

Odol Tanta Lehorren fidagarritasunaren azterketa farmakoen analisi kuantitatiborako UHPLC-PDA-FLDren bidez

Study of the reliability of Dry Blood Spot for the quantification of drugs by UHPLC-PDA-FLD

Beatriz Uribe, Oskar Gonzalez, Rosa M. Alonso*

Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, UPV/EHU.

* oskar.gonzalezm@ehu.eus

DOI: 10.1387/ekaia.15547

Jasoa: 2015-12-14

Onartua: 2016-03-10

Laburpena: Lan honetan Odol Tanta Lehorren (OTLa) laginketa-teknikaren fidagarritasuna ikertu da farmakoen analisirako fotodiodo- eta fluoreszentzia-detektatzailei akoplatutako bereizmen oso altuko likido-kromatografiaren (UHPLC-PDA-FLD) bidez. OTLak, odol-tanta bat kotoi-paperezko euskarri batean jartzean eta lehortzen uztean datzan teknikak, azken urteotan erabileraren handipen garrantzitsua antzeman du bioanalisian. OTLak ohiko odol-analisiak baino hainbat abantaila erakutsi arren, analisi kuantitatiboaren ikuspuntutik hainbat faktorekiko mendekotasuna duela antzeman da. Ikerketa honetan faktore batzuek (hematokritoa, odol-bolumena eta laginketa-puntua) farmakoen determinazioan duten eragina aztertu da, horretarako amilorida, propranolola eta valsartan farmakoak eredu gisa erabiliz. Emaitzetan oinarrituta, zuloaren kokapenak eta hematokritoa analizien zehaztasunean eta doitasunean eragina dutela ondorioztatu da, teknika honen aplikazio kuantitatiboa mugatuz. Bestalde, analitoen sakabanaketa odol-tantan zehar analitoen propietate fisiko-kimikoen mendekoa dela ikusi da, metodo analitikoaren garapenean analito bakoitzaren sakabanaketa aztertu behar dela ondorioztatuz.

Hitz gakoak: Odol Tanta Lehorra, Bioanalisia, UHPLC-PDA-FLD.

Abstract: In this work, the reliability of Dried Blood Spot (DBS) as a sampling technique for drug analysis was studied by Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to Photodiode-Array and Fluorescence Detection (UHPLC-PDA-FLD). DBS microsampling, a technique based on placing a drop of blood in a cotton support that is allowed to air dry, has lately noticed an increase in use in bioanalysis. Even though it offers several advantages compared to common blood sampling methods, it also shows some limitations for quantitative analysis due to the dependence on different factors. In this study, the influ-

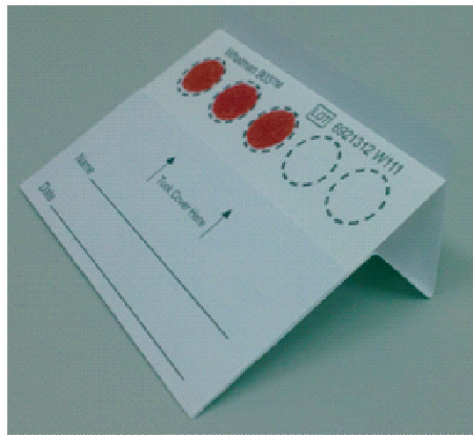
ence of some of them (hematocrit, blood volume and sampling position) has been investigated, using amiloride, propranolol and valsartan drugs as model compounds. According to the results, it has been concluded that the sampling position and the hematocrit have influence in the accuracy and precision of the quantitative results, therefore limiting the use of this technique for quantitative analysis. On the other hand, dispersion of the analytes in the blood drop depends on their physicochemical properties which implies that the distribution of each analyte must be carefully studied during method development.

Keywords: DBS, Bioanalysis, UHPLC-PDA-FLD.

1. SARRERA

Odol Tanta Lehorren (OTLa), ingelesez Dried Blood Spot (DBS), laginketa-teknika 1963. urtean erabili zuen lehenengo aldiz giza odolarekin Robert Gurthrie-k. Bere ikerketa-lanetan OTLa jaioberrietan arazo metabolikoak detektatzeko erabili zuen. Hortik aurrera OTLa hainbat arlotan erabili ohi da, hala nola toxikozinetika- eta farmakozinetika-ikerketetan, farmakoen monitorizazioan, gaixotasunen diagnostikoan eta kirol-lehiaketako dopin-analisietan [1, 2]. Teknika instrumentalen sentikortasun hobekuntzarekin batera, azken urteotan laginketa-teknika horren erabilera nabarmenki hedatu da eskaintzen dituen abantailak direla medio.

OTLaren laginketa-teknika odol-tanta bat kotoi-paperezko euskarri batean ipintzean oinarritzen da, lehortuko dena eta gero analisirako erabiliko dena. Euskarri hau % 100 kotoiaz egin ohi da eta bakterioen eta beste mikroorganismo batzuen hazkundera ekiditeko trataturik dago [3]. Hiru odol-tanta dituen OTLan erabilitako euskarri baten argazkia 1. irudian ikus daiteke.



1. irudia. OTLan erabilitako kotoi-paperezko euskarria hiru odol-tantekin.

OTLaren bidezko prozedura oso erraza da. Nahikoa da gorputzeko edozein tokitan ziztatu eta lortutako odol-tanta paperean jartzea; tokirik erabilienak atzamar bat, belarria eta orpoa dira [2, 4]. Matrize horretan dauden konposatuak analizatzeko, normalean disolbatzaile likido baten bidezko erauzketa gauzatzen da, lehortutako odol-tantan zulo bat eginez (ingelesez «punch» terminoa erabiltzen da) eta disoluzioan murgilduz [3]. Erauzketa egiteko, analitoen izaeraren araberrako disoluzioa erabiliko da; orokorrean erabilienetariko disolbatzaileen artean metanola, ura eta azetonitriloa daude [5-10]. Erauzketa hau egin ondoren, disoluzioa aukeratutako instrumentuan analizatuko da. Horretarako, hainbat teknika erabiltzen dira gaur egun, haien artean, DNAn oinarritutako entseguak, aktibitate entzimatiakoenak, immunoentseguak, masa-espektrometria (MS) zuzena eta likido-kromatografia detektagailu ezberdinekin akoplatuta [1]. OTLak hainbat abantaila erakusten ditu ohiko odolaren, plasmaren eta serumaren lagin-bilketa metodoekin konparatuta [6]. Abantaila horien artean analitoen egonkortasuna (hezetasunaren eliminazioa eta degradazio entzimatiako ezagatik), beharrezko odol-bolumen txikia eta laginen prozesatzea automatizatzeko aukera daude [11]. Gainera, biltegitratzeko eta garraiatzeko orduan leku gutxi okupatzen dute, orokorrean odol-laginak biltegitratzeko erabiltzen diren odol-tutuen aldean [4]. Arrisku biologikoa ere txikiagoa da ohiko odol-lagin likidoekin konparatuta; horren ondorioz, GIB/Hiesa eta beste patogenoekin infektatzeko aukera asko murrizten da. Teknika hau, aipatutako abantailak direla eta, ospitaletan jaioberriei odola hartzeko eta 3. munduan laginketa-teknika bezala erabili ohi da [2].

