

ΔΗΜΟΚΡΕΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
 ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
 Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
 «Κλινική Φαρμακολογία και Θεραπευτική»

**" ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ
 ΝΕΥΡΟΛΗΠΤΙΚΩΝ (ΑΜΙΣΟΥΛΠΡΙΔΗ) ΣΕ ΑΙΜΑ
 ΚΑΙ ΟΥΡΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ GC/MS "**

ΑΝΝΑ ΡΙΖΟΠΟΥΛΟΥ, φαρμακοποιός

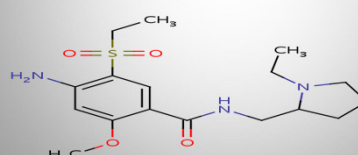
Επιβλέπων: Σ. ΑΘΑΝΑΣΕΛΗΣ
 ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
 ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

Συνεπιβλέπων: Ι. ΠΑΠΟΥΤΣΗΣ
 ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
 ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ 2013

ΑΜΙΣΟΥΛΠΡΙΔΗ

- άτυπο νευροληπτικό φάρμακο
- παράγωγο του μεθοξυβενζαμιδίου
- Μ.Β.: 369.48
- μοριακός τύπος : $C_{17}H_{27}N_3O_4S$
- συντακτικός τύπος



ΑΜΙΣΟΥΛΠΡΙΔΗ-ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

- υψηλή συγγένεια για τους ντοπαμινεργικούς υποδοχείς D_2 , D_3
- αποκλεισμός σεροτονινεργικών υποδοχέων $5-HT_{7A}$
- στερείται συγγένειας για τους α -αδρενεργικούς, ισταμινικούς, μουσκαρινικούς υποδοχείς

ΑΜΙΣΟΥΛΠΡΙΔΗ-ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Αποτελεσματική στη θεραπεία

- της δυσθυμίας
- των αρνητικών και θετικών συμπτωμάτων της σχιζοφρένειας

**ΑΜΙΣΟΥΛΠΡΙΔΗ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ
ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ**

- μεταβολικά σταθερή
- λιγότερο από το 5% βιομετατρέπεται σε δύο ανενεργούς μεταβολίτες
- απεκκρίνεται από τους νεφρούς και τα κόπρανα

ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

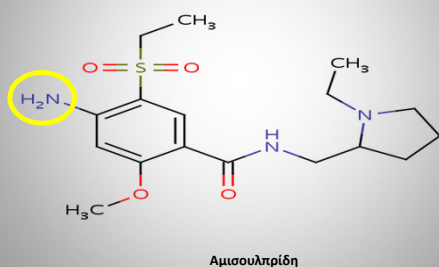
- αμισουλπίδη: ευρέως συνταγογραφούμενη
- PubMed: καμία δημοσιευμένη εργασία για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της αμισουλπίδης με την τεχνική της GC-MS

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

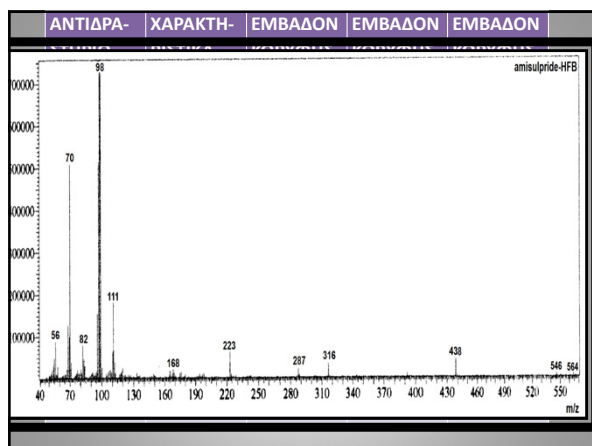
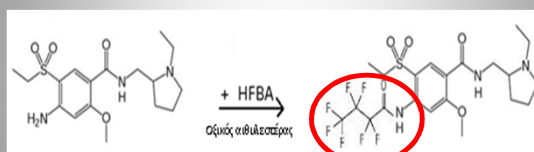
Η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μιας αναλυτικής μεθόδου για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της αμισουλπίδης σε βιολογικά δείγματα (ολικό αίμα και ούρα) με τη τεχνική της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματογράφο μαζών (GC-MS)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- εσωτερικό πρότυπο: προτριπτυλίνη
- διαλύματα εργασίας :
αμισουλπίδη: 5,0 µg/ml, 0,5 µg/ml
προτριπτυλίνη: 2,0 µg/ml

ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ**ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ**

- 1) N,O-δι-(τριμεθυλ-σιλυλ) τριφθοριο ακεταμίδιο με 1% τριμεθυλ-χλωροσιλάνιο (BSTFA με 1% TMCS)
- 2) οξικός ανυδρίτης σε πυριδίνη (AAP)
- 3) Επταφθοριοβουτυρικός ανυδρίτης (HFBA)
- 4) N-μεθυλο-N-(t-βουτυλδιμεθυλ-σιλυλ) τριφθοριο ακεταμίδιο (MTBSTFA) με 1% t-βουτυλ-διμεθυλ-χλωροσιλάνιο (TBDMSCL)

**ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΜΙΣΟΥΛΠΡΙΔΗΣ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ HFBA**

**ΧΡΟΝΟΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗ
ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΤΗΣ ΑΜΙΣΟΥΛΠΡΙΔΗΣ ΜΕ HFBA (C=5μg/ml,
n=3)**

ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	ΕΜΒΑΔΟΝ ΚΟΡΥΦΗΣ M/Z 98
15 λεπτά	11250311
30 λεπτά	11802658
45 λεπτά	11570211

**ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

- υγρό-υγρό εκχύλιση (liquid-liquid extraction, LLE)
 - οξικός αιθυλεστέρας
 - εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας (3:1, v/v)
 - εξάνιο: διχλωρομεθάνιο(3:1, v/v)
 - διχλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη(9:1, v/v)
 - οξικός αιθυλεστέρας: ισοπροπανόλη(9:1, v/v)
 - διχλωρομεθάνιο: εξάνιο: ισοπροπανόλη (3:6:1, v/v/v)
 - διχλωρομεθάνιο: οξικός αιθυλεστέρας : ισοπροπανόλη (2:7:1, v/v/v)
- εκχύλιση στερεάς φάσεως (solid-phase extraction, SPE)

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΕΩΣ

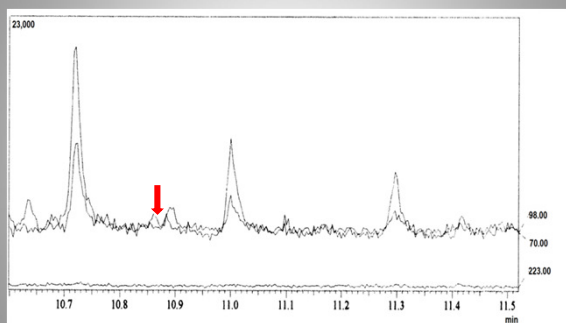
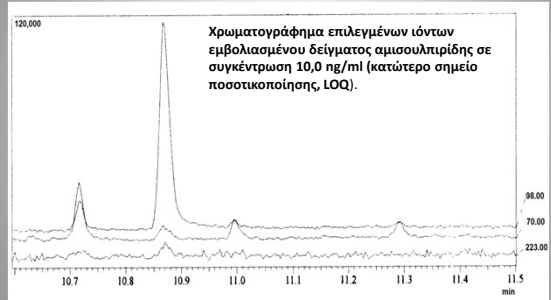
SPE Στήλη	Απόλυτη Ανάκτηση (%)	Σχετική Ανάκτηση (%)
Bond Elut Certify	45,6	53,1
Bond Elut Certify II	52,5	75,0
Nexus	118	136
HF Bond Elut C18	93,2	95,3

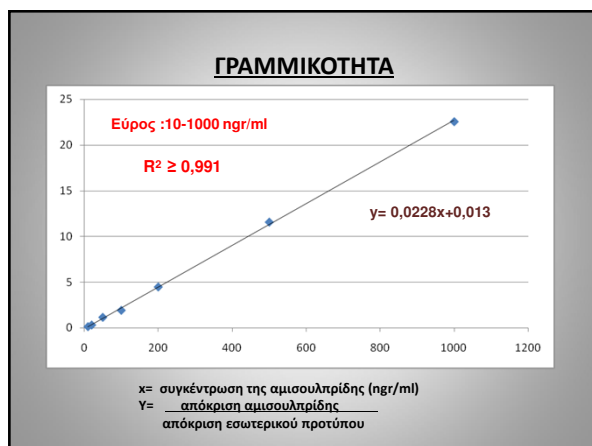
ΠΟΡΕΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

- 1ml αίματος (εμβολιασμένου ή άγνωστου δείγματος)
- 30 μl διαλύματος εσωτερικού προτύπου προτριπτυλίνη 2 μg/ml
- 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0,1M (NaH₂PO₄ pH=6)
- ανάδευση για 1 λεπτό (Vortex)
- Φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 5 λεπτά
- Ενεργοποίηση της στήλης με 2 ml μεθανόλη και 2 ml απιοντισμένο νερό
- εφαρμογή του δείγματος στη στήλη
- πλύσιμο της στήλης με 2 ml απιοντισμένο νερό
- εφαρμογή απόλυτου κενού στη στήλη (5 λεπτά, P ≥10mmHg)
- έκλουση με 2 x1,5 ml μίγματος διχλωρομεθάνιο: ισοπροπανόλη: αμμωνία (85:15:2, o/o/o)
- εξάτμιση μέχρι ξηρού με ρεύμα N₂
- 30 μl οξικού αιθυλεστέρα και 30 μl HFBA, 25°C, 30 λεπτά
- εξάτμιση μέχρι ξηρού και παραλαβή με 60 μl οξικού αιθυλεστέρα
- έγχυση 2μl στο χρωματογραφικό σύστημα GC-MS

