραφικές συνθήκες των αναπτυχθέντων δύο μεθόδων προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων.

Χρωματογραφικές συνθήκες	
Θερμοκρασία σημείου έγχυσης	240 °C
Θερμοκρασία πηγής ιονισμού	200 °C
Θερμοκρασία ανιχνευτή	300 °C
Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου	1,0 mL/min
Αρχική θερμοκρασία στήλης (χρόνος παραμονής)	70 °C (1 min)
Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας	10 °C/min
Ενδιάμεση θερμοκρασία στήλης (χρόνος παραμονής)	120 °C (0 min)
Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας	40 °C/min
Τελική θερμοκρασία στήλης (χρόνος παραμονής)	300 °C (7 min)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΝΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΕΠΙΛΗΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΑ

8.1. Εισαγωγή

Η επικύρωση (validation) των μεθόδων προσδιορισμού των αντιεπιληπτικών φαρμάκων, σε ολικό αίμα και πλάσμα, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA (Food and Drug Administration) [FDA, 2001], της Ευρωπαϊκής Ένωσης [Ευρωπαϊκή Οδηγία, 2002], του ICH (International Conference on Harmonization) [ICH, 2005] και της EURACHEM [Eurachem, 2014], καθώς και τη σχετική Ελληνική βιβλιογραφία [Ευσταθίου, Χημειομετρία]. Το πρωτόκολλο επικύρωσης περιλάμβανε τη μελέτη της εκλεκτικότητας (selectivity), της ειδικότητας (specificity) και της γραμμικότητας (linearity), τον προσδιορισμό των κατώτατων ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ), τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας (intraday precision), της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (interday precision), της ορθότητας εντός της ημέρας (intraday accuracy) και δια των ημερών (interday accuracy), της απόλυτης ανάκτησης (absolute recovery) και της ανθεκτικότητας (robustness) των αναπτυχθέντων μεθόδων, καθώς και της σταθερότητας (stability) των αναλυτών σε εμβολιασμένα πρότυπα βιολογικά δείγματα.

8.2. Εκλεκτικότητα της μεθόδου

Η μελέτη της εκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση έξι τυφλών βιολογικών δειγμάτων ολικού αίματος και πλάσματος διαφορετικής προέλευσης και τον έλεγχο των χρωματογραφημάτων για να διαπιστωθούν τυχόν παρεμποδίσεις από ενδογενή συστατικά των βιολογικών υλικών στους χρόνους ανάλυσης των αναλυτών και των εσωτερικών τους προτύπων [FDA, 2001; Eurachem, 2014]. Τα δείγματα κατεργάστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου, όπως περιγράφεται στην αναπτυχθείσα κοινή μέθοδο για το ολικό αίμα και το πλάσμα.

8.3. Ειδικότητα της μεθόδου

Η μελέτη της ειδικότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση έξι μικτών διαλυμάτων εργασίας 34 διαφορετικών ουσιών (διάλυμα Δ₁). Επιλέχθηκαν ουσίες ή μεταβολίτες αυτών που μπορεί να λαμβάνονται, νόμιμα ή παράνομα, από άτομα που λαμβάνουν αντιεπιληπτική αγωγή και ενδέχεται να συνυπάρχουν με τα αντιεπιληπτικά φάρμακα και τους μεταβολίτες τους στα υπό εξέταση βιολογικά δείγματα των ασθενών αυτών. Οι ουσίες καθώς και οι μεταβολίτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες: αλοπεριδόλη, αμιτρυπτίνη, βενλαφαξίνη, βιπεριδίνη, ζολπιδέμη, κλοζαπίνη, κλομιπραμίνη, λεβομεπρομαζίνη, μιρταζαπίνη, ολανζαπίνη, παρακεταμόλη, σεφτραλίνη, σιταλοπράμη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακετυλομορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεκγονίνη, μεθυλεστέρας της εκγονίνης, Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη, 11-nor-Δ⁹-τετραϋδροκανναβινοϊκό οξύ, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, διαζεπάμη, νορδιαζεπάμη, οξαζεπάμη, 7-αμινοφθορονιτραζεπάμη, μιδαζολάμη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDMA, MDA, κεταμίνη και εφεδρίνη. Επίσης, παρασκευάστηκαν έξι εμβολιασμένα πρότυπα βιολογικά δείγματα ολικού αίματος και πλάσματος, με μικτό μεθανολικό διάλυμα (διάλυμα Δ₂) των παραπάνω 34 προτύπων ουσιών και χωρίς την προσθήκη αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Τα δείγματα κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφεται στις δύο αναπτυχθείσες μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο των αλκαλικών όσο και των όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων, σε ολικό αίμα και σε πλάσμα, προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη τυχόν παρεμπόδισης στους χρόνους ανάλυσης των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων τους [FDA, 2001; Eurachem, 2014].

8.4. Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου

Ως κατώτατο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης θεωρήθηκε η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη που είχε απόκριση μεγαλύτερη από το θόρυβο ενός τυφλού δείγματος τουλάχιστον κατά τρεις (LOD, S/N > 3:1) και δέκα φορές (LOQ, S/N > 10:1), αντίστοιχα [Ευσταθίου, Χημειομετρία].

Επίσης, τα κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για τον κάθε αναλύτη υπολογίστηκαν με βάση τα στοιχεία της αντίστοιχης εξίσωσης παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης για την κάθε ημέρα και στη

συνέχεια υπολογίστηκε η μέση τιμή από τις 5 ημέρες [ICH, 2005]. Η μαθηματική σχέση που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό τους ήταν:

$$\text{LOD ή LOQ} = \frac{\kappa \times SD_{\beta}}{\alpha}$$

όπου:

- κ είναι ο παράγοντας που εξαρτάται από την πιθανότητα κατανομής των τιμών τυφλού δείγματος και από την επιθυμητή τιμή σφάλματος τύπου «B». Για το κατώτατο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, η τιμή του κ είναι 3,33 και 10, αντίστοιχα, για στάθμη εμπιστοσύνης 95% (όπου υπάρχει πιθανότητα σφάλματος τύπου «B» 5%).
- SD_{β} είναι η τυπική απόκλιση της τομής (β) του άξονα των τιμών y , στη σχέση $y = \alpha x + \beta$.
- α είναι η κλίση της εξίσωσης παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης.

8.5. Γραμμικότητα της μεθόδου

Η μελέτη της γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή διαγραμμάτων βαθμονόμησης έξι σημείων σε 5 διαφορετικές ημέρες. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης που επελέγησαν για το ολικό αίμα και το πλάσμα αναφέρονται στον Πίνακα 5.1. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης ($y = \alpha x + \beta$) των διαγραμμάτων βαθμονόμησης υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και με συντελεστή βαρύτητας $1/x^2$, όπου το x αντιστοιχεί στην ονομαστική (θεωρητική) τιμή της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη εκφρασμένη σε $\mu\text{g/mL}$, ενώ το y αντιστοιχεί στο λόγο της απόκρισης του αναλύτη προς την απόκριση του αντίστοιχου εσωτερικού προτύπου.

Στο πλαίσιο της μελέτης της γραμμικότητας της μεθόδου υπολογίστηκε το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2) για κάθε εξίσωση παλινδρόμησης και έπρεπε να ισχύει ότι $R^2 \geq 0,98$ [ICH, 2005; Eurachem, 2014].

8.6. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Τα δείγματα βαθμονόμησης κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφεται στις δύο αναπτυχθείσες μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο των αλκαλικών όσο και των όξινων και επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών

φαρμάκων, σε ολικό αίμα και σε πλάσμα, και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των αντίστοιχων διαγραμμάτων βαθμονόμησης. Στη συνέχεια, έγιναν επαναποσοτικοποιήσεις των βαθμονομητών με την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων για την κάθε ημέρα και υπολογίστηκε το σχετικό σφάλμα (% E_r) των τιμών αυτών, σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\% E_r = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100$$

όπου x είναι η τιμή της συγκέντρωσης που υπολογίστηκε κατά την επαναποσοτικοποίηση και μ η αντίστοιχη αναμενόμενη συγκέντρωση. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, τα αποδεκτά όρια αποκλίσεων από τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις έπρεπε να ήταν έως $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα και έως $\pm 20\%$ για το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης [FDA, 2001; Eurachem, 2014].

8.7. Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου

Η επαναληψιμότητα (εντός της ημέρας) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (δια των ημερών), ελέγχθηκαν με επαναλαμβανόμενες αναλύσεις δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC's). Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας παρασκευάστηκαν σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, ένα χαμηλό (συγκέντρωσης 3πλάσιας του πρώτου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης), ένα μεσαίο (συγκέντρωσης περίπου στο μέσο του δυναμικού εύρους του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη) και ένα υψηλό (συγκέντρωσης ίσης με το 80% της συγκέντρωσης του τελευταίου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη) επίπεδο. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC's) που επελέγησαν για το ολικό αίμα και το πλάσμα αναφέρονται στον Πίνακα 5.1. Αναλύθηκαν έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο σε κάθε μία από τις πέντε ημέρες ανάλυσης (συνολικά 30 δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο) σύμφωνα με τις δύο αναπτυχθείσες μεθόδους για τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο των αλκαλικών όσο και των όξινων και επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων, σε ολικό αίμα και σε πλάσμα. Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του

διαγράμματος βαθμονόμησης της κάθε ημέρας και στη συνέχεια υπολογίζονταν η μέση τιμή της συγκέντρωσης και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα αποτελούν μέτρο του τυχαίου σφάλματος των μεθόδων και εκτιμήθηκαν από το ποσοστό % της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των μετρήσεων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και σε 5 διαφορετικές ημέρες, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές της % RSD, που εκφράζουν την επαναληψιμότητα και την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, έπρεπε να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων έως $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας [FDA, 2001].

Επιπλέον, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, που εκφράζει τη μεταξύ των ημερών επαναληψιμότητα των μεθόδων, εκτιμήθηκε από το % ποσοστό της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης, που ελήφθησαν σε διαφορετικές ημέρες ανάλυσης [Eurachem, 2014].

8.8. Ορθότητα της μεθόδου, εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας της κάθε ημέρας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης και υπολογιζόταν η μέση τιμή των μετρήσεων για τα έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης. Η ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών, αποτελεί μέτρο του συστηματικού σφάλματος της μεθόδου και εκτιμήθηκε από το % σχετικό σφάλμα (% E_r), που υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\% E_r = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100$$

για δείγματα ελέγχου ποιότητας που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και σε 5 διαφορετικές ημέρες, αντίστοιχα. Το % E_r δείχνει πόσο απέχει η μέση τιμή (x) των μετρήσεων για δείγματα ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης, από την πραγματική τιμή (μ), δηλαδή την ονομαστική (θεωρητική) συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στο εμβολιασμένο δείγμα ελέγχου ποιότητας. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές του % E_r , που εκφράζουν την ορθότητα της μεθόδου, έπρεπε να

βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας [FDA, 2001; Eurachem, 2014].

8.9. Απόλυτη ανάκτηση της μεθόδου

Η απόλυτη ανάκτηση για τα υπό προσδιορισμό αντιεπιληπτικά φάρμακα εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας για το κάθε βιολογικό υλικό. Επίσης, υπολογίστηκε η απόλυτη ανάκτηση των εσωτερικών τους προτύπων, της λεβετιρακετάμης-d6 και της γκαμπαπεντίνης-d10. Αναλύθηκαν από έξι εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, χαμηλό, μεσαίο και υψηλό. Για τον υπολογισμό της απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών και των εσωτερικών τους προτύπων, γινόταν παράλληλα απευθείας έγχυση παραγωγοποιημένων μικτών διαλυμάτων τους σε ακετονιτρίλιο αντίστοιχων συγκεντρώσεων. Η απόλυτη ανάκτηση υπολογίστηκε στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC1, QC2 και QC3) με βάση την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$\% \text{ Απόλυτη Ανάκτηση} = \frac{E_1}{E_2} \times 100$$

όπου:

E_1 είναι το εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε παραγωγοποιημένου αναλύτη μετά από την εκχύλιση του βιολογικού δείγματος και

E_2 είναι το εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε παραγωγοποιημένου αναλύτη, μετά από απευθείας έγχυση παραγωγοποιημένου μικτού διαλύματος αντίστοιχης συγκέντρωσης [FDA, 2001; Eurachem, 2014].

8.10. Ανθεκτικότητα της μεθόδου

Η ανθεκτικότητα εκτιμήθηκε προκαλώντας σκόπιμα μεταβολές, εντός συγκεκριμένων ορίων, σε παραμέτρους της μεθόδου που είναι δυνατόν να επηρεάσουν την αξιοπιστία της ανάλυσης. Η μελέτη της ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκε στο μεσαίο επίπεδο συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC2) για το κάθε βιολογικό υλικό.

Στη μελέτη ανθεκτικότητας, οι παράμετροι της μεθόδου πρέπει να μεταβάλλονται στην τάξη μεγέθους των αποκλίσεων που μπορεί να συμβούν, όπως μεταβολές $\pm 0,5$ μονάδας στο pH, $\pm 3-5$ °C στις θερμοκρασίες και $\pm 3\%$ της αριθμητικής τιμής σε άλλες παραμέτρους που χρησιμοποιούνται σε μία μέθοδο [Ευρωπαϊκή Οδηγία, 2002; ICH, 2005]. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν να μεταβληθούν τρεις παράμετροι από το στάδιο κατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων και τέσσερις παράμετροι από τις χρωματογραφικές συνθήκες των αναπτυχθέντων μεθόδων. Οι μεταβολές που πραγματοποιήθηκαν ήταν:

- για τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα: στο pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών από 6,0 σε 6,5, και για τα όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά φάρμακα: στο pH του ρυθμιστικού διαλύματος από 1,0 σε 1,2
- στην παρτίδα παραγωγής στηλών SPE τύπου HF Bond Elut C18,
- στην αναλογία του μίγματος διαλυτών έκλουσης των αναλυτών (διχλωρομεθάνιο:ισοπροπανόλη:αμμωνία, v/v/v) από 85:15:2 σε 90:15:2,
- στην ταχύτητα ροής φέροντος αερίου από 1,00 mL/min σε 0,96 mL/min,
- στη θερμοκρασία ενδιάμεσου σταδίου από 120 °C σε 123 °C,
- στη θερμοκρασία του σημείου έγχυσης του δείγματος από 240 °C σε 237 °C, και
- στο δυναμικό λειτουργίας (voltage) του φασματόμετρου μαζών το οποίο μειώθηκε κατά 3% της τιμής του δυναμικού λειτουργίας που ελήφθη από την τελευταία ρύθμιση του φασματόμετρου μαζών (tuning).

Στη μελέτη ανθεκτικότητας, οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το λόγο αποκρίσεων του αναλύτη προς το αντίστοιχο εσωτερικό πρότυπο. Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση της μέσης τιμής του λόγου των αποκρίσεων από δείγματα που αναλύθηκαν με τις αναπτυχθείσες μεθόδους (χωρίς μεταβολές), με τη μέση τιμή του λόγου των αποκρίσεων από δείγματα με τις τροποποιημένες μεθόδους με τις μεταβολές που προαναφέρθηκαν, και υπολογίστηκε η διαφορά τους (D_i) κάθε φορά. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (SD_i) σύμφωνα με την παρακάτω μαθηματική εξίσωση:

$$SD_i = \sqrt{2 \times \sum \left(D_i^2 / n \right)}$$

όπου n, το πλήθος των μεταβολών που πραγματοποιήθηκαν [Ευρωπαϊκή Οδηγία, 2002].

8.11. Σταθερότητα εμβολιασμένων προτύπων βιολογικών δειγμάτων

Μελετήθηκε η σταθερότητα εμβολιασμένων προτύπων βιολογικών δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) για 24 h, σε θερμοκρασία φύλαξης 4 °C για μία βδομάδα και δύο βδομάδες, σε θερμοκρασία φύλαξης -20 °C για 2 βδομάδες και 1 μήνα, καθώς και για 3 κύκλους ψύξης-απόψυξης. Η μελέτη σταθερότητας προτύπων βιολογικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο χαμηλό και στο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας τα οποία αποθηκεύονταν σε πλαστικά σωληνάρια που περιείχαν 3 mg NaF ως συντηρητικό [FDA, 2001; ICH, 2005]. Πρόσφατα εμβολιασμένα βιολογικά δείγματα παρασκευάστηκαν και συγκρίθηκαν με αντίστοιχης συγκέντρωσης εμβολιασμένα βιολογικά δείγματα που είχαν παρασκευαστεί και φυλαχτεί στις συνθήκες της μελέτης σταθερότητας («γερασμένα» δείγματα).

Όλα τα πρότυπα δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της ημέρας ανάλυσής τους και συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων των αναλυτών μεταξύ «γερασμένων» και πρόσφατων εμβολιασμένων βιολογικών δειγμάτων. Για τη μελέτη σταθερότητας προτύπων βιολογικών δειγμάτων αντιεπιληπτικών φαρμάκων υπολογίστηκε η % απώλεια ή η απόκλιση με βάση την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$\% \text{ Απώλεια ή Απόκλιση} = \frac{A - B}{B} \times 100$$

A: Μέση τιμή συγκέντρωσης «γερασμένου» δείγματος

B: Μέση τιμή συγκέντρωσης πρόσφατου δείγματος

8.12. Κριτήρια αποδοχής ανάλυσης δειγμάτων

Για την αποδοχή ή όχι ενός διαγράμματος βαθμονόμησης και κατ' επέκταση ολόκληρης της σειράς ανάλυσης των δειγμάτων της ημέρας ορίστηκαν τα παρακάτω κριτήρια σύμφωνα με τα διεθνή κριτήρια που ισχύουν [FDA, 2001; ICH, 2005; Eurachem, 2014]:

- το τυφλό δείγμα της ημέρας ανάλυσης να μην εμφανίζει κάποια κορυφή στους χρόνους ανάσχεσης των αναλυτών,
- το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης της εξίσωσης παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της ημέρας να είναι $R^2 \geq 0,98$,
- η επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης να έχει αποτελέσματα εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και $\pm 20\%$ για το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης, και
- οι τιμές της ορθότητας εντός της ημέρας ($\% E_r$) και της επαναληψιμότητας ($\% RSD$) για τα δείγματα ελέγχου ποιότητας στα τρία επίπεδα (χαμηλό, μεσαίο και υψηλό), να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

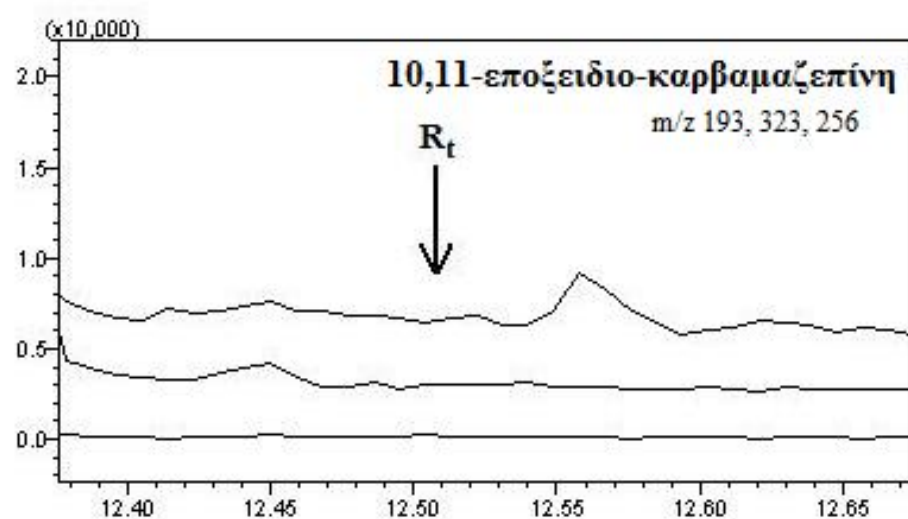
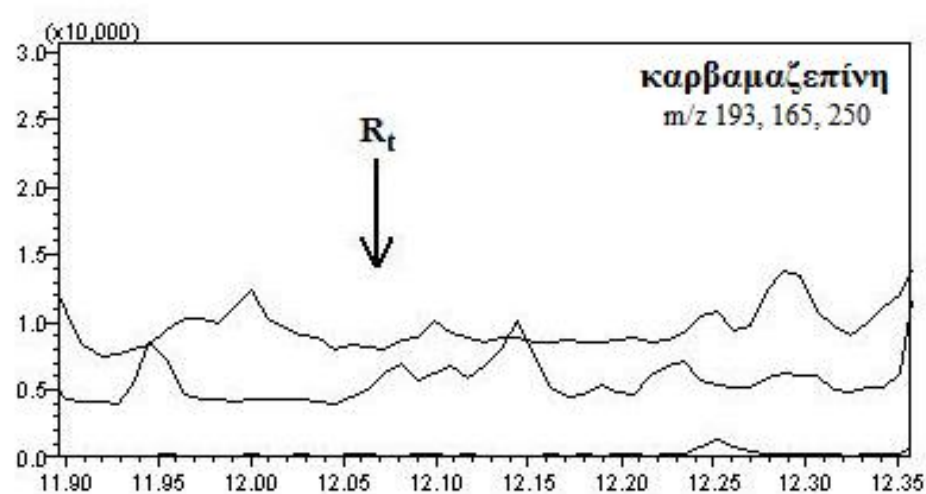
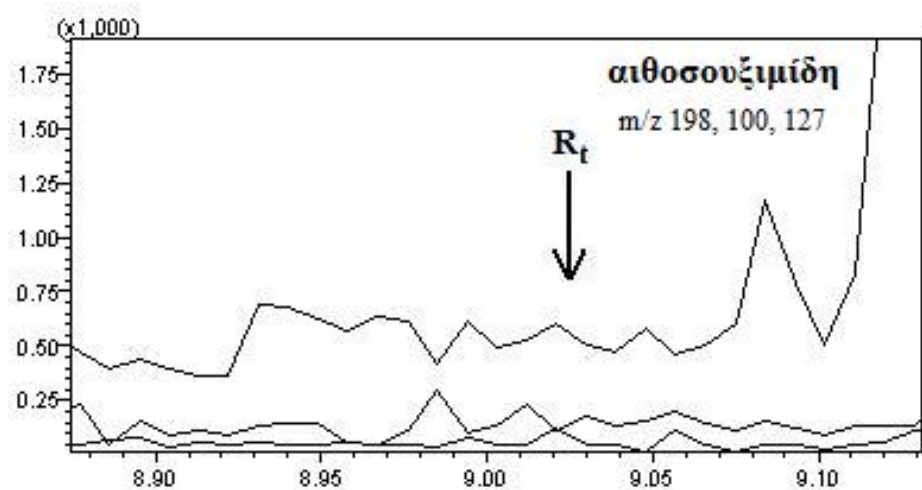
ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΚΑΛΙΚΩΝ ΑΝΤΙΕΠΙΛΗΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ

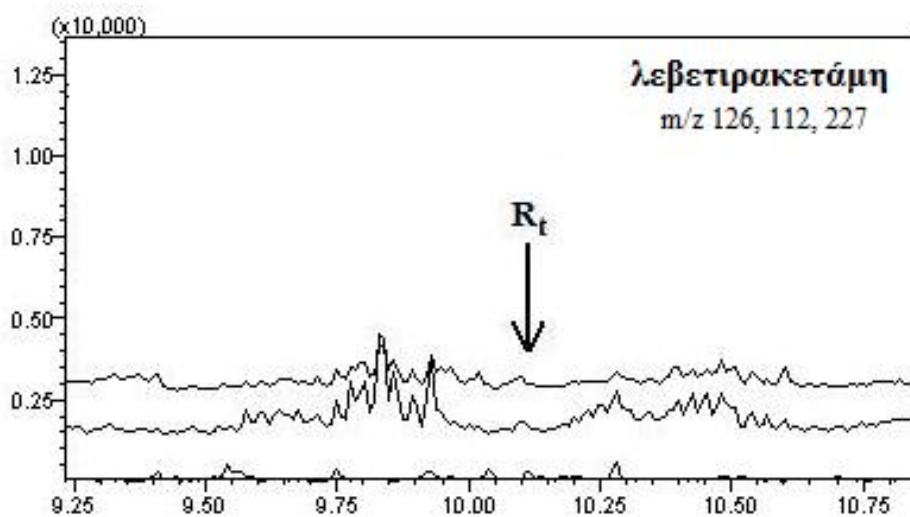
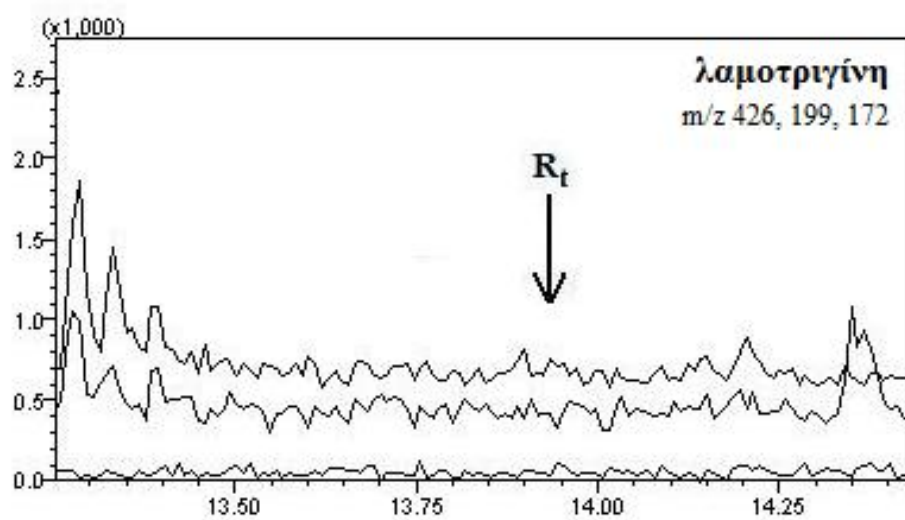
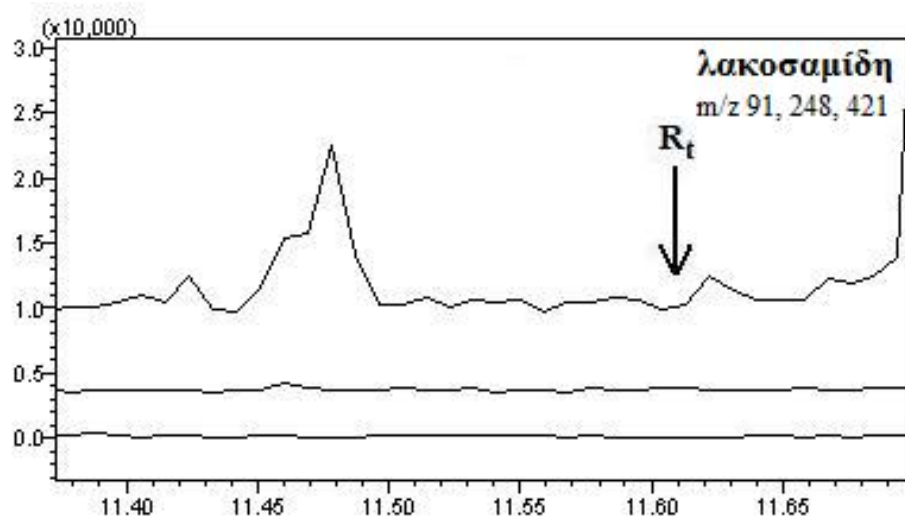
9.1. Εισαγωγή

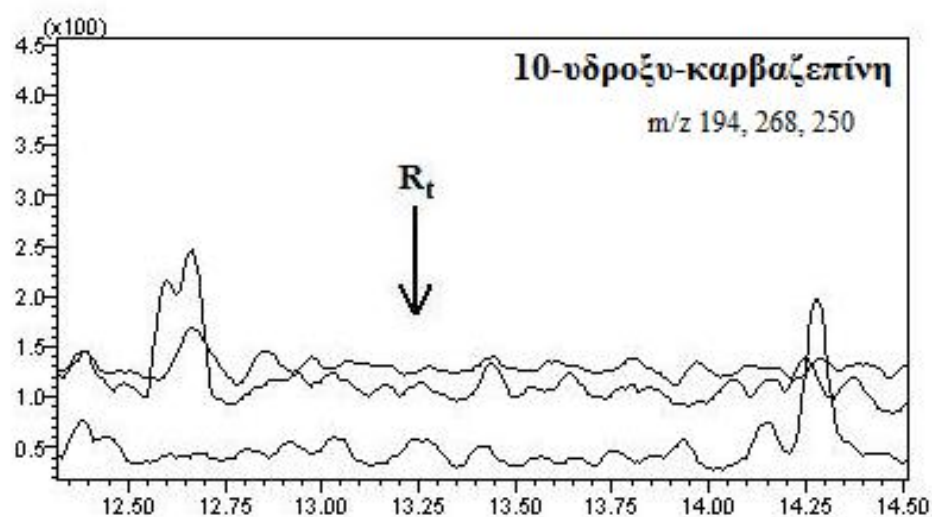
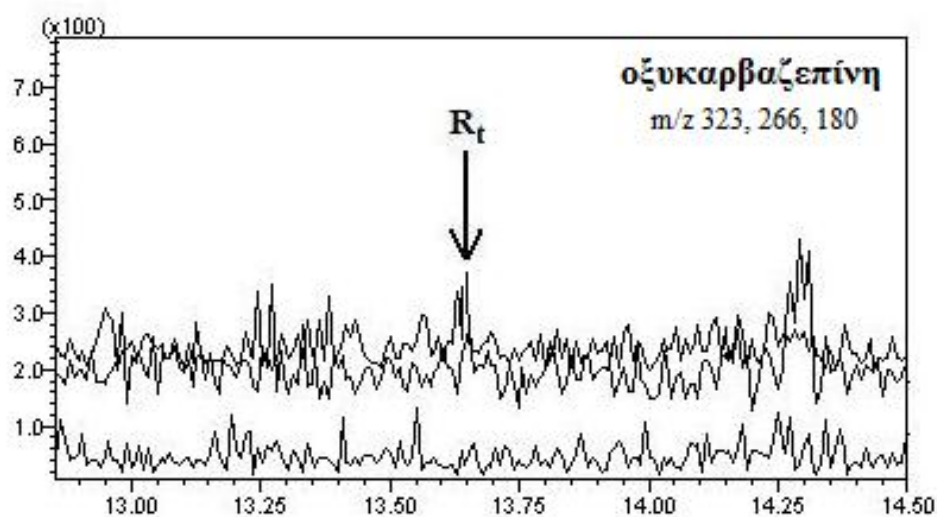
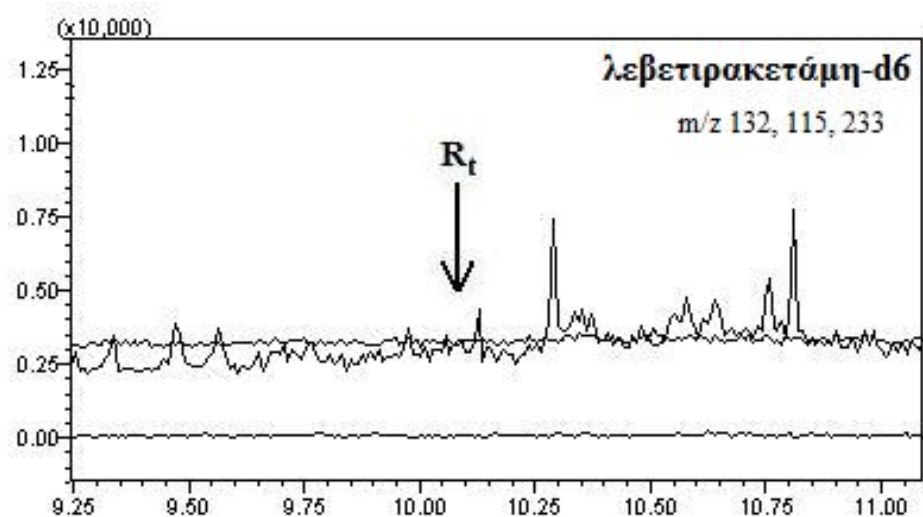
Τα εννέα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα (αιθοσουξιμίδη, καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινυτοΐνη) και οι δύο μεταβολίτες (10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη και 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη), καθώς και το εσωτερικό τους πρότυπο, λεβετιρακετάμη-d6, απομονώνονταν από το ολικό αίμα μετά από καταβύθιση πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο και εκχύλιση στερεής φάσης με στήλες HF Bond Elut C18. Στη συνέχεια, το έκλουσμα που περιείχε τους αναλύτες εξατμίζονταν μέχρι ξηρού και γινόταν παραγωγοποίηση με MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε θερμοκρασία 70°C για 30 λεπτά. Τέλος, γινόταν έγχυση 1 µL από το δείγμα σε αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματογράφο μαζών σε λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM). Η τελική μέθοδος προσδιορισμού έχει αναφερθεί αναλυτικά στο Κεφάλαιο 7.

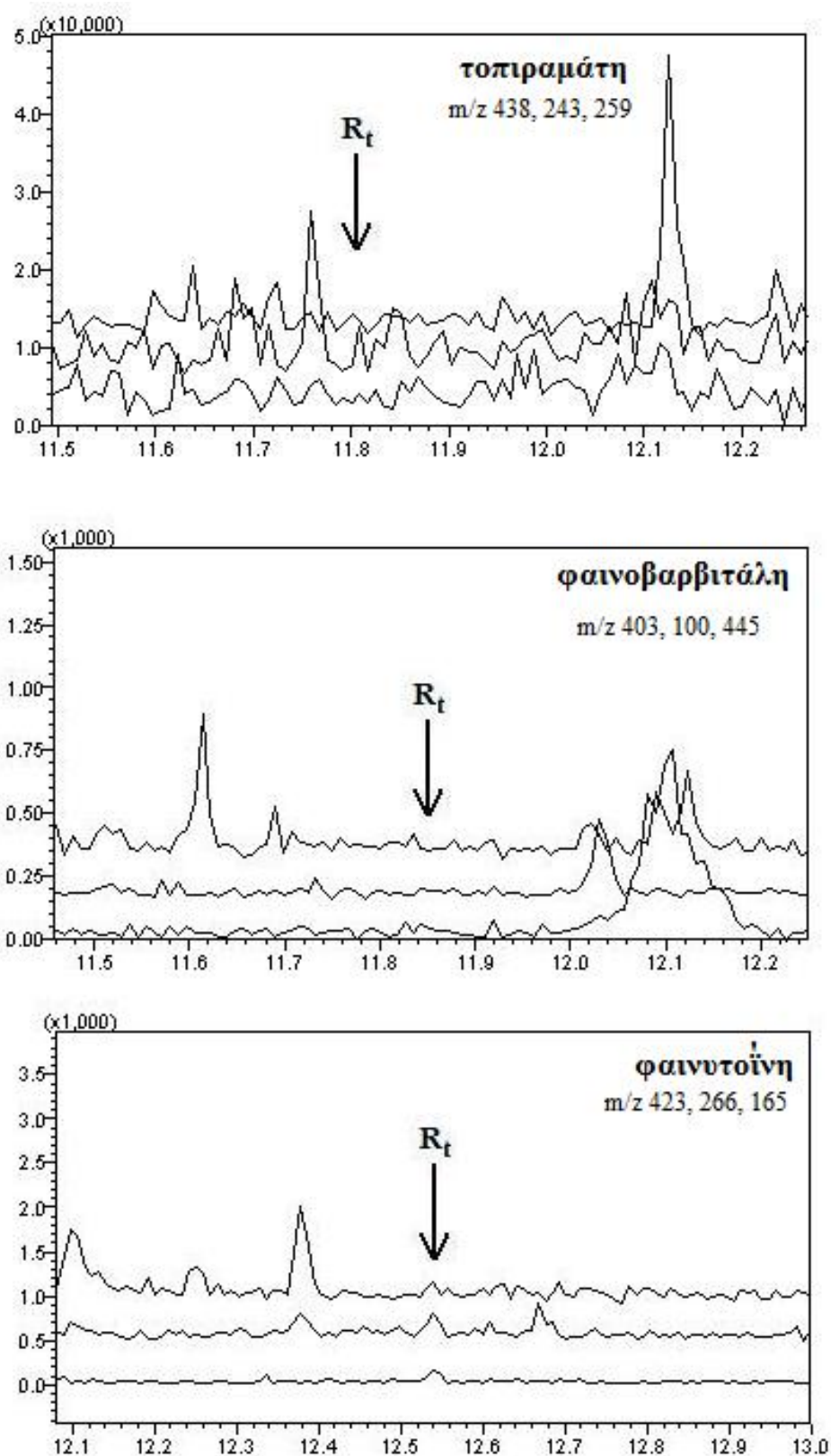
9.2. Εκλεκτικότητα

Έξι τυφλά δείγματα ολικού αίματος που προήρχοντο από τρεις υγιείς εθελοντές και από τρεις διαφορετικές μονάδες αιμοδοσίας, κατεργάστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου, όπως περιγράφεται στη μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, καμία παρεμπόδιση από τα συστατικά του ολικού αίματος δεν παρατηρήθηκε στους χρόνους ανάλυσης των εννέα αντιεπιληπτικών φαρμάκων, των δύο μεταβολιτών και του εσωτερικού προτύπου τους. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων των αναλυτών και του εσωτερικού τους προτύπου, που ελήφθησαν από ένα τυφλό δείγμα ολικού αίματος παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.1.









Σχήμα 9.1. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων των έντεκα αναλυτών και του εσωτερικού τους προτύπου, που ελήφθησαν από ένα τυφλό δείγμα ολικού αίματος.

9.3. Ειδικότητα

Αρχικά αναλύθηκαν με τις χρωματογραφικές συνθήκες της αναπτυχθείσας μεθόδου έξι μικτά διαλύματα εργασίας 34 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/mL (διάλυμα Δ₁), που δύνανται να συνυπάρχουν σε δείγματα ολικού αίματος ασθενών που λαμβάνουν αντιεπιληπτικά φάρμακα (Κεφάλαιο 8.3). Από το διάλυμα Δ₁ ελήφθησαν 50 µL τα οποία εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και παραγωγοποιήθηκαν με 30 µL MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε 30 µL ακετονιτριλίου. Τέλος, γινόταν έγχυση 1 µL από το δείγμα στο χρωματογραφικό σύστημα. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε στους χρόνους ανάλυσης των εννέα υπό μελέτη αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων, των δύο μεταβολιτών και του εσωτερικού τους προτύπου.

Στη συνέχεια, έξι τυφλά δείγματα ολικού αίματος εμβολιάστηκαν με 50 µL μικτού διαλύματος εργασίας των 34 αυτών ουσιών συγκέντρωσης 20 µg/mL (διάλυμα Δ₂) και με 20 µL μικτού διαλύματος εργασίας Α₂ (με όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά φάρμακα) συγκέντρωσης 50 µg/mL, οπότε η τελική συγκέντρωση για την κάθε ουσία στο αίμα ήταν 5,0 µg/mL. Τα εμβολιασμένα αυτά δείγματα ολικού αίματος, χωρίς την προσθήκη αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων, κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη μέθοδο προσδιορισμού, προκειμένου να διερευνηθεί τυχόν παρεμπόδιση. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε στους χρόνους ανάλυσης και των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών (αιθοσουξιμίδη, καρβαμαζεπίνη, 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινοτοΐνη), καθώς και του εσωτερικού τους προτύπου, λεβετιρακετάμης-d6.

9.4. Προσδιορισμός κατώτατων ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών στο ολικό αίμα, υπολογίστηκαν με δύο τρόπους (Πίνακας 9.1), με βάση:

- το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος ολικού αίματος στο χρόνο ανάσχεσης του αναλύτη, που έπρεπε να είναι τουλάχιστον 3 ($S/N > 3:1$) και βρέθηκε να είναι 0,15 $\mu\text{g/mL}$ για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδα, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη και 0,67 $\mu\text{g/mL}$ για την αιθοσουξιμίδα και την τοπιραμάτη. Για τον υπολογισμό των τιμών αυτών, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 6 εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος στις παραπάνω συγκεντρώσεις για τους έντεκα αναλύτες και 6 τυφλά δείγματα ολικού αίματος.
- τα στοιχεία της εξίσωσης παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της κάθε ημέρας χρησιμοποιώντας τη σχετική μαθηματική σχέση (Κεφάλαιο 8.4), και στη συνέχεια τον υπολογισμό των μέσων τιμών από τα 5 διαγράμματα βαθμονόμησης για τον κάθε αναλύτη όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.1.

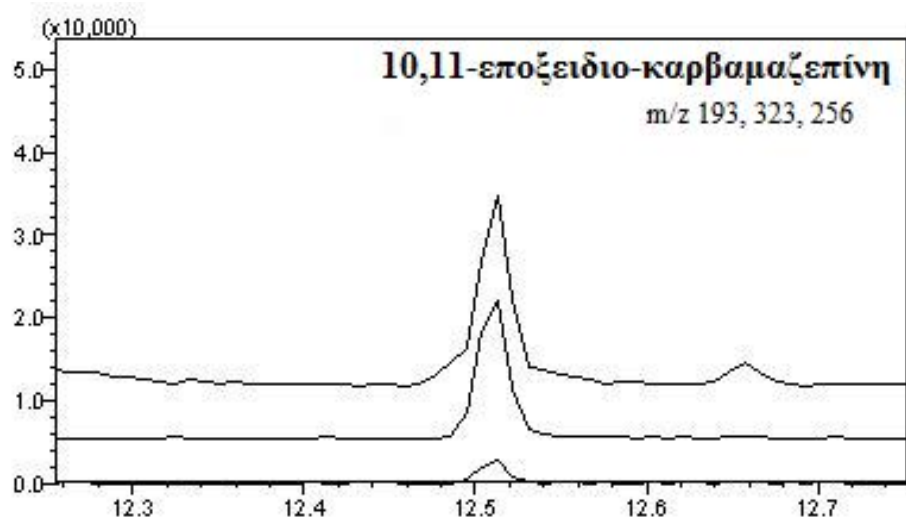
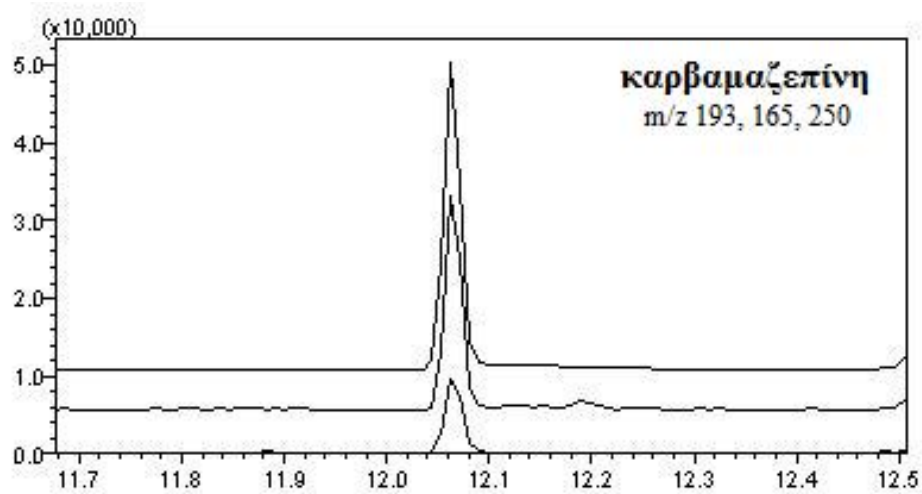
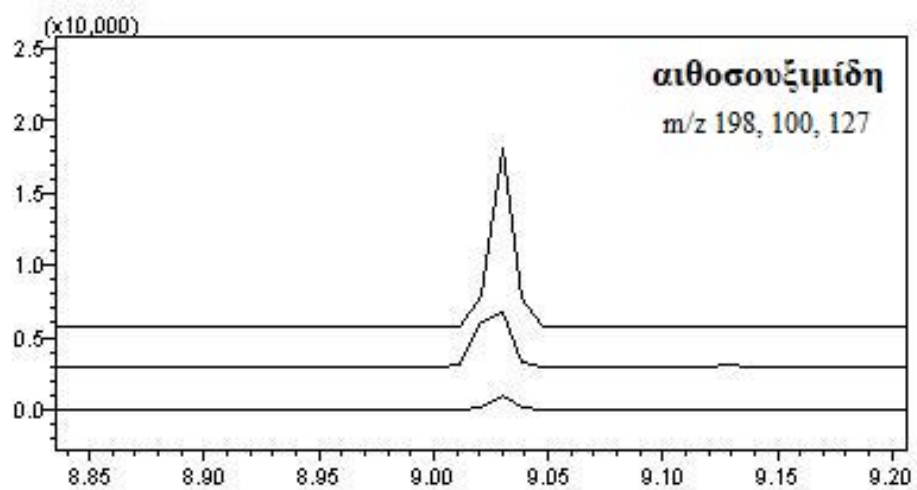
Τα κατώτατα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών στο ολικό αίμα, υπολογίστηκαν επίσης με δύο τρόπους (Πίνακας 9.1), με βάση:

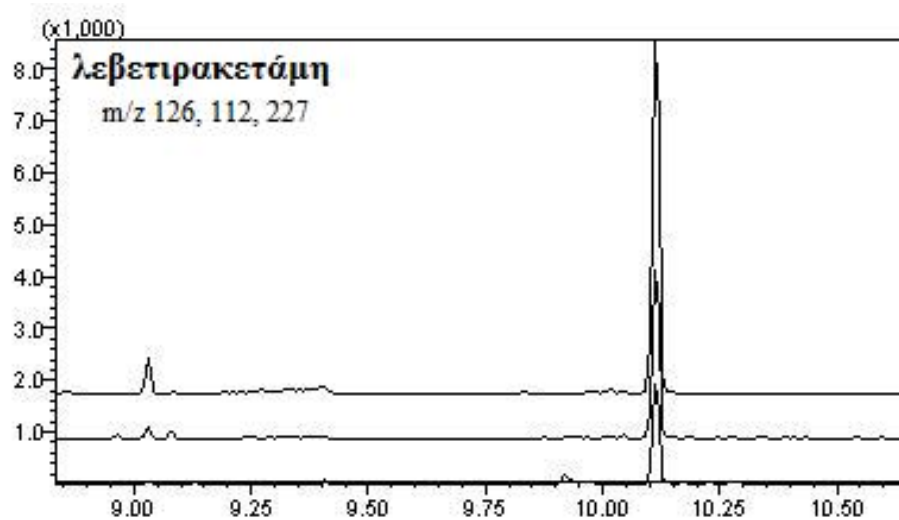
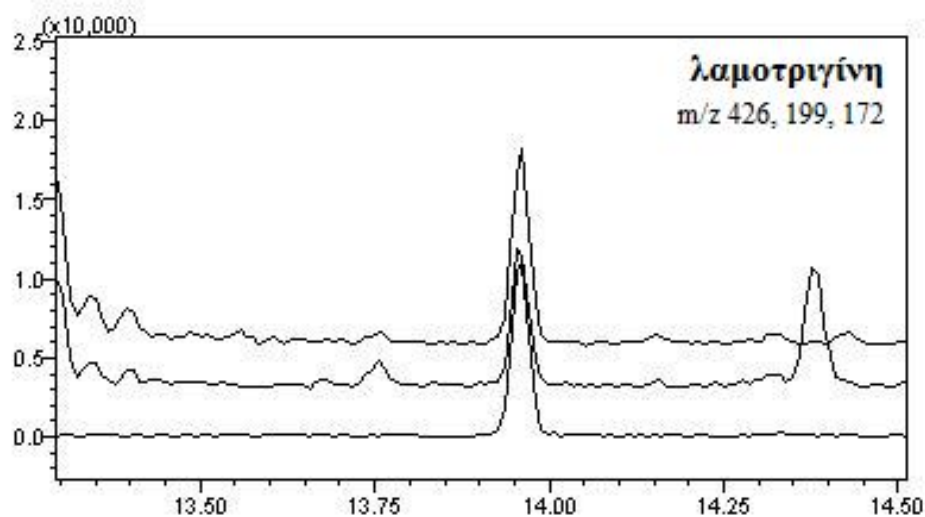
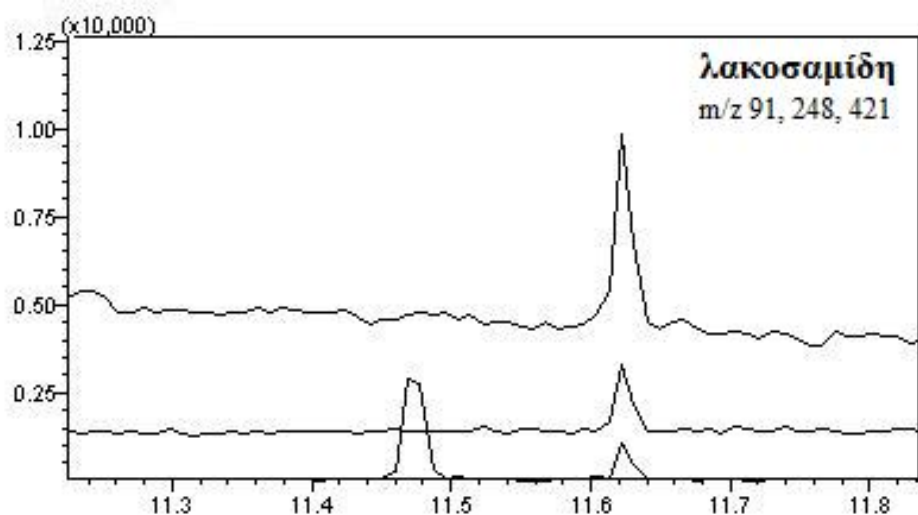
- το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος ολικού αίματος στο χρόνο ανάσχεσης του αναλύτη, που έπρεπε να είναι τουλάχιστον 10 ($S/N > 10:1$) και βρέθηκε να είναι 0,50 $\mu\text{g/mL}$ για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδα, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη και 2,00 $\mu\text{g/mL}$ για την αιθοσουξιμίδα και την τοπιραμάτη. Για τον υπολογισμό των τιμών αυτών, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 6 εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος στις παραπάνω συγκεντρώσεις για τους έντεκα αναλύτες και 6 τυφλά δείγματα ολικού αίματος.
- τα στοιχεία της εξίσωσης παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της κάθε ημέρας χρησιμοποιώντας τη σχετική μαθηματική σχέση (Κεφάλαιο 8.4), και στη συνέχεια τον υπολογισμό των μέσων τιμών από τα 5 διαγράμματα βαθμονόμησης για τον κάθε αναλύτη όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.1.

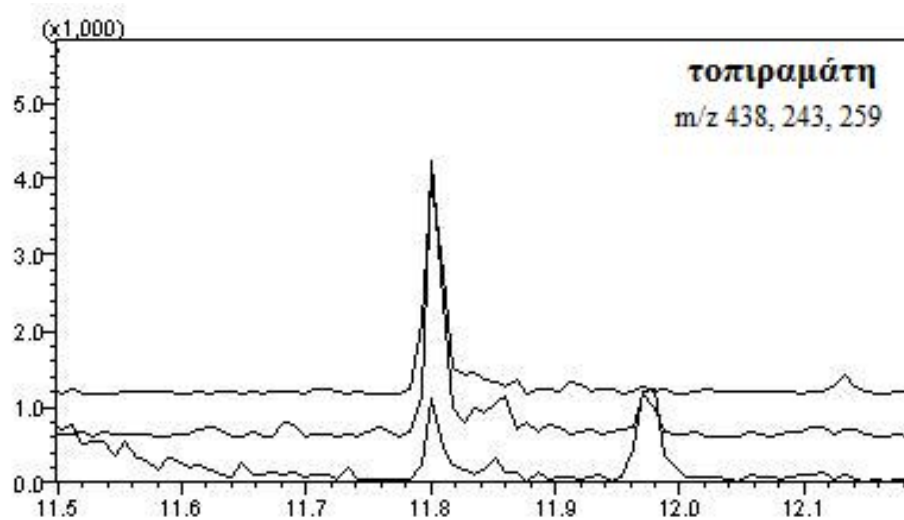
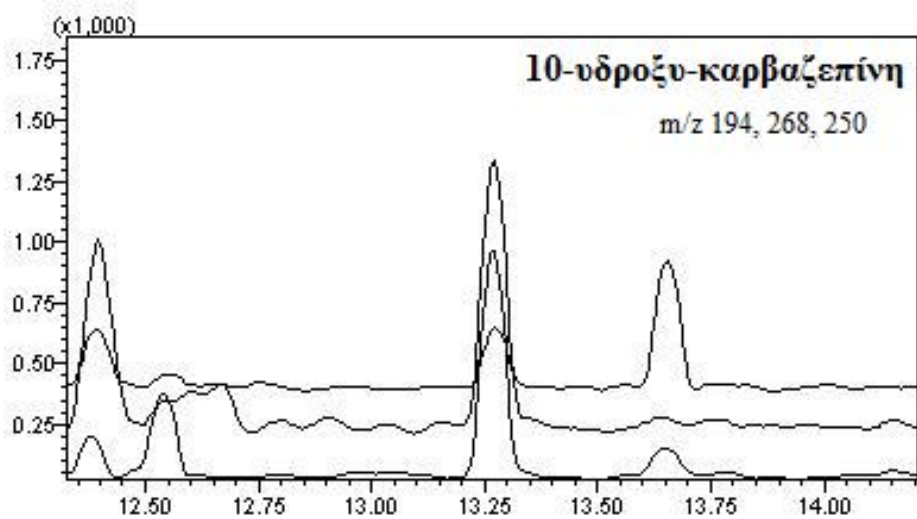
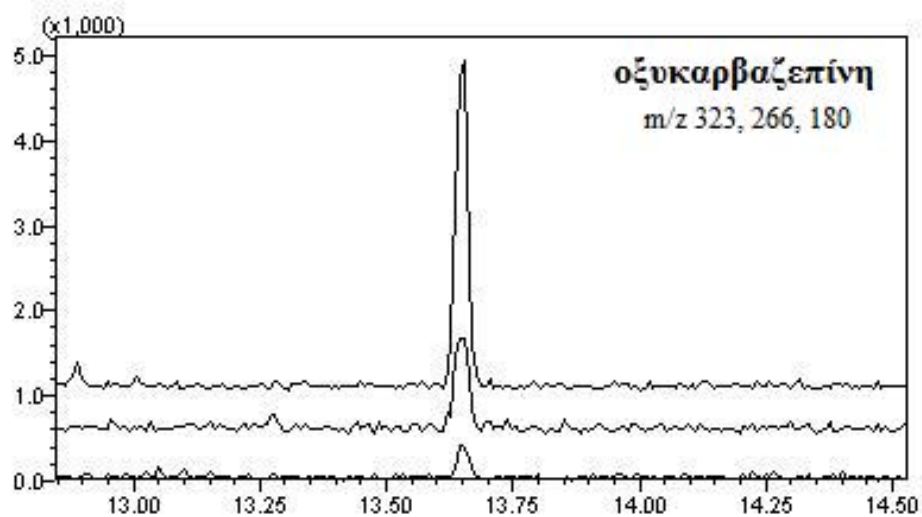
Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων των έντεκα αναλυτών, που ελήφθησαν από ένα εμβολιασμένο δείγμα ολικού αίματος στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.2.

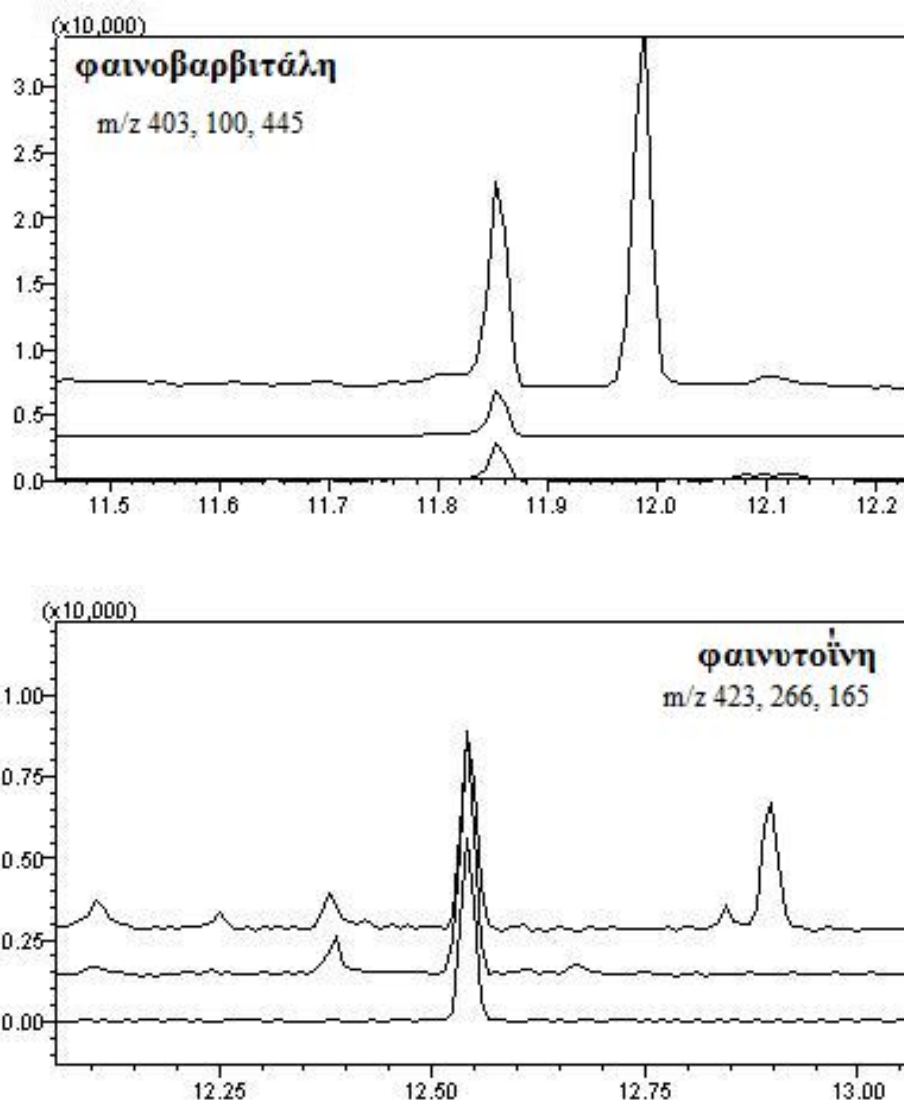
Πίνακας 9.1. Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου προσδιορισμού των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών σε ολικό αίμα.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	LOD (μg/mL)		LOQ (μg/mL)	
	(S/N>3:1)	(3,3 $\cdot$ SD $_{\beta/\alpha}$)	(S/N>10:1)	(10 $\cdot$ SD $_{\beta/\alpha}$)
Αιθοσουξιμίδη	0,67	0,39	2,00	1,19
Καρβαμαζεπίνη	0,15	0,27	0,50	0,82
10,11-εποξειδιο- καρβαμαζεπίνη	0,15	0,10	0,50	0,31
Λακосуαμίδη	0,15	0,30	0,50	0,92
Λαμοτριγίνη	0,15	0,04	0,50	0,13
Λεβετιρακετάμη	0,15	0,14	0,50	0,43
Οξυκαρβαζεπίνη	0,15	0,07	0,50	0,21
10-υδροξυ-καρβαζεπίνη	0,15	0,11	0,50	0,33
Τοπιραμάτη	0,67	1,14	2,00	3,45
Φαινοβαρβιτάλη	0,15	0,60	0,50	1,82
Φαινοτοΐνη	0,15	0,08	0,50	0,23









Σχήμα 9.2. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων των έντεκα αναλυτών, που ελήφθησαν από ένα εμβολιασμένο δείγμα ολικού αίματος στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης.

9.5. Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών σε ολικό αίμα, πραγματοποιήθηκε σε πέντε διαφορετικές ημέρες με την κατασκευή ισάριθμων διαγραμμάτων βαθμονόμησης 6 σημείων, που παρουσίασαν γραμμική συσχέτιση. Οι συγκεντρώσεις των 6 σημείων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για την κάθε ουσία,

καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους αναφέρονται στον Πίνακα 5.1. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για όλες τις ουσίες ήταν της μορφής $y=ax+\beta$, όπου:

y =λόγος επιφάνειας κορυφής αναλύτη προς επιφάνεια κορυφής εσωτερικού προτύπου
 x =συγκέντρωση αναλύτη στο αίμα, σε $\mu\text{g/mL}$.

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης σε ολικό αίμα για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 9.10, 9.11 και 9.12 για την αιθοσουξιμίδη, την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, την τοπιραμάτη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, αντίστοιχα. Η % RSD των κλίσεων αποτέλεσε κριτήριο της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση για εύρος συγκεντρώσεων στο αίμα από 0,50 έως 50,0 $\mu\text{g/mL}$ για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, καθώς και από 2,00 έως 160,0 $\mu\text{g/mL}$ για την αιθοσουξιμίδη και την τοπιραμάτη. Το τετράγωνο του μέσου συντελεστή συσχέτισης ήταν εντός των αποδεκτών ορίων και για τους έντεκα αναλύτες σε όλες τις σειρές ανάλυσης ($R^2 \geq 0,9924$).

Πίνακας 9.2. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την αιθοσουξιμίδη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R^2
1 ^η	$y=3,7123 (\pm 0,0012) \cdot x - 2,3218 (\pm 0,0062)$	0,9944
2 ^η	$y=3,3852 (\pm 0,00011) \cdot x - 1,8711 (\pm 0,0055)$	0,9950
3 ^η	$y=3,7889 (\pm 0,0022) \cdot x - 1,2946 (\pm 0,0069)$	0,9989
4 ^η	$y=3,6258 (\pm 0,0041) \cdot x - 2,3669 (\pm 0,0060)$	0,9971
5 ^η	$y=3,5874 (\pm 0,0034) \cdot x - 1,9614 (\pm 0,0055)$	0,9973
Μέση εξίσωση	$y=3,6199 (\pm 0,1527) \cdot x - 1,9632 (\pm 0,4322)$	
% RSD κλίσεων	4,2	

Πίνακας 9.3. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την καρβαμαζεπίνη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=3,4233(\pm 0,0014) \cdot x+3,7076 (\pm 0,0035)$	0,9929
2 ^η	$y=3,1799 (\pm 0,0021) \cdot x+3,1284 (\pm 0,0052)$	0,9971
3 ^η	$y=3,5629 (\pm 0,0020) \cdot x+3,1946 (\pm 0,0019)$	0,9984
4 ^η	$y=3,3891 (\pm 0,0012) \cdot x+3,1068 (\pm 0,0041)$	0,9935
5 ^η	$y=3,1972 (\pm 0,0010) \cdot x+3,5617 (\pm 0,0024)$	0,9951
Μέση εξίσωση	$y=3,3505 (\pm 0,1616) \cdot x+3,3398 (\pm 0,2759)$	
% RSD κλίσεων	4,8	

Πίνακας 9.4. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0,1474 (\pm 0,0009) \cdot x+0,0600 (\pm 0,0052)$	0,9958
2 ^η	$y=0,1418 (\pm 0,0011) \cdot x+0,0581 (\pm 0,0034)$	0,9977
3 ^η	$y=0,1509 (\pm 0,0014) \cdot x+0,0547 (\pm 0,0029)$	0,9959
4 ^η	$y=0,1522 (\pm 0,0011) \cdot x+0,0625 (\pm 0,0041)$	0,9930
5 ^η	$y=0,1397 (\pm 0,0016) \cdot x+0,0668 (\pm 0,0025)$	0,9979
Μέση εξίσωση	$y=0,1464 (\pm 0,0055) \cdot x+0,0604 (\pm 0,0046)$	
% RSD κλίσεων	3,8	

Πίνακας 9.5. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για τη λακοσαμίδα σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0,4102 (\pm 0,0013) \cdot x - 0,5362 (\pm 0,0042)$	0,9969
2 ^η	$y=0,4268 (\pm 0,0017) \cdot x - 0,5198 (\pm 0,0037)$	0,9971
3 ^η	$y=0,4332 (\pm 0,0021) \cdot x - 0,6027 (\pm 0,0029)$	0,9988
4 ^η	$y=0,4175 (\pm 0,0024) \cdot x - 0,5035 (\pm 0,0023)$	0,9938
5 ^η	$y=0,4445 (\pm 0,0018) \cdot x - 0,5174 (\pm 0,0019)$	0,9981
Μέση εξίσωση	$y=0,4264 (\pm 0,0134) \cdot x - 0,5359 (\pm 0,0391)$	
% RSD κλίσεων	3,1	

Πίνακας 9.6. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για τη λαμοτριγίνη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0,7753 (\pm 0,0009) \cdot x + 0,0724 (\pm 0,0012)$	0,9955
2 ^η	$y=0,7153 (\pm 0,0007) \cdot x + 0,0735 (\pm 0,0025)$	0,9981
3 ^η	$y=0,7962 (\pm 0,0006) \cdot x + 0,0895 (\pm 0,0013)$	0,9924
4 ^η	$y=0,7511 (\pm 0,0011) \cdot x + 0,0942 (\pm 0,0024)$	0,9978
5 ^η	$y=0,7145 (\pm 0,0010) \cdot x + 0,0885 (\pm 0,0015)$	0,9982
Μέση εξίσωση	$y=0,7505 (\pm 0,0362) \cdot x + 0,0836 (\pm 0,0099)$	
% RSD κλίσεων	4,8	

Πίνακας 9.7. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για τη λεβετιρακετάμη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=1,3642 (\pm 0,0034) \cdot x - 0,3048 (\pm 0,0051)$	0,9960
2 ^η	$y=1,3489 (\pm 0,0032) \cdot x - 0,2189 (\pm 0,0047)$	0,9954
3 ^η	$y=1,2263 (\pm 0,0026) \cdot x - 0,1792 (\pm 0,0039)$	0,9966
4 ^η	$y=1,2547 (\pm 0,0019) \cdot x - 0,1961 (\pm 0,0037)$	0,9974
5 ^η	$y=1,2758 (\pm 0,0026) \cdot x - 0,1614 (\pm 0,0029)$	0,9953
Μέση εξίσωση	$y=1,2940 (\pm 0,0600) \cdot x - 0,2121 (\pm 0,0560)$	
% RSD κλίσεων	4,6	

Πίνακας 9.8. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την οξυκαρβαζεπίνη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=2,4900 (\pm 0,00012) \cdot x + 0,4390 (\pm 0,0017)$	0,9928
2 ^η	$y=2,5221 (\pm 0,00011) \cdot x + 0,3701 (\pm 0,0015)$	0,9981
3 ^η	$y=2,3128 (\pm 0,00013) \cdot x + 0,4723 (\pm 0,0019)$	0,9959
4 ^η	$y=2,5298 (\pm 0,00011) \cdot x + 0,3641 (\pm 0,0021)$	0,9933
5 ^η	$y=2,4213 (\pm 0,00010) \cdot x + 0,4614 (\pm 0,0015)$	0,9964
Μέση εξίσωση	$y=2,4552 (\pm 0,0904) \cdot x + 0,4214 (\pm 0,0510)$	
% RSD κλίσεων	3,7	

Πίνακας 9.9. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=1,2113 (\pm 0,0024) \cdot x + 0,4243 (\pm 0,0023)$	0,9971
2 ^η	$y=1,1794 (\pm 0,0031) \cdot x + 0,4224 (\pm 0,0015)$	0,9986
3 ^η	$y=1,1885 (\pm 0,0023) \cdot x + 0,3315 (\pm 0,0036)$	0,9972
4 ^η	$y=1,2721 (\pm 0,0029) \cdot x + 0,4285 (\pm 0,0028)$	0,9945
5 ^η	$y=1,2679 (\pm 0,0040) \cdot x + 0,3965 (\pm 0,0023)$	0,9939
Μέση εξίσωση	$y=1,2238 (\pm 0,0437) \cdot x + 0,4006 (\pm 0,0406)$	
% RSD κλίσεων	3,6	

Πίνακας 9.10. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την τοπιραμάτη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0,0124 (\pm 0,0014) \cdot x + 0,0633 (\pm 0,0016)$	0,9954
2 ^η	$y=0,0126 (\pm 0,0021) \cdot x + 0,0612 (\pm 0,0017)$	0,9964
3 ^η	$y=0,0135 (\pm 0,0035) \cdot x + 0,0558 (\pm 0,0025)$	0,9989
4 ^η	$y=0,0125 (\pm 0,0030) \cdot x + 0,0425 (\pm 0,0032)$	0,9941
5 ^η	$y=0,0122 (\pm 0,0018) \cdot x + 0,0587 (\pm 0,0026)$	0,9972
Μέση εξίσωση	$y=0,0126 (\pm 0,0020) \cdot x + 0,0563 (\pm 0,0082)$	
% RSD κλίσεων	4,0	

Πίνακας 9.11. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για τη φαινοβαρβιτάλη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0,8289 (\pm 0,0031) \cdot x - 0,6905 (\pm 0,0028)$	0,9956
2 ^η	$y=0,7709 (\pm 0,0027) \cdot x - 0,3333 (\pm 0,0030)$	0,9925
3 ^η	$y=0,7979 (\pm 0,0029) \cdot x - 0,4157 (\pm 0,0011)$	0,9967
4 ^η	$y=0,8158 (\pm 0,0010) \cdot x - 0,3579 (\pm 0,0047)$	0,9935
5 ^η	$y=0,8474 (\pm 0,0017) \cdot x - 0,3614 (\pm 0,0032)$	0,9989
Μέση εξίσωση	$y=0,8122 (\pm 0,0293) \cdot x - 0,4318 (\pm 0,1477)$	
% RSD κλίσεων	3,6	

Πίνακας 9.12. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για τη φαινοτοΐνη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=0,8653 (\pm 0,0015) \cdot x + 0,5131 (\pm 0,0032)$	0,9962
2 ^η	$y=0,8458 (\pm 0,0021) \cdot x + 0,4932 (\pm 0,0025)$	0,9985
3 ^η	$y=0,7929 (\pm 0,0026) \cdot x + 0,4926 (\pm 0,0019)$	0,9932
4 ^η	$y=0,8221 (\pm 0,0031) \cdot x + 0,4668 (\pm 0,0025)$	0,9961
5 ^η	$y=0,8972 (\pm 0,0035) \cdot x + 0,5145 (\pm 0,0017)$	0,9983
Μέση εξίσωση	$y=0,8447 (\pm 0,0399) \cdot x + 0,4960 (\pm 0,0194)$	
% RSD κλίσεων	4,7	

9.6. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Οι επαναποσοτικοποιήσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης ολικού αίματος σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και οι αποκλίσεις τους (% E_r) για την κάθε ημέρα παρουσιάζονται στους Πίνακες 9.13, 9.14, 9.15, 9.16, 9.17, 9.18, 9.19, 9.20, 9.21, 9.22 και 9.23 για την αιθοσουξιμίδη, την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την

οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, την τοπιραμάτη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, αντίστοιχα. Οι αποκλίσεις των αποτελεσμάτων επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών -13,0% και 14,0% για όλους τους αναλύτες, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και για το σύνολο των ημερών. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ (στο $LOQ \pm 20\%$).

Πίνακας 9.13. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για την αιθοσουλζιμίδη, στο ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	2,00	4,00	12,0	40,0	80,0	200,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	1,96	4,23	12,5	41,4	89,5	204,6
	% E _r	-2,0	5,8	4,2	3,5	11,9	2,3
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,03	4,17	12,2	39,7	87,4	195,6
	% E _r	1,5	4,3	1,7	-0,7	9,3	-2,2
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,06	3,95	11,1	38,2	82,4	211,3
	% E _r	3,0	-1,3	-7,5	-4,5	3,0	5,7
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,03	3,87	10,9	42,1	76,7	184,6
	% E _r	1,5	-3,3	-9,2	5,3	-4,1	-7,7
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,21	4,36	11,3	42,7	83,4	178,9
	% E _r	10,5	9,0	-5,8	6,8	4,3	-10,6

Πίνακας 9.14. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για την καρβαμαζεπίνη, στο ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,56	1,07	3,31	9,45	19,5	54,6
	% E _r	12,0	7,0	10,3	-5,5	-2,5	9,2
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,54	0,98	2,95	9,71	22,5	52,6
	% E _r	8,0	-2,0	-1,7	-2,9	12,5	5,2
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,46	1,09	3,11	10,5	18,7	47,9
	% E _r	-8,0	9,0	3,7	5,0	-6,5	-4,2
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,53	0,88	3,11	10,8	20,7	44,6
	% E _r	6,0	-12,0	3,7	8,0	3,5	-10,8
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,44	1,06	2,87	10,7	18,9	51,9
	% E _r	-12,0	6,0	-4,3	7,0	-5,5	3,8

Πίνακας 9.15. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, στο ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,48	1,05	3,28	10,5	21,5	53,8
	% E _r	-4,0	5,0	9,3	5,0	7,5	7,6
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,46	0,99	2,93	9,61	18,5	52,3
	% E _r	-8,0	-1,0	-2,3	-3,9	-7,5	4,6
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,54	1,04	3,21	10,9	21,7	48,9
	% E _r	8,0	4,0	7,0	9,0	8,5	-2,2
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,57	0,92	3,16	8,85	22,3	52,3
	% E _r	14,0	-8,0	5,3	-11,5	11,5	4,6
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,48	1,07	3,07	9,71	18,7	47,9
	% E _r	-4,0	7,0	2,3	-2,9	-6,5	-4,2

Πίνακας 9.16. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη λακοσαμίδα, στο ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,53	1,04	3,28	9,47	21,5	52,6
	% E _r	6,0	4,0	9,3	-5,3	7,5	5,2
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,56	0,88	2,85	9,76	18,5	53,6
	% E _r	12,0	-12,0	-5,0	-2,4	-7,5	7,2
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,48	1,11	3,21	9,75	19,3	47,5
	% E _r	-4,0	11,0	7,0	-2,5	-3,5	-5,0
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,51	0,87	3,17	8,99	20,1	43,9
	% E _r	2,0	-13,0	5,7	-10,0	0,5	-12,2
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,45	1,0	2,79	9,06	17,9	51,5
	% E _r	-10,0	7,0	-7,0	-9,4	-10,5	3,0

Πίνακας 9.17. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη λαμοτριγίνη, στο ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,46	1,03	3,17	10,7	19,5	47,5
	% E _r	-8,0	3,0	5,7	7,0	-2,5	-5,0
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,52	0,87	3,14	9,69	21,5	51,8
	% E _r	4,0	-13,0	4,7	-3,1	7,5	3,6
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,57	1,12	3,19	10,7	17,7	46,5
	% E _r	14,0	12,0	6,3	7,0	-11,5	-7,0
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,44	0,93	3,23	9,23	21,3	47,8
	% E _r	-12,0	-7,0	7,7	-7,7	6,5	-4,4
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,48	1,04	2,76	9,51	19,2	53,1
	% E _r	-4,0	4,0	-8,0	-4,9	-4,0	6,2

Πίνακας 9.18. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη λεβετιρακετάμη, στο ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,47	0,89	3,27	10,4	22,5	48,2
	% E _r	-6,0	-11,0	9,0	4,0	12,5	-3,6
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,53	0,96	3,15	9,87	18,5	49,6
	% E _r	6,0	-4,0	5,0	-1,3	-7,5	-0,8
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,44	1,01	2,87	11	21,7	53,4
	% E _r	-12,0	1,0	-4,3	10,0	8,5	6,8
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,52	0,99	2,76	10,6	18,7	55,1
	% E _r	4,0	-1,0	-8,0	6,0	-6,5	10,2
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,48	0,94	3,12	10,7	18,1	48,3
	% E _r	-4,0	-6,0	4,0	7,0	-9,5	-3,4

Πίνακας 9.19. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για την οξυκαρβαζεπίνη, στο ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,47	0,95	2,87	10,4	18,6	52,6
	% E _r	-6,0	-5,0	-4,3	4,0	-7,0	5,2
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,45	0,91	2,93	9,71	21,7	53
	% E _r	-10,0	-9,0	-2,3	-2,9	8,5	6,0
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,53	1,14	2,84	10,3	19,4	46,9
	% E _r	6,0	14,0	-5,3	3,0	-3,0	-6,2
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,57	1,08	3,14	9,85	22,3	48,2
	% E _r	14,0	8,0	4,7	-1,5	11,5	-3,6
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,46	0,93	3,25	8,96	19,4	47,6
	% E _r	-8,0	-7,0	8,3	-10,4	-3,0	-4,8

Πίνακας 9.20. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, στο ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,44	1,02	3,18	10,5	21,7	52,8
	% E _r	-12,0	2,0	6,0	5,0	8,5	5,6
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,56	0,99	2,96	9,74	18,7	52,3
	% E _r	12,0	-1,0	-1,3	-2,6	-6,5	4,6
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,51	1,05	3,17	10,7	22,7	46,9
	% E _r	2,0	5,0	5,7	7,0	13,5	-6,2
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,52	0,95	3,22	8,88	21,3	52,6
	% E _r	4,0	-5,0	7,3	-11,2	6,5	5,2
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,45	1,03	3,15	9,76	19,7	47,4
	% E _r	-10,0	3,0	5,0	-2,4	-1,5	-5,2

Πίνακας 9.21. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για την τοπιραμάτη, στο ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	2,00	4,00	12,0	40,0	80,0	200,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	1,96	4,23	12,5	41,4	89,5	204,6
	% E _r	-2,0	5,8	4,2	3,5	11,9	2,3
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,03	4,17	12,2	39,7	87,4	195,6
	% E _r	1,5	4,3	1,7	-0,7	9,3	-2,2
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,06	3,95	11,1	38,2	82,4	211,3
	% E _r	3,0	-1,3	-7,5	-4,5	3,0	5,7
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,03	3,87	10,9	42,1	76,7	184,6
	% E _r	1,5	-3,3	-9,2	5,3	-4,1	-7,7
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,21	4,36	11,3	42,7	83,4	178,9
	% E _r	10,5	9,0	-5,8	6,8	4,3	-10,6

Πίνακας 9.22. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη φαινοβαρβιτάλη, στο ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,55	1,01	3,25	9,41	17,5	53,6
	% E _r	10,0	1,0	8,3	-5,9	-12,5	7,2
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,47	0,88	2,77	9,21	21,5	52,6
	% E _r	-6,0	-12,0	-7,7	-7,9	7,5	5,2
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,49	1,04	3,11	10,6	18,9	54,9
	% E _r	-2,0	4,0	3,7	6,0	-5,5	9,8
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,56	0,91	3,16	10,8	21,7	47,6
	% E _r	12,0	-9,0	5,3	8,0	8,5	-4,8
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,47	1,03	2,84	10,3	19,9	51,2
	% E _r	-6,0	3,0	-5,3	3,0	-0,5	2,4

Πίνακας 9.23. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη φαινυτοΐνη, στο ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,48	1,05	3,13	10,3	22,5	52,8
	% E _r	-4,0	5,0	4,3	3,0	12,5	5,6
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,52	0,95	2,93	9,66	19,6	52,1
	% E _r	4,0	-5,0	-2,3	-3,4	-2,0	4,2
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,47	1,07	3,25	10,4	21,7	48,5
	% E _r	-6,0	7,0	8,3	4,0	8,5	-3,0
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,51	0,97	3,13	8,89	21,3	52,9
	% E _r	2,0	-3,0	4,3	-11,1	6,5	5,8
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,49	1,04	3,17	9,79	17,7	47,1
	% E _r	-2,0	4,0	5,7	-2,1	-11,5	-5,8

9.7. Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου προσδιορισμού των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων (αιθοσουξιμίδη, καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινυτοΐνη) και των δύο μεταβολιτών σε ολικό αίμα, εκτιμήθηκαν στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας:

- 1,50 μg/mL για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, καθώς και 6,00 μg/mL για την αιθοσουξιμίδη και την τοπιραμάτη (QC1, χαμηλό επίπεδο)
- 15,0 μg/mL για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, καθώς και 60,0 μg/mL για την αιθοσουξιμίδη και την τοπιραμάτη (QC2, μεσαίο επίπεδο)

- 40,0 µg/mL για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδα, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, καθώς και 160,0 µg/mL για την αιθοσουξιμίδη και την τοπιραμάτη (QC3, υψηλό επίπεδο).

Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας της μεθόδου στο ολικό αίμα για τις 5 ημέρες και στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 9.24, 9.25, 9.26, 9.27, 9.28, 9.29, 9.30, 9.31, 9.32, 9.33 και 9.34 για την αιθοσουξιμίδη, την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδα, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, την τοπιραμάτη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.35. Οι τιμές της επαναληψιμότητας και της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$.

Επίσης, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκτιμήθηκε από την % σχετική τυπική απόκλιση των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης των 5 ημερών και ήταν εντός των αποδεκτών ορίων ($\leq 5\%$) και συγκεκριμένα, 4,2%, 3,8%, 3,7%, 3,1%, 4,8%, 4,6%, 3,7%, 3,6%, 4,0%, 3,6% και 4,7% για την αιθοσουξιμίδη, την καρβαμαζεπίνη, 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδα, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, την τοπιραμάτη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, αντίστοιχα.

9.8. Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η ορθότητα εντός της ημέρας εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας ολικού αίματος, για την κάθε ημέρα και οι μεγαλύτερες, κατά απόλυτη τιμή, μέσες τιμές του % E_r που παρατηρήθηκαν ήταν:

- στο χαμηλό επίπεδο ελέγχου ποιότητας (QC1), 7,8% για την αιθοσουξιμίδη, 9,4% για την καρβαμαζεπίνη, 9,1% για τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, 6,8% για τη λακοσαμίδα, 11,3% για τη λαμοτριγίνη, 11,1% για τη λεβετιρακετάμη, 8,7% για την οξυκαρβαζεπίνη, 9,7% για τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, 10,7% για την τοπιραμάτη, 12,0% για τη φαινοβαρβιτάλη και 11,3% για τη φαινυτοΐνη.

- στο μεσαίο επίπεδο (QC2), 8,7% για την αιθοσουξιμίδη, 6,0% για την καρβαμαζεπίνη, 10,7% για τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, 7,8% για τη λακοσαμίδη, 11,1% για τη λαμοτριγίνη, 7,6% για τη λεβετιρακετάμη, 9,7% για την οξυκαρβαζεπίνη, 12,4% για τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, 12,7% για την τοπιραμάτη, 12,1% για τη φαινοβαρβιτάλη και 9,9% για τη φαινυτοΐνη.
- στο υψηλό επίπεδο (QC3), 6,1% για την αιθοσουξιμίδη, 12,0% για την καρβαμαζεπίνη, 13,8% για τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, 8,7% για τη λακοσαμίδη, 12,3% για τη λαμοτριγίνη, 9,3% για τη λεβετιρακετάμη, 13,8% για την οξυκαρβαζεπίνη, 10,8% για τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, 7,0% για την τοπιραμάτη, 14,8% για τη φαινοβαρβιτάλη και 9,8% για τη φαινυτοΐνη.

Τα αποτελέσματα της ορθότητας της μεθόδου εντός της ημέρας στο ολικό αίμα για τις 5 ημέρες και στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 9.24, 9.25, 9.26, 9.27, 9.28, 9.29, 9.30, 9.31, 9.32, 9.33 και 9.34 για την αιθοσουξιμίδη, την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, την τοπιραμάτη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της ορθότητας της μεθόδου δια των ημερών στο ολικό αίμα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 9.35. Οι τιμές για την ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$.

Πίνακας 9.24. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την αιθουσούμιδη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (6,00 µg/mL)			QC2 (60,0 µg/mL)			QC3 (160,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	5,96 $\pm$ 0,27	4,5	-0,7	64,4 $\pm$ 4,2	6,5	7,3	150,9 $\pm$ 5,9	3,9	-5,7
2 ^η	5,88 $\pm$ 0,21	3,6	-2,0	55,4 $\pm$ 5,1	9,2	-7,7	150,3 $\pm$ 8,5	5,7	-6,1
3 ^η	6,32 $\pm$ 0,35	5,5	5,3	57,3 $\pm$ 4,3	7,5	-4,5	166,4 $\pm$ 7,9	4,7	4,0
4 ^η	6,45 $\pm$ 0,36	5,6	7,5	65,2 $\pm$ 3,8	5,8	8,7	161,2 $\pm$ 9,1	5,6	0,7
5 ^η	6,47 $\pm$ 0,24	3,7	7,8	63,8 $\pm$ 2,9	4,5	6,3	153,4 $\pm$ 8,4	5,5	-4,1

Πίνακας 9.25. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την καρβαμαζεπίνη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	1,561 $\pm$ 0,089	5,7	4,1	14,4 $\pm$ 1,9	13,2	-4,0	43,3 $\pm$ 5,1	11,8	8,2
2 ^η	1,641 $\pm$ 0,055	3,4	9,4	15,9 $\pm$ 1,8	11,3	6,0	35,2 $\pm$ 4,4	12,5	-12,0
3 ^η	1,433 $\pm$ 0,061	4,3	-4,5	15,3 $\pm$ 1,3	8,5	2,0	37,6 $\pm$ 3,8	10,1	-6,0
4 ^η	1,582 $\pm$ 0,078	4,9	5,5	14,7 $\pm$ 1,6	10,9	-2,0	36,9 $\pm$ 2,7	7,3	-7,8
5 ^η	1,575 $\pm$ 0,093	5,9	5,0	15,7 $\pm$ 1,1	7,0	4,7	40,0 $\pm$ 3,1	7,7	1,0

Πίνακας 9.26. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη 10,11-εποξιδιο-καρβαμαζεπίνη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	1,442 $\pm$ 0,022	1,5	-3,9	16,1 $\pm$ 2,1	13,0	7,3	37,8 $\pm$ 4,8	12,7	-5,5
2 ^η	1,461 $\pm$ 0,069	4,7	-2,6	13,4 $\pm$ 1,8	13,4	-10,7	45,5 $\pm$ 3,4	7,5	13,8
3 ^η	1,364 $\pm$ 0,079	5,8	-9,1	16,4 $\pm$ 1,1	6,7	9,3	44,7 $\pm$ 2,9	6,5	11,8
4 ^η	1,522 $\pm$ 0,085	5,6	1,5	15,6 $\pm$ 1,3	8,3	4,0	39,8 $\pm$ 4,1	10,3	-0,5
5 ^η	1,458 $\pm$ 0,093	6,4	-2,8	14,8 $\pm$ 1,5	10,1	-1,3	43,2 $\pm$ 3,1	7,2	8,0

Πίνακας 9.27. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη λακοσαμίδα σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%) E _r)	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%) E _r)	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%) E _r)
1 ^η	1,545 $\pm$ 0,056	3,6	3,0	13,92 $\pm$ 0,31	2,2	-7,2	41,57 $\pm$ 0,87	2,1	3,9
2 ^η	1,462 $\pm$ 0,044	3,0	-2,5	14,19 $\pm$ 0,55	3,9	-5,4	43,38 $\pm$ 0,82	1,9	8,5
3 ^η	1,423 $\pm$ 0,061	4,3	-5,1	14,39 $\pm$ 0,67	4,7	-4,1	43,46 $\pm$ 0,93	2,1	8,7
4 ^η	1,548 $\pm$ 0,072	4,7	3,2	13,83 $\pm$ 0,73	5,3	-7,8	39,37 $\pm$ 0,77	2,0	-1,6
5 ^η	1,398 $\pm$ 0,038	2,7	-6,8	14,75 $\pm$ 0,92	6,2	-1,7	42,87 $\pm$ 0,95	2,2	7,2

Πίνακας 9.28. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη λαμοτριγίνη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	1,43 $\pm$ 0,11	7,7	-4,7	15,63 $\pm$ 0,85	5,4	4,2	41,2 $\pm$ 4,7	11,4	3,0
2 ^η	1,33 $\pm$ 0,12	9,0	-11,3	16,67 $\pm$ 0,74	4,4	11,1	38,8 $\pm$ 2,8	7,2	-3,0
3 ^η	1,52 $\pm$ 0,10	6,6	1,3	16,18 $\pm$ 0,63	3,9	7,9	37,1 $\pm$ 1,9	5,1	-7,3
4 ^η	1,35 $\pm$ 0,13	9,6	-10,0	14,78 $\pm$ 0,58	3,9	-1,5	44,9 $\pm$ 1,5	3,3	12,3
5 ^η	1,38 $\pm$ 0,10	7,2	-8,0	13,51 $\pm$ 0,67	5,0	-9,9	43,2 $\pm$ 2,1	4,9	8,0

Πίνακας 9.29. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη λεβετιρακετάμη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	1,403 $\pm$ 0,022	1,6	-6,5	14,60 $\pm$ 0,26	1,8	-2,7	41,7 $\pm$ 1,2	2,9	4,2
2 ^η	1,481 $\pm$ 0,085	5,7	-1,3	13,86 $\pm$ 0,38	2,7	-7,6	43,7 $\pm$ 2,8	6,4	9,3
3 ^η	1,398 $\pm$ 0,064	4,6	-6,8	14,13 $\pm$ 0,49	3,5	-5,8	38,5 $\pm$ 1,7	4,4	-3,8
4 ^η	1,333 $\pm$ 0,051	3,8	-11,1	13,98 $\pm$ 0,57	4,1	-6,8	42,9 $\pm$ 2,3	5,4	7,3
5 ^η	1,512 $\pm$ 0,073	4,8	0,8	15,26 $\pm$ 0,63	4,1	1,7	39,1 $\pm$ 3,4	8,7	-2,3

Πίνακας 9.30. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την οξυκαρβαζεπίνη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	1,568 $\pm$ 0,028	1,8	4,5	13,55 $\pm$ 0,48	3,5	-9,7	34,5 $\pm$ 2,8	8,1	-13,8
2 ^η	1,616 $\pm$ 0,064	4,0	7,7	15,93 $\pm$ 0,39	2,4	6,2	37,8 $\pm$ 1,9	5,0	-5,5
3 ^η	1,622 $\pm$ 0,071	4,4	8,1	16,21 $\pm$ 0,74	4,6	8,1	41,6 $\pm$ 2,6	6,3	4,0
4 ^η	1,587 $\pm$ 0,082	5,2	5,8	13,98 $\pm$ 0,36	2,6	-6,8	38,5 $\pm$ 3,7	9,6	-3,8
5 ^η	1,369 $\pm$ 0,055	4,0	-8,7	14,11 $\pm$ 0,41	2,9	-5,9	36,3 $\pm$ 2,2	6,1	-9,3

Πίνακας 9.31. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	1,551 $\pm$ 0,052	3,4	3,4	13,14 $\pm$ 0,22	1,7	-12,4	37,8 $\pm$ 2,1	5,6	-5,5
2 ^η	1,623 $\pm$ 0,049	3,0	8,2	16,32 $\pm$ 0,39	2,4	8,8	41,6 $\pm$ 1,7	4,1	4,0
3 ^η	1,422 $\pm$ 0,061	4,3	-5,2	15,58 $\pm$ 0,85	5,5	3,9	35,7 $\pm$ 1,9	5,3	-10,8
4 ^η	1,397 $\pm$ 0,073	5,2	-6,9	14,22 $\pm$ 0,94	6,6	-5,2	38,1 $\pm$ 3,3	8,7	-4,8
5 ^η	1,355 $\pm$ 0,074	5,5	-9,7	13,47 $\pm$ 0,75	5,6	-10,2	36,9 $\pm$ 4,1	11,1	-7,8

Πίνακας 9.32. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την τοπιραμάτη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (6,00 µg/mL)			QC2 (60,0 µg/mL)			QC3 (160,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	6,14 $\pm$ 0,33	5,4	2,3	62,7 $\pm$ 3,8	6,1	4,5	165,7 $\pm$ 7,1	4,3	3,6
2 ^η	6,28 $\pm$ 0,29	4,6	4,7	65,2 $\pm$ 2,5	3,8	8,7	171,2 $\pm$ 6,4	3,7	7,0
3 ^η	5,48 $\pm$ 0,32	5,8	-8,7	54,8 $\pm$ 3,0	5,5	-8,7	154,3 $\pm$ 5,8	3,8	-3,6
4 ^η	5,55 $\pm$ 0,27	4,9	-7,5	52,4 $\pm$ 3,7	7,1	-12,7	149,8 $\pm$ 4,9	3,3	-6,4
5 ^η	5,36 $\pm$ 0,18	3,4	-10,7	55,9 $\pm$ 2,1	3,8	-6,8	169,9 $\pm$ 6,6	3,9	6,2

Πίνακας 9.33. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη φαινοβαρβιτάλη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%) E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%) E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%) E _r)
1 ^η	1,59 $\pm$ 0,14	8,8	6,0	13,23 $\pm$ 0,52	3,9	-11,8	35,5 $\pm$ 2,2	6,2	-11,3
2 ^η	1,61 $\pm$ 0,12	7,5	7,3	16,52 $\pm$ 0,63	3,8	10,1	34,1 $\pm$ 3,9	11,4	-14,8
3 ^η	1,32 $\pm$ 0,18	13,6	-12,0	15,87 $\pm$ 0,72	4,5	5,8	39,4 $\pm$ 4,1	10,4	-1,5
4 ^η	1,65 $\pm$ 0,13	7,9	10,0	16,13 $\pm$ 0,91	5,6	7,5	43,2 $\pm$ 2,8	6,5	8,0
5 ^η	1,58 $\pm$ 0,10	6,3	5,3	16,82 $\pm$ 0,42	2,5	12,1	42,9 $\pm$ 5,5	12,8	7,3

Πίνακας 9.34. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη φαινυτοΐνη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	1,42 $\pm$ 0,11	7,7	-5,3	13,51 $\pm$ 0,57	4,2	-9,9	38,8 $\pm$ 2,5	6,4	-3,0
2 ^η	1,33 $\pm$ 0,13	9,8	-11,3	13,62 $\pm$ 0,63	4,6	-9,2	37,1 $\pm$ 1,9	5,1	-7,3
3 ^η	1,35 $\pm$ 0,15	11,1	-10,0	16,24 $\pm$ 0,47	2,9	8,3	36,9 $\pm$ 3,6	9,8	-7,8
4 ^η	1,59 $\pm$ 0,10	6,3	6,0	15,24 $\pm$ 0,38	2,5	1,6	41,5 $\pm$ 3,7	8,9	3,8
5 ^η	1,45 $\pm$ 0,12	8,3	-3,3	13,57 $\pm$ 0,52	3,8	-9,5	36,1 $\pm$ 2,4	6,6	-9,8

Πίνακας 9.35. Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα και ορθότητα δια των ημερών της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και δύο μεταβολιτών σε ολικό αίμα, στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Αναμενόμενη Συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	Ευρεθείσα Συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	Ορθότητα δια των ημερών (% E_r)	Ενδοεργαστηριακή Αναπαραγωγικότητα (% RSD, n=36)
Αιθοσουξιμίδη	6,00	$6,22 \pm 0,28$	3,6	4,5
	60,0	$61,2 \pm 4,5$	2,0	7,4
	160,0	$156,4 \pm 7,1$	-2,2	4,5
Καρβαμαζεπίνη	1,50	$1,558 \pm 0,076$	3,9	4,9
	15,0	$15,20 \pm 0,64$	1,3	4,2
	40,0	$38,7 \pm 3,2$	-3,3	8,3
10,11-εποξειδιο- καρβαμαζεπίνη	1,50	$1,449 \pm 0,057$	-3,4	3,9
	15,0	$15,3 \pm 1,2$	1,7	7,9
	40,0	$42,2 \pm 3,3$	5,5	7,8
Λακосуαμίδη	1,50	$1,475 \pm 0,069$	-1,7	4,7
	15,0	$14,22 \pm 0,37$	-5,2	2,6
	40,0	$42,1 \pm 1,7$	5,3	4,1
Λαμοτριγίνη	1,50	$1,402 \pm 0,076$	-6,5	5,4
	15,0	$15,4 \pm 1,2$	2,4	8,1
	40,0	$41,0 \pm 3,2$	2,6	7,7
Λεβετιρακετάμη	1,50	$1,425 \pm 0,071$	-5,0	5,0
	15,0	$14,37 \pm 0,57$	-4,2	4,0
	40,0	$41,2 \pm 2,3$	3,0	5,6
Οξυκαρβαζεπίνη	1,50	$1,55 \pm 0,10$	3,5	6,8
	15,0	$14,8 \pm 1,2$	-1,6	8,3
	40,0	$37,7 \pm 2,6$	-5,7	7,0
10-υδροξυ- καρβαζεπίνη	1,50	$1,47 \pm 0,11$	-2,0	7,7
	15,0	$14,5 \pm 1,4$	-3,0	9,4
	40,0	$38,0 \pm 2,2$	-4,9	5,8

Τοπιραμάτη	6,00	5,76 ± 0,42	-4,0	7,2
	60,0	58,2 ± 5,5	-3,0	9,4
	160,0	162,2 ± 9,6	1,4	5,9
Φαινοβαρβιτάλη	1,50	1,55 ± 0,13	3,3	8,5
	15,0	15,7 ± 1,4	4,8	9,1
	40,0	39,0 ± 4,2	-2,5	10,7
Φαινυτοΐνη	1,50	1,43 ± 0,10	-4,8	7,2
	15,0	14,4 ± 1,2	-3,8	8,6
	40,0	38,1 ± 2,1	-4,8	5,6

9.9. Απόλυτη ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση της μεθόδου σε ολικό αίμα εκτιμήθηκε για την αιθοσουξιμίδη, την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, την τοπιραμάτη, τη φαινοβαρβιτάλη, και τη φαινυτοΐνη, στα τρία διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της μεθόδου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 9.36. Η απόλυτη ανάκτηση της λεβετιρακετάμης-d6 (για συγκέντρωση στο αίμα 1,25 µg/mL) υπολογίστηκε σε 93,8% (±6,7).

Πίνακας 9.36. % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και δύο μεταβολιτών σε ολικό αίμα.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Συγκέντρωση (μg/mL)	% απόλυτη ανάκτηση (± SD)
Αιθοσουξιμίδη	6,00 (n=6)	84,8 ± 3,6
	60,0 (n=6)	85,6 ± 2,4
	160,0 (n=6)	87,5 ± 4,4
Καρβαμαζεπίνη	1,50 (n=6)	92,4 ± 2,5
	15,0 (n=6)	91,7 ± 1,9
	40,0 (n=6)	93,1 ± 3,5
10,11-εποξειδιο- καρβαμαζεπίνη	1,50 (n=6)	88,6 ± 3,8
	15,0 (n=6)	90,5 ± 4,1
	40,0 (n=6)	89,3 ± 5,3
Λακοσαμίδη	1,50 (n=6)	89,1 ± 4,2
	15,0 (n=6)	94,6 ± 5,4
	40,0 (n=6)	93,5 ± 4,0
Λαμοτριγίνη	1,50 (n=6)	102,2 ± 4,6
	15,0 (n=6)	97,2 ± 2,8
	40,0 (n=6)	102,6 ± 5,9
Λεβετιρακετάμη	1,50 (n=6)	96,3 ± 4,1
	15,0 (n=6)	92,0 ± 3,3
	40,0 (n=6)	90,0 ± 4,2
Οξυκαρβαζεπίνη	1,50 (n=6)	91,8 ± 3,1
	15,0 (n=6)	92,6 ± 2,2
	40,0 (n=6)	88,5 ± 5,4
10-υδροξυ-καρβαζεπίνη	1,50 (n=6)	90,8 ± 3,1
	15,0 (n=6)	86,6 ± 2,7
	40,0 (n=6)	84,5 ± 5,7
Τοπιραμάτη	6,00 (n=6)	92,4 ± 2,1
	60,0 (n=6)	91,7 ± 4,2
	160,0 (n=6)	90,1 ± 4,6
	1,50 (n=6)	82,9 ± 4,1

Φαινοβαρβιτάλη	15,0 (n=6)	84,1 ± 3,4
	40,0 (n=6)	82,3 ± 5,2
Φαινυτοΐνη	1,50 (n=6)	93,9 ± 3,1
	15,0 (n=6)	94,1 ± 4,7
	40,0 (n=6)	95,3 ± 2,9

9.10. Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε μεταβάλλοντας σκόπιμα τις επτά παραμέτρους που επιλέχθηκαν από τα στάδια της κατεργασίας των δειγμάτων και της αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης. Παρασκευάστηκαν είκοσι εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας μεσαίου επιπέδου (QC2) και κατεργάστηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών σε ολικό αίμα. Τα τέσσερα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με τις χρωματογραφικές παραμέτρους της αναπτυχθείσας μεθόδου, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα αναλύθηκαν ανά τέσσερα με τη μέθοδο τροποποιημένη ως προς: α) την ταχύτητα ροής φέροντος αερίου, β) τη θερμοκρασία ενδιάμεσου σταδίου, γ) τη θερμοκρασία του σημείου έγχυσης και δ) το δυναμικό λειτουργίας (voltage) του φασματογράφου μαζών (1,45 αντί 1,50 kV). Επιπλέον, παρασκευάστηκαν 12 εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας μεσαίου επιπέδου (QC2), εκ των οποίων τέσσερα δείγματα κατεργάστηκαν μεταβάλλοντας το pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, τέσσερα δείγματα με στήλες SPE διαφορετικής παρτίδας παραγωγής και τέλος τέσσερα δείγματα κατεργάστηκαν μεταβάλλοντας την αναλογία του μίγματος διαλυτών έκλυσης. Όλα τα δείγματα (28 δείγματα) που αναλύθηκαν συγκρίθηκαν με τα τέσσερα δείγματα που αναλύθηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο για τον προσδιορισμό των αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και σύμφωνα με τις χρωματογραφικές παραμέτρους της μεθόδου αυτής.

Με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων που υπολογίστηκαν για την αιθοσουξιμίδη, την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, την τοπιραμάτη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη ήταν 0,0051, 0,0047, 0,0055, 0,0053, 0,0041, 0,0039, 0,0041, 0,0050,

0,0029, 0,0036 και 0,0023, αντίστοιχα. Οι αποκλίσεις αυτές θεωρούνται αμελητέες και δεν μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της ανάλυσης.

9.11. Σταθερότητα εμβολιασμένων προτύπων δειγμάτων ολικού αίματος

Μελετήθηκε η σταθερότητα εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος που περιείχαν αιθοσουξιμίδη, καρβαμαζεπίνη, 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινυτοΐνη, σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης:

- 6,00 και 160,0 $\mu\text{g/mL}$ για την αιθοσουξιμίδη και την τοπιραμάτη
- 1,50 και 40,0 $\mu\text{g/mL}$ για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και φαινυτοΐνη.

Μελέτες σταθερότητας πραγματοποιήθηκαν:

- στους 25 °C για 24 h,
- στους 4°C για μία και δύο βδομάδες,
- στους -20 °C για δύο βδομάδες και ένα μήνα,
- και για 3 κύκλους ψύξης-απόψυξης.

Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν 6 εμβολιασμένα δείγματα των έντεκα αναλυτών σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και φυλάχθηκαν στους -20 °C για ένα μήνα. Μετά την πάροδο δύο εβδομάδων, παρασκευάστηκαν 12 εμβολιασμένα δείγματα στο κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, από τα οποία:

- 6 δείγματα του κάθε επιπέδου συγκέντρωσης φυλάχθηκαν στους -20 °C για δύο βδομάδες και
- 6 δείγματα του κάθε επιπέδου συγκέντρωσης φυλάχθηκαν στους 4°C για δύο βδομάδες.

Μετά την πάροδο άλλης μίας εβδομάδας, παρασκευάστηκαν 6 εμβολιασμένα δείγματα στο κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και φυλάχθηκαν στους 4°C για μία εβδομάδα. Τέλος, μετά από άλλη μία εβδομάδα παρασκευάστηκαν 18 εμβολιασμένα δείγματα στο κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και:

- 6 δείγματα του κάθε επιπέδου συγκέντρωσης φυλάχθηκαν στους 25°C για μία ημέρα

- 6 δείγματα του κάθε επιπέδου συγκέντρωσης υποβλήθηκαν σε 3 κύκλους ψύξης-απόψυξης
- 6 δείγματα του κάθε επιπέδου συγκέντρωσης αναλύθηκαν αμέσως μετά την παρασκευή τους και θεωρήθηκαν ως πρόσφατα δείγματα.

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν την ίδια ημέρα σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο για τον προσδιορισμό των αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα και ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε την ημέρα ανάλυσής τους. Στη συνέχεια, συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων των αναλυτών σε «γερασμένα» και πρόσφατα εμβολιασμένα δείγματα. Για τη μελέτη σταθερότητας των εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος αιθοσουξιμίδης, καρβαμαζεπίνης, 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνης, λακοσαμίδης, λαμοτριγίνης, λεβετιρακετάμης, οξυκαρβαζεπίνης, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνης, τοπιραμάτης, φαινοβαρβιτάλης και φαινυτοΐνης υπολογίστηκε η απώλεια για την κάθε ουσία. Οι απώλειες για όλες τις υπό μελέτη ουσίες κυμαίνονταν από -14,6 έως -1,8%. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.37, οι έντεκα αναλύτες θεωρείται ότι παραμένουν σταθεροί στο χρόνο και στις συνθήκες φύλαξης που ελέγχθηκαν.

Πίνακας 9.37. Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας (% απώλεια) σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλό και υψηλό), για την αιθοσουλμίδη, την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, την τοπιραμάτη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος, υπό διαφορετικές συνθήκες.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Συγκέντρωση (µg/mL)	% Απώλεια					
		25 °C 24 h	4 °C 1 βδομάδα	4 °C 2 βδομάδες	-20 °C 2 βδομάδες	-20 °C 1 μήνα	3 κύκλοι ψύξης/απόψυξης
Αιθοσουλμίδη	6,00	-6,3	-5,2	-10,2	-8,4	-12,4	-3,5
	160,0	-5,8	-4,7	-9,6	-9,0	-11,9	-4,2
Καρβαμαζεπίνη	1,50	-9,1	-6,6	-8,4	-6,2	-10,3	-5,1
	40,0	-7,4	-7,2	-8,9	-5,4	-9,8	-4,7
10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη	1,50	-7,6	-8,4	-11,4	-10,3	-13,8	-5,5
	40,0	-9,1	-7,9	-12,9	-9,9	-14,3	-5,6
Λακοσαμίδη	1,50	-2,1	-7,5	-9,5	-8,3	-12,5	-4,6
	40,0	-1,8	-6,6	-10,1	-7,9	-11,2	-3,2
Λαμοτριγίνη	1,50	-2,7	-3,2	-4,1	-4,7	-6,2	-5,6
	40,0	-1,9	-2,2	-3,6	-4,2	-5,4	-4,1
Λεβετιρακετάμη	1,50	-4,2	-10,0	-14,4	-13,3	-13,9	-2,6

	40,0	-4,0	-9,5	-14,6	-13,1	-13,6	-2,4
Οξοκαρβαξεπίνη	1,50	-5,2	-4,6	-8,4	-7,6	-11,2	-5,0
	40,0	-4,8	-5,9	-9,4	-8,0	-11,0	-4,1
10-υδροξο-καρβαξεπίνη	1,50	-6,6	-7,1	-11,8	-10,4	-14,4	-5,2
	40,0	-6,9	-8,0	-10,3	-11,2	-13,9	-5,7
Τοπιραμάτη	6,00	-7,1	-5,9	-9,6	-7,6	-12,2	-3,5
	160,0	-6,5	-5,0	-10,4	-8,5	-11,4	-2,8
Φαινοβαρβιτάλη	1,50	-4,2	-5,6	-8,8	-6,3	-10,2	-4,8
	40,0	-3,3	-7,0	-9,9	-6,9	-9,3	-4,6
Φαινοτοΐνη	1,50	-3,1	-4,4	-10,1	-7,5	-9,0	-5,2
	40,0	-2,4	-5,5	-8,3	-6,7	-10,4	-5,0

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

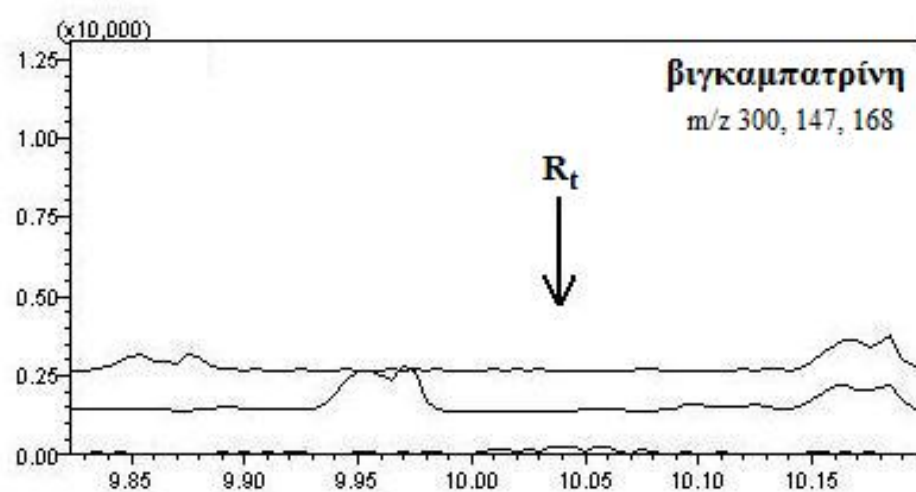
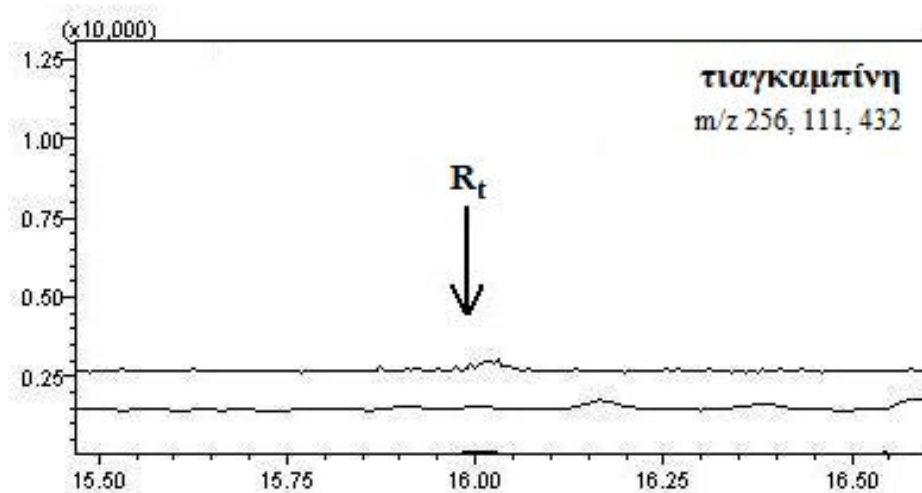
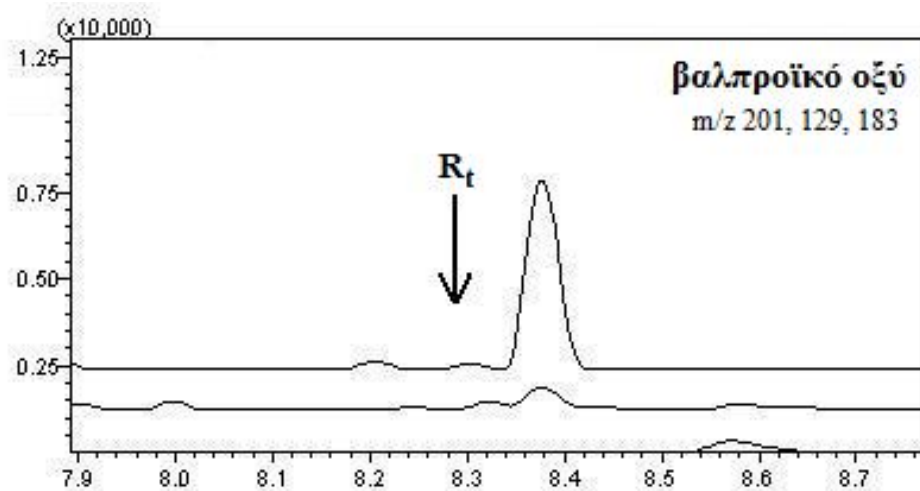
ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΞΙΝΩΝ ΚΑΙ ΕΠΑΜΦΟΤΕΡΙΖΟΝΤΩΝ ΑΝΤΙΕΠΙΛΗΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΟΛΙΚΟ ΑΙΜΑ

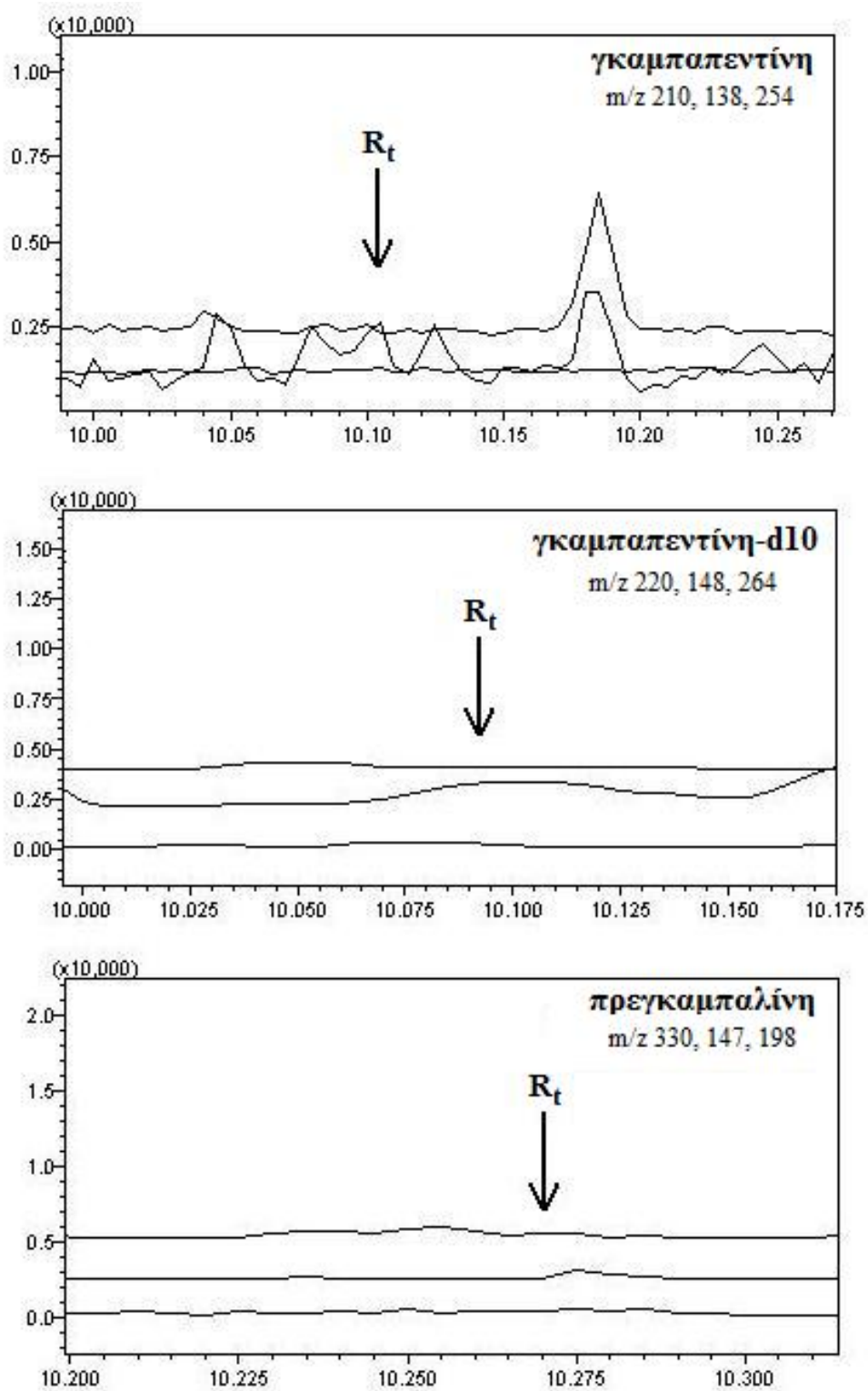
10.1. Εισαγωγή

Τα δύο όξινα (βαλπροϊκό οξύ και τιαγκαμπίνη) και τα τρία επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά φάρμακα (βιγκαμπατρίνη, γκαμπαπεντίνη και πρεγκαμπαλίνη), καθώς και το εσωτερικό τους πρότυπο, γκαμπαπεντίνη-d10, απομονώνονταν από το ολικό αίμα μετά από καταβύθιση πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο και εκχύλιση στερεής φάσης με στήλες HF Bond Elut C18. Στη συνέχεια, στο έκλουσμα που περιείχε τους αναλύτες γινόταν απευθείας παραγωγοποίηση με MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε θερμοκρασία 70°C για 30 λεπτά. Τέλος, γινόταν έγχυση 1 µL από το δείγμα σε αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματογράφο μαζών σε λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM). Η τελική μέθοδος προσδιορισμού έχει αναφερθεί αναλυτικά στο Κεφάλαιο 7.

10.2. Εκλεκτικότητα

Έξι τυφλά δείγματα ολικού αίματος που προήρχοντο από τρεις υγιείς εθελοντές και από τρεις διαφορετικές μονάδες αιμοδοσίας, κατεργάστηκαν χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου, όπως περιγράφεται στη μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό όξινων και επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, καμία παρεμπόδιση από τα συστατικά του ολικού αίματος δεν παρατηρήθηκε στους χρόνους ανάσχεσης τόσο των πέντε αντιεπιληπτικών φαρμάκων, όσο και του εσωτερικού προτύπου τους. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων των αναλυτών και του εσωτερικού τους προτύπου, που ελήφθησαν από ένα τυφλό δείγμα ολικού αίματος παρουσιάζονται στο Σχήμα 10.1.





Σχήμα 10.1. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος των πέντε αναλυτών και του εσωτερικού τους προτύπου, που ελήφθησαν από ένα τυφλό δείγμα ολικού αίματος.

10.3. Ειδικότητα

Αρχικά αναλύθηκαν με τις χρωματογραφικές συνθήκες της αναπτυχθείσας μεθόδου έξι μικτά διαλύματα εργασίας 34 ουσιών συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/mL}$ (διάλυμα Δ_1), που δύνανται να συνυπάρχουν σε δείγματα ολικού αίματος ασθενών που λαμβάνουν αντιεπιληπτικά φάρμακα (Κεφάλαιο 8.3). Από το διάλυμα Δ_1 ελήφθησαν 50 μL τα οποία εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και παραγωγοποιήθηκαν με 30 μL MTBSTFA με 1% TBDMSCl σε 30 μL ακετονιτριλίου. Τέλος, γινόταν έγχυση 1 μL από το δείγμα στο χρωματογραφικό σύστημα. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε στους χρόνους ανάλυσης των πέντε υπό μελέτη όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων και του εσωτερικού τους προτύπου.

Στη συνέχεια, έξι τυφλά δείγματα ολικού αίματος εμβολιάστηκαν με 50 μL μικτού διαλύματος εργασίας των 34 αυτών ουσιών συγκέντρωσης 20 $\mu\text{g/mL}$ (διάλυμα Δ_2) και με 20 μL μικτού διαλύματος εργασίας A_1 (με αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα) συγκέντρωσης 50 $\mu\text{g/mL}$, οπότε η τελική συγκέντρωση για την κάθε ουσία στο αίμα ήταν 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Τα εμβολιασμένα αυτά δείγματα ολικού αίματος, χωρίς την προσθήκη όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων, κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη μέθοδο προσδιορισμού, προκειμένου να διερευνηθεί τυχόν παρεμπόδιση. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν, καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε στους χρόνους ανάλυσης και των πέντε αντιεπιληπτικών φαρμάκων (βαλπροϊκό οξύ, τιαγκαμπίνη, βιγκαπατρίνη, γκαμπαπεντίνη και πρεγκαμπαλίνη), καθώς και του εσωτερικού τους προτύπου, γκαμπαπεντίνης-d10.

10.4. Προσδιορισμός κατώτατων ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των δύο όξινων (βαλπροϊκό οξύ, τιαγκαμπίνη) και των τριών επαμφοτεριζόντων (βιγκαπατρίνη, γκαμπαπεντίνη και πρεγκαμπαλίνη) αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα, υπολογίστηκαν με δύο τρόπους (Πίνακας 10.1), με βάση:

- το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος ολικού αίματος στο χρόνο ανάσχεσης του αναλύτη, που έπρεπε να είναι τουλάχιστον 3 ($S/N > 3:1$) και βρέθηκε να είναι 0,02 $\mu\text{g/mL}$ για την τιαγκαμπίνη, 0,15 $\mu\text{g/mL}$ για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και 0,67 $\mu\text{g/mL}$ για το βαλπροϊκό οξύ. Για τον υπολογισμό των τιμών αυτών, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 6 εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος στις παραπάνω συγκεντρώσεις για τους πέντε αναλύτες και 6 τυφλά δείγματα ολικού αίματος.
- τα στοιχεία της εξίσωσης παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της κάθε ημέρας χρησιμοποιώντας τη σχετική μαθηματική σχέση (Κεφάλαιο 8.4.), και στη συνέχεια τον υπολογισμό των μέσων τιμών από τα 5 διαγράμματα βαθμονόμησης για τον κάθε αναλύτη όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.1.

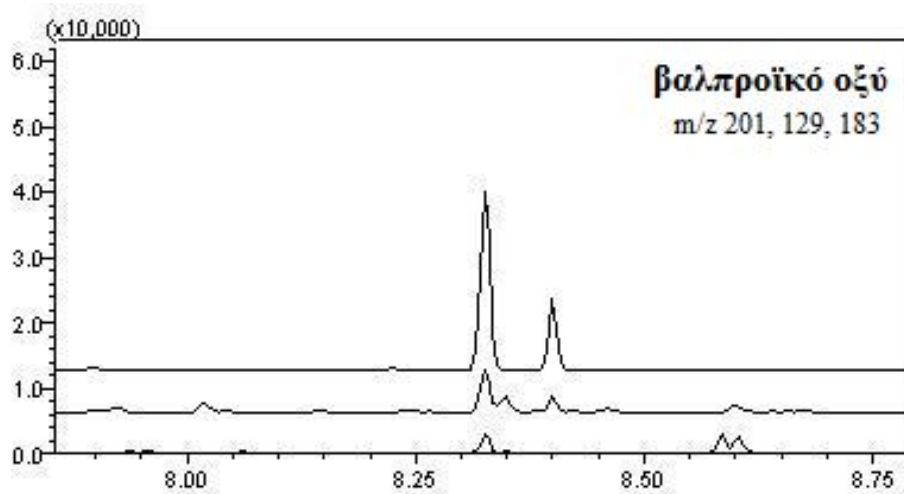
Τα κατώτατα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των δύο όξινων (βαλπροϊκό οξύ, τιαγκαμπίνη) και τριών επαμφοτεριζόντων (βιγκαμπατρίνη, γκαμπαπεντίνη και πρεγκαμπαλίνη) αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα, υπολογίστηκαν επίσης με δύο τρόπους (Πίνακας 10.1), με βάση:

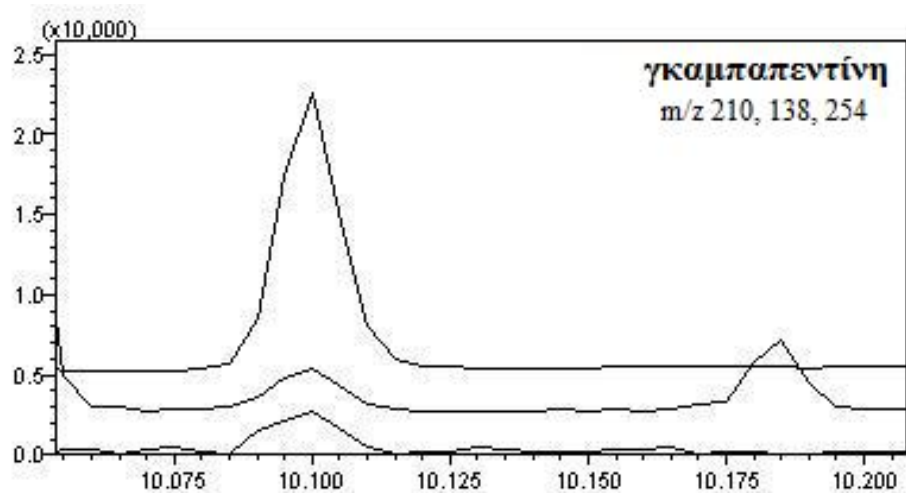
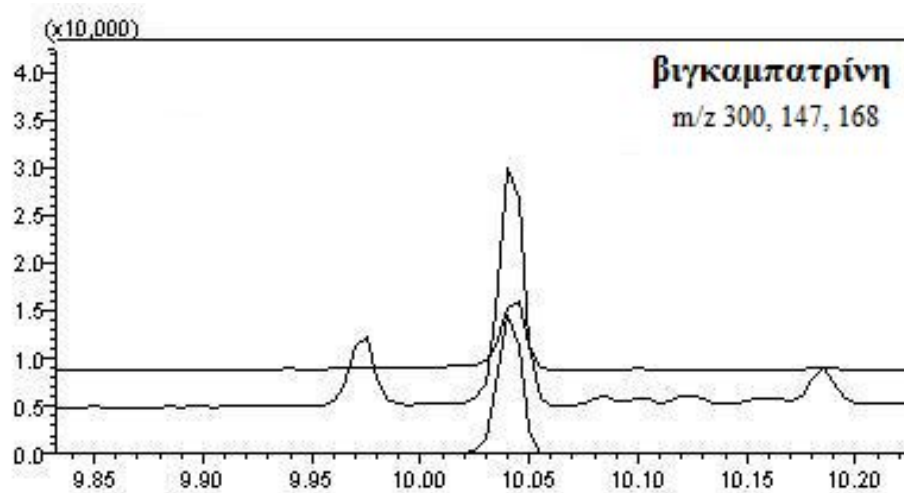
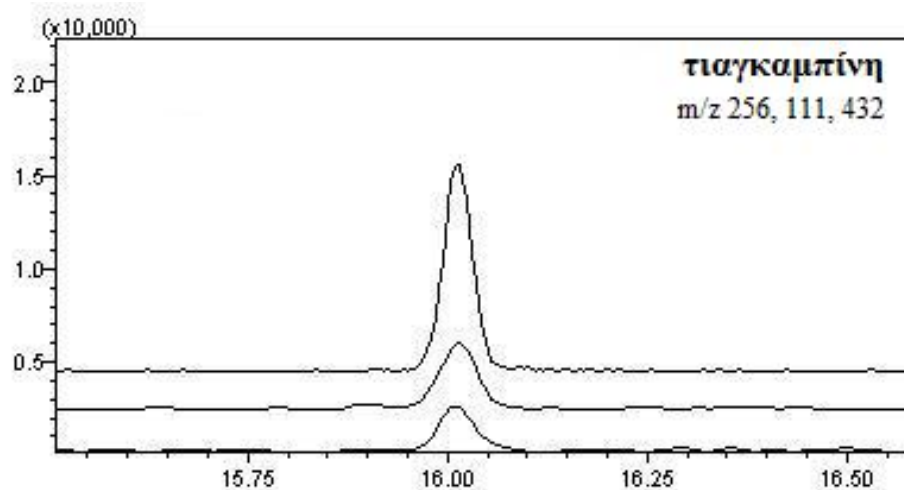
- το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος ολικού αίματος στο χρόνο ανάσχεσης του αναλύτη, που έπρεπε να είναι τουλάχιστον 10 ($S/N > 10:1$) και βρέθηκε να είναι 0,05 $\mu\text{g/mL}$ για την τιαγκαμπίνη, 0,50 $\mu\text{g/mL}$ για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και 2,00 $\mu\text{g/mL}$ για το βαλπροϊκό οξύ. Για τον υπολογισμό των τιμών αυτών, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 6 εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος στις παραπάνω συγκεντρώσεις για τους πέντε αναλύτες και 6 τυφλά δείγματα ολικού αίματος.
- τα στοιχεία της εξίσωσης παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της κάθε ημέρας χρησιμοποιώντας τη σχετική μαθηματική σχέση (Κεφάλαιο 8.4.), και στη συνέχεια τον υπολογισμό των μέσων τιμών από τα 5 διαγράμματα βαθμονόμησης για τον κάθε αναλύτη όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.1.

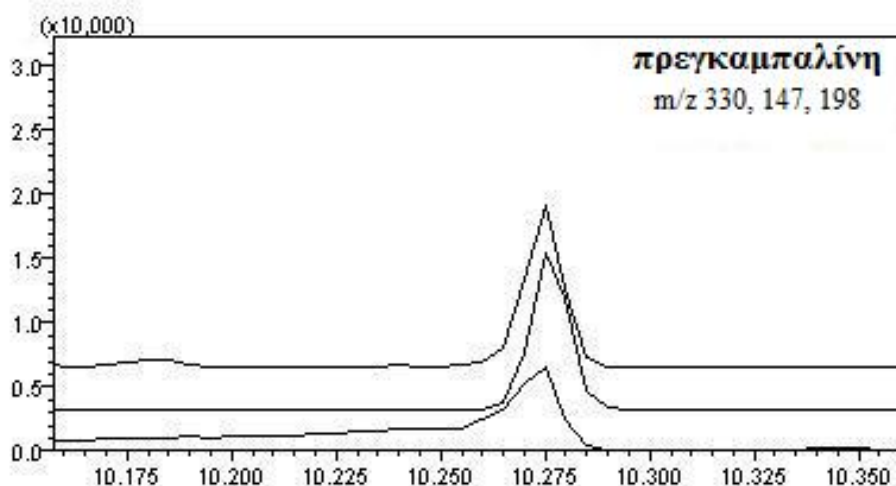
Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων των πέντε αναλυτών, που ελήφθησαν από ένα εμβολιασμένο δείγμα ολικού αίματος στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης παρουσιάζονται στο Σχήμα 10.2.

Πίνακας 10.1. Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου προσδιορισμού των δύο όξινων και των τριών επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	LOD (μg/mL)		LOQ (μg/mL)	
	(S/N>3:1)	(3,3·SD _{β/α})	(S/N>10:1)	(10·SD _{β/α})
Βαλπροϊκό Οξύ	0,67	1,58	2,00	4,79
Τιαγκαμπίνη	0,02	0,03	0,05	0,08
Βιγκαπατρίνη	0,15	0,19	0,50	0,58
Γκαμπαπεντίνη	0,15	0,16	0,50	0,49
Πρεγκαμπαλίνη	0,15	0,09	0,50	0,28







Σχήμα 10.2. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων των πέντε αναλυτών, που ελήφθησαν από ένα εμβολιασμένο δείγμα ολικού αίματος στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης.

10.5. Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των δύο όξινων και των τριών επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα, πραγματοποιήθηκε σε πέντε διαφορετικές ημέρες με την κατασκευή ισάριθμων διαγραμμάτων βαθμονόμησης 6 σημείων, που παρουσίασαν γραμμική συσχέτιση. Οι συγκεντρώσεις των 6 σημείων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για την κάθε ουσία, καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους αναφέρονται στον Πίνακα 5.1. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για όλες τις ουσίες ήταν της μορφής $y=ax+\beta$, όπου:

y =λόγος επιφάνειας κορυφής αναλύτη προς επιφάνεια κορυφής εσωτερικού προτύπου
 x =συγκέντρωση αναλύτη στο αίμα, σε $\mu\text{g/mL}$.

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης σε ολικό αίμα για τις πέντε ημέρες, καθώς και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων παρουσιάζονται στους Πίνακες 10.2, 10.3, 10.4, 10.5 και 10.6 για το βαλπροϊκό οξύ, την τιαγκαμπίνη, τη βιγκαπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, αντίστοιχα. Η % RSD των κλίσεων αποτέλεσε κριτήριο της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση για εύρος συγκεντρώσεων στο ολικό αίμα από 0,05 έως 5,00 $\mu\text{g/mL}$ για την τιαγκαμπίνη, από 0,50 έως 50,0 $\mu\text{g/mL}$ για τη βιγκαπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και από 2,00 έως

200,0 µg/mL για το βαλπροϊκό οξύ. Το τετράγωνο του μέσου συντελεστή συσχέτισης ήταν εντός των αποδεκτών ορίων και για τους πέντε αναλύτες σε όλες τις σειρές ανάλυσης ($R^2 \geq 0,9934$).

Πίνακας 10.2. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για το βαλπροϊκό οξύ σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R^2
1 ^η	$y=2,7124 (\pm 0,0034) \cdot x + 16,558 (\pm 0,072)$	0,9964
2 ^η	$y=2,5187 (\pm 0,0028) \cdot x + 19,179 (\pm 0,155)$	0,9934
3 ^η	$y=2,6347 (\pm 0,0039) \cdot x + 17,128 (\pm 0,099)$	0,9941
4 ^η	$y=2,8153 (\pm 0,0041) \cdot x + 18,563 (\pm 0,090)$	0,9952
5 ^η	$y=2,6466 (\pm 0,0054) \cdot x + 16,254 (\pm 0,105)$	0,9989
Μέση εξίσωση	$y=2,6655 (\pm 0,1090) \cdot x + 17,536 (\pm 1,277)$	
% RSD κλίσεων	4,1	

Πίνακας 10.3. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την τιαγκαμπίνη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R^2
1 ^η	$y=7,9629 (\pm 0,0025) \cdot x + 0,4529 (\pm 0,0062)$	0,9944
2 ^η	$y=7,8523 (\pm 0,0031) \cdot x + 0,3985 (\pm 0,0052)$	0,9982
3 ^η	$y=7,6941 (\pm 0,0042) \cdot x + 0,4173 (\pm 0,0049)$	0,9953
4 ^η	$y=7,8317 (\pm 0,0051) \cdot x + 0,5521 (\pm 0,0061)$	0,9955
5 ^η	$y=7,5842 (\pm 0,0064) \cdot x + 0,4881 (\pm 0,0045)$	0,9974
Μέση εξίσωση	$y=7,7850 (\pm 0,1474) \cdot x + 0,4618 (\pm 0,0611)$	
% RSD κλίσεων	1,9	

Πίνακας 10.4. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για τη βιγκαμπατρίνη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=1,1288 (\pm 0,0052) \cdot x - 0,2128 (\pm 0,0032)$	0,9980
2 ^η	$y=1,0985 (\pm 0,00061) \cdot x - 0,3574 (\pm 0,0055)$	0,9961
3 ^η	$y=1,1783 (\pm 0,0072) \cdot x - 0,2965 (\pm 0,0063)$	0,9971
4 ^η	$y=1,1206 (\pm 0,0041) \cdot x - 0,1985 (\pm 0,0067)$	0,9944
5 ^η	$y=1,0632 (\pm 0,0043) \cdot x - 0,2547 (\pm 0,0054)$	0,9988
Μέση εξίσωση	$y=1,1179 (\pm 0,0423) \cdot x - 0,2640 (\pm 0,0648)$	
% RSD κλίσεων	3,8	

Πίνακας 10.5. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την γκαμπαπεντίνη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=1,3472 (\pm 0,0027) \cdot x + 0,3926 (\pm 0,0054)$	0,9970
2 ^η	$y=1,2106 (\pm 0,0021) \cdot x + 0,2329 (\pm 0,0051)$	0,9955
3 ^η	$y=1,3325 (\pm 0,0030) \cdot x + 0,3547 (\pm 0,0062)$	0,9946
4 ^η	$y=1,2987 (\pm 0,0037) \cdot x + 0,3389 (\pm 0,0058)$	0,9955
5 ^η	$y=1,3265 (\pm 0,0044) \cdot x + 0,2751 (\pm 0,0056)$	0,9984
Μέση εξίσωση	$y=1,3031 (\pm 0,0546) \cdot x + 0,3188 (\pm 0,0641)$	
% RSD κλίσεων	4,2	

Πίνακας 10.6. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις πέντε ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την πρεγκαμπαλίνη σε ολικό αίμα, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R ²
1 ^η	$y=1,0815 (\pm 0,0025) \cdot x + 0,3960 (\pm 0,0051)$	0,9958
2 ^η	$y=1,0741 (\pm 0,00036) \cdot x + 0,4156 (\pm 0,0045)$	0,9961
3 ^η	$y=1,0569 (\pm 0,0047) \cdot x + 0,3745 (\pm 0,0039)$	0,9946
4 ^η	$y=1,0433 (\pm 0,0043) \cdot x + 0,3864 (\pm 0,0051)$	0,9985

5 ^η	$y=1,0180 (\pm 0,0024) \cdot x + 0,3357 (\pm 0,0052)$	0,9989
Μέση εξίσωση	$y=1,0548 (\pm 0,0254) \cdot x + 0,3816 (\pm 0,0298)$	
% RSD κλίσεων	2,4	

10.6. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Οι επαναποσοτικοποιήσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης ολικού αίματος σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και οι αποκλίσεις τους (% E_r) για την κάθε ημέρα παρουσιάζονται στους Πίνακες 10.7, 10.8, 10.9, 10.10 και 10.11 για το βαλπροϊκό οξύ, την τιαγκαμπίνη, τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, αντίστοιχα. Οι αποκλίσεις των αποτελεσμάτων επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών -14,0% και 14,0% για όλους τους αναλύτες, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και για το σύνολο των ημερών. Οι τιμές αυτές ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ (± 20 για το LOQ).

Πίνακας 10.7. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για το βαλπροϊκό οξύ, σε ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	2,00	4,00	12,0	40,0	80,0	200,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	1,97	4,26	12,7	41,5	88,5	213,6
	% E _r	-1,5	6,5	5,8	3,8	10,6	6,8
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,06	4,19	12,9	39,1	87,2	191,6
	% E _r	3,0	4,8	7,5	-2,3	9,0	-4,2
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,09	3,91	11,2	37,2	82,9	214,3
	% E _r	4,5	-2,3	-6,7	-7,0	3,6	7,2
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,13	3,77	10,8	41,9	75,7	179,6
	% E _r	6,5	-5,8	-10,0	4,8	-5,4	-10,2
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	2,23	4,16	11,1	43,7	84,4	181,9
	% E _r	11,5	4,0	-7,5	9,3	5,5	-9,1

Πίνακας 10.8. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για την τιαγκαμπίνη, σε ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,05	0,10	0,30	1,00	2,00	5,00
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,056	0,105	0,324	0,954	2,17	5,23
	% E _r	12,0	5,0	8,0	-4,6	8,5	4,6
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,054	0,088	0,287	0,976	1,87	5,37
	% E _r	8,0	-12,0	-4,3	-2,4	-6,5	7,4
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,048	0,113	0,322	0,962	1,94	4,71
	% E _r	-4,0	13,0	7,3	-3,8	-3,0	-5,8
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,045	0,092	0,318	1,084	2,08	4,37
	% E _r	-10,0	-8,0	6,0	8,4	4,0	-12,6
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,047	0,097	0,279	1,056	1,76	5,27
	% E _r	-6,0	-3,0	-7,0	5,6	-12,0	5,4

Πίνακας 10.9. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη βιγκαμπατρίνη, σε ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,47	1,04	3,34	9,43	19,1	53,6
	% E _r	-6,0	4,0	11,3	-5,7	-4,5	7,2
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,55	0,88	2,91	9,61	22,6	52,8
	% E _r	10,0	-12,0	-3,0	-3,9	13,0	5,6
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,46	1,07	3,13	10,8	18,4	47,4
	% E _r	-8,0	7,0	4,3	8,0	-8,0	-5,2
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,54	0,87	3,12	10,9	20,8	44,1
	% E _r	8,0	-13,0	4,0	9,0	4,0	-11,8
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,45	0,89	2,87	9,54	17,9	52,9
	% E _r	-10,0	-11,0	-4,3	-4,6	-10,5	5,8

Πίνακας 10.10. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για την γκαμπαπεντίνη, σε ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,55	1,08	3,32	9,42	19,2	53,6
	% E _r	10,0	8,0	10,7	-5,8	-4,0	7,2
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,53	0,97	2,94	9,76	22,3	52,9
	% E _r	6,0	-3,0	-2,0	-2,4	11,5	5,8
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,47	1,08	3,19	10,9	18,9	47,5
	% E _r	-6,0	8,0	6,3	9,0	-5,5	-5,0
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,52	0,89	3,24	11,0	21,7	44,7
	% E _r	4,0	-11,0	8,0	10,0	8,5	-10,6
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,45	1,04	2,77	10,6	18,8	52,9
	% E _r	-10,0	4,0	-7,7	6,0	-6,0	5,8

Πίνακας 10.11. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για την πρεγκαμπαλίνη, σε ολικό αίμα.

ημέρα	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mL)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
1 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,46	1,06	3,26	10,7	21,7	54,8
	% E _r	-8,0	6,0	8,7	7,0	8,5	9,6
2 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,45	0,92	2,91	9,62	18,6	52,9
	% E _r	-10,0	-8,0	-3,0	-3,8	-7,0	5,8
3 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,56	1,05	3,28	10,6	21,9	48,4
	% E _r	12,0	5,0	9,3	6,0	9,5	-3,2
4 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,57	0,91	3,14	8,86	21,3	52,1
	% E _r	14,0	-9,0	4,7	-11,4	6,5	4,2
5 ^η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,43	1,09	3,15	9,73	18,5	46,9
	% E _r	-14,0	9,0	5,0	-2,7	-7,5	-6,2

10.7. Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου προσδιορισμού των δύο όξινων (βαλπροϊκό οξύ και τιαγκαμπίνη) και των τριών επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων (βιγκαμπατρίνη, γκαμπαπεντίνη, πρεγκαμπαλίνη) σε ολικό αίμα, εκτιμήθηκαν στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας:

- 0,15 µg/mL για την τιαγκαμπίνη, 1,50 µg/mL για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και 6,00 µg/mL για το βαλπροϊκό οξύ (QC1, χαμηλό επίπεδο)
- 1,50 µg/mL για την τιαγκαμπίνη, 15,0 µg/mL για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και 60,0 µg/mL για το βαλπροϊκό οξύ (QC2, μεσαίο επίπεδο)
- 4,00 µg/mL για την τιαγκαμπίνη, 40,0 µg/mL για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και 160,0 µg/mL για το βαλπροϊκό οξύ (QC3, υψηλό επίπεδο).

Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας της μεθόδου σε ολικό αίμα για τις 5 ημέρες και στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 10.12, 10.13, 10.14, 10.15 και 10.16 για το βαλπροϊκό οξύ, την τιαγκαμπίνη, τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.17. Οι τιμές της επαναληψιμότητας και της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$.

Επίσης, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκτιμήθηκε από την % σχετική τυπική απόκλιση των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης των 5 ημερών και ήταν εντός των αποδεκτών ορίων ($\leq 5\%$) και συγκεκριμένα, 4,1%, 1,9%, 3,8%, 4,2%, και 2,4% για το βαλπροϊκό οξύ, την τιαγκαμπίνη, τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, αντίστοιχα.

10.8. Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η ορθότητα εντός της ημέρας εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας ολικού αίματος, για την κάθε ημέρα και οι μεγαλύτερες, κατά απόλυτη τιμή, μέσες τιμές του % E_r που παρατηρήθηκαν ήταν:

- στο χαμηλό επίπεδο ελέγχου ποιότητας (QC1): 10,3% για το βαλπροϊκό οξύ, 6,0% για την τιαγκαμπίνη, 9,8% για τη βιγκαμπατρίνη, 13,5% για την γκαμπαπεντίνη και 11,5% για την πρεγκαμπαλίνη.
- στο μεσαίο επίπεδο (QC2): 12,3% για το βαλπροϊκό οξύ, 8,2% για την τιαγκαμπίνη, 8,6% για τη βιγκαμπατρίνη, 8,5% για την γκαμπαπεντίνη και 9,9% για την πρεγκαμπαλίνη.
- στο υψηλό επίπεδο (QC3): 9,8% για το βαλπροϊκό οξύ, 8,8% για την τιαγκαμπίνη, 10,3% για τη βιγκαμπατρίνη, 9,5% για την γκαμπαπεντίνη και 9,8% για την πρεγκαμπαλίνη.

Τα αποτελέσματα της ορθότητας της μεθόδου εντός της ημέρας σε ολικό αίμα για τις 5 ημέρες και στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 10.12, 10.13, 10.14, 10.15 και 10.16 για το βαλπροϊκό οξύ, την τιαγκαμπίνη, τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της ορθότητας της μεθόδου δια των ημερών σε ολικό αίμα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 10.17. Οι τιμές για την ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$.

Πίνακας 10.12. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για το βαλπροϊκό οξύ σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (6,00 µg/mL)			QC2 (60,0 µg/mL)			QC3 (160,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	6,24 $\pm$ 0,32	5,1	4,0	63,7 $\pm$ 3,7	5,8	6,2	146,7 $\pm$ 7,4	5,0	-8,3
2 ^η	6,28 $\pm$ 0,30	4,8	4,7	65,9 $\pm$ 2,9	4,4	9,8	171,3 $\pm$ 6,8	4,0	7,1
3 ^η	5,38 $\pm$ 0,34	6,3	-10,3	53,8 $\pm$ 3,3	6,1	-10,3	144,3 $\pm$ 5,9	4,1	-9,8
4 ^η	5,45 $\pm$ 0,29	5,3	-9,2	52,6 $\pm$ 3,8	7,2	-12,3	149,1 $\pm$ 8,9	6,0	-6,8
5 ^η	5,38 $\pm$ 0,28	5,2	-10,3	56,9 $\pm$ 2,9	5,1	-5,2	167,9 $\pm$ 7,6	4,5	4,9

Πίνακας 10.13. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την τιαγκαμπίνη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (0,15 µg/mL)			QC2 (1,50 µg/mL)			QC3 (4,00 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	0,157 $\pm$ 0,014	8,9	4,7	1,562 $\pm$ 0,042	2,7	4,1	4,22 $\pm$ 0,21	5,0	5,5
2 ^η	0,159 $\pm$ 0,011	6,9	6,0	1,623 $\pm$ 0,063	3,9	8,2	3,87 $\pm$ 0,32	8,3	-3,3
3 ^η	0,142 $\pm$ 0,017	12,0	-5,3	1,614 $\pm$ 0,074	4,6	7,6	3,74 $\pm$ 0,19	5,1	-6,5
4 ^η	0,156 $\pm$ 0,011	7,1	4,0	1,431 $\pm$ 0,083	5,8	-4,6	3,71 $\pm$ 0,25	6,7	-7,3
5 ^η	0,158 $\pm$ 0,010	6,3	5,3	1,617 $\pm$ 0,058	3,6	7,8	3,65 $\pm$ 0,23	6,3	-8,8

Πίνακας 10.14. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη βιγκαμπατρίνη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συνγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	1,413 $\pm$ 0,021	1,5	-5,8	14,51 $\pm$ 0,31	2,1	-3,3	42,7 $\pm$ 3,2	7,5	6,8
2 ^η	1,371 $\pm$ 0,055	4,0	-8,6	13,79 $\pm$ 0,41	3,0	-8,1	43,9 $\pm$ 3,8	8,7	9,8
3 ^η	1,378 $\pm$ 0,065	4,7	-8,1	14,03 $\pm$ 0,52	3,7	-6,5	36,5 $\pm$ 2,9	7,9	-8,8
4 ^η	1,353 $\pm$ 0,052	3,8	-9,8	13,71 $\pm$ 0,75	5,5	-8,6	44,1 $\pm$ 2,8	6,3	10,3
5 ^η	1,516 $\pm$ 0,079	5,2	1,1	15,75 $\pm$ 0,83	5,3	5,0	37,1 $\pm$ 3,6	9,7	-7,3

Πίνακας 10.15. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την γκαμπαπεντίνη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%) E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%) E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%) E _r)
1 ^η	1,549 $\pm$ 0,055	3,6	3,3	13,88 $\pm$ 0,32	2,3	-7,5	41,47 $\pm$ 0,88	2,1	3,7
2 ^η	1,452 $\pm$ 0,045	3,1	-3,2	14,09 $\pm$ 0,56	4,0	-6,1	43,78 $\pm$ 0,92	2,1	9,5
3 ^η	1,413 $\pm$ 0,062	4,4	-5,8	14,11 $\pm$ 0,69	4,9	-5,9	43,36 $\pm$ 0,91	2,1	8,4
4 ^η	1,298 $\pm$ 0,074	5,7	-13,5	13,73 $\pm$ 0,75	5,5	-8,5	38,37 $\pm$ 0,72	1,9	-4,1
5 ^η	1,408 $\pm$ 0,037	2,6	-6,1	14,69 $\pm$ 0,91	6,2	-2,1	37,87 $\pm$ 0,85	2,2	-5,3

Πίνακας 10.16. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την πρεγκαμπαλίνη σε ολικό αίμα.

Ημέρα	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
1 ^η	1,431 $\pm$ 0,019	1,3	-4,6	15,83 $\pm$ 0,77	4,9	5,5	42,2 $\pm$ 4,6	10,9	5,5
2 ^η	1,332 $\pm$ 0,022	1,7	-11,2	15,57 $\pm$ 0,84	5,4	3,8	37,8 $\pm$ 2,9	7,7	-5,5
3 ^η	1,529 $\pm$ 0,054	3,5	1,9	16,11 $\pm$ 0,73	4,5	7,4	37,7 $\pm$ 1,8	4,8	-5,7
4 ^η	1,335 $\pm$ 0,053	4,0	-11,0	13,78 $\pm$ 0,68	4,9	-8,1	43,9 $\pm$ 1,9	4,3	9,8
5 ^η	1,328 $\pm$ 0,041	3,1	-11,5	16,48 $\pm$ 0,71	4,3	9,9	42,2 $\pm$ 2,4	5,7	5,5

Πίνακας 10.17. Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα και ορθότητα δια των ημερών της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των όξινων και επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα, στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Αναμενόμενη Συγκέντρωση (μg/mL)	Ευρεθείσα Συγκέντρωση (μg/mL)	Ορθότητα δια των ημερών (% E_r)	Ενδοεργαστηριακή Αναπαραγωγιμότητα (% RSD, n=36)
Βαλπροϊκό οξύ	6,00	5,75 ± 0,47	-4,2	8,2
	60,0	58,6 ± 5,9	-2,4	10,1
	160,0	156 ± 13	-2,6	8,2
Τιαγκαμπίνη	0,15	0,154 ± 0,007	2,9	4,5
	1,50	1,569 ± 0,081	4,6	5,2
	4,00	3,84 ± 0,23	-4,1	5,9
Βιγκαμπατρίνη	1,50	1,406 ± 0,065	-6,3	4,6
	15,0	14,36 ± 0,84	-4,3	5,8
	40,0	40,9 ± 3,8	2,2	9,2
Γκαμπαπεντίνη	1,50	1,424 ± 0,090	-5,1	6,3
	15,0	14,10 ± 0,37	-6,0	2,6
	40,0	41,0 ± 2,7	2,4	6,7
Πρεγκαμπαλίνη	1,50	1,391 ± 0,088	-7,3	6,4
	15,0	15,6 ± 1,0	3,7	6,7
	40,0	40,8 ± 2,8	1,9	7,0

10.9. Απόλυτη ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση της μεθόδου στο ολικό αίμα εκτιμήθηκε για το βαλπροϊκό οξύ, την τιαγκαμπίνη, τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, στα τρία διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της μεθόδου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 10.18. Η απόλυτη ανάκτηση της γκαμπαπεντίνης-d10 (για συγκέντρωση στο αίμα 1,25 µg/mL) υπολογίστηκε σε 88,9% ($\pm 5,2$).

Πίνακας 10.18. % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της μεθόδου προσδιορισμού σε ολικό αίμα για το βαλπροϊκό οξύ, την τιαγκαμπίνη, τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Συγκέντρωση (µg/mL)	% απόλυτη ανάκτηση ($\pm$ SD)
Βαλπροϊκό οξύ	6,00 (n=6)	96,4 $\pm$ 2,8
	60,0 (n=6)	95,7 $\pm$ 1,8
	160,0 (n=6)	96,1 $\pm$ 5,5
Τιαγκαμπίνη	0,15 (n=6)	94,8 $\pm$ 3,6
	1,50 (n=6)	95,6 $\pm$ 2,4
	4,00 (n=6)	97,5 $\pm$ 4,4
Βιγκαμπατρίνη	1,50 (n=6)	84,8 $\pm$ 3,4
	15,0 (n=6)	85,6 $\pm$ 2,9
	40,0 (n=6)	87,5 $\pm$ 3,1
Γκαμπαπεντίνη	1,50 (n=6)	86,4 $\pm$ 2,9
	15,0 (n=6)	85,7 $\pm$ 3,6
	40,0 (n=6)	86,1 $\pm$ 5,1
Πρεγκαμπαλίνη	1,50 (n=6)	94,9 $\pm$ 3,1
	15,0 (n=6)	93,1 $\pm$ 3,6
	40,0 (n=6)	92,3 $\pm$ 4,8

10.10. Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε μεταβάλλοντας σκόπιμα τις επτά παραμέτρους που επιλέχθηκαν από τα στάδια της κατεργασίας των δειγμάτων και της αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης. Παρασκευάστηκαν είκοσι εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας μεσαίου επιπέδου (QC2) και κατεργάστηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού των δύο όξινων και τριών επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα. Τα τέσσερα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με τις χρωματογραφικές παραμέτρους της αναπτυχθείσας μεθόδου, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα αναλύθηκαν ανά τέσσερα με τη μέθοδο τροποποιημένη ως προς: α) την ταχύτητα ροής φέροντος αερίου, β) τη θερμοκρασία ενδιάμεσου σταδίου, γ) τη θερμοκρασία του σημείου έγχυσης και δ) το δυναμικό λειτουργίας (voltage) του φασματογράφου μαζών (1,45 αντί 1,50 kV). Επιπλέον, παρασκευάστηκαν 12 εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας μεσαίου επιπέδου (QC2), εκ των οποίων τα τέσσερα δείγματα κατεργάστηκαν μεταβάλλοντας το pH του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, τέσσερα δείγματα με στήλες SPE διαφορετικής παρτίδας παραγωγής και τέλος τέσσερα δείγματα κατεργάστηκαν μεταβάλλοντας την αναλογία του μίγματος διαλυτών έκλουσης. Όλα τα δείγματα (28 δείγματα) που αναλύθηκαν συγκρίθηκαν με τα τέσσερα δείγματα που αναλύθηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο για τον προσδιορισμό των όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων και σύμφωνα με τις χρωματογραφικές παραμέτρους της μεθόδου αυτής.

Με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, οι τιμές των τυπικών αποκλίσεων που υπολογίστηκαν για το βαλπροϊκό οξύ, την τιαγκαμπίνη, τη βιγκαπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη ήταν 0,0057, 0,0023, 0,0031, 0,0048 και 0,0053, αντίστοιχα. Οι αποκλίσεις αυτές θεωρούνται αμελητέες και δεν μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της ανάλυσης.

10.11. Σταθερότητα εμβολιασμένων προτύπων δειγμάτων ολικού αίματος

Μελετήθηκε η σταθερότητα εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος που περιείχαν τιαγκαμπίνη, βαλπροϊκό οξύ, βιγκαπατρίνη, γκαμπαπεντίνη και πρεγκαμπαλίνη, σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης:

- 0,15 και 4,00 µg/mL για την τιαγκαμπίνη

- 1,50 και 40,0 $\mu\text{g/mL}$ για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη
- 6,00 και 160,0 $\mu\text{g/mL}$ για το βαλπροϊκό οξύ.

Μελέτες σταθερότητας πραγματοποιήθηκαν:

- στους 25 °C για 24 h,
- στους 4°C για μία και δύο βδομάδες,
- στους -20 °C για δύο βδομάδες και ένα μήνα,
- και για 3 κύκλους ψύξης-απόψυξης.

Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν 6 εμβολιασμένα δείγματα των πέντε αναλυτών σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και φυλάχθηκαν στους -20 °C για ένα μήνα. Μετά την πάροδο δύο εβδομάδων, παρασκευάστηκαν 12 εμβολιασμένα δείγματα στο κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, από τα οποία:

- 6 δείγματα του κάθε επιπέδου συγκέντρωσης φυλάχθηκαν στους -20 °C για δύο βδομάδες και
- 6 δείγματα του κάθε επιπέδου συγκέντρωσης φυλάχθηκαν στους 4°C για δύο βδομάδες.

Μετά την πάροδο άλλης μίας εβδομάδας, παρασκευάστηκαν 6 εμβολιασμένα δείγματα στο κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και φυλάχθηκαν στους 4°C για μία εβδομάδα. Τέλος, μετά από άλλη μία εβδομάδα παρασκευάστηκαν 18 εμβολιασμένα δείγματα στο κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και:

- 6 δείγματα του κάθε επιπέδου συγκέντρωσης φυλάχθηκαν στους 25°C για μία ημέρα
- 6 δείγματα του κάθε επιπέδου συγκέντρωσης υποβλήθηκαν σε 3 κύκλους ψύξης-απόψυξης
- 6 δείγματα του κάθε επιπέδου συγκέντρωσης αναλύθηκαν αμέσως μετά την παρασκευή τους και θεωρήθηκαν ως πρόσφατα δείγματα.

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν την ίδια ημέρα σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο για τον προσδιορισμό των όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα και ποσοτικοποιήθηκαν με βάση την εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε την ημέρα ανάλυσής τους. Στη συνέχεια, συγκρίθηκαν οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων των αναλυτών σε «γερασμένα» και πρόσφατα εμβολιασμένα δείγματα. Για τη μελέτη σταθερότητας των εμβολιασμένων δειγμάτων ολικού αίματος βαλπροϊκού οξέος,

τιαγκαμπίνης, βιγκαμπατρίνης, γκαμπαπεντίνης και πρεγκαμπαλίνης υπολογίστηκε η απώλεια για την κάθε ουσία. Οι απώλειες για όλες τις υπό μελέτη ουσίες κυμαίνονταν από -14,3 έως -2,1%. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.19, οι πέντε αναλύτες θεωρείται ότι παραμένουν σταθεροί στο χρόνο και στις συνθήκες φύλαξης που ελέγχθηκαν.

Πίνακας 10.19. Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας (% απώλεια) σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλό και υψηλό), για το βαλπροϊκό οξύ, την τιαγκαμπίνη, τη βιγκαπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, σε εμβολιασμένα δείγματα ολικού αίματος, υπό διαφορετικές συνθήκες.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Συγκέντρωση (μg/mL)	% Απώλεια					
		25 °C 24 h	4 °C 1 βδομάδα	4 °C 2 βδομάδες	-20 °C 2 βδομάδες	-20 °C 1 μήνα	3 κύκλοι ψύξης/απόψυξης
Βαλπροϊκό οξύ	6,00	-2,1	-4,2	-6,5	-6,4	-8,5	-5,9
	160,0	-3,6	-3,7	-7,2	-7,0	-9,6	-6,7
Τιαγκαμπίνη	0,15	-8,2	-6,8	-9,9	-8,4	-11,4	-2,6
	4,00	-6,8	-7,1	-10,3	-7,5	-13,2	-4,6
Βιγκαπατρίνη	1,50	-4,5	-5,3	-7,9	-6,8	-11,2	-4,4
	40,0	-6,3	-7,7	-10,3	-7,1	-10,4	-3,2
Γκαμπαπεντίνη	1,50	-8,1	-6,2	-10,5	-9,1	-14,3	-3,5
	40,0	-7,5	-6,3	-12,4	-8,8	-13,3	-2,9
Πρεγκαμπαλίνη	1,50	-6,5	-7,1	-9,9	-7,8	-12,6	-4,5
	40,0	-5,9	-6,4	-11,2	-8,3	-13,9	-5,2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΕΠΙΛΗΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

11.1. Εισαγωγή

Οι δύο μέθοδοι προσδιορισμού που αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων, αλκαλικών και όξινων ή επαμφοτεριζόντων, σε ολικό αίμα εφαρμόστηκαν και σε δείγματα πλάσματος. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκαν οι ίδιες πορείες προκατεργασίας που έχουν αναφερθεί αναλυτικά στο Κεφάλαιο 7 χρησιμοποιώντας ως βιολογικό υπόστρωμα πλάσμα αντί για ολικό αίμα. Στο πλαίσιο της επικύρωσης των αναπτυχθέντων μεθόδων για το πλάσμα ελέγχθηκαν οι παρακάτω παράμετροι για μία ημέρα εργασίας: εκλεκτικότητα, ειδικότητα, ευαισθησία, γραμμικότητα, ορθότητα, επαναληψιμότητα και απόλυτη ανάκτηση, όπως έχει περιγραφεί στα Κεφάλαια 9 και 10. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα βαθμονόμησης για τον κάθε αναλύτη με βιολογικό υπόστρωμα πλάσμα και αναλύθηκαν παράλληλα έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας σε καθένα από τα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η εφαρμοσιμότητα των αναπτυχθέντων μεθόδων και στο πλάσμα. Το πλάσμα αποτελεί μέρος του ολικού αίματος, επομένως τα ενδογενή συστατικά του πλάσματος περιέχονται στο ολικό αίμα, οπότε το πλάσμα αποτελεί σαφώς πιο εύκολο βιολογικό υπόστρωμα κατά την κατεργασία και την απομόνωση των υπό προσδιορισμό ουσιών από ότι το ολικό αίμα λόγω μη ύπαρξης έμμορφων συστατικών σε αυτό. Η επιβεβαίωση της εφαρμοσιμότητας των αναπτυχθέντων μεθόδων στο πλάσμα πραγματοποιήθηκε επειδή το πλάσμα αποτελεί το βιολογικό υλικό εκλογής για την παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ασθενείς υπό αντιεπιληπτική αγωγή.

11.2. Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου για τον προσδιορισμό αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο πλάσμα

Αρχικά αναλύθηκαν έξι τυφλά δείγματα πλάσματος που προήρχοντο από τρεις υγιείς εθελοντές και από τρεις διαφορετικές μονάδες αιμοδοσίας, χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου, όπως περιγράφεται στη αναπτυχθείσα μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό αλκαλικών αντιεπιληπτικών

φαρμάκων στο ολικό αίμα. Στη συνέχεια, έξι τυφλά δείγματα πλάσματος εμβολιάστηκαν με 50 μL μικτού διαλύματος εργασίας συγκέντρωσης 20 $\mu\text{g/mL}$ (διάλυμα Δ_2) με τις 34 ουσίες (Κεφάλαιο 8.3) που ελέγχθηκαν κατά την επικύρωση της αντίστοιχης μεθόδου για το ολικό αίμα και με 20 μL μικτού διαλύματος εργασίας A_2 (με όξινα και επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά φάρμακα) συγκέντρωσης 50 $\mu\text{g/mL}$. Η τελική συγκέντρωση για την κάθε ουσία στο πλάσμα ήταν 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Τα δείγματα αυτά, χωρίς την προσθήκη των αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων, κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη μέθοδο προσδιορισμού, προκειμένου να διερευνηθεί τυχόν παρεμπόδιση της ανάλυσης οφειλόμενη στο βιολογικό υλικό ή σε κάποια από τις παραπάνω ουσίες.

Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν κατά τον έλεγχο της εκλεκτικότητας και της ειδικότητας της μεθόδου, καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε στους χρόνους ανάλυσης και των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών (αιθοσουξιμίδη, καρβαμαζεπίνη, 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινυτοΐνη).

Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της αναπτυχθείσας μεθόδου για τον προσδιορισμό αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα ελέγχθηκαν και διαπιστώθηκε ότι μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν και σε δείγματα πλάσματος. Έτσι, τα προσδιορισθέντα κατώτατα όρια ανίχνευσης (0,15 $\mu\text{g/mL}$ για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη και 0,67 $\mu\text{g/mL}$ για την αιθοσουξιμίδη και την τοπιραμάτη) και ποσοτικοποίησης (0,50 $\mu\text{g/mL}$ για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη και 2,00 $\mu\text{g/mL}$ για την αιθοσουξιμίδη και την τοπιραμάτη) για το ολικό αίμα έγιναν αποδεκτά και για τα δείγματα πλάσματος.

Η μελέτη της γραμμικότητας, της ορθότητας, της επαναληψιμότητας και της απόλυτης ανάκτησης της μεθόδου προσδιορισμού των εννέα αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών σε πλάσμα, πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή ισάριθμων διαγραμμάτων βαθμονόμησης 6 σημείων (Πίνακα 5.1), που

παρουσίασαν γραμμική συσχέτιση, και την ανάλυση έξι δειγμάτων ελέγχου ποιότητας σε καθένα από τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης.

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης σε δείγματα πλάσματος για τα εννέα αντιεπιληπτικά φάρμακα και τους δύο μεταβολίτες παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.1. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση για εύρος συγκεντρώσεων στο πλάσμα από 0,50 έως 50,0 $\mu\text{g/mL}$ για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδα, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, καθώς και για εύρος από 2,00 έως 200,0 $\mu\text{g/mL}$ για την αιθοσουξιμίδη και την τοπιραμάτη. Το τετράγωνο του μέσου συντελεστή συσχέτισης ήταν εντός των αποδεκτών ορίων και για τους έντεκα αναλύτες ($R^2 \geq 0,9916$).

Πίνακας 11.1. Εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τα εννέα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα και τους δύο μεταβολίτες σε δείγματα πλάσματος.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R^2
Αιθοσουξιμίδη	$y=3,5724 (\pm 0,0021)x-1,5874 (\pm 0,0032)$	0,9962
Καρβαμαζεπίνη	$y=3,2587 (\pm 0,0033)x+2,9617 (\pm 0,0041)$	0,9948
10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη	$y=0,1387 (\pm 0,0019)x+0,0416 (\pm 0,0011)$	0,9916
Λακοσαμίδα	$y=0,3862 (\pm 0,0020)x-0,4712 (\pm 0,0019)$	0,9978
Λαμοτριγίνη	$y=0,7469 (\pm 0,0024)x+0,0777 (\pm 0,0015)$	0,9958
Λεβετιρακετάμη	$y=1,1865 (\pm 0,0031)x-0,1312 (\pm 0,0018)$	0,9947
Οξυκαρβαζεπίνη	$y=2,4461 (\pm 0,0038)x+0,3387 (\pm 0,0019)$	0,9974
10-υδροξυ-καρβαζεπίνη	$y=1,2175 (\pm 0,0020)x+0,3854 (\pm 0,0025)$	0,9989
Τοπιραμάτη	$y=0,0137 (\pm 0,0011)x+0,0482 (\pm 0,0021)$	0,9929
Φαινοβαρβιτάλη	$y=0,8085 (\pm 0,0031)x-0,4009 (\pm 0,0019)$	0,9943
Φαινυτοΐνη	$y=0,8464 (\pm 0,0026)x+0,4517 (\pm 0,0022)$	0,9922

y = λόγος επιφάνειας κορυφής αναλύτη προς επιφάνεια κορυφής εσωτερικού προτύπου

x = συγκέντρωση αναλύτη στο πλάσμα, σε $\mu\text{g/mL}$

Οι επαναποσοτικοποιήσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης στο πλάσμα σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και οι αποκλίσεις τους (% E_r) για τον κάθε αναλύτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.2 για την αιθοσουξιμίδη και την τοπιραμάτη και στον Πίνακα 11.3 για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη. Οι αποκλίσεις των αποτελεσμάτων επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών -8,0% και 6,0% για όλους τους αναλύτες και σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ για το LOQ).

Πίνακας 11.2. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για την αιθοσουξιμίδη και την τοπιραμάτη, στο πλάσμα.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	2,00	4,00	12,0	40,0	80,0	200,0
Αιθοσουξιμίδη	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	2,08	4,11	11,6	42,2	81,4	188,9
	% E _r	4,0	2,8	-3,3	5,5	1,8	-5,6
Τοπιραμάτη	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	1,95	4,12	12,3	38,7	79,4	201,9
	% E _r	-2,5	3,0	2,5	-3,2	-0,7	1,0

Πίνακας 11.3. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδη, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, στο πλάσμα.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
Καρβαμαζεπίνη	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	0,52	0,96	2,92	10,4	19,6	50,9
	% E _r	4,0	-4,0	-2,7	4,0	-2,0	1,8

10,11-εποξειδιο- καρβαμαζεπίνη	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,49	1,05	3,04	10,3	19,1	51,9
	% E _r	-2,0	5,0	1,3	3,0	-4,5	3,8
Λακοσαμίδα	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,48	1,04	2,95	9,56	18,9	50,9
	% E _r	-4,0	4,0	-1,7	-4,4	-5,5	1,8
Λαμοτριγίνη	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,51	0,94	2,86	10,5	19,2	48,1
	% E _r	2,0	-6,0	-4,7	5,0	-4,0	-3,8
Λεβετιρακετάμη	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,52	0,95	3,14	10,6	19,1	49,3
	% E _r	4,0	-5,0	4,7	6,0	-4,5	-1,4
Οξυκαρβαζεπίνη	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,47	0,94	3,15	9,46	19,5	48,6
	% E _r	-6,0	-6,0	5,0	-5,4	-2,5	-2,8
10-υδροξυ- καρβαζεπίνη	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,46	1,05	3,14	9,86	18,7	48,4
	% E _r	-8,0	5,0	4,7	-1,4	-6,5	-3,2
Φαινοβαρβιτάλη	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,51	1,05	2,94	10,4	18,9	51,7
	% E _r	2,0	5,0	-2,0	4,0	-5,5	3,4
Φαινυτοΐνη	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	0,48	0,96	3,15	9,81	18,7	48,1
	% E _r	-4,0	-4,0	5,0	-1,9	-6,5	-3,8

Η επαναληψιμότητα και η ορθότητα της μεθόδου προσδιορισμού των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών στο πλάσμα, εκτιμήθηκαν στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας:

- 1,50 μg/mL για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδα, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, καθώς και 6,00 μg/mL για την αιθοσουξιμίδη και την τοπιραμάτη (QC1, χαμηλό επίπεδο)

- 15,0 µg/mL για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδα, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, καθώς και 60,0 µg/mL για την αιθοσουξιμίδα και την τοπιραμάτη (QC2, μεσαίο επίπεδο)
- 40,0 µg/mL για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδα, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη, καθώς και 160,0 µg/mL για την αιθοσουξιμίδα και την τοπιραμάτη (QC3, υψηλό επίπεδο).

Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας και της ορθότητας εντός της ημέρας της μεθόδου για το πλάσμα και στα τρία επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 11.4 για την αιθοσουξιμίδα και την τοπιραμάτη και στον Πίνακα 11.5 για την καρβαμαζεπίνη, τη 10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, τη λακοσαμίδα, τη λαμοτριγίνη, τη λεβετιρακετάμη, την οξυκαρβαζεπίνη, τη 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη, τη φαινοβαρβιτάλη και τη φαινυτοΐνη. Οι τιμές της επαναληψιμότητας και της ορθότητας εντός της ημέρας, ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$.

Η % απόλυτη ανάκτηση της μεθόδου προσδιορισμού των αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε πλάσμα εκτιμήθηκε για τους έντεκα αναλύτες στα τρία διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της μεθόδου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 11.6. Η απόλυτη ανάκτηση της λεβετιρακετάμης-d6 (για συγκέντρωση στο πλάσμα 1,25 µg/mL) υπολογίστηκε σε 94,2% ($\pm 5,1$).

Πίνακας 11.4. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου της μεθόδου προσδιορισμού της αιθοσουξιμίδης και της τοπιραμάτης στο πλάσμα.

Αναλύτης	QC1 (6,00 µg/mL)			QC2 (60,0 µg/mL)			QC3 (160,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
Αιθοσουξιμίδη	6,31 $\pm$ 0,25	4,0	5,2	62,8 $\pm$ 3,9	6,2	4,7	154,4 $\pm$ 8,7	5,6	-3,5
Τοπιραμάτη	6,36 $\pm$ 0,15	2,4	6,0	62,9 $\pm$ 2,5	4,0	4,8	167,9 $\pm$ 7,6	4,5	4,9

Πίνακας 11.5. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου της μεθόδου προσδιορισμού της καρβαμαζεπίνης, της 10,11-εποξειδίου-καρβαμαζεπίνης, της λακοσαμίδης, της λαμοτριγίνης, της λεβετιρακετάμης, της οξυκαρβαζεπίνης, της 10-υδροξυ-καρβαζεπίνης, της φαινοβαρβιτάλης και της φαινυτοΐνης στο πλάσμα.

αναλύτης	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
Καρβαμαζεπίνη	1,555 $\pm$ 0,076	4,9	3,7	14,1 $\pm$ 1,0	7,1	-6,0	42,4 $\pm$ 2,8	6,6	6,0
10,11-εποξειδίου- καρβαμαζεπίνη	1,452 $\pm$ 0,087	6,0	-3,2	14,4 $\pm$ 1,1	7,6	-4,0	42,2 $\pm$ 2,8	6,6	5,5
Λακοσαμίδα	1,408 $\pm$ 0,033	2,3	-6,1	14,65 $\pm$ 0,87	5,9	-2,3	40,87 $\pm$ 0,86	2,1	2,2
Λαμοτριγίνη	1,42 $\pm$ 0,11	7,7	-5,3	14,51 $\pm$ 0,54	3,7	-3,3	41,2 $\pm$ 2,4	5,8	3,0
Λεβετιρακετάμη	1,552 $\pm$ 0,064	4,1	3,5	16,11 $\pm$ 0,61	3,8	7,4	38,8 $\pm$ 2,1	5,4	-3,0
Οξυκαρβαζεπίνη	1,367 $\pm$ 0,059	4,3	-8,9	14,01 $\pm$ 0,49	3,5	-6,6	37,1 $\pm$ 2,4	6,5	-7,3
10-υδροξυ- καρβαζεπίνη	1,385 $\pm$ 0,061	4,4	-7,7	14,47 $\pm$ 0,81	5,6	-3,5	37,9 $\pm$ 2,1	5,5	-5,3
Φαινοβαρβιτάλη	1,55 $\pm$ 0,11	7,1	3,3	15,82 $\pm$ 0,38	2,4	5,5	41,9 $\pm$ 3,2	7,6	4,8
Φαινυτοΐνη	1,43 $\pm$ 0,11	7,7	-4,7	14,57 $\pm$ 0,42	2,9	-2,9	37,1 $\pm$ 2,6	7,0	-7,3

Πίνακας 11.6. % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της μεθόδου προσδιορισμού των εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των δύο μεταβολιτών σε δείγματα πλάσματος.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Συγκέντρωση (μg/mL)	% απόλυτη ανάκτηση (± SD)
Αιθοσουξιμίδη	6,00 (n=6)	86,1 ± 4,8
	60,0 (n=6)	84,6 ± 3,2
	160,0 (n=6)	88,3 ± 2,9
Καρβαμαζεπίνη	1,50 (n=6)	91,4 ± 2,6
	15,0 (n=6)	93,5 ± 3,9
	40,0 (n=6)	93,9 ± 4,2
10,11-εποξειδιο- καρβαμαζεπίνη	1,50 (n=6)	89,2 ± 3,1
	15,0 (n=6)	88,4 ± 4,8
	40,0 (n=6)	92,5 ± 5,2
Λακοσαμίδη	1,50 (n=6)	92,5 ± 3,5
	15,0 (n=6)	97,6 ± 4,3
	40,0 (n=6)	96,4 ± 5,2
Λαμοτριγίνη	1,50 (n=6)	99,3 ± 4,6
	15,0 (n=6)	95,5 ± 1,7
	40,0 (n=6)	98,2 ± 4,9
Λεβετιρακετάμη	1,50 (n=6)	95,7 ± 3,6
	15,0 (n=6)	89,6 ± 2,4
	40,0 (n=6)	96,5 ± 6,7
Οξυκαρβαζεπίνη	1,50 (n=6)	89,5± 4,6
	15,0 (n=6)	95,2 ± 4,2
	40,0 (n=6)	90,1 ± 5,4
10-υδροξυ-καρβαζεπίνη	1,50 (n=6)	89,4 ± 3,7
	15,0 (n=6)	84,8 ± 2,0
	40,0 (n=6)	87,3 ± 2,1
Τοπιραμάτη	6,00 (n=6)	95,3 ± 6,1
	60,0 (n=6)	89,2 ± 4,0
	160,0 (n=6)	90,4 ± 4,8
	1,50 (n=6)	86,6 ± 5,1

Φαινοβαρβιτάλη	15,0 (n=6)	87,4 ± 3,3
	40,0 (n=6)	83,2 ± 5,0
Φαινυτοΐνη	1,50 (n=6)	91,5 ± 3,9
	15,0 (n=6)	98,7 ± 5,7
	40,0 (n=6)	91,3 ± 5,3

11.3. Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου για τον προσδιορισμό όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο πλάσμα

Αρχικά αναλύθηκαν έξι τυφλά δείγματα πλάσματος που προήρχοντο από τρεις υγιείς εθελοντές και από τρεις διαφορετικές μονάδες αιμοδοσίας, χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου, όπως περιγράφεται στην αναπτυχθείσα μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο ολικό αίμα. Στη συνέχεια, έξι τυφλά δείγματα πλάσματος εμβολιάστηκαν με 50 μL μικτού διαλύματος εργασίας συγκέντρωσης 20 $\mu\text{g/mL}$ (διάλυμα Δ_2) με τις 34 ουσίες (Κεφάλαιο 8.3) που ελέγχθησαν κατά την επικύρωση της αντίστοιχης μεθόδου για το ολικό αίμα και με 20 μL μικτού διαλύματος εργασίας A_1 (με τα αλκαλικά αντιεπιληπτικά φάρμακα) συγκέντρωσης 50 $\mu\text{g/mL}$. Η τελική συγκέντρωση για την κάθε ουσία στο πλάσμα ήταν 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Τα δείγματα αυτά, χωρίς την προσθήκη όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων, κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη μέθοδο προσδιορισμού, προκειμένου να διερευνηθεί τυχόν παρεμπόδιση της ανάλυσης οφειλόμενη στο βιολογικό υλικό ή σε κάποια από τις παραπάνω ουσίες.

Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν κατά τον έλεγχο της εκλεκτικότητας και της ειδικότητας της μεθόδου, καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε στους χρόνους ανάλυσης και των πέντε αντιεπιληπτικών φαρμάκων (βαλπροϊκό οξύ, τιαγκαμπίνη, βιγκαμπατρίνη, γκαμπαπεντίνη και πρεγκαμπαλίνη).

Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της αναπτυχθείσας μεθόδου για τον προσδιορισμό όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα ελέγχθησαν και διαπιστώθηκε ότι μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν και σε δείγματα πλάσματος. Έτσι, τα προσδιορισθέντα κατώτατα όρια ανίχνευσης (0,02 $\mu\text{g/mL}$ για την τιαγκαμπίνη, 0,15 $\mu\text{g/mL}$ για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και 0,67 $\mu\text{g/mL}$ για το βαλπροϊκό οξύ) και ποσοτικοποίησης (0,05 $\mu\text{g/mL}$ για την τιαγκαμπίνη, 0,50 $\mu\text{g/mL}$ για τη

βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και 2,00 µg/mL για το βαλπροϊκό οξύ) για το ολικό αίμα έγιναν αποδεκτά και για τα δείγματα πλάσματος.

Η μελέτη της γραμμικότητας, της ορθότητας, της επαναληψιμότητας και της απόλυτης ανάκτησης της μεθόδου προσδιορισμού των δύο όξινων και των τριών επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε δείγματα πλάσματος, πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή ισάριθμων διαγραμμάτων βαθμονόμησης 6 σημείων (Πίνακας 5.1), που παρουσίασαν γραμμική συσχέτιση, και την ανάλυση έξι δειγμάτων ελέγχου ποιότητας σε καθένα από τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης.

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης σε δείγματα πλάσματος για τα πέντε αντιεπιληπτικά φάρμακα παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.7. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση για εύρος συγκεντρώσεων στο πλάσμα από 0,05 έως 5,00 µg/mL για την τιαγκαμπίνη, από 0,50 έως 50,0 µg/mL για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και για εύρος από 2,00 έως 200,0 µg/mL για το βαλπροϊκό οξύ. Το τετράγωνο του μέσου συντελεστή συσχέτισης ήταν εντός των αποδεκτών ορίων και για τους πέντε αναλύτες ($R^2 \geq 0,9927$).

Πίνακας 11.7. Εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τα δύο όξινα και τα τρία επαμφοτερίζοντα αντιεπιληπτικά φάρμακα σε δείγματα πλάσματος.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Εξίσωση διαγράμματος βαθμονόμησης	R^2
Βαλπροϊκό Οξύ	$y=2,5781 (\pm 0,0032) \cdot x + 15,128 (\pm 0,162)$	0,9947
Τιαγκαμπίνη	$y=7,7569 (\pm 0,0074) \cdot x + 0,4177 (\pm 0,0045)$	0,9989
Βιγκαμπατρίνη	$y=1,1058 (\pm 0,0021) \cdot x - 0,2547 (\pm 0,0025)$	0,9927
Γκαμπαπεντίνη	$y=1,2568 (\pm 0,0023) \cdot x + 0,3416 (\pm 0,0029)$	0,9965
Πρεγκαμπαλίνη	$y=1,0602 (\pm 0,0023) \cdot x + 0,3422 (\pm 0,0025)$	0,9943

y = λόγος επιφάνειας κορυφής αναλύτη προς επιφάνεια κορυφής εσωτερικού προτύπου

x = συγκέντρωση αναλύτη στο πλάσμα, σε µg/mL

Οι επαναποσοτικοποιήσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης στο πλάσμα σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και οι αποκλίσεις τους (% E_r) παρουσιάζονται στον

Πίνακα 11.8 για το βαλπροϊκό οξύ, στον Πίνακα 11.9 για την τιαγκαμπίνη και στον Πίνακα 11.10 για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη. Οι αποκλίσεις των αποτελεσμάτων επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών -10,0% και 11,0% για όλους τους αναλύτες και σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων. Οι τιμές αυτές βρέθηκαν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ για το LOQ).

Πίνακας 11.8. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για το βαλπροϊκό οξύ, στο πλάσμα.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	2,00	4,00	12,00	40,0	80,0	200,0
Βαλπροϊκό Οξύ	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	2,15	4,11	11,8	41,7	82,4	190,9
	% E_r	7,5	2,8	-1,7	4,3	3,0	-4,6

Πίνακας 11.9. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για την τιαγκαμπίνη, στο πλάσμα.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	0,05	0,10	0,30	1,00	2,00	5,00
Τιαγκαμπίνη	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	0,048	0,096	0,282	1,047	1,86	5,17
	% E_r	-4,0	-4,0	-6,0	4,7	-7,0	3,4

Πίνακας 11.10. Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, στο πλάσμα.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Δείγματα Βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6
	Αναμενόμενη συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	0,50	1,00	3,00	10,0	20,0	50,0
Βιγκαμπατρίνη	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	0,48	0,94	2,93	9,57	18,9	51,9
	% E_r	-4,0	-6,0	-2,3	-4,3	-5,5	3,8

Γκαμπαπεντίνη	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	0,52	1,04	2,87	10,5	19,2	51,9
	% E_r	4,0	4,0	-4,3	5,0	-4,0	3,8
Πρεγκαμπαλίνη	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)	0,45	1,11	3,05	9,83	18,6	47,9
	% E_r	-10,0	11,0	1,7	-1,7	-7,0	-4,2

Η επαναληψιμότητα και η ορθότητα της μεθόδου προσδιορισμού των δύο όξινων και των τριών επαμφοτεριζόντων φαρμάκων σε δείγματα πλάσματος, εκτιμήθηκαν στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας:

- 0,15 $\mu\text{g/mL}$ για την τιαγκαμπίνη, 1,50 $\mu\text{g/mL}$ για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και 6,00 $\mu\text{g/mL}$ για το βαλπροϊκό οξύ (QC1, χαμηλό επίπεδο)
- 1,50 $\mu\text{g/mL}$ για την τιαγκαμπίνη, 15,0 $\mu\text{g/mL}$ για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και 60,0 $\mu\text{g/mL}$ για το βαλπροϊκό οξύ (QC2, μεσαίο επίπεδο)
- 4,00 $\mu\text{g/mL}$ για την τιαγκαμπίνη, 40,0 $\mu\text{g/mL}$ για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη, καθώς και 160,0 $\mu\text{g/mL}$ για το βαλπροϊκό οξύ (QC3, υψηλό επίπεδο).

Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας και της ορθότητας εντός της ημέρας της μεθόδου για το πλάσμα και στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 11.11 για το βαλπροϊκό οξύ, στον Πίνακα 11.12 για την τιαγκαμπίνη και στον Πίνακα 11.13 για τη βιγκαμπατρίνη, την γκαμπαπεντίνη και την πρεγκαμπαλίνη. Οι τιμές της επαναληψιμότητας και της ορθότητας εντός της ημέρας, ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$.

Η % απόλυτη ανάκτηση της μεθόδου προσδιορισμού των όξινων και επαμφοτεριζόντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε πλάσμα εκτιμήθηκε για τους πέντε αναλύτες στα τρία διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της μεθόδου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 11.14. Η % απόλυτη ανάκτηση της γκαμπαπεντίνης-d10 (για συγκέντρωση στο πλάσμα 1,25 $\mu\text{g/mL}$) υπολογίστηκε σε 90,2% ($\pm 6,3$).

Πίνακας 11.11. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου της μεθόδου προσδιορισμού του βαλπροϊκού οξέος στο πλάσμα.

Αναλύτης	QC1 (6,00 µg/mL)			QC2 (60,0 µg/mL)			QC3 (160,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
Βαλπροϊκό οξύ	5,88 $\pm$ 0,26	4,4	-2,0	57,9 $\pm$ 2,4	4,1	-3,5	166,9 $\pm$ 6,1	3,7	4,3

Πίνακας 11.12. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου της μεθόδου προσδιορισμού της τιαγκαμπίνης στο πλάσμα.

Αναλύτης	QC1 (0,15 µg/mL)			QC2 (1,50 µg/mL)			QC3 (4,00 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
Τιαγκαμπίνη	0,155 $\pm$ 0,011	7,1	3,3	1,597 $\pm$ 0,043	2,7	6,5	3,78 $\pm$ 0,19	5,0	-5,5

Πίνακας 11.13. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου της μεθόδου προσδιορισμού της βιγκαπατρίνης, της γκαμπαπεντίνης και της πρεγκαμπαλίνης στο πλάσμα.

αναλύτης	QC1 (1,50 µg/mL)			QC2 (15,0 µg/mL)			QC3 (40,0 µg/mL)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\pm$ SD, n=6) (µg/mL)	Επαναληψιμότητα (% RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (% E _r)
Βιγκαπατρίνη	1,576 $\pm$ 0,081	5,1	5,1	15,65 $\pm$ 0,77	4,9	4,3	37,6 $\pm$ 2,6	6,9	-6,0
Γκαμπαπεντίνη	1,412 $\pm$ 0,033	2,3	-5,9	14,59 $\pm$ 0,88	6,0	-2,7	38,87 $\pm$ 0,91	2,3	-2,8
Πρεγκαμπαλίνη	1,428 $\pm$ 0,044	3,1	-4,8	15,48 $\pm$ 0,71	4,6	3,2	43,2 $\pm$ 2,7	6,3	8,0

Πίνακας 11.14. % ποσοστά απόλυτης ανάκτησης της μεθόδου προσδιορισμού των όξινων και επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε δείγματα πλάσματος.

Αντιεπιληπτικό Φάρμακο	Συγκέντρωση (μg/mL)	% απόλυτη ανάκτηση (± SD)
Βαλπροϊκό οξύ	6,00 (n=6)	93,6 ± 4,9
	60,0 (n=6)	96,7 ± 5,8
	160,0 (n=6)	94,2 ± 5,4
Τιαγκαμπίνη	0,15 (n=6)	92,5 ± 4,2
	1,50 (n=6)	95,1 ± 6,7
	4,00 (n=6)	96,9 ± 6,2
Βιγκαπατρίνη	1,50 (n=6)	83,7 ± 3,0
	15,0 (n=6)	87,2 ± 2,1
	40,0 (n=6)	89,4 ± 5,2
Γκαμπαπεντίνη	1,50 (n=6)	88,8 ± 4,4
	15,0 (n=6)	85,0 ± 2,4
	40,0 (n=6)	84,9 ± 3,0
Πρεγκαμπαλίνη	1,50 (n=6)	91,9 ± 5,1
	15,0 (n=6)	95,3 ± 5,6
	40,0 (n=6)	94,0 ± 4,1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΝΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΕΠΙΛΗΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

12.1. Εισαγωγή

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των αντιεπιληπτικών φαρμάκων που αναπτύχθηκαν, βελτιστοποιήθηκαν και επικυρώθηκαν, στη συνέχεια εφαρμόστηκαν σε πραγματικά δείγματα πλάσματος και ολικού αίματος υποθέσεων κλινικού και δικαστικού τοξικολογικού ενδιαφέροντος και επιβεβαιώθηκε η εφαρμοσιμότητά τους σε τέτοιου είδους περιστατικά. Στο πλαίσιο της Διδακτορικής αυτής Διατριβής αναλύθηκαν συνολικά 54 βιολογικά δείγματα, εκ των οποίων τα 9 ήταν δείγματα πλάσματος και αναλύθηκαν στο πλαίσιο ρύθμισης του δοσολογικού σχήματος ή διερεύνησης πιθανής δηλητηρίασης ασθενών, ενώ τα υπόλοιπα 45 ήταν μεταθανάτια δείγματα αίματος, που αναλύθηκαν στο πλαίσιο τοξικολογικής διερεύνησης δικαστικών υποθέσεων του Εργαστηρίου.

12.2. Εφαρμογές των αναπτυχθέντων μεθόδων προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων στην Κλινική Τοξικολογία σε δείγματα πλάσματος

Οι αναπτυχθείσες μέθοδοι προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων εφαρμόστηκαν σε δείγματα πλάσματος που ελήφθησαν από ασθενείς που λάμβαναν αντιεπιληπτική αγωγή. Οι ασθενείς που ελέγχθησαν είτε εμφάνιζαν επιληπτικές κρίσεις ή τοξικές εκδηλώσεις οπότε χρειαζόταν ρύθμιση του δοσολογικού σχήματος της αντιεπιληπτικής αγωγής που ελάμβαναν ή ακόμη και αλλαγή αυτής, είτε επρόκειτο για έλεγχο ρουτίνας των θεραπευτικών επιπέδων των αντιεπιληπτικών φαρμάκων που λάμβαναν. Σε όλους τους ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη γινόταν πλήρης ενημέρωση (προφορική και γραπτή με επιστολή) σχετικά με το σκοπό και τα στάδια της διαδικασίας, τη φύλαξη και τη χρήση των πληροφοριών που θα παρείχαν, και εφόσον επιθυμούσαν να συμμετάσχουν στη μελέτη υπέγραφαν έντυπο συγκατάθεσης. Στοιχεία του ιστορικού για τον κάθε ασθενή, όπως το φύλο, η ηλικία, η φαρμακευτική αγωγή και ο χρόνος λήψης της τελευταίας δόσης αντιεπιληπτικών φαρμάκων παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.1. Ο χρόνος

δειγματοληψίας σε όλες τις περιπτώσεις ήταν ακριβώς πριν την πρώτη πρωινή χορήγηση του εκάστοτε αντιεπιληπτικού φαρμάκου, προκειμένου να προσδιοριστεί η χαμηλότερη θεραπευτική συγκέντρωση (trough concentration) στη σταθεροποιημένη κατάσταση (steady-state) του κάθε ασθενούς, όπως συστήνουν οι διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες [Hiemke και συν., 2011]. Οι συγκεντρώσεις των αντιεπιληπτικών φαρμάκων προσδιορίστηκαν με βάση την καμπύλη αναφοράς που έγινε την ημέρα της ανάλυσης των δειγμάτων και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στο Πίνακα 12.1.

Τα περιστατικά 1, 2, 3, 6, 7, 8 και 9 αφορούν περιπτώσεις παρακολούθησης θεραπευτικών επιπέδων αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Στις περιπτώσεις 1, 6, 7, 8 και 9, οι ασθενείς δεν εμφάνιζαν επιληπτικές κρίσεις ή συμπτώματα τοξικότητας και αφορούσαν ελέγχους ρουτίνας. Σε αυτά τα περιστατικά, οι συγκεντρώσεις των αντιεπιληπτικών φαρμάκων βρέθηκαν να είναι στις αναμενόμενες κατώτερες θεραπευτικές συγκεντρώσεις, και δε χρειάστηκε να γίνει κάποια τροποποίηση στο δοσολογικό σχήμα των ασθενών αυτών. Στις περιπτώσεις 2 και 3, οι ασθενείς εμφάνιζαν συμπτώματα όπως υπνηλία και αταξία και κρίθηκε σκόπιμο από το θεράποντα ιατρό να γίνει μέτρηση των επιπέδων των αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Στην περίπτωση 2, η λαμοτριγίνη βρέθηκε κάτω από τα θεραπευτικά όρια ενώ το βαλπροϊκό οξύ στα ανώτερα θεραπευτικά επίπεδα. Στην περίπτωση 3, η λαμοτριγίνη ήταν στα χαμηλά θεραπευτικά επίπεδα, ενώ το βαλπροϊκό οξύ βρέθηκε άνω των θεραπευτικών ορίων. Σε αυτές τις δύο περιπτώσεις, η εκδήλωση των ανεπιθύμητων ενεργειών οφειλόταν στις υψηλές συγκεντρώσεις του βαλπροϊκού οξέος και κρίθηκε σκόπιμη η κατάλληλη αλλαγή του δοσολογικού σχήματος.

Οι μετρήσεις που έγιναν για τις περιπτώσεις 4 και 5 αφορούν περιστατικό δηλητηρίασης παιδιού με οξυκαρβαζεπίνη. Το παιδί διακομίστηκε στο νοσοκομείο με συμπτώματα όπως υπνηλία, αστάθεια βάδισης, ζάλη και αδυναμία συγκέντρωσης, ενώ βάση ιστορικού δε λάμβανε καμία φαρμακευτική αγωγή. Δείγματα αίματος και ούρων εστάλησαν στο Εργαστήριο για τοξικολογική ανάλυση, καθώς δε βρέθηκε κάποιο παθολογικό αίτιο κατά τον υπόλοιπο κλινικοεργαστηριακό έλεγχο που έγινε στο νοσοκομείο. Κατά τη γενική τοξικολογική ανάλυση των ούρων του παιδιού διαπιστώθηκε η παρουσία της 10-υδροξυ-καρβαζεπίνης και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο πλάσμα οι συγκεντρώσεις της οξυκαρβαζεπίνης και της 10-υδροξυ-καρβαζεπίνης, οι οποίες κατά την πρώτη μέτρηση βρέθηκαν υψηλότερες των

θεραπευτικών συγκεντρώσεων. Μετά την πάροδο 2 ημερών, τα επίπεδα αυτά μειώθηκαν σε τιμές κάτω των θεραπευτικών ορίων. Η λεπτομερέστερη διερεύνηση του περιστατικού έδειξε ότι το φάρμακο είχε χορηγηθεί από τη μητέρα, η οποία διαγνώστηκε ότι έπασχε από το σύνδρομο Μινχάουζεν δια αντιπροσώπου (Munchausen syndrome by proxy).

Πίνακας 12.1. Περιστατικά κλινικού ενδιαφέροντος που διερευνήθηκαν με τις αναπτυγθείσες μεθόδους προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο πλάσμα με αέρια χρωματογραφία-φασματογραφία μαζών.

α/α	Φύλο Ηλικία	Φαρμακευτική αγωγή	Χρόνος μεσολάβησης από την τελευταία λήψη	Αντιεπιληπτικό φάρμακο	Συγκέντρωση (μg/mL)	Άλλα φάρμακα (σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις)
1	Θήλυ 8	Vimpat 100 mg 1 x 2 ημερησίως	11 ώρες	Λακοσαμίδα	3,11	---
		Depakine 500 mg 1 x 2 ημερησίως	11 ώρες	Βαλπροϊκό οξύ	39,1	
		Epanutin 100 mg 1 x 2 ημερησίως	11 ώρες	Φαινυτοΐνη	3,97	
2	Θήλυ 10	Lamictal 20 mg 1 x 2 ημερησίως	12 ώρες	Λαμοτριγίνη	2,80	---
		Depakine 500 mg 1 x 2 ημερησίως	12 ώρες	Βαλπροϊκό οξύ	90,0	
3	Θήλυ 11	Lamictal 20 mg πρωί 25 mg βράδυ	11 ώρες	Λαμοτριγίνη	6,20	---

		Depakine 500 mg 1 x 2 ημερησίως	11 ώρες	Βαλπροϊκό οξύ	119,0	
4	Άρρεν 4	Trileptal 300 mg/ 5mL	άγνωστο κατά την εισαγωγή	Οξυκαρβαζεπίνη	6,54	---
				10-υδροξύ-καρβαζεπίνη	35,27	
5	Άρρεν 4	Trileptal 300 mg/ 5mL	2 μέρες μετά την εισαγωγή	Οξυκαρβαζεπίνη	0,13	---
				10-υδροξύ-καρβαζεπίνη	1,04	
6	Άρρεν 37	Depakine 500 mg 1 x 2 ημερησίως	12 ώρες	Βαλπροϊκό οξύ	61,3	---
7	Άρρεν 37	Depakine 500 mg 1 x 2 ημερησίως	12 ώρες	Βαλπροϊκό οξύ	52,5	---
8	Άρρεν 38	Depakine 500 mg 1 x 2 ημερησίως	12 ώρες	Βαλπροϊκό οξύ	56,3	Λεβομεπρομαζίνη
		Keppra 500 mg 1 x 2 ημερησίως	12 ώρες	Λεβετιρακετάμη	13,4	
9	Άρρεν 38	Depakine 500 mg 1 x 2 ημερησίως	12 ώρες	Βαλπροϊκό οξύ	69,0	Λεβομεπρομαζίνη
		Keppra 500 mg 1 x 2 ημερησίως	12 ώρες	Λεβετιρακετάμη	17,1	

12.3. Εφαρμογές των αναπτυχθέντων μεθόδων προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων στη Δικαστική Τοξικολογία σε μεταθανάτια δείγματα αίματος

Οι αναπτυχθείσες μέθοδοι προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων εφαρμόστηκαν κυρίως σε μεταθανάτια δείγματα αίματος ατόμων που σύμφωνα με το ιστορικό τους λάμβαναν αντιεπιληπτική αγωγή στο πλαίσιο της τοξικολογικής διερεύνησης των αντίστοιχων περιστατικών ή που διαπιστώθηκε η παρουσία τους κατά τη γενική τοξικολογική ανάλυση ούρων. Τα δείγματα αίματος που αναλύθηκαν αφορούσαν δικαστικές υποθέσεις του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας ή υποθέσεις που εστάλησαν στο Εργαστήριο από άλλες Ιατροδικαστικές Υπηρεσίες για τοξικολογική ανάλυση.

Στοιχεία του ιστορικού για το κάθε περιστατικό, όπως το φύλο και η ηλικία του ατόμου, η αιτία και το είδος θανάτου, άλλα φάρμακα ή ναρκωτικές ουσίες που ανιχνεύθηκαν κατά την τοξικολογική ανάλυση, καθώς και οι συγκεντρώσεις του οινόπνεύματος που προσδιορίστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.2. Οι συγκεντρώσεις των αντιεπιληπτικών φαρμάκων προσδιορίστηκαν με βάση την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε την ημέρα της ανάλυσης των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.2. Τα παθολογικά αίτια τα οποία αναφέρονται στον Πίνακα ως αιτία θανάτου περιλαμβάνουν έμφραγμα του μυοκαρδίου, πολυοργανική ανεπάρκεια, εγκεφαλική αιμορραγία κ.α.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τοξικές συγκεντρώσεις αντιεπιληπτικών φαρμάκων βρέθηκαν στις περιπτώσεις 33 και 37, που σχετίζονται με την αιτία θανάτου. Οι περιπτώσεις 8, 21, 36, 39 και 45 αφορούν περιστατικά δηλητηρίασης με άλλα φάρμακα ή ναρκωτικές ουσίες, όπου αντιεπιληπτικά φάρμακα ανιχνεύθηκαν σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις και είναι πιθανόν να εμφάνισαν συνεργική δράση και να συνέβαλαν στην τελική αιτία θανάτου. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, τα αντιεπιληπτικά φάρμακα προσδιορίστηκαν σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις και πιθανόν δε σχετίζονται άμεσα με την αιτία θανάτου. Τέλος, στις περιπτώσεις 5, 6, 7, 9, 16 και 35 προσδιορίστηκαν περισσότερα από ένα αντιεπιληπτικά φάρμακα, γεγονός που υποδεικνύει τη χρησιμότητα αναλυτικών μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων.

Πίνακας 12.2. Περιστατικά δικαστικού ενδιαφέροντος που διερευνήθηκαν με τις αναπτυγθείσες μεθόδους προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο αίμα με αέρια χρωματογραφία-φασματογραφία μαζών.

α/α	Φύλο Ηλικία	Αιτία θανάτου	Είδος θανάτου	Οινόπνευμα (g/L)	Αντιεπιληπτικό φάρμακο	Συγκέντρωση (μg/mL)	Άλλα φάρμακα (σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις)
1	Άρρεν 69	Πνιγμονή (τροφή)	Ατύχημα	Αρνητικό	Λεβετιρακετάμη	30,4	ΡΙβαστιγμίνη Βενλαφαζίνη Λιδοκαΐνη Μιδαζολάμη
2	Θήλυ 91	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Λεβετιρακετάμη	38,1	---
3	Άρρεν 20	Πολλαπλές κακώσεις	Τροχαίο ατύχημα	Αρνητικό	Λεβετιρακετάμη	8,20	Λιδοκαΐνη Μιδαζολάμη Θειοπεντάλη Πεντοβαρβιτάλη
4	Άρρεν 33	Πολλαπλές κακώσεις	Τροχαίο ατύχημα	Αρνητικό	Λεβετιρακετάμη	20,8	Τραμαδόλη Ατροπίνη Βιπεριδίνη
5	Άρρεν	Παθολογικά	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Λεβετιρακετάμη	1,88	---

	29	αίτια				Καρβαμαζεπίνη	5,76	
						Βαλπροϊκό οξύ	89,0	
6	Άρρεν 20	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	0,25		Λεβετιρακετάμη	8,12	---
						Φαινυτοΐνη	9,58	
						Οξυκαρβαζεπίνη	13,4	
						10-υδροξυ- καρβαζεπίνη	21,3	
7	Άρρεν 52	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό		Λεβετιρακετάμη	14,8	---
						Φαινυτοΐνη	11,2	
8	Άρρεν 47	Φαρμακευτική δηλητηρίαση (νιμεσουλίδη)	Αυτοκτονία	Αρνητικό		Λαμοτριγίνη	6,59	Κουετιαπίνη Διαζεπάμη Νιμεσουλίδη (τοξικές συγκεντρώσεις)
9	Θήλυ 44	Πολυαπλές κακώσεις	Αυτοκτονία (πτώση εξ' ύψους)	0,29		Λαμοτριγίνη	3,66	Σερτραλίνη Κουετιαπίνη
						Φαινοβαρβιτάλη	4,14	
10	Άρρεν 68	Πνιγμός εντός ύδατος	Ατύχημα	Αρνητικό		Φαινυτοΐνη	14,9	---
11	Άρρεν	Παθολογικά	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό		Φαινυτοΐνη	16,3	Λιδοκαΐνη

	40	αίτια						
12	Άρρεν 66	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Τοπιραμάτη	3,60	Σερτραλίνη Ολανζαπίνη	
13	Άρρεν 76	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Φαινουτοΐνη	18,5	Μιδαζολάμη	
14	Άρρεν 74	Κακώσεις κεφαλής	Αυτοκτονία (αυτοπυρροβολισμός)	0,35	Τοπιραμάτη	2,21	Μιρταζαπίνη	
15	Άρρεν 70	Πολλαπλές κακώσεις	Τροχάιο ατύχημα	1,90	Καρβαμαζεπίνη	5,24	---	
					10,11-εποξειδιο- καρβαμαζεπίνη	6,82		
16	Άρρεν 55	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Λεβετιρακετάμη	30,2	Μιδαζολάμη	
					Φαινουτοΐνη	18,5		
17	Θήλυ 7	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Φαινουτοΐνη	11,2	Λιδοκαΐνη Θειοπεντάλη Πεντοβαρβιτάλη Μιδαζολάμη	
18	Άρρεν 47	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Φαινοβαρβιτάλη	20,4	---	
19	Θήλυ	Πολλαπλές	Ατύχημα	Αρνητικό	Φαινουτοΐνη	19,2	Μιδαζολάμη	

	68	κακώσεις	(πτώση εξ' ύψους)				Τραμαδόλη Βενλαφαξίνη Νορβενλαφαξίνη
20	Άρρεν 48	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Φαινοβαρβιτάλη	33,1	---
21	1476	Δηλητηρίαση από ναρκωτικά (χρήστης)	Ατύχημα	Αρνητικό	Φαινυτοΐνη	13,6	Μορφίνη Κωδεΐνη 6-ακετυλο-μορφίνη 7-αμινο-φλουνιτραζεπάμη Παρακεταμόλη
22	Άρρεν 66	Πνιγμός εντός ύδατος	Ατύχημα	1,66	Φαινοβαρβιτάλη	11,9	---
23	Άρρεν 74	Πνιγμός εντός ύδατος	Ατύχημα	Αρνητικό	Καρβαμαζεπίνη 10,11-εποξειδιο- καρβαμαζεπίνη	4,71 8,12	---
24	Θήλυ 64	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Τοπιραμάτη	6,71	Νορδιαζεπάμη Ζολπιδέμη Διλτιαζέμη
25	Άρρεν	Κακώσεις	Αυτοκτονία	0,29	Τοπιραμάτη	7,32	Διαζεπάμη

	51	κεφαλής	(αυτοπυρροβολισμός)				
26	Άρρεν 45	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Καρβαμαζεπίνη	2,94	---
					10,11-εποξείδιο- καρβαμαζεπίνη	6,54	
27	Άρρεν 55	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Τοπιραμιάτη	3,12	---
28	Θήλυ 44	Πολλαπλά τραύματα	Ανθρωποκτονία	0,69	Τοπιραμιάτη	7,11	---
29	Άρρεν 55	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Φαινυτοΐνη	12,2	---
30	Άρρεν 64	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Λεβετιρακετάμη	14,4	---
31	Θήλυ 82	Πολλαπλές κακώσεις	Ατύχημα (πτώση εξ' ύψους)	Αρνητικό	Λεβετιρακετάμη	25,2	Μιρταζαπίνη
32	Άρρεν 62	Πολλαπλά εγκύματα	Ατύχημα (πυρκαγιά)	2,14	Τοπιραμιάτη	6,65	Βενλαφαξίνη Νορβενλαφαξίνη Χλωροδιαζεποξείδιο Νορδιαζεπάμη
33	Άρρεν	Δηλητηρίαση	Ατύχημα	Αρνητικό	Καρβαμαζεπίνη	20,5	Μορφίνη

	36	από ναρκωτικά (χρήστης)				10,11-εποξειδιο- καρβαμαζεπίνη	13,2	Κωδεΐνη 6-ακετυλο-μορφίνη Διαζεπάμη Νορδιαζεπάμη Οξαζεπάμη Λεβομεπρομαζίνη
34	Άρρεν 47	Πολλαπλές κακώσεις	Τροχαίο ατύχημα	1,14	Λεβετιρακετάμη	Λεβετιρακετάμη	38,1	Δ ⁹ -THC 11-nor-Δ ⁹ -THCCOOH
35	Άρρεν 57	Ασφυκτικός θάνατος	Αυτοκτονία (απαγχονισμός)	Αρνητικό	Λεβετιρακετάμη	Λακοσαμίδα	21,3	---
					Οξυκαρβαζεπίνη		5,78	
					10-υδροξυ- καρβαζεπίνη		11,2	
							16,5	
36	Άρρεν 69	Δηλητηρίαση από φάρμακα	Ατύχημα	Αρνητικό	Πρεγκαμπαλίνη		7,63	Μορφίνη Κωδεΐνη Φαιντανύλη Τραμαδόλη
37	Θήλυ 55	Δηλητηρίαση από φάρμακα	Ατύχημα	1,31	Γκαμπαπεντίνη		104,9	Διοφαινυδραμίνη Σιταλοπράμη

38	Άρρεν 64	Πνιγμός εντός ύδατος	Ατύχημα	0,11	Βαλπροϊκό οξύ	33,9	Προμεθαζίνη Κουετιαπίνη
39	Άρρεν 40	Δηλητηρίαση από ναρκωτικά (χρήστης)	Ατύχημα	0,75	Πρεγκαμπαλίνη	0,54	Μορφίνη Κωδεΐνη
40	Θήλυ 60	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Γκαμπαπεντίνη	10,0	Λιδοκαΐνη Τραμαδόλη Παρακεταμόλη
41	Άρρεν 47	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Πρεγκαμπαλίνη	0,53	Βενλαφαξίνη Νορβενλαφαξίνη Τραμαδόλη Παρακεταμόλη
42	Άρρεν 76	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Πρεγκαμπαλίνη	3,01	Βενλαφαξίνη Νορβενλαφαξίνη Κουετιαπίνη Παρακεταμόλη
43	Άρρεν 54	Πολλαπλές κακώσεις	Αυτοκτονία (πτώση εξ' ύψους)	Αρνητικό	Βαλπροϊκό οξύ	2,72	Ολανζαπίνη Λιδοκαΐνη

44	Θήλυ 31	Παθολογικά αίτια	Αιφνίδιος θάνατος	Αρνητικό	Λαμοτριγίνη	5,51	---
45	Άρρεν 51	Δηλητηρίαση από φάρμακα	Ατύχημα	Αρνητικό	Τοπιραμιάτη	7,53	Διαζεπάμη Νορδιαζεπάμη Αμιτριπτυλίνη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επιληψία εξακολουθεί να είναι μία συχνά εμφανιζόμενη νόσος στην ανθρωπότητα από τα αρχαία ακόμα χρόνια μέχρι και σήμερα. Η κύρια και πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση των επιληπτικών κρίσεων πραγματοποιείται με τη χρήση αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα που είναι εγκεκριμένα από τον Ε.Ο.Φ. και χρησιμοποιούνται κυρίως σήμερα στον ελληνικό χώρο είναι η αιθοσουξιμίδη, το βαλπροϊκό νάτριο, η βιγκαμπατρίνη, η γκαμπαπεντίνη, η καρβαμαζεπίνη, η λακοσαμίδη, η λαμοτριγίνη, η λεβετιρακετάμη, η οξυκαρβαζεπίνη, η πρεγκαμπαλίνη, η τιαγκαμπίνη, η τοπιραμάτη, η φαινοβαρβιτάλη και η φαινυτοΐνη. Ορισμένα από αυτά τα αντιεπιληπτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται, εκτός από την αντιμετώπιση των επιληπτικών κρίσεων, και για άλλες παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως νευραλγίες, κατάθλιψη και διπολική διαταραχή, με αποτέλεσμα ο αριθμός των ασθενών που λαμβάνουν θεραπευτική αγωγή που περιλαμβάνει αντιεπιληπτικά φάρμακα αυξάνεται συνεχώς με την πάροδο του χρόνου.

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της AGNP (Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie) που ισχύουν διεθνώς, οι συστάσεις για την παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων αντιεπιληπτικών φαρμάκων κατατάσσουν τα υπό μελέτη φάρμακα σε τέσσερις κατηγορίες: «αυστηρώς συνιστώμενα» (η φαινοβαρβιτάλη και η φαινυτοΐνη), «συνιστώμενα» (η αιθοσουξιμίδη, το βαλπροϊκό οξύ, η καρβαμαζεπίνη, η λαμοτριγίνη, η λεβετιρακετάμη, η οξυκαρβαζεπίνη και η τιαγκαμπίνη), «χρήσιμα» (η γκαμπαπεντίνη, η πρεγκαμπαλίνη και η τοπιραμάτη) και «πιθανώς χρήσιμα» (η βιγκαμπατρίνη) [Hiemke και συν., 2011].

Δεδομένου ότι ο ρυθμός βιομετατροπής και απέκκρισης των αντιεπιληπτικών φαρμάκων μπορεί να διαφέρει από άτομο σε άτομο και δεν υπάρχει πάντα θεωρητική συσχέτιση μεταξύ της ληφθείσας δόσης αντιεπιληπτικών φαρμάκων και των επιπέδων αυτών στο πλάσμα ή στο ολικό αίμα, πρέπει ορισμένες φορές να γίνεται εξατομίκευση του δοσολογικού σχήματος για τον κάθε ασθενή. Επιπλέον, οι ασθενείς που λαμβάνουν αντιεπιληπτικά φάρμακα συνήθως λαμβάνουν κι άλλα φάρμακα παράλληλα που μπορεί να αλληλεπιδρούν με αυτά, οπότε ειδικά σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται πιο προσεκτική ρύθμιση του δοσολογικού σχήματος του

ασθενή με τη βοήθεια της μέτρησης των επιπέδων των αντιεπιληπτικών φαρμάκων. Ειδικότερα, η παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων των αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο πλάσμα ή / και στο αίμα κρίνεται απαραίτητη σε ασθενείς που:

- παίρνουν αντιεπιληπτικά φάρμακα για πρώτη φορά ή διαφοροποιούν την αντιεπιληπτική αγωγή που ήδη λαμβάνουν
- δεν ανταποκρίνονται σε συνήθεις θεραπευτικές δόσεις των αντιεπιληπτικών φαρμάκων και συνεχίζουν να εμφανίζουν επιληπτικές κρίσεις,
- εμφανίζουν τοξικές εκδηλώσεις κατά την έναρξη ή τη διάρκεια της αντιεπιληπτικής θεραπείας,
- λαμβάνουν πολυφαρμακευτική αγωγή και τα λαμβανόμενα φάρμακα (αντιεπιληπτικά ή μη) μπορούν να επηρεάσουν τη βιομετατροπή των αντιεπιληπτικών φαρμάκων με τελικό αποτέλεσμα τον επηρεασμό των επιπέδων τους,
- παρουσιάζουν μειωμένη ηπατική ή νεφρική λειτουργία,
- ανήκουν σε ειδικές κατηγορίες, όπως νεογνά, παιδιά, γυναίκες σε κύηση ή περίοδο λοχείας,
- υπάρχει η υπόνοια μη σωστής λήψης της αντιεπιληπτικής αγωγής και απαιτείται ο έλεγχος συμμόρφωσής τους.

Επίσης, ο ποσοτικός προσδιορισμός αντιεπιληπτικών φαρμάκων στο αίμα ασθενών υπό αντίστοιχη αγωγή κρίνεται συχνά απαραίτητος σε περιπτώσεις που αυτά δεν ακολουθούν γραμμική κινητική ως προς τη βιομετατροπή τους αλλά κινητική κορεσμού, οπότε μικρή αλλαγή στη δόση πιθανόν να οδηγήσει σε τοξικές συγκεντρώσεις, ή όταν το θεραπευτικό τους εύρος είναι μικρό [Johannessen και συν., 2003; Shader και Greenblatt, 2003; Patsalos, 2003; Patsalos και συν., 2008; Johannessen και Landmark, 2010].

Η εφαρμογή μεθόδων προσδιορισμού των αντιεπιληπτικών φαρμάκων, σε πλάσμα και ολικό αίμα, είναι απαραίτητη για τη σωστή αντιμετώπιση όλων των ανωτέρω περιστατικών και ειδικότερα στο πλαίσιο της εξατομίκευσης του δοσολογικού σχήματος. Μέθοδοι ταυτόχρονου προσδιορισμού ικανού αριθμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση των επιπέδων των φαρμάκων αυτών σε πλάσμα και ολικό αίμα, με ακρίβεια, αξιοπιστία και σε μικρό χρονικό διάστημα, μπορούν να βοηθήσουν τους κλινικούς γιατρούς που παρακολουθούν τους ασθενείς υπό αντιεπιληπτική αγωγή να ρυθμίσουν το

δοσολογικό σχήμα των ασθενών, καθώς και να τροποποιήσουν την αντιεπιληπτική αγωγή αλλάζοντας ή προσθέτοντας κάποιο επιπλέον αντιεπιληπτικό φάρμακο.

Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός αντιεπιληπτικών φαρμάκων είναι επίσης απαραίτητα κατά την τοξικολογική ανάλυση βιολογικών υλικών ατόμων που λάμβαναν αντιεπιληπτικά φάρμακα στο πλαίσιο της διερεύνησης δικαστικών υποθέσεων, όπως τροχαία και άλλα ατυχήματα (π.χ. πτώση εξ' ύψους, πνιγμός εντός ύδατος, ιατρικό λάθος, τυχαία λήψη κτλ.), περιστατικά αυτοκτονίας ή εγκληματικής ενέργειας, καθώς και περιστατικά αιφνίδιων θανάτων που σχετίζονται με άτομα που λάμβαναν τα φάρμακα αυτά. Για τη διερεύνηση τέτοιων περιστατικών απαιτούνται αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα που να συνδυάζουν υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια, ειδικότητα και εκλεκτικότητα, να είναι σχετικά χαμηλού κόστους και να απαιτούν σύντομο χρόνο ανάλυσης.

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε δείγματα πλάσματος και ολικού αίματος. Κατά την ανάπτυξη της μεθολογίας, προέκυψε η ανάγκη διαχωρισμού των υπό μελέτη φαρμάκων σε δύο ομάδες ανάλογα με τη χημική συμπεριφορά τους. Έτσι στην ουσία αναπτύχθηκαν, βελτιστοποιήθηκαν και επικυρώθηκαν δύο παρεμφερείς μέθοδοι, μία για τον προσδιορισμό των εννέα αντιεπιληπτικών φαρμάκων με την αλκαλική χημική συμπεριφορά (αιθοσουξιμίδη, καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινυτοΐνη) και των δύο μεταβολιτών (10,11-εποξειδίο-καρβαμαζεπίνη, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη), καθώς και μία για τα πέντε συνολικά φάρμακα με την όξινη (βαλπροϊκό οξύ και τιαγκαμπίνη) ή επαμφοτερίζουσα (βιγκαμπατρίνη, γκαμπαπεντίνη και πρεγκαμπαλίνη) συμπεριφορά. Οι αναπτυχθείσες μέθοδοι είναι πρωτότυπες, αφού σπάνια επιτυγχάνεται ο ταυτόχρονος προσδιορισμός ικανού αριθμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων, και βασίζονται στην ευρύτατα χρησιμοποιούμενη παγκοσμίως αναλυτική τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματογραφία μαζών-ιονισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα εφαρμογής τους από το μεγαλύτερο μέρος των Τοξικολογικών Εργαστηρίων τόσο στο πλαίσιο της Κλινικής όσο και της Δικαστικής Τοξικολογίας.

Η προκατεργασία των βιολογικών δειγμάτων περιλάμβανε καταβύθιση πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο, εκχύλιση στερεής φάσης με στήλες τύπου HF Bond Elut

C18 και παραγωγοποίηση των υπό μελέτη αναλυτών με MTBSTFA με 1% TBDMSCl, με στόχο:

- την αποδέσμευση των αναλυτών από τις πρωτεΐνες του πλάσματος ή του ολικού αίματος,
- τον καθαρισμό των βιολογικών δειγμάτων, την απομόνωση και το διαχωρισμό των αναλυτών από τα ενδογενή συστατικά των βιολογικών υλικών, και
- τον προσδιορισμό της ολικής συγκέντρωσης των αναλυτών σε δείγματα πλάσματος και ολικού αίματος, που λαμβάνονται από ασθενείς υπό αντιεπιληπτική αγωγή.

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας των μεθόδων προσδιορισμού των αντιεπιληπτικών φαρμάκων που αναπτύχθηκαν στην εργασία αυτή σε σχέση με τις αντίστοιχες μεθόδους που έχουν δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία και βασίζονται σε αέριο ή υγρή χρωματογραφία, παρουσιάζουν συγκρίσιμα και σε ορισμένες περιπτώσεις καλύτερα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, οι αναπτυχθείσες μέθοδοι είναι εκλεκτικές, ειδικές, ταχείες, χαμηλού κόστους, υψηλής ευαισθησίας, ακρίβειας και επαναληψιμότητας. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό κυρίως με συζευγμένη φασματογραφία μαζών [Ifa και συν., 2001; Jain και συν., 2006; Ji και συν., 2006; Ramakrishna και συν., 2006; Guo και συν., 2007; Park και συν., 2007; Matar, 2008, Subramanian και συν., 2008; Zhang και συν., 2008; Nirogi και συν., 2009; Oertel και συν., 2009; Warrananat και Akarawut, 2009; Bhatt και συν., 2010; Blonk και συν., 2010; Kolokouri και συν., 2010; Mendu και Soldin, 2010; Antonilli και συν., 2011; Heltsley και συν., 2011; Hotha και συν., 2012; Juenke και συν., 2011; Kim και συν., 2011; Liu και συν., 2011; Middleton και συν., 2011; Sorensen και συν., 2011; Tai και συν., 2011; Collins και Jain, 2012; Dahl και συν., 2012; Kim και συν., 2012; Lionetto και συν., 2012; Shibata και συν., 2012; Kostic και συν., 2013; Luo και συν., 2013; Hakkinen και συν., 2014] μπορεί να είναι εφάμιλλες ή ακόμη και να πλεονεκτούν των αναπτυχθέντων μεθόδων σε ορισμένα σημεία, αλλά απαιτούν αναλυτικό εξοπλισμό υψηλού κόστους απόκτησης και συντήρησης που δεν είναι διαθέσιμος σε πολλά τοξικολογικά εργαστήρια. Από την άλλη μεριά, η αναλυτική τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματογραφία μαζών-ιονισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων αποτελεί μία από τις πλέον διαδεδομένες και διαθέσιμες τεχνικές για τα τοξικολογικά εργαστήρια που ασχολούνται με τοξικολογικές αναλύσεις της καθημερινής πράξης.

Σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά τους οι δύο μέθοδοι που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο αυτής της Διδακτορικής Διατριβής προσφέρουν:

- ταυτόχρονο προσδιορισμό εννέα αλκαλικών αντιεπιληπτικών φαρμάκων και δύο μεταβολιτών, καθώς και πέντε όξινων ή επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων, σε αντίθεση με τις μέχρι σήμερα δημοσιευμένες περιπτώσεις όπου με την αναλυτική τεχνική της αέριας χρωματογραφίας-φασματογραφίας μαζών προσδιορίζεται ένα μόνο [Schramm και συν., 1993; Vermeij και Edelbroek, 1994; Wolf και συν., 1996; Watelle και συν., 1997; Van Lente και Gatautis, 1998; Kushnir και συν., 1999; Isoherranen και συν., 2000; Sghendo και συν., 2002; Levine και συν., 2004; Gambelunghe και συν., 2005; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Lehner και συν., 2007; Mudiam και συν., 2012] ή μικρότερος αριθμός αντιεπιληπτικών φαρμάκων ταυτόχρονα [Hallbach και συν., 1997; Borrey και συν., 2005; Pujadas και συν., 2007; Levine και συν., 2010; Rani και Malik, 2012; Yu και συν., 2012; Ikeda και συν., 2014],
- κοινή μέθοδο παραγωγοποίησης όλων των υπό προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε πλάσμα και ολικό αίμα,
- πλήρη επικύρωση των αναπτυχθέντων μεθόδων για τον προσδιορισμό της κάθε ομάδας αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ολικό αίμα, η οποία δεν συμπεριλαμβάνεται σε αντίστοιχες δημοσιευμένες εργασίες [Horning και συν., 1977; Schramm και συν., 1993; Watelle και συν., 1997; Hallbach και συν., 1997; Isoherranen και συν., 2000; Levine και συν., 2004; Borrey και συν., 2005; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Pujadas και συν., 2007; Yu και συν., 2012],
- εκλεκτικότητα ως προς τα ενδογενή συστατικά του κάθε βιολογικού υλικού
- πλήρη στοιχεία για τη μελέτη ειδικότητας ως προς εξωγενείς ουσίες, τα οποία συχνά παραλείπονται στις ήδη δημοσιευμένες εργασίες [Horning και συν., 1977; Schramm και συν., 1993; Watelle και συν., 1997; Hallbach και συν., 1997; Isoherranen και συν., 2000; Levine και συν., 2004; Borrey και συν., 2005; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Pujadas και συν., 2007; Yu και συν., 2012],
- υψηλά ποσοστά % απόλυτης ανάκτησης (>80%)

- χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, οπότε και βελτιωμένη ευαισθησία σε σχέση με αρκετές από τις ήδη δημοσιευμένες μεθόδους [Horning και συν., 1977; Schramm και συν., 1993; Hallbach και συν., 1997; Van Lente και Gatautis, 1998; Kushnir και συν., 1999; Isoherranen και συν., 2000; Speed και συν., 2000; Sghendo και συν., 2002; Levine και συν., 2004; Borrey και συν., 2005; Gambelunghe και συν., 2005; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Pujadas και συν., 2007; Levine και συν., 2010; Yu και συν., 2012; Ikeda και συν., 2014]
- μεγάλο δυναμικό εύρος συγκεντρώσεων των αναλυτών
- σημαντική ανθεκτικότητα των μεθόδων σε μεταβολές ορισμένων χρωματογραφικών συνθηκών και παραμέτρων της προκατεργασίας των βιολογικών δειγμάτων, η οποία δεν ελέγχεται πάντα σε αντίστοιχες δημοσιευμένες εργασίες [Horning και συν., 1977; Schramm και συν., 1993; Watelle και συν., 1997; Hallbach και συν., 1997; Isoherranen και συν., 2000; Levine και συν., 2004; Borrey και συν., 2005; Greiner-Sosanko και συν., 2007; Pujadas και συν., 2007; Yu και συν., 2012].

Λαμβάνοντας υπόψη όσα προαναφέρθηκαν, οι αναπτυχθείσες μέθοδοι προσδιορισμού των αλκαλικών και των όξινων ή επαμφοτερίζοντων αντιεπιληπτικών φαρμάκων, σε πλάσμα και ολικό αίμα, στο πλαίσιο της Διδακτορικής αυτής Διατριβής μπορούν να βοηθήσουν:

- στην εξατομίκευση του δοσολογικού σχήματος των ασθενών υπό αντιεπιληπτική αγωγή,
- στην τροποποίηση της αντιεπιληπτικής αγωγής (αλλαγή αντιεπιληπτικής αγωγής ή προσθήκη συμπληρωματικού αντιεπιληπτικού φαρμάκου),
- στη διερεύνηση εάν τυχόν τοξικές εκδηλώσεις οφείλονται σε τοξικές συγκεντρώσεις αντιεπιληπτικών φαρμάκων,
- στη διερεύνηση κλινικών περιστατικών δηλητηριάσεων (ακούσιων ή εκούσιων) που οφείλονται σε κάποιο αντιεπιληπτικό φάρμακο,
- στη διερεύνηση θανατηφόρων περιστατικών ατόμων υπό αντιεπιληπτική αγωγή και της σχέσης των λαμβανομένων φαρμάκων με την αιτία θανάτου.

Οι αναπτυχθείσες μέθοδοι μπορούν να συμβάλλουν στην επίλυση προβλημάτων της τρέχουσας τοξικολογικής ανάλυσης τόσο στο πλαίσιο της Κλινικής όσο και της Δικαστικής Τοξικολογίας. Τα προβλήματα αυτά μπορεί να αφορούν: α)

την παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων αντιεπιληπτικών φαρμάκων με σκοπό την εξατομίκευση του δοσολογικού σχήματος της αγωγής ασθενών, β) τη διερεύνηση των ανεπιθυμητών ενεργειών και της τοξικότητας των αντιεπιληπτικών φαρμάκων, γ) τη διερεύνηση της φαρμακοκινητικής τους, δ) τη διάγνωση και αντιμετώπιση δηλητηριάσεων στις οποίες εμπλέκονται αντιεπιληπτικά φάρμακα και ε) τη διερεύνηση δικαστικών υποθέσεων που απαιτούν ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό αντιεπιληπτικών φαρμάκων, σε προθανάτια ή/και μεταθανάτια βιολογικά υγρά, ο οποίος σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί να αφορά περισσότερα του ενός αντιεπιληπτικά φάρμακα.

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΕΠΙΛΗΠΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ
ΥΛΙΚΑ – ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΚΑΣΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιληψία είναι μία νόσος γνωστή από την αρχαιότητα και σήμερα αποτελεί μία από τις σχετικά πιο συχνές νόσους στον κόσμο, αφού υπολογίζεται ότι περίπου το 1% του πληθυσμού πάσχει από επιληψία, παρόλο που συχνά η πάθηση δεν εκδηλώνεται κλινικά. Το ποσοστό αυτό, το οποίο αυξάνεται, αντιστοιχεί κατά το μεγαλύτερο μέρος του σε παιδιά ηλικίας περίπου 6-15 χρονών. Η επιληψία οφείλεται σε χημικές ή δομικές διαταραχές που παρατηρούνται στον φλοιό του εγκεφάλου. Οι επιληπτικές κρίσεις εκδηλώνονται ως διαφορετικού τύπου διαταραχές που έχουν ως κοινό σημείο τους επαναλαμβανόμενους παροξυσμούς λόγω αιφνίδιας, υπέρμετρης και ανώμαλης εκφόρτισης εγκεφαλικών νευρώνων.

Οι επιληπτικές κρίσεις μπορούν να ελεγχθούν απόλυτα στο 50% περίπου των επιληπτικών ασθενών με την κατάλληλη αντιεπιληπτική αγωγή. Τα αντιεπιληπτικά φάρμακα είναι μία ομάδα ουσιών που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην κλινική πράξη για την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης και της έντασης των επιληπτικών κρίσεων. Σήμερα, στον ελληνικό χώρο κυκλοφορούν κυρίως τα εξής αντιεπιληπτικά φάρμακα: αιθοσουξιμίδη, βαλπροϊκό οξύ, βιγκαμπατρίνη, γκαμπαπεντίνη, καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, πρεγκαμπαλίνη, τιαγκαμπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινοτοΐνη. Ορισμένα από αυτά τα αντιεπιληπτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται στη θεραπευτική για την αντιμετώπιση και άλλων παθήσεων, κυρίως του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε δείγματα πλάσματος και ολικού αίματος. Κατά την ανάπτυξη της μεθολογίας, προέκυψε η ανάγκη διαχωρισμού των υπό μελέτη φαρμάκων σε δύο ομάδες ανάλογα με τη χημική συμπεριφορά τους. Έτσι στην ουσία αναπτύχθηκαν, βελτιστοποιήθηκαν και επικυρώθηκαν δύο παρεμφερείς μέθοδοι, μία για τον προσδιορισμό των εννέα αντιεπιληπτικών φαρμάκων με την αλκαλική χημική συμπεριφορά (αιθοσουξιμίδη,

καρβαμαζεπίνη, λακοσαμίδη, λαμοτριγίνη, λεβετιρακετάμη, οξυκαρβαζεπίνη, τοπιραμάτη, φαινοβαρβιτάλη και φαινυτοΐνη) και των δύο μεταβολιτών (10,11-εποξειδιο-καρβαμαζεπίνη, 10-υδροξυ-καρβαζεπίνη), καθώς και μία για τα πέντε συνολικά φάρμακα με την όξινη (βαλπροϊκό οξύ και τιαγκαμπίνη) ή επαμφοτερίζουσα (βιγκαπατρίνη, γκαμπαπεντίνη και πρεγκαμπαλίνη) συμπεριφορά. Η κατεργασία των βιολογικών δειγμάτων περιελάμβανε καταβύθιση πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο, εκχύλιση στερεής φάσης και παραγωγοποίηση των αναλυτών με MTBSTFA με 1% TBDMSCl στους 70°C για 30 λεπτά. Στις μεθόδους χρησιμοποιήθηκε η λεβετιρακετάμη-d6 ως εσωτερικό πρότυπο για τον προσδιορισμό της αιθοσουξιμίδης, της καρβαμαζεπίνης, της λακοσαμίδης, της λαμοτριγίνης, της λεβετιρακετάμης, της οξυκαρβαζεπίνης, της τοπιραμάτης, της φαινοβαρβιτάλης και της φαινυτοΐνης, ενώ η γκαμπαπεντίνη-d10 για τον προσδιορισμό του βαλπροϊκού οξέος, της βιγκαπατρίνης, της γκαμπαπεντίνης, της πρεγκαμπαλίνης και της τιαγκαμπίνης. Οι παράμετροι επικύρωσης των μεθόδων ήταν οι εξής: εκλεκτικότητα, ειδικότητα, γραμμικότητα, κατώτατο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, επαναληψιμότητα, ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα, ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών, απόλυτη ανάκτηση και ανθεκτικότητα των μεθόδων, καθώς και σταθερότητα των αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα αίματος.

Οι αναπτυχθείσες μέθοδοι εφαρμόστηκαν τόσο στην παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων των αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε ασθενείς υπό αντιεπιληπτική αγωγή, όσο και στην τοξικολογική διερεύνηση περιστατικών κλινικού και δικαστικού τοξικολογικού ενδιαφέροντος. Παράλληλα, οι αναπτυχθείσες μέθοδοι μπορούν να βρουν εφαρμογή σε φαρμακοκινητικές μελέτες που περιλαμβάνουν τα δεκατέσσερα αυτά αντιεπιληπτικά φάρμακα.

Panagiota D. Nikolaou

Development, optimization and validation of analytical methods for the determination of antiepileptic drugs in biological samples - Application in Clinical and Forensic Toxicology

SUMMARY

Epilepsy is a disease known since ancient times and today it is one of the relatively most frequent diseases in the world, since it is estimated that about 1% of the population suffers from epilepsy, although often the disease is not clinically manifested. This percentage, which increases continuously, mainly concerns children aged around 6-15 years. The cause of epilepsy is chemical or structural perturbations observed in the cortex. Seizures appear as the result of different disorders that have as common symptom recurrent seizures due to sudden, excessive and abnormal discharges of cerebral neurons.

Seizures can be controlled completely in approximately 50% of epileptic patients with appropriate antiepileptic treatment. Antiepileptic drugs are a group of substances widely used in clinical practice to reduce the frequency and severity of epileptic seizures. Today, the antiepileptic drugs that are mainly used in Greece are the following: ethosuximide, valproic acid, vigabatrin, gabapentin, carbamazepine, lacosamide, lamotrigine, levetiracetam, oxcarbazepine, pregabalin, tiagabine, topiramate, phenytoin and phenobarbital. Some of these antiepileptic drugs are also used for the treatment of other diseases especially of the central nervous system.

The aim of this doctoral thesis was the development, optimization and validation of a gas chromatographic method in combination with mass spectrometry detection for the simultaneous determination of antiepileptic drugs, in plasma and whole blood samples. During the development of the method, the necessity appeared for separation of the studied antiepileptics in two groups according to their chemical behavior. So, two similar methods were actually developed, optimized and validated, one for the determination of the nine antiepileptic drugs with alkaline behavior (ethosuximide, carbamazepine, lacosamide, lamotrigine, levetiracetam, oxcarbazepine, phenobarbital, phenytoin and topiramate) and two metabolites (10,11-epoxide-carbamazepine and 10-hydroxy-carbazepine), and one for the five

antiepileptics with acidic (valproic acid and tiagabine) and zwitterionic (gabapentin, pregabalin and vigabatrin) behavior. The pretreatment of biological samples included protein precipitation with acetonitrile, solid phase extraction and derivatization of analytes using MTBSTFA with 1% TBDMSCl at 70°C for 30 minutes. Levetiracetam-d6 was used as internal standard for the determination of ethosuximide, carbamazepine, lacosamide, lamotrigine, levetiracetam, oxcarbazepine, topiramate, phenobarbital and phenytoin, whereas gabapentin-d10 was used for the determination of valproic acid, vigabatrin, gabapentin, pregabalin and tiagabine. The validation of the developed methods included the evaluation of the following parameters: selectivity, specificity and linearity, limits of detection and quantification, intra- and inter-day accuracy and precision, absolute recovery of the methods and the stability of analytes in spiked blood samples.

The developed methods were applied for therapeutic antiepileptic drug monitoring of patients under antiepileptic treatment, and for the toxicological investigation of clinical and forensic cases where antiepileptic drugs were involved. The developed methods can be also used for pharmacokinetic studies of these fourteen antiepileptic drugs.

Βιβλιογραφία

1. Abajo FJ. Phenytoin interaction with rifampicin. 1988; 297: 1048.
2. Abramson FP. Autoinduction of phenobarbital elimination in the dog. 1988; 77(9): 768-770.
3. Alarcon G, Valentin A. Introduction to epilepsy. 1st edition, Cambridge University Press, 2012, Cambridge, UK.
4. Al-Majed AA. A direct HPLC method for the resolution and quantitation of the R-(-)- and S-(+)-enantiomers of vigabatrin (γ -vinyl-GABA) in pharmaceutical dosage forms using teicoplanin aglycone chiral stationary phase. J Pharm Biomed Anal 2009; 50(1): 96-99.
5. Ambrosio AF, Soares-Da-Silva P, Carvalho CM, Carvalho AP. Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. Neurochem Res 2002; 27(1-2): 121-130.
6. Amini M, Rouini MR, Asad-Paskeh A, Shafiee A. A new pre-column derivatization method for determination of gabapentin in human serum by HPLC using UV detection. J Chromatogr Sci 2010; 48: 358-361.
7. Antonilli L, Brusadin V, Filipponi F, Guglielmi R, Nencini P. Development and validation of an analytical method based on high performance thin layer chromatography for the simultaneous determination of lamotrigine, zonisamide and levetiracetam in human plasma. J Pharm Biomed Anal 2011; 56: 763-770.
8. Arana GW, Hyman SE. Ψυχοφαρμακολογία (επιμέλεια: Νέστορος Ι.Ν.). Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 1994, Αθήνα.
9. Bachmann KA, Schwatz JI, Forney RB, Jauregui L, Sullivan TJ. Inability of ibuprofen to alter single dose phenytoin disposition. 1986; 21: 165-169.
10. Backonja M, Glanzman RL. Gabapentin dosing for neuropathic pain: evidence from randomized, placebo-controlled clinical trials. Clin Ther 2003; 25(1): 81-104.
11. Bahrami G, Kiani A. Sensitive high-performance liquid chromatographic quantitation of gabapentin in human serum using liquid-liquid extraction and pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. J Chromatogr B 2006; 835: 123-126.
12. Bahrami G, Mirzaeei SH, Kiani A. Sensitive analytical method for topiramate in human serum by HPLC with pre-column fluorescent derivatization and its application in human pharmacokinetic studies. J Chromatogr B 2004; 813(1-2): 175-180.

13. Bahrami G, Mohammadi B. Sensitive microanalysis of gabapentin by high-performance liquid chromatography in human serum using pre-column derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: Application to a bioequivalence study. *J Chromatogr B* 2006; 837: 24-28.
14. Baranano KW, Hartman AL. The fetogenic diet: uses in epilepsy and other neurologic illnesses. *Curr Treat Options Neurol* 2008; 10(6): 410-419.
15. Barbosa NR, Midio AF. Validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in human plasma. *J Chromatogr B* 2000; 741(2): 289-293.
16. Bell WL, Walczak TS, Shin C, Radtke RA. Painful generalized clonic and tonic-clonic seizures with retained consciousness. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63: 792-795.
17. Ben-Menachem E, Biton V, Jatuzis D, Abou-Khalil B, Doty P and Rudd GD. Efficacy and safety of oral lacosamide as adjunctive therapy in adults with partial-onset seizures. *Epilepsia* 2007; 48: 1308-1317.
18. Bergen DC. Pharmacokinetics of phenytoin: reminders and discoveries. *Epil Curr* 2009; 9(4): 102-104.
19. Berlin RK, Butler PM, Perloff MD. Gabapentin therapy in psychiatric disorders: a systematic review. *Prim Care Companion CNS Disord* 2015; doi: 10.4088/PCC.15r01821.
20. Berry D, Millington C. Analysis of pregabalin at therapeutic concentrations in human plasma/serum by reversed-phase HPLC. *Ther Drug Monit* 2005; 27(4): 451-456.
21. Bertilsson L. Clinical pharmacokinetics of carbamazepine. *Clin Pharmacokin* 1978; 3(2): 128-143.
22. Beyreuther BK, Freitag J, Heers C, Krebsfänger U and Stöhr T. Lacosamide: a review of preclinical properties. *CNS Drug Review* 2007; 13: 21-32.
23. Bhatt M, Shah S, Shivprakash. Development of a high-throughput method for the determination of ethosuximide in human plasma by liquid chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2010; 878: 1605-1610.
24. Blanco C, Raza MS, Schneier FR, Stein D, Lerer B, Stahl S. Evidence-based pharmacotherapy of social anxiety disorder. *Evidence-based psychopharmacology*. Cambridge University Press 2005; 137-164.

25. Blonk MI, Van der Nagel BC, Smit LS, Mathot RAA. Quantification of levetiracetam in plasma of neonates by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2010; 878: 675-681.
26. Blumenfeld H. Consciousness and epilepsy: why are patients with absence seizures absent? *Prog Brain Res* 2005; 150: 271-286.
27. Borrey DCR, Godderis KO, Engelrelst VIL, Bernard DR, Langlois MR. Quantitative determination of vigabatrin and gabapentin in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2005; 354: 147-151.
28. Bourgeois FD. Drug interaction profile of topiramate. *Epilepsia* 1996; 37(2): S14-S17.
29. Brodie MJ, Kwan P. Current position of phenobarbital in epilepsy and its future. *Epilepsia* 2012; 53(8): 40-46.
30. Brodie MJ, Sills GJ. Combining antiepileptic drugs-rational polytherapy? *Seizure* 2011; 20: 369-375.
31. Brodie MJ. Drug interactions in epilepsy. *Epilepsia* 1992; 33(1): S13-S22.
32. Brodie MJ. Practical use of newer antiepileptic drugs as adjunctive therapy in focal epilepsy. *CNS Drugs* 2015; 29: 893-904.
33. Brunetto RM, Contresas Y, Delgado Y, Galignani M, Estela JM, Martin VC. Development and validation of a rapid column-switching high-performance liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in human serum. *J Chromatogr B* 2009; 47(6): 478-484.
34. Buck ML, Goodkim HP. Use of lacosamide in children with refractory epilepsy. *J Pediatr Pharmacol Ther* 2012; 17(3): 211-219.
35. Buggy Y, Layton D, Fogg C, Shakir SAW. Safety profile of oxcarbazepine: results from a prescription-event monitoring study. *Epilepsia* 2010; 51(5): 818-829.
36. Calisto V, Bahlmann A, Schneider RJ, Esteves VI. Application of an ELISA to the quantification of carbamazepine in ground, surface and wastewaters and validation with LC-MS/MS. *Chemosphere* 2011; 84: 1708-1715.
37. Cary PL, Johnson CA, Foltz RL, Pape BE. Driving under the influence of phenobarbital. *J Forensic Sci* 1983; 28(2): 502-504.
38. Castel-Branco MM, Almeida AM, Falcao AC, Macedo TA, Caramona MM, Lopez FG. Lamotrigine analysis in blood and brain by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 2001; 755: 119-127.

39. Cetin SM, Atmaca S. Determination of vigabatrin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with UV-Vis detection. *J Chromatogr A* 2004; 1031: 237-242.
40. Chen JWY, Ruff RL, Eavey R, Wasterlain CG. Posttraumatic epilepsy and treatment. *J Reh Res Develop* 2009; 46(6): 685-696.
41. Chollet DF, Goumaz L, Anderegg G. Fast isocratic high-performance liquid chromatographic assay method for the simultaneous determination of gabapentin and vigabatrin in human serum. *J Chromatogr B* 2000; 746(2): 311-314.
42. Chung S, Sperling MR, Biton V, Krauss G, Hebert D, Rudd GC, Doty P, SP754 Study Group. Lacosamide as adjunctive therapy for partial-onset seizures: a randomized controlled trial. *Epilepsia* 2010; 51(6): 958-967.
43. Chung TC, Tai CT, Wu HL. Simple and sensitive liquid chromatographic method with fluorimetric detection for the analysis of gabapentin in human plasma. *J Chromatogr A* 2006; 1119(1-2): 294-298.
44. Ciavarella AB, Gupta A, Sayeed VA, Khan MA, Faustino PJ. Development and application of a validated HPLC method for the determination of gabapentin and its major degradation impurity in drug products. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43(5): 1647-1653.
45. Citrome L. Adjunctive lithium and anticonvulsants for the treatment of schizophrenia: what is the evidence? *Exp Rev Neurother* 2009; 9: 55-71.
46. Clark MA, Finkel R, Rey JA, Whalen K, Harvey RA. Lippincott's Illustrated Reviews. Pharmacology, 5th edition, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012, Baltimore, USA.
47. Colbert DL. Measurement of phenytoin in serum using in-house reagents employing the Syva enzyme-multiplied immunoassay technique principle. *Ther Drug Monit* 1992; 14(5): 386-390.
48. Collins JA, Janis G. Analysis of selected anticonvulsants by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods Molec Biol* 2012; 902: 201-209.
49. Contin M, Balboni M, Callegati E, Candela C, Albani F, Riva R, Baruzzi A. Simultaneous liquid chromatographic determination of lamotrigine, oxcarbazepine monohydroxy derivative and felbamate in plasma of patients with epilepsy. *J Chromatogr* 2005; 828: 113-117.

50. Conway JM, Henry TR. Antiepilepsy drugs: mechanisms of action and pharmacokinetics. *Epilepsy* 2012; 1(5): 1-11.
51. Cretin B, Hirsch E. Adjunctive antiepileptic drugs in adult epilepsy: how the first add-on could be the last. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11(7): 1053-1067.
52. Croci D, Salmaggi A, Grazia U, Bernardi G. New high-performance liquid chromatographic method for plasma/serum analysis of lamotrigine. *Ther Drug Monit* 2001; 23(6): 665-668.
53. Cross SA and Curran MP. Lacosamide: in partial-onset seizures. *Drugs* 2009; 69: 449-459.
54. Czapinski P, Blaszczyk B, Czuczwar SJ. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr Top Med Chem* 2005; 5: 3-14.
55. Dahl SR, Olsen KM, Strand DH. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC-MSMS. *J Chromatogr B* 2012; 885-886: 37-42.
56. Dalili H, Nayeri F, Shariat M, Asgarzadeh L. Lamotrigine effects on breastfed infants. *Acta Med Iran* 2015; 53(7): 393-394.
57. Dasgupta A, Datta P. Analytic performance evaluation of a new turbidimetric immunoassay for carbamazepine on the ADVIA 1650 analyzer: effect of carbamazepine 10,11-epoxide. *Ther Drug Monit* 2005; 27:31-34.
58. Dasgupta A, Davis B, Chow L. Validation of a free phenytoin assay on Cobas c501 analyzer using calibrators from Cobas Integra free phenytoin assay by comparing its performance with fluorescence polarization immunoassay for free phenytoin on the TDx analyzer. *J Clin Lab Anal* 2013; 27: 1-4.
59. Dasgupta A, Reyes MA, Davis BG, Marlow AM, Johnson M. Analytical performance evaluation of ADVIA chemistry carbamazepine_2 assay: minimal cross-reactivity with carbamazepine 10,11-epoxide and none with hydroxyzine or cetirizine. *J Clin Lab Anal* 2010; 24: 278-282.
60. Dasgupta A, Wahed A. *Clinical Chemistry, immunology and laboratory quality control. A comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice.* Elsevier, 2014, San Diego, USA.
61. Datta P, Scurlock D, Dasgupta A. Analytic performance evaluation of a new turbidimetric immunoassay for phenytoin on the ADVIA 1650 analyzer: effect of phenytoin metabolite and analogue. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 305-308.

62. Davanzo R, Dal Bo S, Bua J, Copertino M, Zaneli E, Matarazzo L. Antiepileptic drugs and breastfeeding. *Ital J Pediatr* 2013; 39: 1-11.
63. Davies JA. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Seizure* 1995; 4: 267-272.
64. Dhillon S, Kostrzewski AJ. Clinical pharmacokinetics. 1st edition, Pharmaceutical Press, 2006, London, UK.
65. Diaz RAS, Sancho J, Serratosa J. Antiepileptic drug interactions. *Ther Neurologist* 2008; 14: S55-S65.
66. Dijck AV, Daele WV, De Deyn PP. Uremic encephalopathy, Miscellanea on encephalopathies-a second look. Tanasescu R (Ed.). In Tech Europe, 2012, Rijeka, Croatia.
67. Dolk H, McElhatton P. Assessing epidemiological evidence for the teratogenic effects of anticonvulsant medications. *J Med Genet* 2002; 39: 248-250.
68. Duncan JS. Occipital and parietal lobe epilepsies. Chapter 15, 2015, London, UK.
69. Eckhardt K, Ammon S, Hofmann U, Riebe A, Gugeler N, Mikus G. Gabapentin enhances the analgesic effect of morphine in healthy volunteers. *Anest Analg* 2000; 91: 185-191.
70. El-Enany NM, El-Sherbiny DT, Abdelal AA, Belal FF. Validated spectrofluorimetric method for the determination of lamotrigine in tablets and human plasma through derivatization with o-phthalaldehyde. *J Fluoresc* 2010; 20(2): 463-472.
71. Emami J, Ghassami N, Ahmadi F. Development and validation of a new HPLC method for the determination of lamotrigine and related compounds in tablet formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 40(4): 999-1005.
72. Erturk S, Aktas ES, Atmaca S. Determination of vigabatrin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2001; 760: 207-212.
73. Evrensel A, Unsulver BO. Psychotic and depressive symptoms after gabapentin treatment. *Int J Psychiatry Med* 2015; 49(4): 245-248.
74. Faingold CL, Browning RA. Mechanisms of anticonvulsant drug action. Drugs primarily used for absence epilepsy. *Eur J Pediatr* 1987; 146: 8-14.
75. Farjzadeh MA, Farhadi K, Matin AA, Hashemi P, Jouyban A. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography method for the determination of valproic acid in human serum, and formulations using hollow-fiber coated wire. *Anal Sci* 2009; 25: 875-879.

76. file:///C:/Users/user/Downloads/Applied_Clinical_Pharmacokinetics_-_2nd_ed-
_Phenytoin%20(1).pdf
77. Forssblad E, Eriksson AS, Beck O. Liquid chromatographic determination of plasma lamotrigine in pediatric samples. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 14: 755-758.
78. Franceschi L, Furlanut M. A simple method to monitor plasma concentrations of oxcarbazepine, carbamazepine, their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients. *Pharmacol Res* 2005; 51(4): 297-302.
79. Franco V, Mazzucchelli I, Fattore C, Marchiselli R, Gatti G, Perucca E. Stereoselective determination of vigabatrin enantiomers in human plasma by high performance liquid chromatography using UV detection. *J Chromatogr B* 2007; 854: 63-67.
80. Frank EL, Schwarz EL, Juenke JE, Annesley TM, Roberts WL. Performance characteristics of four immunoassays for antiepileptic drugs on the IMMULITE 2000 automated analyzer. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 124-131.
81. Fraser AD, MacNeil W, Isner AF, Camfield PR. Lamotrigine analysis in serum by high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 174-178.
82. Gambelunghe C, Mariucci G, Tantucci M, Ambrosini MV. Gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of gabapentin in serum. *Biomed Chromatogr* 2005; 19: 63-67.
83. Gavatha M, Ioannou I, Papavasiliou AS. Efficacy and tolerability of oral lacosamide as adjunctive therapy in pediatric patients with pharmacoresistant focal epilepsy. *Epilepsy Behav* 2011; 20(4): 691-693.
84. Glue P, Banfield CR, Perhach JL, Mather GG, Racha JK, Levy RH. Pharmacokinetic interactions with felbamate. In vitro-in vivo correlation. *Clin Pharmacokinet* 1997; 33(3): 214-224.
85. Goa KL, Sorkin EM. Gabapentin, a review of its pharmacological properties and clinical potential in epilepsy. *Drugs* 1993; 46: 409-427.
86. Goswami D, Kumar A, Khuroo AH, Monif T, Rab S. Bioanalytical LC-MS/MS method validation for plasma determination of topiramate in healthy Indian volunteers. *Biomed Chromatogr* 2009; 23(11): 1227-1241.
87. Greenaway C, Ratnaraj N, Sander JW, Patsalos N. A high-performance liquid chromatography assay to monitor the new antiepileptic drug lacosamide in patients with epilepsy. *Ther Drug Monit* 2010; 32(4): 448-452.

88. Greenberg MI. Valproic acid: pharmacology and pharmacokinetics. *Emerg Med News* 2003; 25(5): 38-42.
89. Greenway C, Ratnaraj N, Sander JW, Patsalos PN. Saliva and serum lacosamide concentrations in patients with epilepsy. *Epilepsia* 2011; 52(2): 258-63.
90. 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). *J Chromatogr B* 2007; 854(1-2): 338-344.
91. Greiner-Sosanko E, Giannoutsos S, Lower DR, Virji MA, Krasowski MD. Drug monitoring: simultaneous analysis of lamotrigine, oxcarbazepine, 10-hydroxycarbamazepine, and zonisamide by HPLC-UV and a rapid GC method using a nitrogen-phosphorus detector for levetiracetam. *J Chromatogr Sci* 2007; 45(9): 616-622.
92. Guerreiro MM, Manreza ML, Scotoni AE, Silva EA, Guerreiro CA, Souza EA, Ferreira VB, Reed UC, Diamant A, Trefiglio R, Chiu HC, Bacaltchuk J. A pilot study of topiramate in children with Lennox-Gastaut syndrome. *Arg Neuropsiquiatr* 1999; 57(2A): 167-175.
93. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Food and Drug Administration (FDA), 2001.
94. Guilhoto LM, Loddenkemper T, Gooty VD, Rotenberg A, Takeoka M, Duffy FH, Coulter D, Urien D, Bourgeois BF, Kothare SV. Experience with lacosamide in a series of children with drug-resistant focal epilepsy. *Pediatr Neurol* 2011; 44(6): 414-419.
95. Guo T, Oswald LM, Mendu DR, Sordin SJ. Determination of levetiracetam in human plasma/serum/saliva by liquid chromatography-electrospray tandem spectrometry. *Clin Chi Acta* 2007; 375: 115-118.
96. Gupta A, Ciavarella AB, Sayeed VA, Khan MA, Faustino PJ. Development and application of a validated HPLC method for the analysis of dissolution samples of gabapentin drug products. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 46(1): 181-186.
97. Hakkinen M, Vuori E, Kalso E, Gergov M, Ojanpera I. Profiles of pregabalin and gabapentin abuse by postmortem toxicology. *Forensic Sci Int* 2014; 241: 1-6.
98. Halasz P, Kalviainen R, Mazurkiewicz-Beldzinska M, Rosenow F, Doty P, Hebert D and Sullivan T on behalf of the SP755 Study Group. Adjunctive lacosamide for

- partial-onset seizures: efficacy and safety results from a randomized controlled trial. *Epilepsia* 2009; 50: 443-453.
99. Hallbach J, Vogel H, Guder WG. Determination of lamotrigine, carbamazepine and carbamazepine epoxide in human serum by gas chromatography mass spectrometry, *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35(10): 755-759.
 100. Harden CL. New antiepileptic drugs. *Neurology* 1994; 44: 787.
 101. Hawker MJ, Astbury NJ. The ocular side effects of vigabatrin (Sabril): information and guidance for screening. *Eye* 2008; 22: 1097-1098.
 102. Heim M, Conte-Devolx B, Bonnefoy M, Bouyard P. Serum RIA vasopressin levels in 5 healthy subjects during water loading, before and during treatment by carbamazepine. *Pathol Biol* 1979; 27: 95-98.
 103. Heltsley R, dePriest A, Black DL, Rombert T, Caplan YH, Cone EJ. Urine drug testing of chronic pain patients. IV prevalence of gabapentin and pregabalin. *J Anal Toxicol* 2011; 35: 357-359.
 104. Hemmateenejad B, Rezaei Z, Khabnadideh S, Saffari M. A PLS-based extractive spectrophotometric method for simultaneous determination of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in plasma and comparison with HPLC. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2007; 68(3): 718-724.
 105. Hernandez-Diaz S, Smith CR, Shen A, Mittendorf R, Hauser WA, Yerby M, Holmes LB. Comparative safety of antiepileptic drugs during pregnancy. *Neurology* 2012; 78(21): 1692-1699.
 106. Herranz JL, Armijo JA, Arteaga R. Effectiveness and toxicity of phenobarbital, primidone, and sodium valproate in the prevention of febrile convulsions, controlled by plasma levels. *Epilepsia* 1984; 25(1): 89-95.
 107. Heyman E, Lahat E, Levin N, Berkovitch M, Gandelman-Marton R. Preliminary efficacy and safety of lacosamide in children with refractory epilepsy. *Eur J Paediatr Neurol* 2012; 16(1): 15-19.
 108. Hiemke C, Bauman P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, Fric M, Gerlach M, Greiner C, Grunder G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Sirot EJ, Kirchherr H, Laux G, Lutz UC, Messer T, Muller MJ, Pfuhmann B, Rambeck B, Riederer P, Schoppek B, Stingl J, Uhr M, Ulrich S, Waschgl R, Zernig G. AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011; 44: 195-235.

109. Hirtz DG. Generalized tonic-clonic and febrile seizures. *Pediatr Clin North Am* 1989; 36(2): 365-382.
110. Hixson JD. Stopping antiepileptic drugs: when and why? *Curr Treat Option Neurology* 2010; 12: 434-442.
111. Hofler J, Trinka E. Lacosamide as new treatment option in status epilepticus. *Epilepsia* 2013; 54(3): 393-404.
112. Hori Y, Fujisawa M, Shimada K, Hirose Y, Yoshioka T. Method for screening and quantitative determination of serum levels of salicylic acid, acetaminophen, theophylline, Phenobarbital, bromvalerylurea, pentobarbital, and amobarbital using liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(1): 7-13.
113. Horning MG, Brown L, Nowlin J, Lertratanangkoon K, Kellaway P, Zion TE. Use of saliva in therapeutic drug monitoring. *Clin Chem* 1977; 23: 157-164.
114. Hotha KK, Kumar SS, Bharathi DV, Venkateswarulu V. Rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of lamotrigine in human plasma: application to a human pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr* 2012; 26: 491-496.
115. http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/1999/199910053340/anx_3340_el.pdf
116. <http://emedicine.medscape.com/article/813654-overview>
117. <http://ltd.aruplab.com/Tests/Pub/0070390>
118. <http://pathlabs.rlbuht.nhs.uk/lamotrigine.pdf>
119. <http://www.childrensmn.org/manuals/lab/Chemistry/069676.pdf>
120. <http://www.childrensmn.org/manuals/lab/Chemistry/179769.pdf>
121. <http://www.drugbank.ca/drugs/db01174>
122. <http://www.ema.europa>
123. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000546/WC500046602.pdf
124. http://www.emedicinehealth.com/drug-ethosuximide/article_em.htm
125. <http://www.epilepsy.com/medications/phenobarbital>
126. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/PediatricAdvisoryCommittee/UCM234474.pdf>
127. <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/nomcodes/04.05>
128. http://www.globalrph.com/labs_drug_levels.htm

129. <http://www.health.vic.gov.au/edfactsheets/downloads/febrile-convulsions-in-children.pdf>
130. <http://www.iator.gr/2010/11/20/fainitoini/>
131. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25954794>
132. http://www.novartis.com.au/PI_PDF/tgr.pdf
133. http://www.novartis.com.au/PI_PDF/tri.pdf
134. <https://www.epilepsy.org.au/sites/default/files/Seizure%20Smart%20-%20Classification%20of%20Seizures.pdf>
135. https://www.healthcare.uiowa.edu/path_handbook/handbook/test298.html
136. <https://www.nice.org.uk/donotdo/adjunctive-treatment-in-children-young-people-and-adults-withlennox8211gastaut-syndromedo-not-offer-carbamazepine-gabapentin-oxcarbazepine-pregabalin-tiagabineor-vigabatrin>
137. <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a682327.html>
138. Huang LS, Pheanpanitporn Y, Yen YK, Chang KF, Lin LY, Lai DM. Detection of the antiepileptic drug phenytoin using a single free-standing piezoresistive microcantilever for therapeutic drug monitoring. *Biosensors Bioelectronics* 2014; 59: 233-238.
139. Ichimura F, Deguchi Y, Yokogawa K, Yamana T. Physiologically based pharmacokinetics of valproic acid in rabbits. *Int J Pharm* 1985; 27: 45-60.
140. Ifa DR, Falci M, Moraes ME, Bezerra AF, Moraes MO, deNucci G. Gabapentin quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence study. *J Mass Spectrom* 2001; 36: 188-194.
141. Ilangarante NB, Mannakkara NN, Bell GS, Sander JW. Phenobarbital: missing in action. *Bull World Health Organ* 2012; 90: 871-871A.
142. Iivanainen M, Savolainen H. Side effects of phenobarbital and phenytoin during long-term treatment of epilepsy. *Acta Neurol Scand Suppl* 1983; 97: 49-67.
143. Ikeda K, Ikawa K, Yokoshige S, Yoshikawa S, Morikawa N. Gas chromatography-electron ionization-mass spectrometry quantitation of valproic acid and gabapentin, using dried plasma spots, for therapeutic drug monitoring in in-home medical care. *Biomed Chromatogr* 2014; 28: 1756-1762.
144. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH harmonized tripartite guideline, Validation of Analytical procedures Text and methodology Q2(R1), step 4, 2005.

145. Islam SI, Al Aidarous RS, Jan MS, Dehlawi FA. Population pharmacokinetics of carbamazepine and optimizing its use in Saudi epileptic children. *Int Res J Med Med Sci* 2013; 1(4): 85-93.
146. Isoherranen N, Roeder M, Soback S, Yagen B, Schurig V, Bialer M. Enantioselective analysis of levetiracetam and its enantiomer R- α -ethyl-2-oxo-pyrrolidine acetamide using gas chromatography and ion trap mass spectrometric detection. *J Chromatogr B* 2000; 745: 325-332.
147. Jain DS, Subbaiah G, Sanyal M, Pal U, Shrivastav PS. Determination of levetiracetam in human plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry and its application to bioequivalence studies. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20: 2539-2547.
148. Jain DS, Subbaiah G, Sanyal M, Shrivastav P. A high throughput and selective method for the estimation of valproic acid an antiepileptic drug in human plasma by tandem LC-MS/MS. *Talanta* 2007; 72(1): 80-88.
149. Jalalizadeh H, Sourì E, Tehrani MB, Jahangiri A. Validated HPLC method for the determination of gabapentin in human plasma using pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B* 2007; 854(1-2): 43-47.
150. Ji HY, Jeong DW, Kim YH, Kim HH, Yoon YS, Lee KC, Lee HS. Determination of gabapentin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20: 2127-2132.
151. Jiang Q, Li S. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of serum gabapentin. *J Chromatogr B* 1999; 727: 119-123.
152. Johannessen SI, Battino D, Berry DJ, Bialer M, Krammer G, Tomson T, Patsalos PN. Therapeutic drug monitoring of the newer antiepileptic drugs. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 347-363.
153. Johannessen SI, Landmark CJ. Antiepileptic drug interactions –principles and clinical implications. *Curr Neuropharmacol* 2010; 8: 254-267.
154. Johnson P, Becker L, Halpern R, Sweeney M. Real-world treatment of post-herpetic neuralgia with gabapentin or pregabalin. *Clin Drug Invest* 2013; 33: 35-44.
155. Jones A. Epilepsy and anticonvulsants. *Perspectives in drug discovery. TIAFT Bull* 2016; 46(1): 5-13.

156. Juenke JEM, Brown PI, McMillin GA, Urry FM. Procedure for the monitoring of gabapentin with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid derivatization followed by HPLC with ultraviolet detection. *Clin Chem* 2003; 49(7): 1198-1201.
157. Juenke JM, Wienhoff KA, Anderson BL, McMillin GA, Johnson-Davis KL. Performance characteristics of the ARK diagnostics gabapentin immunoassay. *Ther Drug Monit* 2011; 33(4): 398-401.
158. Kadam SS, Mahadik KR, Bothara KG. Principles of medicinal chemistry. 18th edition, Pune Nirali Prakashan, 2007, India.
159. Karceski S, Morrell MJ, Carpenter D. Treatment of epilepsy in adults: expert opinion, 2005. *Epilepsy Behav* 2005; 7: S1-S64.
160. Kaussner Y, Kenntner-Mabiala R, Hoffmann S, Klatt J, Tracik F, Kruger HP. Effects of oxcarbazepine and carbamazepine on driving ability: a double-blind, randomized crossover trial with healthy volunteers. *Psychopharmacol* 2010; 210(1): 53-63.
161. Kellinghaus C, Berning S, Stogbauer F. Use of oxcarbazepine for treatment of refractory status epilepticus. *Seizure* 2014; 23: 151-154.
162. Kestelyn C, Lastelle M, Hiquet N, Dell'Aiera S, Staelens L, Boulanger P, Boekens H, Smith S. A simple HPLC-UV method for the determination of lacosamide in human plasma. *Bioanalysis* 2011; 3(22): 2515-22.
163. Khedr A, Moustafa M, Abdel-Naim AB, Alahdal A, Mosli H. High-performance liquid chromatographic method for the determination of phenytoin in rabbits receiving sildenafil. *Anal Chem Insights* 2008; 3: 61-67.
164. Killestein J. Cannabinoids in the treatment of epilepsy. *N Engl J Med* 2016; 374:94-95.
165. Kim DW, Gu N, Jang IJ, Chu K, Yu KS, Cho JY, Yoon SH, Kim HS, Oh J, Lee SK. Efficacy, tolerability, and pharmacokinetics of oxcarbazepine oral loading in patients with epilepsy. *Epilepsia* 2012; 53(1): e9-e12.
166. Kim KB, Seo KA, Kim SE, Bae SK, Kim DH, Shin JG. Simple and accurate quantitative analysis of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 56: 771-777.
167. Kim SJ, Koo TS, Ha DJ, Baek M, Lee SK, Shin DS, Moon H. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for quantification of lacosamide, an

- antiepileptic drug, in rat plasma and its application to pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr* 2012; 26: 371-376.
168. Kimiskidis V, Spanakis M, Niopas I, Kazis D, Gabrieli C, Kanaze FI, Divanoglou D. 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 Biomed Anal* 2007; 43(2): 763-768.
169. Kojovic M, Cordivari C, Bhatia K. Myoclonic disorders: a practical approach for diagnosis and treatment. *The Adv Neurol Disord* 2011; 4(1): 47-62.
170. Kolocouri F, Dotsikas Y, Loukas Y. Dried plasma spots as an alternative sample collection technique for the quantitative LC-MS/MS determination of gabapentin. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398: 1339-1347.
171. Kostic N, Dotsikas Y, Malenovic A, Stojanovic J, Rakic T, Ivanovic D, Medenica M. Stepwise optimization approach for improving LC-MS/MS analysis of switterionic antiepileptic drugs with implementation of experimental design. *J Mass Spectrom* 2013; 48: 875-884.
172. Koul R, Chacko A, Ganesh A, Bulusu S, Al Riyami K. Vigabatrin associated retinal dysfunction in children with epilepsy. *Arch Dis Child* 2001; 85: 469-473.
173. Kowski AB, Weissinger F, Gaus V, Fidzinski P, Losch F, Holtkamp M. Specific adverse effects of antiepileptic drugs-a true-to-life. *Epilepsy Behav* 2016; 54: 150-157.
174. Kristensen JH, Ilett KF, Hackett LP, Kohan R. Gabapentin and breastfeeding: a case report. *J Hum Lact* 2006; 22: 426-428.
175. Krivanek P, Koppatz K, Turnheim K. Simultaneous isocratic HPLC determination of vigabatrin and gabapentin in human plasma by dansyl derivatization. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 374-377.
176. Kushnir MM, Crossett J, Brown PI, Urry FM. Analysis of gabapentin in serum and plasma by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *J Anal Toxicol* 1999; 23: 1-6.
177. La Marca G, Malvagia S, Filippi L, Fiorini P, Innocenti M, Luceri F, Pieraccini G, Moneti G, Francese S, Dani FR, Guerrini R. Rapid assay of topiramate on dried blood spots by a new liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48(5): 1392-1396.

178. Lal R, Sukbuntherng J, Luo W, Vicente V, Blumenthal R, ho J, Cundy KC. Clinical pharmacokinetic drug interaction studies of gabapentin enacarbil, a novel transported prodrug of gabapentin, with naproxen and cimetidine. *Br J Clin Pharmacol* 2010; 36(5): 498-507.
179. Lau AH, Gustavson LE, Sperelakis R, Lam NP, El-Shourbagy T, Qian JX, Layden T. Pharmacokinetics and safety of tiagabine in subjects with various degrees of hepatic function. *Epilepsia* 1997; 38(4): 445-451.
180. Lehne RA. Pharmacology for nursing care. 8th edition, Elsevier Inc., 2013, London, UK.
181. Lehner AF, Stewart J, Dafalla A, Ely KJ, Connerly AL, Jones CN, ElkHoly H, Thompson K, Tobin T, Dirikolu L. Gabapentin in horse: Validation of an analytical method for gabapentin quantitation. *J Anal Toxicol* 2007; 31: 555-565.
182. Lensmeyer GL, Gidal BE, Wiebe DA. Optimized high-performance liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in serum with concomitant determination of phenytoin, carbamazepine, and carbamazepine epoxide. *Ther Drug Monit* 1997; 19(3): 292-300.
183. Leon J. A practitioner's guide to prescribing antiepileptics and mood stabilizers for adults with intellectual disabilities. Springer Science and Business Media, LCC, 2012.
184. Leppick I.E. Antiepileptic drugs (AEDs). Contemporary diagnosis and management of the patient with epilepsy. *Handbooks in Health Care* 2001; 74-116.
185. Levetiracetam, Highlights of prescribing information, 2011.
186. Levine B, Green-Johnson D, Moore KA, Fowler DR. Hydroxycarbazepine distribution on three postmortem cases. *J Anal Toxicol* 2004; 28: 509-511.
187. Levine B, Phipps RJ, Naso C, Fahie K, Fowler D. Tissue distribution of newer anticonvulsant drugs in postmortem cases. *J Anal Toxicol* 2010; 34: 506-509.
188. Lin CH, Lu CH, Wang FJ, Tsai MH, Chang WN, Tsai NW, Lai SL, Tseng YL, Chuang YC. Risk factors of oxcarbazepine-induced hyponatremia in patients with epilepsy. *Clin Neuropharmacol* 2010; 33(6): 293-296.
189. Lionetto L, Casolla B, Cavallari M, Tisei P, Buttinelli C, Simmaco M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of carbamazepine, oxcarbazepine, and their main metabolites in human serum. *Ther Drug Monit* 2012; 34: 53-58.

190. Liu Y, Uboh CE, Soma LR, Li X, Guan F, You Y, Rudy JA, Chen JW. Analysis of gabapentin in equine plasma with measurement uncertainty estimation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2011; 35: 75-84.
191. Lockard JS, Levy RH, Uhler V, Farquhar JA. Interactions of phenytoin and phenobarbital in terms of order and temporal spacing of administration in monkeys. *Epilepsia* 1976; 17: 481-485.
192. Longmore M, Wilkinson I, Baldwin A, Wallin E. Oxford handbook of clinical medicine. 9th edition, Oxford Medical Handbooks, 2014, Oxford, UK.
193. Luo W, Kong ST, Yang S, Chan BC, Ho PC. A simple assay for determination of levetiracetam in rat dried blood spots by LC-MS/MS. *Bioanalysis* 2013; 5(15): 1843-1851.
194. MacDonald RL, Kelly KM. Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia* 1993; 34(5): 1-8.
195. MacDonald RL, Kelly KM. Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia* 1995; 36(2): 2-12.
196. Maguire M, Marson AG, Ramaratnam S. Epilepsy (generalized) neurological disorders. *Clin Evidence* 2012; 02: 1201-1214.
197. Mandal A, Chatterjee S, Bose S, Ganguly G. Ocular adverse effects of topiramate: two case reports. *Indian J Pharmacol* 2008; 40(6): 278-280.
198. Margolis JM, Chu BC, Wang ZJ, Copher R, Cavazos JE. Effectiveness of antiepileptic drug combination therapy for partial-onset seizures based on mechanisms of action. *JAMA Neurol* 2014; 71(8): 985-993.
199. Marini C, King MA, Archer JS, Newton MR, Berkovic SF. Idiopathic generalized epilepsy of adult onset: clinical syndromes and genetics. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 192-196.
200. Marsot A, Brevaut-Malaty V, Vialet R, Boulamery A, Bruguerolle B, Simon N. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of phenobarbital in neonates and young infants, a population pharmacokinetic modeling approach. *Fund Clin Pharmacol* 2014; 28: 465-471.
201. Martens-Lobenhoffer J, Bode-Boger SM. Determination of levetiracetam in human plasma with minimal sample pretreatment. *J Chromatogr B* 2005; 819: 197-200.
202. Martindale: The complete drug reference. Sweetman SC. 35th edition, Pharmaceutical Press, 2007, London, UK.

203. Martinez SE, Bowen KA, Remsberg CM, Takemoto JK, Wright HM, Chen-Allen AV, Davies NM. High-performance liquid chromatographic analysis of lacosamide in canine serum using ultraviolet detection: application to preclinical pharmacokinetics in dogs. *Biomed Chromatogr* 2012; 26: 606-609.
204. Maschio M. Brain tumor-related epilepsy. *Curr Neuroparmacol* 2012; 10: 124-133.
205. Matar KM, Nicholls PJ, Tekle A, Bawazir SA, Al-Hassan MI. Liquid chromatographic determination of six antiepileptic drugs and two metabolites in microsamples of human plasma. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 559-566.
206. Matar KM. Quantification of levetiracetam in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to therapeutic drug monitoring. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 48: 822-828.
207. Mayo Clinic, Mayo Medical Laboratories. Test ID: LAMO. Lamotrigine, Serum.
208. Meatherall R, Krahn J. Modified enzyme-multiplied immunoassay technique valproic acid test kit. *Ther Drug Monit* 1995; 17(1): 104-105.
209. Mehta AK, Ticku MK. Interactions of phenobarbital and phenobarbital with GABAergic drugs against chemoconvulsants. *Pharmacol Biochem Beh* 1998; 30: 995-1000.
210. Meinardi H, Cramer JA, Baker GA, da Silva AM. Quantitative assessment in epilepsy care. Springer Science and Business Media, 1993, New York, USA.
211. Mendu DR, Soldin SJ. Simultaneous determination of levetiracetam and its acid metabolite (usb L057) in serum/plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2010; 43: 485-489.
212. Mercolini L, Mandrioli R, Amore M, Raggi MA. Simultaneous HPLC-F analysis of three antiepileptic drugs in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53: 62-67.
213. Middleton O. Suicide by gabapentin overdose. *J Forensic Sci* 2011; 56(5): 1373-1375.
214. Ming-Chun L, Hwang-Shang K, Cheng-Chung C, Shou-Mei W, Hsin-Lung W. Simple and sensitive fluorimetric liquid chromatography method for the determination of valproic acid in plasma. *J Chromatogr B* 2004; 810(1): 169-172.
215. Moffa Jr DA. Preventing toxic drug interactions and exposures. Cleveland Clinic, Center for Continuing Education, 2010.
216. Montgomery S, Baldwin D. Clinician's manual on generalized anxiety disorder. Current Medicine Group Ltd 2006, 24-48.

217. Mudiam MKR, Chauhan A, Jain R, Ch R, Fatima G, Malhorta E, Murthy RC. Development, validation and comparison of two microextraction techniques for the rapid and sensitive determination of pregabalin in urine and pharmaceutical formulations after ethyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometric analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2012; 70: 310-319.
218. Muller PB, Taboada J, Hosgood G, Partington BP, VanSteenhouse JL, Taylor HW, Wolfdeimer KJ. Effects of long-term phenobarbital treatment on the liver in dogs. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 165-171.
219. Nagel AG, Zaccara G, Baldinetti F, Leon T. Add-on treatment with PRG for partial seizures with or without generalization: pooled data analysis of four randomized placebo-controlled trials. *Seizures* 2009; 18: 184-192.
220. Nelson E, Powell JR, Conrad K, Likes K, Byers J, Baker S, Perrier D. Phenobarbital pharmacokinetics and bioavailability in adults. *J Clin Pharmacol* 1982; 22: 141-148.
221. New AM, Nei SD, Kashani KB, Rabinstein AA, Frazee EN. Levetiracetam pharmacokinetics during continuous venovenous hemofiltration and acute liver dysfunction. *Neurocrit Care* 2016. Article in press.
222. Newton HB, Maschio M. *Epilepsy and Brain Tumors*. 1st edition, Elsevier Inc., 2015, London, UK.
223. Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Komarneni P, Aleti R. Liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry method for the quantification of pregabalin in human plasma. *J Chromatogr B* 2009; 877: 3899-3906.
224. Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Komarneri P, Aleti R. Liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry method for the quantification of pregabalin in human plasma. *J Chromatogr B* 2009; 877(30): 3899-3906.
225. Oertel R, Arenz N, Pietsch J, Kirch W. Simultaneous determination of three anticonvulsants using hydrophilic interaction LC-MS. *J Sep Sci* 2009; 32: 238-243.
226. Ouellet D, Bockbrader HN, Wesche DL, Shapiro DY, Garofalo E. Population pharmacokinetics of gabapentin in infants and children. *Epilepsy Res* 2001; 47: 229.
227. Paglia G, D'Apolito O, Garofalo D, Scarano C, Corso G. Development and validation of a LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of

- oxcarbazepine and its main metabolites in human serum. *J Chromatogr B* 2007; 860(2): 153-159.
228. Pal DK. Phenobarbital for childhood epilepsy: systematic review. *Paediatr Perinat Drug Ther* 2006; 7(1): 31-42.
229. Panayiotopoulos CP. A clinical guide to epileptic syndromes and their treatment. 2nd edition, Springer Healthcare Ltd, 2010, London, UK.
230. Panayiotopoulos CP. The epilepsies. Seizures, syndromes and management. Blandon Medical Publishing, 2005, Oxfordshire, UK.
231. Pande AC, Davidson RT, Jefferson JW. Treatment of social phobia with gabapentine: a placebo controlled study. *J Clin Psychopharmacology* 1999; 19: 341-348.
232. Parant F, Bossu H, Gagnieu MC, Lardet G, Moulisma M. Cross-reactivity assessment of carbamazepine-10,11-epoxide, oxcarbazepine, and 10-hydroxycarbamazepine in two automated carbamazepine immunoassays: PETINIS and EMIT 2000. *Ther Drug Monit* 2003; 25(1): 41-45.
233. Park JH, Jhee OH, Park SH, Lee JS, Lee MH, Shaw LM, Kim KH, Lee JH, Kim YS, Kang JS. Validated LC-MS/MS method for the quantification of gabapentin in human plasma: application to pharmacokinetic and bioequivalence studies in Korean volunteers. *Biomed Chromatogr* 2007; 21: 829-835.
234. Park KJ, Kim JR, Joo EY, Seo DW, Hong SB, Ko JW, Kim SR, Huh W, Lee SY. Drug interaction and pharmacokinetic modeling of oxcarbazepine in Korean patients with epilepsy. *Clin Neuropharm* 2012; 35: 40-44.
235. Pathare DB, Jadhav AS, Shingare MS. A validated stability indicating LC method for oxcarbazepine. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43(5): 1825-1830.
236. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BFD, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, Leppik IE, Tomson T and Perucca E. Antiepileptic drugs-Best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the Subcommission on Therapeutic Drug Monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 2008; 49: 239-1276.
237. Patsalos PN, Bourgeois BFD. The epilepsy prescriber's guide to antiepileptic drugs, 2nd edition, Cambridge University Press, 2014, Cambridge, UK.
238. Patsalos PN. Antiepileptic drugs interactions: a clinical guide. 2nd edition. Springer-Verlag, 2013, London, UK.

239. Patsalos PN. Drugs interactions with newer antiepileptic drugs (AEDs)-Part 1: Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between AEDs. *Clin Pharmacokinet* 2013; 52: 927-966.
240. Patsalos PN. Properties of antiepileptic drugs in the treatment of idiopathic generalized epilepsies. *Epilepsia* 2005; 46(9): 140-148.
241. Patsalos PN. The mechanism of action of topiramate. *Rev Contemp Pharmacol* 1999; 10(3): 147-153.
242. Pennell PB. Using current evidence in selecting antiepileptic drugs for use during pregnancy. *Epilepsy Curr* 2005; 5(2): 45-51.
243. Perucca E. A pharmacological and clinical review on topiramate, a new antiepileptic drug. *Pharmacol Res* 1997; 35(4): 241-256.
244. Perucca E. An introduction to antiepileptic drugs. *Epilepsia* 2005; 46(4): 31-37.
245. Perucca E. Clinically relevant drug interactions with antiepileptic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 61(3): 246-255.
246. Perucca E. Extended-release formulations of antiepileptic drugs: rationale and comparative value. *Curr Rev Clin Sci* 2009; 9(6): 153-157.
247. Perucca E. Marketed new antiepileptic drugs: are they better than old-generation agents? *Ther Drug Monit* 2002; 24: 74-80.
248. Petroff OAC, Rothman DL, Behar KL, Lamoureux D, Mattson RH. The effect of gabapentin on brain gamma-aminobutyric acid in patients with epilepsy. *Ann Neurol* 1996; 39: 95-99.
249. Pfaender M, D'Souza WJ, Trost N, Litewka L, Paine M, Cook M. Visual disturbances representing occipital lobe epilepsy in patients with cerebral calcifications and coeliac disease: a case series. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 1623-1625.
250. Pillai LV, Ambike DA, Hussainy SMK, Vishwasrao S, Pataskar S, Gaikwad MM. Hypersensitivity and dose related side effects of phenytoin mimicking critical illness. *Indian J Crit Care Med* 2005; 9(1): 22-27.
251. Prabhavalkar KS, Poovanpallil NB, Bhatt LK. Management of bipolar depression with lamotrigine: an antiepileptic mood stabilizer. *Front Pharmacol* 2015; 6: 1-11.
252. Preece NE, Jackson GD, Houseman JA, Duncan JS, Williams SR. Nuclear magnetic resonance detection of increased GABA in vigabatrin-treated rats in vivo. *Epilepsia* 1994; 35: 431-436.

253. Pucci V, Bugamelli F, Mandrioli R, Ferranti A, Kenndler E, Raggi MA. High-performance liquid chromatographic determination of levetiracetam in human plasma: comparison of different sample clean-up procedures. *Biomed Chromatogr* 2004; 18: 37-44.
254. Qi ML, Wang P, Wang LJ, Fu RN. LC method for the determination of oxcarbazepine in pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 31(1): 57-62.
255. Queiroz MEC, Silva SM, Carvalho D, Lancas FM. Determination of lamotrigine simultaneously with carbamazepine, carbamazepine epoxide, phenytoin, phenobarbital, and primidone in human plasma by SPME-GC-TSD. *J Chromatogr Sci* 2002; 40: 219-223.
256. Quinn B, Weiner IB. *The Wiley concise guides to mental health: bipolar disorder*. John Wiley & Sons, Inc., 2007, New Jersey, USA.
257. Rahman T, Campell A, O'Connell CR, Nallapula K. Carbamazepine in bipolar disorder with pain: reviewing treatment guidelines. *Prim Care Companion CNS Disord* 2014; 16(5): 10.4088/PCC.14r01672.
258. Ramakrishna NVS, Vishwottam KN, Koteswara M, Manoj S, Santosh M, Chidambara J, Sumatha B, Varma DP. Rapid quantification of gabapentin in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 40: 360-368.
259. Ramakrishna NVS, Vishwottam KN, Manoj S, Koteswara M, Santosh M, Chidambara J, Kumar BR. Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification of valproic acid in human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19: 1970-1978.
260. Ramiseti NR, Kuntamukkala R, Lakshetti S, Sripadi P. Identification and characterization of stress degradants of lacosamide by LC-MS and ESI-Q-TOF-MS/MS: Development and validation of a stability indicating RP-HPLC method. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 95: 256-264.
261. Rani S, Malik AK. A novel microextraction by packed sorbent-gas chromatography procedure for the simultaneous analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. *J Sep Sci* 2012; 35: 2970-2977.
262. Rao BM, Ravi R, Shyam Sundar Reddy B, Sivakumar S, Gopi Chand I, Praveen Kumar K, Acharyulu PV, Om Reddy G, Srinivasu MK. A validated chiral LC method for the enantioselective analysis of levetiracetam and its enantiomer R-alpha-ethyl-2-

- oxo-pyrrolidine acetamide on amylase-based stationary phase. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 35(5): 1017-1026.
263. Rastogi RG, Ng Y. Lacosamide in refractory mixed pediatric epilepsy: a prospective add-on study. *J Child Neurol* 2012; 27(4): 492-495.
 264. Raymond AA. How to stop antiepileptic drugs. *Neurology Asia* 2007; 12(1): 27-29.
 265. Reddy DS, Golub VM. The pharmacological basis of cannabis therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 2016; 357(1): 45-55.
 266. Reineks EZ, Lawson SE, Lembright KE, Wang S. Performance characteristics of a new immunoassay and method comparison with a high-performance liquid chromatography method. *Ther Drug Monit* 2011; 33(1): 124-127.
 267. Richens A. Clinical pharmacokinetics of phenytoin. *Clin Pharmacolkinet* 1979; 4(3): 153-169.
 268. Ries RK, Roy-Byrne PP, Ward NG, Neppe V, Cullison S. Carbamazepine treatment for benzodiazepine withdrawal. *Am J Psychiatry* 1989; 146: 536-537.
 269. Roberts WL, Annesley TM, De BK, Moulton L, Juenke JM, Moyer TP. Performance characteristics of four free phenytoin immunoassays. *Ther Drug Monit* 2001; 23(2): 148-154.
 270. Rogawski MA, Cavazos JE. Mechanisms of action of antiepileptic drugs (Chapter 43). *Wyllie's treatment of epilepsy: principles and practices*. 6th edition, Wolters Kluwer, 2014, Philadelphia, USA.
 271. Rogawski MA, Loscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat ev Neurosc* 2004; 5: 553-564.
 272. Rothrock JF. Topiramate for migraine prevention: an update. *Headache* 2012; 859-860.
 273. Sadock BJ, Sadock VA. Kaplan and Sadock's synopsis of psychiatry: behavioral sciences/clinical psychiatry. Lippincott Williams & Wilkins, 2011, Baltimore, USA.
 274. Sagirli O, Cetin SM, Onal A. Determination of gabapentin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with UV-Vis detection. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 42: 618-624.
 275. Sander JW. Stopping antiepileptic drug treatment (Chapter 32). In *Epilepsy 2015, from channels to commissioning-a practical guide to epilepsy*. Rugg-Gunn FJ, Smalls JE. International League Against Epilepsy, 2015, East Sussex, UK.

276. Sattler A, Schaefer M, May TW, Rambeck B, Brandt C. Fluctuation of lacosamide serum concentrations during the day and occurrence of adverse drug reactions-First clinical experience. *Epilepsy Res* 2011; 95: 207-212.
277. Scheinfeld N. Phenytoin in cutaneous medicine: its uses, mechanisms and side effects. *Dermatol Online J* 2003; 9(3): 6.
278. Schmidt D, Schachter SC. Drug treatment of epilepsy in adults. *BMJ* 2014; 28: 254.
279. Schneiderman JH. Topiramate: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Can J Neurol Sci* 1998; 25(3): 3-5.
280. Schramm TM, McKinnon GE, Eadie MJ. Gas chromatographic assay of vigabatrin enantiomers in plasma. *J Chromatogr* 1993; 616:39-44.
281. Sghendo L, Mifsud J, Ellul-Micallef R, Portelli J, Millership JS. A sensitive gas chromatographic/mass spectrometric method for the resolution and quantification of ethosuximide enantiomers in biological fluids. *J Chromatogr B* 2002; 772(2): 307-315.
282. Shader RI, Greenblatt DJ. Approaches to the treatment of anxiety states. *Manual of psychiatric therapeutics*. Shader R.I. Third edition. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia 2003; 184-206.
283. Shah S, Vasantharaju SG, Arumugam K, Muddukrishna BS, Desai N. Development of a sensitive bioanalytical method for the quantification of lacosamide in rat plasma. Application to preclinical pharmacokinetics studies in rats. *Arzneimittelforschung* 2012; 62(5): 243-6.
284. Shibata M, Hashi S, Nakanishi H, Masuda S, Katsura T, Yano I. Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. *Biomed Chromatogr* 2012; 26: 1519-1528.
285. Shin JH, Gadde KM. Clinical utility of phentermine/topiramate (QsymiaTM) combination for the treatment of obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2013; 6: 131-139.
286. Shorvon S. *Handbook of epilepsy treatment*. 3rd edition, Wiley-Blackwell, 2010, London, UK.
287. Shorvon SD. Safety of topiramate: adverse effects and relationships to dosing. *Epilepsia* 1996; 37(2): 18-22.
288. Sills GJ. Mechanisms of action of antiepileptic drugs (Chapter). In *Epilepsy* by Sander JW, Walker MC, Smalls JE. 2011, London, UK.

289. Smedt TD, Raedt R, Vonck K, Boon P. Levetiracetam: part II, the clinical profile of a novel anticonvulsant drug. *CNS Drug Rev* 2007; 13(1): 57-78.
290. Sorensen LK. Determination of acidic and neutral therapeutic drugs in human blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 2011; 206: 119-126.
291. Souppart C, Decherf M, Humbert H, Maurer G. Development of a high throughput 96-well plate sample preparation method for the determination of trileptal (oxcarbazepine) and its metabolites in human plasma. *J Chromatogr B* 2001; 762(1):9-15.
292. Souri E, Jalalizadeh H, Shafiee A. Optimization of an HPLC method for the determination of gabapentin in dosage forms through derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *Chem Pharm Bull* 2007; 55(10): 1427-1430.
293. Speed DJ, Dickson SJ, Cairns ER, Kim ND. Analysis of six anticonvulsant drugs using solid-phase extraction deuterated internal standards, and gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2000; 24: 685-690.
294. Spiller HA, Abat D. Management of carbamazepine overdose. *Pediatr Emerg Care* 2001; 17(6): 452-456.
295. Spiller HA, Wiles D, Russell JL, Casavant MJ. Review of toxicity and trends in the use of tiagabine as reported to US poison centers from 2000 to 2012. *Hum Exp Toxicol* 2016; 35(2): 109-113.
296. Spina E, Pisani F, Perucca E. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with carbamazepine. An update. *Clin Pharmacokinet* 1996; 31(3): 198-214.
297. Steinborn B. Pharmacokinetic onteractions of carbamazepine with some antiepileptic drugs during epilepsy treatment in children and adolescents. *Rocz Akad Med Bialymst* 2005; 50(1): 9-15.
298. Stevens S, Bannon A. The book of poisons. Fraser Direct, 2007, Georgetown, Canada.
299. Stewart CF, Bottorff MB. Fluorescence polarization immunoassay for ethosuximide evaluated and compared with two other immunoassay techniques. *Clin Chem* 1986; 32(9): 1781-1783.
300. Strohcheer I, Borasio GD. Carbamazepine-responsive paroxysmal nausea and vomiting in a patient with meningeal carcinomatosis. *Palliat Med* 2006; 20(5): 549-550.

301. Su W, Lin Q, Song Y. Establishment of ELISA for measuring phenytoin in serum. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2000; 22: 93-95.
302. Subramanian M, Birnbaum AK, Rummel RP. High-speed simultaneous determination of nine antiepileptic drugs using liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 347-356.
303. Suresh SH, Chakraborty A, Virupakshaiah A, Kumar N. Efficacy and safety of levetiracetam and carbamazepine as monotherapy in partial seizures. *Epilepsy Res Treat* 2015; 2015: 415082.
304. Svalheim S, Sveberg L, Mochol M, Tauboll E. Interactions between antiepileptic drugs and hormones. *Seizure* 2015; 28: 12-17.
305. Sveinbjornsdottir S, Duncan JS. Parietal and occipital lobe epilepsy: a review. *Epilepsia* 1993; 34(3): 493-521.
306. Szaflarski JP, Nazzari Y, Dreier LE. Post-traumatic epilepsy: current and emerging treatment options. *Neuropsychiatric Dis Treat* 2014; 10: 1469-1477.
307. Tai SSC, Yeh CY, Phinney KW. Development and validation of a reference measurement procedure for certification of phenytoin, phenobarbital, lamotrigine, and topiramate in human serum using isotope-dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2011; 401: 1915-1922.
308. Taylor CP, Gee NS, Su TZ, Kocsis JD, Welty DF, Brown JP, Dooley DJ, Boden P, Singh L. A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology. *Epilepsy Res* 1998; 29: 233.
309. Tenney JR, Jain SV. Absence epilepsy: older vs newer AEDs. *Curr Treat Options Neurol* 2014; 16(290): 1-8.
310. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd edition, EURACHEM Guide, 2014.
311. The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT). TIAFT reference blood level list of therapeutic and toxic substances, 2004.
312. Thimmisetty RK, Gorthi JR, Hazeem MA. Oral phenytoin toxicity causing sinus arrest: a case report. *Case Rep Cardiol* 2014; 2014: 851767.
313. Tolou-Ghamari Z, Zare M, Habibabadi JM, Najafi MR. A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012. *J Res Med Sci* 2013; 18(1): S81-S85.
314. Torra M, Rodamilans M, Arroyo S, Cordella J. Optimized procedure for lamotrigine analysis in serum by high-performance liquid chromatography without interferences

- from other frequently co-administered anticonvulsants. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 621-625.
315. Touw DJ, Graafland O, Cranendonk A, Vermeulen RJ, van Weissenbruch MM. Clinical pharmacokinetics of phenobarbital in neonates. *Eur J Pharm Sci* 2000; 12: 111-116.
316. Trinka E, Hofler J, Leitinger M, Brigo F. Pharmacotherapy for status epilepticus. *Drugs* 2015; 75: 1499-1521.
317. Tsatsakis AM, Psillakis T, Paritsis N. henytoin concentration in head hair sections: a method to evaluate the history of the drug use. *J Clin Psychopharmacol* 2000; 20(5): 560-573.
318. Tutor-Crespo MJ, Hermida J, Tutor C. Phenytoin immunoassay measurements in serum samples from patients with renal insufficiency: comparison with high-performance liquid chromatography. *J Clin Lab Anal* 2007; 21: 119-123.
319. Ulu ST, Kel E. Highly sensitive determination and validation of gabapentin in pharmaceutical preparations by HPLC with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan derivatization and fluorescence detection. *J Chromatogr Sci* 2011; 49: 417-421.
320. Uribe-Escamilla R, Mota-Rojas D, Sanchez-Aparicio P, Alonso-Spilsbury M, Gonzalez-Pina R, Alfaro-Rodriguez A. Effect of pentobarbital on pH and electrolyte levels after induced seizure in rats. *Seizure* 2007; 16: 397-401.
321. Vajda FJE, Eadie MJ. The clinical pharmacology of traditional antiepileptic drugs. *Epileptic Disord* 2014; 16(4): 395-408.
322. Van Lente F, Gatautis V. Cost-efficient use of gas chromatography-mass spectrometry: a “piggyback” method for analysis of gabapentin. *Clin Chem* 1998; 44: 2044-2045.
323. Veiby G, Bjork M, Engelsen BA, Gilhus NE. Epilepsy and recommendations for breastfeeding. *Seizure* 2015; 28: 57-65.
324. Vermeij TA, Edelbroek PM. High-performance liquid chromatographic and megabore gas-liquid chromatographic determination of levetiracetam (ucb L059) in human serum after solid-phase extraction. *J Chromatogr B* 1994; 662: 134-139.
325. Vermeij TA, Edelbroek PM. Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, oxcarbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction. *J Chromatogr B* 2007; 857(1): 40-46.

326. Vermeij TAC, Edelbroek PMJ. Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2004; 810: 297-303.
327. Vigo DV, Baldessarini RS. Τα αντισπασμικά στη θεραπεία της μείζονος καταθλιπτικής διαταραχής: Γενική ανασκόπηση. *Harvard Rev Psychiatry* 2009; 17(4): 11-21.
328. Walker SM, Hill RE. Substrate-labeled fluorescent immunoassay for ethosuximide evaluated. *Clin Chem* 1983; 29(8): 1567-1568.
329. Warner A, Privitera M, Bates D. Standards of laboratory practice: antiepileptic drug monitoring. *Clin Chem* 1998; 44(5): 1085-1095.
330. Wattle M, Demedts P, Franck F, De Deyn PP, Waters A, Neels H. Analysis of the antiepileptic phenyltriazine compound lamotrigine using gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 460-464.
331. Wattananat T, Akarawut W. Validated LC-MS-MS method for the determination of gabapentin in human plasma: application to a bioequivalence study. *J Chromatogr Sci* 2009; 47(10): 868-871.
332. Webster LK, Mihaly GW, Jones DB, Smallwood RA, Phillips JA, Vajda FJ. Effect of cimetidine and ranitidine on carbamazepine and sodium valproate pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 1984; 27(3): 341-343.
333. Werhahn KJ, Lieber J, Classen J, Noachtar. Motor cortex excitability in patients with focal epilepsy. *Epilepsy Res* 2000; 41: 179-189.
334. Westley IS, Morris RG. Seradyn quantitative microsphere system lamotrigine immunoassay on a Hitachi 911 analyzer compared with HPLC-UV. *Ther Drug Monit* 2008; 30(5):634-637.
335. Wilimowska J, Gomollka E, Parich A, Jenner B, Szpak D. Comparison of fluorescence polarization immunoassay and high performance liquid chromatography for determination of carbamazepine concentration in blood of poisoned patients. *Przegl Lek* 2005; 62: 595-598.
336. Winhusen TM, Somoza EC, Harrer JM, Mezinskis JP, Montgomery MA, Goldsmith RJ, Coleman FS, Bloch DA, Leiderman DB, Singal BM, Berger P, Elkashef A. A placebo-controlled screening trial of tiagabine, sertraline and donepezil as cocaine dependence treatments. *Addiction* 2005; 100(1): 68-77.

337. Wolf CE, Joseph JS, Poklis A. Determination of gabapentin in serum using solid-phase extraction and gas-liquid chromatography. *J Anal Toxicol* 1996; 20: 498-501.
338. Wolff C, Carrington B, Varrin-Doyer M, Vandendriessche A, Van der Perren C, Famelart M, Gillard M, Foerch P, Rogemond V, Honnorat J, Lawson A, Miller K. Drug binding assays do not reveal specific binding of lacosamide to collapsing response mediator protein2 (CRMP-2). *CNS Neurosci Ther* 2012; 18(6): 493-500.
339. Wymer JP, Simpson J, Sen D and Bongardt S. Efficacy and safety of lacosamide in diabetic neuropathic pain: an 18-week double-blind placebo-controlled trial of fixed-dose regimens. *Clin J Pain* 2009; 25(5): 276–385.
340. Yagi T, Naito T, Mino Y, Umemura K, Kawakami J. Impact of concomitant antacid administration on gabapentin plasma exposure and oral bioavailability in healthy adult subjects. *Drug Metab Pharmacokinet* 2012; 27(2): 248-254.
341. Yang X, Janatova J, Juenke JEM, McMillin GA, Andrade JD. An ImmunoChip prototype for simultaneous detection of antiepileptic drugs using an enhanced one-step homogenous immunoassay. *Anal Biochem* 2007; 365: 222-229.
342. You G, Sha Z, Jiang T. The pathogenesis of tumor-related epilepsy and its implications for clinical treatment. *Seizure* 2012; 21: 153-159.
343. Yu JT, Bisceglia KJ, Bouwer EJ, Roberts AL, Coelhan M. Determination of pharmaceuticals and antiseptics in water by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry: analysis via pentafluorobenzoylation and stable isotope dilution. *Anal Bioanal Chem* 2012; 403: 583-591.
344. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 2015; 67(4): 821-870.
345. Zhang Y, Holliman C, Tang D, Fast D, Michael S. Development and validation of a direct enantiomeric separation of pregabalin to support isolated perfused rat kidney studies. *J Chromatogr B* 2008; 875: 148-153.
346. Zhu Z, Neirinck L. High-performance liquid chromatographic method for the determination of gabapentin in human plasma. *J Chromatogr B* 2002; 779(2): 307-312.
347. Zielinski JJ, Haidukewych D, Leheta BJ. Carbamazepine-phenytoin interaction: elevation of plasma phenytoin concentrations due to carbamazepine comedication. *Ther Drug Monit* 1985; 7(1): 51-53.

348. Zivanovic D, Stanojlovic O, Susic V, Stojanovic J. The effects of phenytoin and phenobarbital on seizures induced by imipenem/cilastatin in rats. *Acta Neurol Belg* 2004; 104: 20-26.
349. Zufia L, Aldaz A, Ibanez N, Giraldez J, Viteri C. LC method for the therapeutic drug monitoring of levetiracetam: evaluation of the assay performance and validation of its application in the routine area. *Clin Biochem* 2010; 43(4-5): 473-482.
350. Zufia L, Aldaz A, Ibanez N, Viteri C. LC method for the therapeutic drug monitoring of lamotrigine: evaluation of the assay performance and validation of its application in the routine area. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 49(2): 547-553.
351. Ευρωπαϊκή Οδηγία 2002/657/EΚ, σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, 2002.
352. Ευσταθίου Κ. Στατιστική Επεξεργασία Αναλυτικών Αποτελεσμάτων. Σημειώσεις του Μεταπτυχιακού Μαθήματος «Χημειομετρία».
353. Καζής Α. Πρόσφατες εξελίξεις στη θεραπεία της επιληψίας, *Ελληνική Ιατρική*, 1995; 61(3): 211-221.
354. Καρλοβασίτου Α, Στεργίου Β. Επιδράσεις και ανεπιθύμητες ενέργειες των αντιεπιληπτικών φαρμάκων από τη ψυχική σφαίρα. *Εγκέφαλος*, 2009; 46(1): 35-39.
355. Μπενέτος Β, Γιουρούκας Σ. Επιληπτική κατάσταση (status epilepticus). *Δελτίο Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών* 2002: 49.