Aurreko abantaila garrantzitsu horiek izan arren, teknika honek desabantailak ere baditu. Alde batetik garrantzitsua da partikulen atxikipen, homogeneotasun eta absortzio berdintsuak bermatzea euskarri ezberdinetan zehar [3, 12]. Bestetik, aipatutako zuloaren bidezko analisi kuantitatiboa aurrera eramane nahi bada, analitoen banaketa homogeneoa gertatu behar da odol-tantan zehar, edozein puntutan zuloa hartuta ere beti analitoen kontzentrazio berdina egoteko. Horren ondorioz, analitoen banaketak faktore batzuekiko duen mendekotasuna kontuan hartu behar da, besteak beste odol mota (zainetakoa edo kapilarra) [13, 14], euskarri mota [10, 15], hematokritoa (odolaren dentsitatearekin lotuta) [3, 13, 14, 16-18] eta odol-tantaren bolumena [19, 20].

Ikerketa-lan honen helburua lagin-bolumenak, hematokritoak eta analisisirako hartutako zuloaren kokapenak OTLaren bidezko analisi kuantitatiboan duten eragina aztertzea izan da, teknika horren fidagarritasuna hobetzeko eta euskarrian analitoek duten dispersioa hobeto ulertzeko. Horretarako, ezaugarri fisiko-kimiko ezberdinak (polaritatea eta azido-base izaera) dituzten hiru farmako (amilorida, propranolol eta valsartan) erabili dira eredu gisa. Gainera, konposatu horien analisia ahalbidetzen duen prozedura analitikoak garatu da eta aukeratu den analisi metodoa fotodiodo- eta

fluoreszentzia-detektigailuei akoplatutako oso bereizmen altuko likido-kromatografia (UHPLC-PDA-FLD) izan da.

2. OTL-aren BIDEZKO FARMAKOEN ANALISIA

2.1. Erreaktiboak

Amilorida klorhidratoa Sigma-Aldrich (San Luis, Estatu Batuak) etxe komertzialetik lortu da, propranolol klorhidratoa Fluka-tik (Buchs, Suitza) eta valsartana Novartis Pharma AG-tik (Basel, Suitza). Farmakoen lanerako disoluzioak eta disoluzio estandarrek Romil (Cambridge, Ingalaterra) etxe komertzialeko gradiente kalitateko metanolean prestatu dira. pH ezberdinetako disoluzioak prestatzeko dipotasio hidrato fosfatoa (>% 99), azido azetiko (LC-MS kalitatea), sodio dihidrato zitrato anhidroa (>% 99) eta disodio hidrogeno zitrato seskihidratatua (>% 99) Fluka etxe komertzialetik lortu dira. Potasio dihidrogeno fosfatoa, sodio azetatoa, trisodio zitrato dihidratatua, amoniakoa (% 25) eta amonio kloruroa, horiek guztiak Pro-Analysi kalitatezkoak, eta sodio hidroxidoa, EMSURE® Millipore's premium grade mailakoa, Merck (Darmstadt, Alemania) etxeak hornitu ditu. Panreac (Bartzelona, Espainia) etxearen eskutik, azido fosforikoa (% 85) eta azido zitrikoa (PA-ACS-ISO) erreaktiboak lortu dira. Fase mugikorrek prestatzeko Romil-eko gradiente kalitateko azetonitriloa eta Fluka-ko LC-MS kalitateko azido formikoa erabili dira. Erabilitako ur ultrapurua Millipore (Milford, Estatu Batuak) Milli-Q Element A10-eko sistemakoa izan da.

2.2. Erabilitako tresnak

OTLa laginketa aurrera eramateko euskarriak Whatman (Sanford, USA) etxeko «903 Protein Saver Card»-ak izan dira. Erabilitako sistema kromatografikoa Waters-eko (Milford, MA, USA) Acquity UPLC-a izan da, fotodiodo (PDA) eta fluoreszentzia (FLD) detektigailuetara akoplaturik, eta zutabe kromatografikoa, berriz, etxe bereko Acquity BEH C18 (2,1 × 50, 1,7 μm) izan da. Zutabearen aurretik iragazki bat erabili da partikuletatik babesteko. Sistema kromatografikoaren kontrola eta datuen prozesatzea Empower 2 software-arekin egin da.

Odol-tanten zuloak egiteko, 5,9 mm-ko diametroa duen paper-zulagailu bat erabili da. Analitoen dispartzioaren ikerketan, ordea, 1,2 mm-ko diametroa duen Harris-eko (Micro-punch) zulagailua erabili da gune periferikoa eta zentrala analizatzeko. Analitoen egitura irudikatzen eta banaketa-koefizientea kalkulatzeko, MarvinSketch 14.9.15 programa erabili da. Odol-tanten azalera neurtzeko, AutoCAD 2016 programa erabili da. Esperimentuen emaitzak tratatzeko, Microsoft Excel 2010 eta Unscrambler 9.7 programak erabili dira.

2.3. Disoluzio estandarrak eta odol-laginak

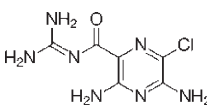
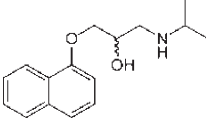
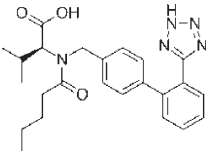
Farmako bakoitzaren gatzaren 1.000 mg/L-ko disoluzioak prestatu dira lehen aipatutako erreaktiboen beharrezko kantitatea metanolean disolbatuz. Horretaz gain, amilorida, propranolol eta valsartan farmakoen 50 mg/L-ko disoluzioa prestatu da metanolean, lanerako disoluzioa lez.

Erabilitako odol-laginak Basurtuko Unibertsitate Ospitaleko (Bilbo, Espainia) hematologiako zerbitzutik lortu dira ikerketa klinikoaren etika batzordearen aginduak jarraituz. Zehazki, hematokritoen balio ezberdina (% 22tik % 55era) duten 15 laginez hornitu gaituzte, lagin horiek hozkailuan, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra kontserbatu dira ikerketa osoan zehar, hezetasunetik babesteko. Lanerako erabili den odol guztia 1 mg/L-eko kontzentrazioarekin dopatu da lanerako disoluzio estandarretik abiatuta.

2.4. Analitoak

Azterketa aurrera eramateko, propietate fisiko-kimiko ezberdinak dituzten farmakoak erabili dira ahalik eta konposatu gehienen eredu izatea izan baita helburua. Aukeratutako farmakoak amilorida, propranolola eta valsartana izan dira. Horien egitura kimikoa eta hainbat propietate 1. taulan ikus daitezke.

1. taula. Amilorida, propranolola eta valsartana. Horien egitura kimikoak, formula molekularrak, pisu molekularrak eta fluoreszentziako kitzikapenen eta igorpenen uhin-luzerak.

Izena	Amilorida	Propranolola	Valsartana
Egitura kimikoa			
Formula molekularra	$\text{C}_6\text{H}_8\text{ClN}_7\text{O}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_2$	$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_3$
Pisu molekularra (g/mol)	229,62	259,34	435,51
Kitzikapenen uhin-luzera (nm)	363	287	237
Igorpenen uhin-luzera (nm)	415	340	371

Aukeratutako hiru analitoak terapia kardiobaskularrean erabiltzen dira. Amilorida pirazinen familiako konposatu diuretiko bat da; bere izaera diuretiko sadioaren absortzioaren inhibizioan oinarritzen da. Propranolola naftalenoen familiako beta blokeatzaile bat da; errezeptore adrenergikoak blokeatzen ditu eta bihotzaren aktibitatea jaisten du. Valsartana, ordea, te-trazolen oinarritzko egitura kimikoa duen konposatua da; Angiotensina II-ren antagonista izanik, odol-hodien estutzearen kontra jokatzen du [21].

2.5. Baldintza kromatografikoak

Bereizketa kromatografikoa aurrera eramateko fase mugikor bezala % 0,01 azido formikoa duen ur-disoluzioa (A fasea) eta azetonitriloa (B fasea) erabili dira. Aplikatutako gradiente hurrengoa izan da: lehenengo, 0,5 minututan konposizioa konstante mantendu da % 1 B fasea erabiliz. Gero, B fasearen konposizioa linealki igo da 3. minutuan % 99 izan arte. Konposizio hori konstante mantendu da 0,5 minutuz eta berriro hasierako konposizioa itzuli da (% 1, B fasea). Sistema minutu bat egonkortzen utzi da hurrengo injekzioa egin aurretik. Fluxua 0,55 mL/min-koa izan da, zutabearen tenperatura 35 °C finkatu da eta laginak 10 °C-tan mantendu dira. Injekzio bolumena 5 µL-koa izan da *Pressure Assisted* injekzio metodoa erabiliz [22]. Detekzioari dagokionez, absortzioa 190-400 nm-ko uhin-luzera tartean neurtu da eta fluoreszentziaren neurketa farmakoen kitzikapenen eta igorpenen uhin-luzerak ($\lambda_{kitz}/\lambda_{ig}$) kontuan hartuz programatu da: 0,00-1,39 min, 363/415 nm; 1,40-1,99 min, 287/340 nm; 2,00-4,50, 237/371 nm.

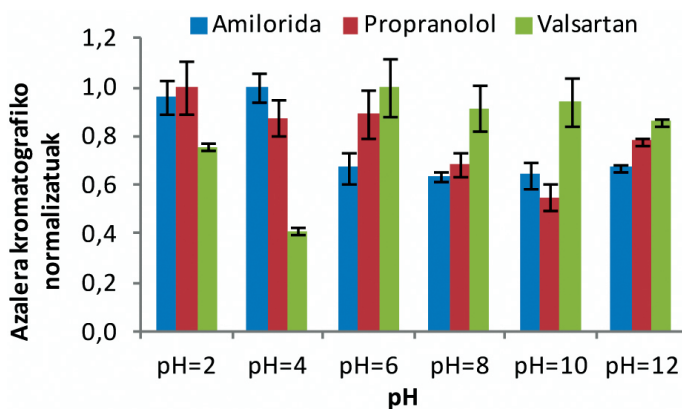
2.6. Erauzketaren optimizazioa

Analitoen banaketan eragina izan dezaketen faktoreak ikasi baino lehen, haien analisia baimentzen duen laginaren tratamendua garatu da. Horretarako lehenengo urratsa OTLa erauzteko erabili den disoluzioaren konposizioa optimizatzea izan da, hau da, disolbatzaile organikoaren eta fase urtsuaren proportzioa eta fase urtsuaren pH-a optimizatu dira. Optimizazio sistematikoari ekin aurretik egindako analisisietan ikusi da azetonitriloa ez dela disolbatzaile organiko egokia analisia oztopatzen duten odol-eko konposatu endogenoak erauzten dituelako. Beraz, metanola hautatu da disolbatzaile organiko bezala, betiere uraren proportzioa % 30etik behera mantenduz, ur-proportzio handiago batekin beste konposatu endogenoak erauzten baitira. Metanolaren proportzio zehatzaren eta fase urtsuaren pH-aren optimizazioa dopatutako odol-tanta osoa hartuz burutu da, analizatu diren lagin guztiek beti analito kantitate berdina izan dutela ziurtatzeko. Ondoren, erauzlearen bolumena optimizatu da; kasu honetan zuloaren bidezko analisia burutu da hartutako laginaren azalerak bolumen egokia baldintzatzen duen ikusteko. Azkenik, ultrasoinuen edo irabiaketaren bidezko erauzketa gauzatu den erabaki da.

2.6.1. Erauzketa-disoluzioaren pH-aren optimizazioa

pH-ak farmakoen polaritatean izan dezakeen eragina kontuan izanda, erauzketan pH-aren eragina aztertzea erabaki da. Horretarako, 100 mM-ko kontzentrazioa duten hainbat pH-tako disoluzio indargetzaileak (pH-aren 2-12 bitarteko balioetakoak: 2, 4, 6, 8, 10 eta 12) prestatu dira. Ondoren, erauzketak egiterako mementoan, metanol:disoluzio indargetzailearen (75:25) 200 μ L erabilia, odol-tantak osotasunean erauzi dira, pH bakoitzeko hiru erreplika eginez.

Erauzketak pH ezberdinetan egitean nabarmendu da honek eragin handia duela analitoen berreskurapenetan. 2. irudian hiru analitoen azalera kromatografiko normalizatuak erakusten dira pH ezberdinetan (normalizazioa analito bakoitzaren kasuan, azalera maximoa eskaini duen pH-aren azalera-rekin egin da interpretazioa errazteko).



2. irudia. Analitoen azalera kromatografiko normalizatuaren emaitzak pH ezberdineko disoluzio indargetzaileekin erauzi ondoren, metanol:disoluzio indargetzailearen (75:25) proportzioan.

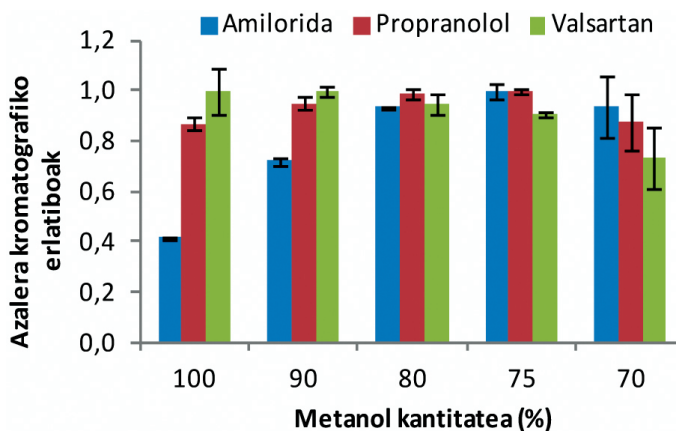
Zenbat eta azidoagoa izan pH-a, orduan eta gehiago erauzten dira amilorida eta propranolola. Valsartanak, ordea, pH basikoagoetan seinale handiagoa erakusten du. Analitoen portaera hori molekulen polaritatearen igoerarekin bat dator, disolbatzaile polarra erabiltzean forma polarren erauzketa hobetzat hartzen bada. Amiloridaren berreskurapena pH = 4tik gora jaisten da bere polaritatea bezala, bere bi talde nitrogenatuen desprotonazioa dela eta. Propranololak ere polaritate jaitsiera nabarmena dauka aminaren desprotonazioaren ondorioz, baina, pH = 12 inguruko polaritatea (eta berreskurapena) arinki igotzen da hidroxidoaren desprotonazioagatik. Valsartanak ordea, erauzketarik baxuena pH = 4 inguruan adierazten du, espezie neutroa nagusia den tartean.

Modu honetan eta hiru analitoen seinale maximoa lortzeko asmoarekin, erauzketa pH = 2ko disoluzio indargetzailearekin (100 mM, azido fosforiko/potasio fosfato) gauzatzea erabaki da.

Hain pH azidoarekin lan egiteak analitoen degradazioa eragin dezakeenez, farmakoen egonkortasuna aztertu da. Horretarako, 5 mg/L-ko disoluzioak prestatu dira pH = 2an eta prestatu bezain laster eta 3 egun pasa ondoren analizatu dira. Ez da gailur kromatografikoen azalaren ezberdintasunik antzeman, ezta degradazio produktuen agerpenik ere nabarmendu. Horrela, pH = 2an analitoak degradatu gabe erauzketa gauzatu daitekeela ondorioztatu da.

2.6.2. Erauzketa-disoluzioaren metanol-kantitatearen hautatzea

Aurretik aipatu den bezala, metanolaren proportzio minimoa % 70ean finkatu da konposatu endogenoen eluzioa ekiditeko. Proportzio optimoa bilatzeko, odol-tanta osoak 200 μ L disoluzioarekin erauzi dira, metanol:disoluzio indargetzailearen (pH = 2) proportzioak aldatuz (70:30, 75:25, 80:20, 90:10, eta 100:0). Bakoitzeko hiru erreplika egin dira.



3. irudia. Analitoen azalera kromatografiko normalizatuaren emaitzak metanol:disoluzio indargetzailearen (pH = 2) proportzio ezberdinekin erauzi ondoren.

Disoluzio urtsu bezala pH = 2ko disoluzio indargetzailea erabilia, metanolaren % 70-% 100 bitarteko kantitateetan egindako erauzketen emaitza normalizatuak 3. irudian ikus daitezke. Emaitza horiek erauzketa disoluzioaren polaritatearekin erlacionatuta dagoela baieztatzen dute. Jakina da uraren polaritatea metanolarena baino altuagoa dela, beraz, bi horien

nahasteetan zenbat eta ur proportzioa altuagoa izan disoluzioa orduan eta polarragoa izango da. Modu horretan, esan daiteke polartasun-igoera horrek duela amiloridaren erauzketan (analito polarrena) eraginik handiena. Propranololaren eta valsartanaren azalerekin, ordea, ez da efektu hori sumatzen metanolarekiko afinitate handiagoa baitute.

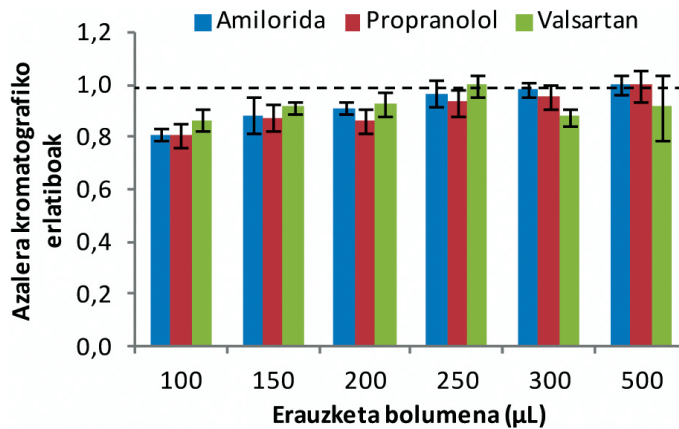
Azalera maximoak metanol:ur (70:30) eta (75:25) proportzioak erakutsi arren, metanol:ur (70:30) proportzioak eskaintzen duen errepikakortasuna txarragoa da, ziur aski % 30eko ur proportzioarekin oraindik lehen aipatu diren eta analisia oztopatzen duten konposatu endogenoetakoren bat erauzten delako. Beraz, proportzio optimoa metanol:ur (75:25) dela ondorioztatu da, azalera kromatografiko maximoak eta errepikakorrenak izan baitira.

2.6.3. *Erauzlearen bolumenaren hautatzea*

Orokorrean, OTLaren teknika aurrera eramateko erabilitako bolumena 100-350 μL -ko tartean dago. Kontuan hartu behar da zenbat eta handiagoa izan bolumena, orduan eta erantzun baxuagoa edukiko dela analitoen diluzioagatik nahiz eta berreskurapena hobetu. Modu berean, bolumen txikiegia erabiltzean posible da disoluzioa asetzea eta berreskurapen baxua lortzea [5, 7, 16, 20]. Horretan guztian oinarrituta 100-500 μL -ko tartea aztertu da. 100 μL -ko, 150 μL -ko, 200 μL -ko, 250 μL -ko, 300 μL -ko eta 500 μL -ko erauzketa-bolumenak erabilia, odol-tantan egindako zuloak analizatu dira. Bakoitzeko hiru erreplika egin dira.

Frogatutako erauzketa bolumen-tarteetan ikusi da zenbat eta bolumen handiagoa erabili, orduan eta seinale baxuagoa lortzen dela analitoen diluzioaren ondorioz. Modu horretan, berreskurapen erlatiboak konparatu ahal izateko, bigarren aldiz normalizatu dira emaitzak bolumen erlazioak erabilia (adibidez, 500 μL -ri dagokion azalera bost aldiz handitu da 100 μL -koarekin konparatzeko). Lortutako emaitzetan oinarrituta (4. irudia) ikus daiteke amiloridaren eta propranololaren kasuetan ez dela erauzketa maximoa lortzen bolumen txikienetan. Valsartanak, ordea, ez du joera hori erakusten; honetan erauzketa konstante mantentzen da.

Emaitza horietan oinarrituta, erauzketan 200 μL -ko disoluzioa erabiltzea erabaki da. Berreskurapen handia lortzen delako sentikortasuna gehiegi gutxitu gabe eta laginaren tratamendu eroso ahalbidetzen delako. Kontuan hartu behar da bolumen txikiekin zulatutako laginaren erauzketa eraginkorra bermatzea zailagoa dela eta ondorioz, laginaren tratamendua luzatzen dela.



4. irudia. Analitoen azalera kromatografiko normalizatuaren emaitzak, bolumen erlazioa kontuan hartuz, erauketa bolumen ezberdinekin erausi ondoren, metanol:disoluzio indargetzaile (pH = 2) (75:25) erabiliz. Puntu-lerroa lortutako berreskurapen maximoari dagokio.

2.6.4. Erauketa-sistemaren hautatzea

Erauketa aurrera eramateko, bi sistema konparatu dira, ultrasoinu-bainua eta irabiagailua (1.200 bira minutuko). Horretarako, OTLean egindako zuloak analizatu dira, 200 µL-ko erauketa-disoluzioa erabiliz, metanol:disoluzio indargetzailearen (pH = 2) (75:25) proportzioan. Bakoitzeko hiru erreplika egin dira, erauketa 20 minutuz egin da eta analizatu aurretik zentrifugatu da.

Emaitzetan oinarrituta sistema biak erabiltzean emaitza konparagarriak % 95eko konfiantza mailarekin lortzen direla ondorioztatu da. Hori horrela izanik, ultrasoinu-bainuarekin lan egitea erabaki da aldi berean lagin kopuru gehiagorekin lan egitea baimentzen duelako.

2.7. Berreskurapenaren kalkulua

Erauketa prozesu baten berreskurapena kalkulatzeko, analizatuko den laginaren kontzentrazio zehatza jakitea beharrezkoa da. OTLaren kasuan zulatu den azaleran dagoen kontzentrazioa ezezaguna denez, berreskurapena kalkulatzeko modurik ohikoena tanta osoa erausztean datza, zuloa erauszteko erabiltzen den erauketa-bolumen berdina erabiliz. Horrela erausziko den laginaren kontzentrazioa (1 mg/L) eta bolumena (25 µL) ezagunak direnez, euskarrian dagoen analito kantitatea kalkulatu daiteke. Jakinda 200 µL erabili direla erauketa prozesuan, eraus-

keta egin ostean disoluzioan egon daitekeen analito kontzentrazio maximoa kalkulatu da (0,125 mg/L). Lortutako erauzkina kontzentrazio hori duen disoluzio estandar batekin konparatuta berreskurapena kalkulatu da.

Nahiz eta azaldutako prozedura onartuena izan, posible da horrela metodoaren benetako berreskurapena ez lortzea. Orokorrean odol-bolumenaren eta erauzketa-disoluzioaren arteko erlazioa analisisian erabiliko dena baino txikiagoa denez, berreskurapena txikiesten da (metodoan zuloa analizatzen da eta berreskurapena kalkulatzeko tanta osoa).

Hori kontuan hartuta, aurreko prozeduraren bidez analitoen berreskurapena txikiesten den aztertzeko tanta osoa erauzi da erauzketa-bolumena 500 μ L-ra arte handiagotuz. Erauzkin horren azken kontzentrazio teorikoa 0,05 mg/L dela kontuan hartuta, estandar batekin konparatu da berreskurapena kalkulatzeko eta aurreko prozedurarekin emaitzak aldaratzeko. Gero, jakinda ohiko analisisetan zulatutako laginarekin lan egiten dela eta ez tanta osoarekin, berreskurapena kalkulatzeko prozedura berria proposatu da. Suposatuz analitoaren banaketa homogenea dela, tanta osoaren eta zuloaren arteko azaleren erlazioa kalkulatu [20] zuloaren azalerari dagokion analito masa kalkulatu da, horretarako bost tanten osoen eta bost zuloen azalera erlazionatuz. Modu horretan zuloa analizatuz lortzen den erauzkinaren seinalea dagokion disoluzio estandarraren seinalearekin (0,049 mg/L) konparatuta berreskurapena kalkulatu da. Proposatutako hiru metodo horiek hiru odol-tantekin gauzatu dira; lortutako berreskurapenak 2. taulan bildu dira.

Tanta osoarekin burututako analisisetan ikus daiteke 500 μ L-ko erauzketa-bolumena erabiltzean, amiloridarentzat eta propranololarentzat berreskurapen balio altuagoak lortzen direla (2. taulan emaitzak ikus daitezke). Hau 200 μ L erabiltzean disoluzioa asetzen den seinale izan daiteke. Hori ikusita, orokorrean OTLaren berreskurapena kalkulatzeko erabilitako metodologiak analito batzuetan behintzat benetako berreskurapena ez duela eskainiko ondorioztatu da.

2. taula. Berreskurapenean lortutako emaitzen konfiantza tartea, tanta osoa bolumen ezberdinekin erauztean eta zuloa erauztean.

Berreskurapena	Tanta osoa (%)		Zuloa (%)
	200 μ L	500 μ L	200 μ L
Erauzketa bolumena	200 μ L	500 μ L	200 μ L
Amilorida	60 \pm 2	70 \pm 1	95 \pm 3
Propranolola	77 \pm 3	88 \pm 2	85 \pm 7
Valsartana	65 \pm 4	69 \pm 2	67 \pm 3

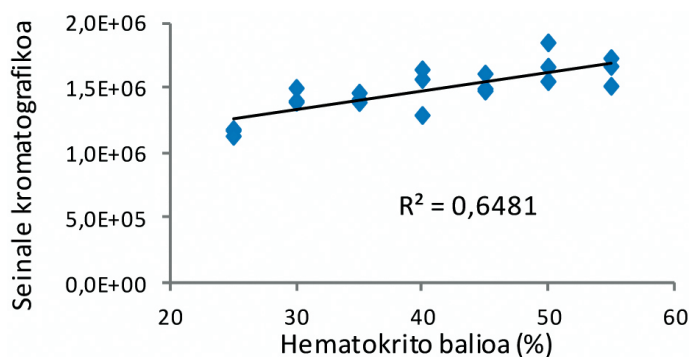
Benetako berreskurapena kalkulatzeko asmoarekin analisisa baldintza normaletan burutu denean, zuloaren eta tantaren arteko azalera erlazioak kontuan hartu dira. Propranololarentzat eta valsartanarentzat konparagariak dira $500 \mu\text{L}$ -rekin erauzitako tanta osorako lortzen diren emaitzak, erauzketa eraginkorra den seinale. Amiloridarekin, ordea, berreskurapen nabarmenki altuagoa lortzen da. Kontuan izan behar da berreskurapena kalkulatzeko analitoen banaketa homogeneoa auresuposatu dela. Gerta liteke amilorida tantan zehar homogeneoki ez dispersatzea barnealdean kontzentratuz. Horrela, odol-tantaren zulaketa erdialdean egin denez, amilorida kantitatea altuagoa izan da eta horregatik espero izan den berreskurapena baino balio altuagoa lortu da. Hain zuzen ere, hau izan da analitoen banaketa heterogeneoaren lehenengo seinalea eta banaketa baldintzatzen duten faktoreen azterketan eragin duena.

2.8. Hematokritoaren eta lagin-bolumenaren eraginaren azterketa OTLaren analisisan

Jakinda populazioaren hematokritoen balio arruntak % 36-50 tartean daudela [23], ikerketa egin da hematokritoen balioen % 25-55 bitarteko hurrengo mailak aztertuz: % 25, % 30, % 35, % 40, % 45, % 50 eta % 55. Euskarrian gehitutako lagin-bolumenak ere analitoen dispersioan eragina izan dezakeenez [19, 24], hematokrito maila bakoitzeko hiru bolumen ezberdin ($15 \mu\text{L}$, $25 \mu\text{L}$ eta $35 \mu\text{L}$) ikertu dira eta bakoitzeko hiru erreplika egin dira.

Bi aldagaietako ANOVA analisiaren bidez eta % 95eko konfiantza mailarekin nabarmendu da, amiloridarentzat eta propranololarentzat hematokritoak eragina duela, lagin-bolumenak aldiz, ez. Valsartanaren kasuan bi aldagaiek eragin esanguratsua dutela ikusi da, hematokritoaren eragina askoz nabarmenagoa izanik.

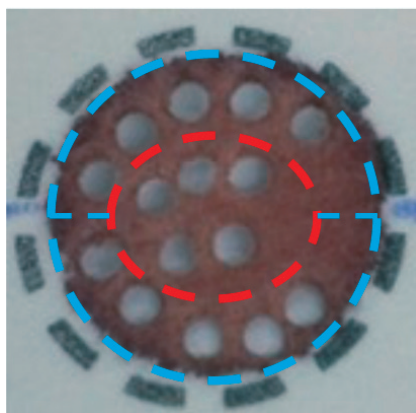
Hematokritoak eragina izan duela ikusirik, aldagai hau bakarka sakonago ikasi da analito ezberdinentzat. Hematokritoak lortutako seinalean duen eragina argi ikus daiteke 5. irudian. Bertan propranololaren azalera kromatografikoa hematokrito balioarekin igotzen dela erakusten da. Analito guztientzat hiru bolumenetan, muturretako hematokrito balioen emaitzen artean ezberdintasunik dagoen aztertu da t frogaren bidez (% 95eko konfiantza mailarekin). Orokorrean baieztatu da analitoaren erantzuna hematokritoaren ehunekoarekin batera igotzen dela. Horrek logikoa dirudi tantaren tamaina hematokritoarekin txikitzen dela kontuan hartuta; ondorioz, diametro berbereko zulo baterako analizatzen den odol kantitatea handiagoa da.



5. irudia. Hematokritoaren balio ezberdinetarako 15 μ L-ko tantaren propranololaren analisisen seinale kromatografikoak.

2.9. Zuloaren kokapenaren eragina

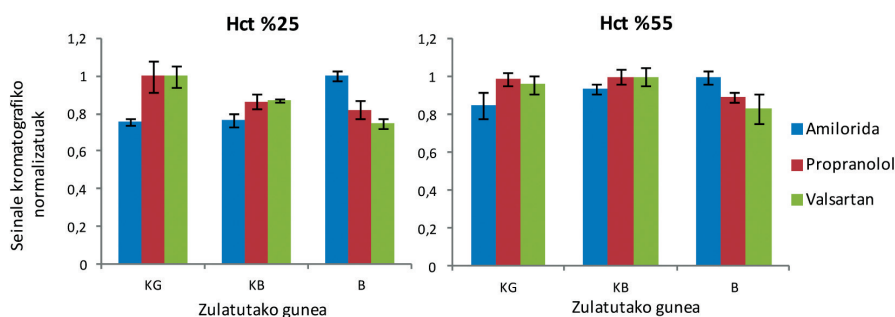
Erakutsi den bezala, analitoen dispersioa heterogeneoa gerta daiteke odol-tantan zehar [15]. Alde batetik posible da hori gertatzea odola, berez, euskarrian homogeneoki ez delako banatu eta euskarriak malda txiki bat duelako (ikusi 1. irudia). Bestetik, egile batzuek ikusi duten bezala, analitoek euskarriarekiko eta odolarekiko duten afinitatearen ezberdintasuna dela eta, euskarrian zehar bereizketa kromatografikoa gerta daiteke [10]. Horren ondorioz, analito bakoitzak dispersio ezberdina izan ahal du. Hori kontuan izanda, analizatutako zuloaren kokapenaren araberako emaitza kuantitatiboak asko alda daitezke.



6. irudia. Odol-tantan zulatutako gune ezberdinak. Urdinez periferikoa (kanpoko goialdea eta kanpoko behealdea, banatuz) eta gorritz barnealdea.

Analitoen dispersioa aztertzeko odol-tantak hiru gunetan banatu dira goiko aldea, behekoa eta barnealdea; kasu honetan, gainera, odol-tantak zultzeko 1,2 mm-ko diametroa duen zulagailua erabili da (guneak 6. irudian ikus daitezkeen bezala banatu dira). Halaber, sentsibilitate arazoak ez edukitzeko kalkulatu da orain arte erabilitako zuloaren eta 1,2 mm-ko diametroa duen zuloaren azalaren arteko erlazioa. Modu horretan ondorioztatu da 17 zulo txiki behar direla antzeko intentsitate kromatografikoa lortzeko. Analisia egiteko, muturreko hematokritoaren balioak (% 25 eta % 55) dituzten odol-laginak erabili dira, bakoitzeko 35 μ L-ko bederatzita tanta behar izan dira. Erreplika bakoitzeko 15 zulo txiki erabili dira (5 zulo txiki eginez hiru tanta ezberdinetan); hiru erreplika egin dira.

% 25 eta % 55 bitarteko hematokritoaren odol-laginen hiru gune ezberdinak (goiko aldea, beheko aldea eta barneko aldea) konparatu dira hiru farmakoentzat. Lortutako emaitza normalizatuak 7. irudian erakusten dira.



7. irudia. Odol-tantaren kanpoko eta barneko guneen konparaketaren analisiaren azalera kromatografiko normalizatuak (KG = kanpoko goialdea, B = barnealdea, KB = kanpoko behealdea).

Emaitzetan oinarrituz eta F froga aplikatuz % 95eko konfiantza mailan, esan daiteke guneetan zehar bariantzaren ezberdintasun esanguratsurik ez dagoela, eta ondorioz, errepikakortasuna konparagarria dela odol-tantaren gune ezberdinetan. Ondoren, t froga egitean (% 95eko konfiantza mailan), bi joera ezberdin ikusi dira ikertutako analitoetan. Alde batetik, amiloridak kontzentrazio altuagoa erakutsi du OTLaren gune zentrolean, ezberdintasun hau hematokrito baxuko analisisetan nabarmenagoa izanik. Bestetik, propranololaren eta valsartanaren dispersioa guztiz kontrakoa izan da; ikusi da gune periferikoan azaltzen duten kontzentrazioa barnealdekoa baino altuagoa dela.

Modu horretan, jokaera hori bibliografian aurkitutako informazioarekin bat datorrela ikusi da, non bi dispersio posible proposatu diren: gune

zentraletik periferikorantz kontzentrazioaren jaitsiera nabarmentzea (amilorida) edo alde periferikoan kontzentrazio altuagoa azaltzea, sumendiefektua deritzona (propranolola eta valsartana). Egile batzuek portaera hau euskarriarekiko afinitatearen ondorioa dela defendatzen dute [10, 15]. Horren arabera, gerta daiteke amilorida analito polarrena izanda euskarriarekin elkarrekintza sendoagoak sortzea eta, ondorioz, gutxiago dispersatzea (paper-kromatografian gertatuko litzatekeen moduan).

3. ONDORIOAK

Lan honetan, OTLaren laginketa-teknikak farmakoen analisi kuantitativa aplikatzerako orduan hainbat ahulgune dituela baieztatu da. Alde batetik frogatu da analito kontzentrazio berbera baina hematokritoaren balio ezberdina duten laginek seinale ezberdina eskaintzen dutela. Portaera hori odol-tantaren azalera ezberdintasunarekin lotu da. Beste alde batetik, ikusi da analitoen dispersio heterogeneoa dela eta, analisia gauzatzeko zuloaren kokapena funtsezko aldagaia dela analisi kuantitatiboaren ikuspuntutik. Gainera, dispersio hori ezberdina (eta auresanezina) denez analitoaren arabera, konposatu anitzen aldebereko analisia gauzatzeko oztopo handia bihurtzen da.

Arazo horiek saihesteko, zuloaren bidezko analisia burutu ordez odol-tanta osoa analizatzea aukera bat izan daiteke, modu horretan euskarrian ipini den tantan dagoen analito kantitate osoa hartuko bailitzateke. Hala ere, modu horretan kontzentrazioa kalkulatzeko ipinitako odol-tantaren bolumena ezagutzea ezinbestekoa da. Argi dago hori ez dela arazoa mikropipeten bidez laborategian prestatutako laginentzat, baina izugarri zailduko luke laginketa bolumena neurtu gabe euskarrian ipintzen denean, hala nola ospitaleetako jaioberrien laginak hartzean edo 3. munduko biztanleen odola eskuratu nahi denean. Beraz, laginketa egiteko erraztasuna izanik OTLaren teknikaren abantaila garrantzitsuenetarikoa ezin da baztertu zuloen bidezko analisia eta arretaz aztertu behar da metodo kuantitatibo fidagarriagoak garatzeko helburuarekin.

4. ESKER ONAK

Egileek Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioaren (CTQ 2013-46179-R proiektua), Euskal Herriko Unibertsitatearen (UFI 11/23) eta Eusko Jaurlaritzaren (IT 789/13 proiektua) diru-laguntzak eskertu nahi dituzte. Era berean, Basurtuko Unibertsitate Ospitaleko hematologiako zerbituari eskerrak eman nahi dizkiote odol-laginen hornikuntzagatik.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] DEMIREV, P.A. 2013. «Dried blood spots: analysis and applications». *Analytical chemistry*, **85**(2), 779-89.
- [2] ODOARDI, S., ANZILLOTTI, L. and STRANO-ROSSI, S. 2014. «Simplifying sample pretreatment: application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC-MS/MS analysis of drugs of abuse». *Forensic science international*, **243**, 61-7.
- [3] LI, W. and TSE, F.L. 2010. «Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules». *Biomedical chromatography: BMC*, **24**(1), 49-65.
- [4] TRETZEL, L., THOMAS, A., GEYER, H., GMEINER, G., FORSDAHL, G., POP, V., SCHANZER, W. and THEVIS, M. 2014. «Use of dried blood spots in doping control analysis of anabolic steroid esters». *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **96**, 21-30.
- [5] BERM, E.J., PAARDEKOOPEER, J., BRUMMEL-MULDER, E., HAK, E., WILFFERT, B. and MARING, J.G. 2015. «A simple dried blood spot method for therapeutic drug monitoring of the tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline, imipramine, clomipramine, and their active metabolites using LC-MS/MS». *Talanta*, **134**, 165-72.
- [6] HAWWA, A.F., ALBAWAB, A., ROONEY, M., WEDDERBURN, L.R., BERESFORD, M.W. and MCELNAY, J.C. 2014. «A novel dried blood spot-LCMS method for the quantification of methotrexate polyglutamates as a potential marker for methotrexate use in children». *PLoS one*, **9**(2), e89908.
- [7] CVAN TROBEC, K., TRONTELJ, J., SPRINGER, J., LAINSCAK, M. and KEREC KOS, M. 2014. «Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of bisoprolol, ramiprilat, propranolol and midazolam in rat dried blood spots». *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **958**, 29-35.
- [8] VILLANELLI, F., GIOCALIERE, E., MALVAGIA, S., ROSATI, A., FORNI, G., FUNGHINI, S., SHOKRY, E., OMBRONE, D., DELLA BONA, M.L., GUERRINI, R. and LA MARCA, G. 2015. «Dried blood spot assay for the quantification of phenytoin using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry». *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **440**, 31-5.
- [9] COX, H.D., RAMPTON, J. and EICHNER, D. 2013. «Quantification of insulin-like growth factor-1 in dried blood spots for detection of growth hormone abuse in sport». *Analytical and bioanalytical chemistry*, **405**(6), 1949-58.
- [10] LI, W. and LEE, M.S. 2014. *Dried Blood Spots: Applications and Techniques*. Wiley.
- [11] DEGLON, J., THOMAS, A., MANGIN, P. and STAUB, C. 2012. «Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: concepts and biomedical applications». *Analytical and bioanalytical chemistry*, **402**(8), 2485-98.

- [12] EDELBROEK, P.M., VAN DER HEIJDEN, J. and STOLK, L.M. 2009. «Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls». *Therapeutic drug monitoring*, **31**(3), 327-36.
- [13] DE KESEL, P.M., CAPIAU, S., LAMBERT, W.E. and STOVE, C.P. 2014. «Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis». *Bioanalysis*, **6**(14), 1871-4.
- [14] CAPIAU, S., STOVE, V.V., LAMBERT, W.E. and STOVE, C.P. 2013. «Prediction of the hematocrit of dried blood spots via potassium measurement on a routine clinical chemistry analyzer». *Analytical chemistry*, **85**(1), 404-10.
- [15] COBB, Z., DE VRIES, R., SPOONER, N., WILLIAMS, S., STAELENS, L., DOIG, M., BROADHURST, R., BARFIELD, M., VAN DE MERBEL, N., SCHMID, B., SIETHOFF, C., ORTIZ, J., VERHEIJ, E., VAN BAAR, B., WHITE, S. and TIMMERMAN, P. 2013. «In-depth study of homogeneity in DBS using two different techniques: results from the EBF DBS-microsampling consortium». *Bioanalysis*, **5**(17), 2161-9.
- [16] SVENSSON, L.D., SENNBRO, C.J., SVANSTROM, C. and HANSSON, G.P. 2015. «Applying dried blood spot sampling with LCMS quantification in the clinical development phase of tasquinimod». *Bioanalysis*, **7**(2), 179-91.
- [17] WILHELM, A.J., DEN BURGER, J.C., VOS, R.M., CHAHBOUNI, A. and SINJEWEL, A. 2009. «Analysis of cyclosporin A in dried blood spots using liquid chromatography tandem mass spectrometry». *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **877**(14-15), 1595-8.
- [18] LI, Y., HENION, J., ABBOTT, R. and WANG, P. 2012. «The use of a membrane filtration device to form dried plasma spots for the quantitative determination of guanfacine in whole blood». *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, **26**(10), 1208-12.
- [19] TER HEINE, R., ROSING, H., VAN GORP, E.C., MULDER, J.W., VAN DER STEEG, W.A., BEIJNEN, J.H. and HUITEMA, A.D. 2008. «Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry». *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **867**(2), 205-12.
- [20] VU, D.H., KOSTER, R.A., ALFFENAAR, J.W., BROUWERS, J.R. and UGES, D.R. 2011. «Determination of moxifloxacin in dried blood spots using LC-MS/MS and the impact of the hematocrit and blood volume». *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **879**(15-16), 1063-70.
- [21] DrugBank [Kontsultatua: 10/07/2015]; Erabilgarri: <http://www.drugbank.ca/>.
- [22] WIKLUND, T. Acquity UPLC Injection Techniques Fixed Loop and Flow through Needle [Kontsultatua: 13/07/2015]; Erabilgarri: <https://www.waters.com>.

com/webassets/cms/library/docs/local_seminar_presentations/DA_NUT2013_G4_Tony_Wiklund.pdf.

- [23] BACCELLS, A. 1989. *La clinica y el laboratorio*. Salvat.
- [24] DAMEN, C.W., ROSING, H., SCHELLENS, J.H. and BEIJNEN, J.H. 2009. «Application of dried blood spots combined with high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of vincristine and actinomycin-D». *Analytical and bioanalytical chemistry*, **394**(4), 1171-82.