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- εκλεκτικότητα
- ειδικότητα
- ευαισθησία
- γραμμικότητα
- % ανάκτηση
- επαναληψιμότητα-αναπαραγωγιμότητα
- ακρίβεια
- ανθεκτικότητα
- σταθερότητα

ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ**ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ****ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ**



ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Δείγματα ελέγχου ποιότητας	ΑΝΑΚΤΗΣΗ	% ΑΝΑΚΤΗΣΗ
QC1: 30,0 ng/ml	Απόλυτη ανάκτηση	94,2
	Σχετική ανάκτηση	95,3
QC2: 150,0 ng/ml	Απόλυτη ανάκτηση	95,2
	Σχετική ανάκτηση	95,6
QC3: 800,0 ng/ml	Απόλυτη ανάκτηση	101
	Σχετική ανάκτηση	103

**ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΝΔΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

- μέτρο του τυχαίου σφάλματος της μεθόδου
- % ποσοστό της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD)
- εντός της ημέρας-επαναληψιμότητα: 2,7-10%
- δια των ημερών - ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα: 4,2-7,5%
- εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$

**ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΗΜΕΡΑΣ
ΚΑΙ ΔΙΑ ΤΩΝ ΗΜΕΡΩΝ**

- το επί τις εκατό σχετικό σφάλμα (% Er)
- $\% Er = 100(x-r)/r$
- -11,9 έως 11,1
- -3,3 έως 1,2
- το % Er ήταν εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ (οδηγία FDA)

ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Μεταβολή στη μέθοδο	Διαφορές λόγου απόκρισης
A) Η θερμοκρασία στο σημείο έκχυσης αντί 250 °C σε 255°C	0,061
B) Ο ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας αντί 20, 0 σε 20, 5 °C/min	-0,099
C) Η θερμοκρασία του ανιχνευτή αντί 300 °C σε 295°C	0,055
D) Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αντί 6 σε 6, 5	0,115
E) Η θερμοκρασία παραγωγιστοποίησης αντί 25°C (θερμοκρασία περιβάλλοντος) σε 30°C	0,055
F) Η αναλογία του υγρού έκλυσης Διχλωρομεθάνιο: Ισοπροπανόλη: NH ₃ αντί 85:15:2 σε 80:15:2 α/α/α	-0,103
Τυπική απόκλιση SD	0,121

ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Συνθήκες φύλαξης	% απώλεια
+4°C για 3 ημέρες	-0,2
+4°C για 1 εβδομάδα	-2,7
+4°C για 2 εβδομάδες	-9,6
-20°C για 2 εβδομάδες	-5,2
-20°C για 1 μήνα	-11,5

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΜΙΣΟΥΛΠΡΙΔΗΣ ΣΤΑ ΟΥΡΑ

- Εφαρμόσιμη η μέθοδος και στα ούρα

Εξίσωση	Κλίση	R ²
$Y=0,022x+0,0011$	0,022	0,998

ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ	ΦΥΛΟ, ΗΛΙΚΙΑ	ΑΙΤΙΑ ΘΑΝΑΤΟΥ- ΤΡΟΠΟΣ ΘΑΝΑΤΟΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΟΥΣΙΑΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ (ngr/ml)
1	ΓΥΝΑΙΚΑ, 34	ΤΡΑΥΜΑΤΑ- ΑΝΘΡΩΠΟΚΤΟΝΙΑ	30,2
2	ΑΝΔΡΑΣ, 51	ΚΡΑΝΙΟΓΕΓΚΕΦΑΛΙΚΕΣ ΚΑΚΩΣΕΙΣ- ΑΝΘΡΩΠΟΚΤΟΝΙΑ	1111
3	ΑΝΔΡΑΣ, 59	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΗ- ΑΥΤΟΚΤΟΝΙΑ	16190
4	ΑΝΔΡΑΣ, 75	ΠΤΩΣΗ ΑΠΟ ΥΨΟΣ- ΑΥΤΟΚΤΟΝΙΑ	625,9
5	ΑΝΔΡΑΣ, 52	ΤΡΑΥΜΑΤΑ- ΤΡΟΧΑΙΟ	341,6
ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ			
1	ΑΝΔΡΑΣ, 36	ΟΞΕΙΑ ΨΥΧΩΣΗ, ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ	108,6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Μέθοδος: υψηλή ακρίβεια, ευαισθησία και επαναληψιμότητα
- πρώτη επικυρωμένη μέθοδος για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της αμισουλπρίδης με την τεχνική της GC-MS σε αίμα και ούρα
- κατάλληλη για κλινικούς σκοπούς όπως η αξιολόγηση της συμμόρφωσης του ασθενούς αλλά και ως οδηγός στη ρύθμιση του δοσολογικού σχήματος
- κατάλληλη για τη διερεύνηση ιατροδικαστικών περιστατικών όπως η οδήγηση υπο την επίρεια του φαρμάκου ή οι αυτοκτονίες

- ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ !