

НАСТАВНО–НАУЧНОМ ВЕЋУ
ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На седници Наставно–научног већа Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, одржаној 26. фебруара 2015. године, на основу члана 94. Статута Фармацеутског факултета у Београду, донета је одлука о именовану Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под насловом: *Биоаналитика антиепилептика цвитерјонске структуре након дериватизације п-алкилхлороформатима применом течне хроматографије с масеном детекцијом*, кандидата дипл. фарм. НАЂЕ КОСТИЋ.

Израда ове докторске дисертације одобрена је на 23. седници Већа научних области медицинских наука Универзитета у Београду, одржаној 24. септембра 2013. године.

Комисија у саставу:

Др АНЂЕЛИЈА МАЛЕНОВИЋ, ванредни професор, ментор
Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду

Др НЕБОЈША ЈОВИЋ, редовни професор, ментор
Медицински факултет, Универзитет у Београду

Dr YANNIS DOTSİKAS, доцент
Фармацеутски факултет, Универзитет у Атини

прочитала је завршену докторску дисертацију, прегледала комплетну документацију и подноси следећи ИЗВЕШТАЈ.

Београд,
26. април 2015.

Др Анђелија Маленовић, ванредни професор, ментор

Др Небојша Јовић, редовни професор, ментор

ИЗВЕШТАЈ

А. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација под насловом *Биоаналитика антиепилептика цвитерјонске структуре након дериватизације п-алкилхлороформатима применом течне хроматографије с масеном детекцијом* написана је на 212 страна, формата А4, уз кратак *Резиме* на српском и енглеском језику. Садржи 6 поглавља: *Увод, Циљ рада, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак и Литература*. Садржи 46 слика, 30 табела, 250 литературних навода, као и списак објављених научних радова и саопштења који представљају публиковане резултате из ове дисертације.

Поглавље *Увод (Анализа лекова у узорцима биолошког материјала, Епилепсија, Масена спектрометрија, Дериватизација анализата и Аналитика цвитерјонских антиепилептика)* написано је на 68 страна.

У првом делу описане су специфичности анализе лекова у узорцима биолошког материјала, које обухватају избор одговарајућег матрикса, начин прикупљања узорака, њихов транспорт, складиштење, екстракцију анализата и, на крају, валидацију саме методе. Посебна пажња посвећена је алтернативним начинима прикупљања узорака, у облику осушене капи матрикса (енг. *Dried Matrix Spots, DMS*). Истакнуте су бројне предности оваквог начина прикупљања узорака, али и главни изазови са којима се аналитичари суочавају, пре свега приликом анализе осушених капи крви (енг. *Dried Blood Spots, DBS*).

Наредно поглавље *Увода* посвећено је епилепсији, као најчешћој озбиљној неуролошкој болести. Приказана је подела епилепсија према етиологији, као једном од кључних клиничких параметара. Такође је дата и историја класификације епилептичких напада, као израз систематизације актуелних знања о епилепсијама. Описани су механизми дејства антиепилептичких лекова, са посебним акцентом на цвитерјонске антиепилептике, вигабатрин, прегабалин и габапентин. Наведене су

њихове физичко-хемијске особине, фармакокинетичке особине, нежељена дејства, као и клинички значај.

У делу који се односи на масену спектрометрију приказане су основе ове, данас незаменљиве, инструменталне технике. У комбинацији са течном хроматографијом, омогућена је квалитативна и квантитативна анализа различитих једињења, као што су протеини, пептиди, угљени-хидрати, ДНК, лекови и други биолошки важни молекули. Описане су постојеће методе јонизације, пре свега електроспреј јонизација (енг. *Electrospray Ionisation*, ESI). Такође су представљени и различити типови масених анализатора, а детаљно је описан анализатор типа троструког квадрупола и различити режими његовог рада: скенирање продукт јона (енг. *Product Ion Scan*), скенирање јона прекурсора (енг. *Precursor Ion Scan*), скенирање неутралног губитка (енг. *Neutral Loss Scan*) и праћење одабраног фрагмента или праћење вишеструке фрагментације (енг. *Selected Reaction Monitoring*, SRM или *Multiple Reaction Monitoring*, MRM). Укратко су описани различити типови детектора јона.

Део *Увода* који се односи на дериватизацију истиче специфичне предности хемијске модификације анализата. Иако ова процедура у течној хроматографији – масеној спектрометрији најчешће није неопходна, у случају анализе одабраних цвитерјонских антиепилептика мора да се примени како би се блокирала једна врста наелектрисања, или додало перманентно наелектрисање. Посебно су описани хлороформати, као готово идеални дериватизациони реагенси, пре свега због једноставности процедуре, брзине реакције, минималне количине реагенса ниске цене и могућности извођења реакције у воденом медијуму биолошког материјала.

Последњи део *Увода* посвећен је аналитици цвитерјонских антиепилептика у узорцима биолошког материјала применом течне хроматографије – тандем масене спектрометрије. Дат је детаљан преглед литературе о методама које су постављене за квантификацију сваког антиепилептика понаособ, али и за њихове комбинације.

Поглавље *Циљ рада* написано је на једној страни. У овом делу наводи се основни циљ ове докторске дисертације а то је развој метода за анализу

цвистерјонских антиепилептика у узорцима биолошког материјала. Како би се остварио постављени циљ, истраживање је подељено у три фазе. У првој фази планирано је проучавање утицаја различитих реагенаса за дериватизацију на одговор испитиваних анализата у систему течна хроматографија – електроспреј јонизација – тандем масена спектрометрија (LC–ESI–MS/MS). Као реагенаси за дериватизацију одабране су различите комбинације парова *n*-алкилхороформата (метил-, етил-, пропил- и бутилхороформат) и *n*-алкохола (метанол, етанол, пропанол и бутанол). Након одабира најбољег дериватизационог сета, друга фаза имала је за циљ систематично унапређење параметара масеног спектрометра, као и параметара методе течне хроматографије, применом *one-factor-at-a-time* приступа и Бокс–Бенкен експерименталног дизајна. У завршној фази планирано је да се потврди применљивост предложених LC–MS/MS метода за анализу садржаја цвистерјонских антиепилептика из течних узорака плазме, вигабатрина из осушених капи плазме (енг. *Dried Plasma Spots*, DPS) и прегабалина из осушених капи крви (DBS) и осушених капи плазме (DPS), под добијеним оптималним условима. Узорци плазме и крви добијени су од пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду. Пацијенти су били на терапији комерцијално доступним фармацеутским облицима вигабатрина, односно прегабалина.

Поглавље *Експериментални део* написано је на 28 страна. У оквиру овог дела приказани су апарати, реагенси, лабораторијски прибор, стандардне супстанце и примењени компјутерски програми. Наведен је начин прикупљања узорака осушених капи плазме и крви, од здравих добровољаца и пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду.

Детаљно је описан протокол дериватизације и наведени су услови методе течне хроматографије и параметри масене спектрометрије под којима су се изводили експерименти са циљем одабира најбољег дериватизационог сета.

У делу који се односи на оптимизацију параметара масеног спектрометра и методе течне хроматографије приказана је систематична стратегија унапређења одговора анализата, варирањем одабраних параметара у нивоима дефинисаним

применом *one-factor-at-a-time* приступа, као и експерименталног дизајна (фракциони факторски дизајн 2^{5-1} са три репликације у централној тачки и Бокс–Бенкен експериментални дизајн са дванаест експеримената и три репликације у централној тачки).

На крају *Експерименталног дела*, дат је детаљан опис извођења валидације биоаналитичких метода за одређивање одабраних антиепилептика у узорцима плазме, као и за одређивање вигабатрина из DPS, односно за одређивање прегабалина из DBS и DPS.

Поглавље *Резултати и дискусија* написано је на 81 страна. У овом поглављу приказани су сви добијени резултати експерименталних истраживања кроз 26 табела и 24 слике. Дата је детаљна дискусија резултата уз теоријску и литературну подршку. Детаљније о овом поглављу у делу Б овог Извештаја.

Поглавље *Закључак* написано је на 3 стране и садржи све закључке у складу са постављеним циљевима.

Поглавље *Литература* написано је на 30 страна и садржи 250 библиографских јединица.

Б. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У првом делу *Резултата и дискусије* приказано је испитивање утицаја различитих комбинација парова *n*-алкилхороформата (метил-, етил-, пропил- и бутилхороформат) и *n*-алкохола (метанол, етанол, пропанол и бутанол) као реагенса за дериватизацију одабраних цвтерјонских антиепилептика. У LC–ESI–MS/MS систему, 48 деривата вигабатрина, прегабалина и габапентина, по 16 за сваки лек, испитано је у погледу ретенционог времена, MS/MS сигнала деривата, лимита детекције и приноса споредне реакције. Такође су испитани различити органски растварачи, коришћени за течно-течну екстракцију новонасталих деривата (етил-

ацетат, ди-изо-пропилетар и *n*-хексан). Примећено је да се коришћењем дериватизационих сетова дужих *n*-алкил низова ретенционо време продужавало, а сигнал појачавао, због ефикасније електроспреј јонизације. Вредност лимита детекције се последично константно смањивала до тренутка када се са даљим продужењем алкил низа, услед превелике липофиности деривата, јавило ширење пикова, што се одразило на смањење осетљивости. Избор растварача за екстракцију није утицао на редослед рангирања сигнала, док су се деривати са мањим алкил радикалима ефикасније екстраховали коришћењем релативно поларних растварача који се не мешају са водом. Од испитиваних растварача, етил-ацетат се показао као најбољи за екстракцију свих деривата одабраних антиепилептика. Принос споредне реакције дериватизације углавном је био мањи од 10 %. Дериватизациони сет *n*-пропилхлороформат/*n*-пропанол изабран је за наставак истраживања зато што обезбеђује постизање најбоље осетљивости уз прихватљиво време трајања анализе. Резултати су објављени у: *N. Kostić, Y. Dotsikas, A. Malenović, M. Medenica, Effects of derivatization reagents consisting of n-alkyl chloroformate/n-alcohol combinations in LC–ESI–MS/MS analysis of zwitterionic antiepileptic drugs, Talanta 116 (2013) 91–99 (M21).*

Други део *Резултата и дискусије* приказује систематично унапређење параметара масеног спектрометра, као и параметара методе течне хроматографије. Иако већина истраживача изводи основну оптимизацију MS параметара, најчешће процесом ауто-подешавања, помоћу софтвера за оптимизацију обезбеђеног од стране самог произвођача, додатна оптимизација MS параметара показала се као неопходна за постизање веће осетљивости. Спроведено је детаљно испитивање фактора са потенцијалним утицајем на сигнал, извођењем више оптимизационих процедура, почевши од прелиминарних експеримената, до постављања коначних услова. На крају сваког корака, одабране су вредности одговарајућих параметара, и процењено постигнуто унапређење. На основу прелиминарних подешавања масеног спектрометра, добијених ауто-подешавањем, дефинисани су почетни хроматографски услови, након чега је уследила процена матрикс ефекта на временима елуирања анализата. У наредном кораку извршено је поређење сигнала и односа сигнал – шум за хроматограме добијене праћењем једне, односно две SRM

транзиције по аналиту. За даље експерименте одабрана је метода са две SRM транзиције, зато што омогућава достизање нижих вредности за лимит квантификације. Применом *one-factor-at-a-time* приступа процењен је утицај ширине скенирања и времена скенирања, на седам нивоа, почевши од подразумеваних, унапред препоручених вредности. Резултати ових експеримената показали су да није било статистички значајне разлике када су вариране вредности за ширину скенирања, док се време скенирања показало као изузетно значајно, нарочито за облик пика. На сигнал испитиваних анализа значајан утицај је имала и геометрија јонског извора, пре свега V-растојање. Параметри јонског извора са значајним утицајем на MS одговор идентификовани су кроз скрининг експерименте, применом фракционог факторског дизајна. Од пет испитиваних фактора, као значајни показали су се температура трансфер капиларе, притисак носећег гаса и притисак помоћног гаса. Оптимизација ових параметара, као и оптимизација параметара методе течне хроматографије (садржај ацетонитрила у мобилној фази, садржај мравље киселине у воденој фази и брзина протока мобилне фазе) изведена је применом Бокс–Бенкен дизајна. Методологија површине одговора (енг. *Response Surface Methodology, RSM*) и Дерингерова функција пожељних одговора (енг. *Derringer Desirability Function*) коришћени су за процену утицаја испитиваних параметара и за дефинисање оптималних услова. Параметри који су испитани на нивоу колизионе ћелије су колизиони притисак и колизионе енергије. Последњи испитивани параметар било је временско сегментирање хроматограма и поређење односа сигнал – шум за сегментирану и несегментирану методу уз закључак да се временским сегментирањем заиста повећала осетљивост предложене методе. Резултат овог обимног поступка оптимизације био је постизање значајног повећања MS сигнала, чиме су омогућени развој и валидација веома осетљивих биоаналитичких метода за одређивање одабраних антиепилептика у биолошком материјалу. На крају овог дела истраживања, парцијално је валидирана метода за одређивање цвистерјонских антиепилептика из плазме, проценом селективности, линеарности, тачности и прецизности, као и матрикс ефекта. Резултати су објављени у: *N. Kostić, Y. Dotsikas, A. Malenović, B. Jančić–Stojanović, T. Rakić, D. Ivanović, M. Medenica, Stepwise*

optimization approach for improving LC–MS/MS analysis of zwitterionic antiepileptic drugs with implementation of experimental design, J. Mass Spectrom. 48 (2013) 875–884 (M21).

У наредном делу *Резултата и дискусије* приказана је валидација методе за одређивање вигабатрина из осушених капи плазме. Од параметара су испитани селективност, линеарност, тачност и прецизност, појава сигнала анализата заосталог из претходно анализираних узорка, принос екстракције и матрикс ефекат, стабилност, реанализа узорака и тест разблажења. Приликом тестирања линеарности, детаљно је објашњен избор одговарајућег тежинског фактора и његов значај за добијање резултата у оквиру дозвољених одступања. Сви добијени резултати били су у складу са захтевима смерница за валидацију биоаналитичких метода. На крају, постављена и валидирана метода примењена је за анализу 12 узорака добијених од пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду. Концентрација вигабатрина у прикупљеним узорцима одређивана је два сата након последњег дозирања када се у крви достиже максимална концентрација. У једном случају (S02), примећено је и непоштовање комплијансе, јер је измерена концентрација вигабатрина одговарала равнотежним нивоима лека, постигнутим пре примене нове дозе. Резултати су објављени у: *N. Kostić, Y. Dotsikas, N. Jović, G. Stevanović, A. Malenović, M. Medenica, Vigabatrin in dried plasma spots: Validation of a novel LC–MS/MS method and application to clinical practice, J. Chromatogr. B 962 (2014) 102–108 (M21).*

Последњи део *Резултата и дискусије* односи се на валидацију метода за одређивање прегабалина из осушених капи крви и осушених капи плазме. Осушене капи матрикса, а пре свега осушене капи крви, представљају актуелни тренд у прикупљању узорака за биоаналитичка истраживања о чему сведочи и константни раст броја публикација на ову тему. Главно питање које се аналитичарима поставља јесте да ли DBS могу да замене плазму као стандардни матрикс? Из тог разлога, пожељно је развијати методе погодне за одређивање концентрације лека и у крви и у плазми, јер доприносе процени односа концентрација између ова два матрикса, а то свакако представља први корак у замени узорака плазме са DBS. Резултати овог дела

докторске дисертације приказују први покушај да се корелишу нивои прегабалина у DBS и DPS, а на основу две валидиране методе у одговарајућем опсегу концентрација. За обе методе тестирани су следећи валидациони параметри: селективност, линеарност, тачност и прецизност, појава сигнала анализата заосталог из претходно анализираних узорка, принос екстракције и матрикс ефекат, стабилност, реанализа узорка, тест разблажења и хомогеност осушених капи. Добијени резултати били су у складу са захтевима смерница за валидацију биоаналитичких метода. На крају, обе методе примењене су за анализу 12 узорка добијених од пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду. Концентрација прегабалина у прикупљеним узорцима одређивана је сат времена након последњег дозирања, када се у крви достиже максимална концентрација. Како би се превазишао ефекат хематокрита, а који за последицу има различито ширење крви нанете на картицу за прикупљање узорка, предложено је множење првобитно добијених вредности корекционим фактором. Поређење резултата добијених два метода извршено је коришћењем Бланд–Алтман теста, уз закључак да су методе компарабилне, с обзиром да су разлике између концентрација добијених анализом DBS и DPS за скоро све пацијенте (осим једног) биле у интервалу поузданости од 95 %. Однос концентрације прегабалина између крви и плазме указао је на делимичну дистрибуцију прегабалина у еритроците. Резултати су објављени у: *N. Kostić, Y. Dotsikas, N. Jović, G. Stevanović, A. Malenović, M. Medenica, Quantitation of pregabalin in dried blood spots and dried plasma spots by validated LC–MS/MS methods, J. Pharmaceut. Biomed. 109 (2015) 79–84 (M21).*

В. УПОРЕДНА АНАЛИЗА СА РЕЗУЛТАТИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Прегледом литературе, утврђено је да цвтерјонски антиепилептици, који су изучавани у овој докторској дисертацији након дериватизације *n*-алкилхороформатима применом течне хроматографије с масеном детекцијом, нису били предмет досадашњих истраживања.

Такође, алтернативне методе прикупљања узорака у облику осушених капи матрикса данас представљају веома атрактиван приступ у биоаналитици, али су до сада коришћене једино за квантитативну анализу габапентина и то коришћењем DPS [1, 2]. За одређивање вигабатрина у узорцима биолошког материјала описана је једна LC–MS/MS метода, базирана на преципитацији протеина и без реакције дериватизације [3]. Прегабалин је такође одређиван применом LC–MS/MS метода припремом узорака која се базирала на преципитацији протеина и директном анализом [4–6]. Прегледом литературе за габапентин, нађена је само једна LC–MS/MS метода за анализу узорака прикупљених у форми DPS, али је за дериватизацију коришћен *n*-бутанол у присуству хлоридне киселине [1]. Што се истовремене анализе одабраних антиепилептика тиче, описана је LC–MS/MS метода за њихово одређивање у серуму [7], затим UPLC–MS/MS метода за одређивање вигабатрина и прегабалина у смеси са других 20 антиепилептика [8], као и једна HILIC–ESI–MS/MS метода, намењена за одређивање цвитерјонских антиепилептика у хуманом серуму [9]. Као што се може закључити, већина до сада публикованих LC–MS/MS метода постављена је за директну квантификацију анализата. Иако је припрема узорака на овај начин знатно бржа и једноставнија, има за последицу добијање не тако чистих екстраката и неадекватно задржавање недериватизованих анализата на неполарним стационарним фазама.

Због своје изузетне реактивности, хлороформати се сматрају општим реагенсима за дериватизацију, пре свега у гасној, али и у течној хроматографији, нарочито за једињења које садрже аминокиселинску и карбоксилну функционалну групу [10]. Највећи број публикација о примени хлороформата односи се на дериватизацију једињења типа аминокиселина у различитом биолошком материјалу [11–14], а посебно треба истаћи њихов значај за различите врсте метаболичког профилисања [15, 16]. У литератури постоји само једна описана метода за квантификацију прегабалина након дериватизације етилхлороформатом, али применом GC–MS методе [17].

Иако су услови за извођење реакције дериватизације добро познати и сам механизам до детаља истражен [18], систематично праћење приноса споредне

реакције, на начин како је то изведено у овој докторској дисертацији за свих 48 деривата, није описано у досадашњим истраживањима.

Примена масене спектрометрије заједно са повећањем осетљивости након реакције дериватизације и значајним унапређењем одговора анализата оптимизацијом инструменталних параметара, омогућила је значајно смањење запремине биолошког материјала потребног за квантитативну анализу (свега неколико микролитара). До сада ни за вигабатрин, ни за прегабалин, у литератури нису описане методе намењене за њихову анализу коришћењем осушених капи матрикса. Такође, први пут је извршена корелација нивоа прегабалина у крви и плазми, а добијени резултати у сагласности су са постојећим подацима за вигабатрин [19].

[1] F. Kolocouri, Y. Dotsikas, Y.L. Loukas, Dried plasma spots as an alternative sample collection technique for the quantitative LC–MS/MS determination of gabapentin, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1339–1347.

[2] K. Ikeda, K. Ikawa, S. Yokoshige, S. Yoshikawa, N. Morikawa, Gas chromatography – electron ionization – mass spectrometry quantitation of valproic acid and gabapentin, using dried plasma spots, for therapeutic drug monitoring in in-home medical care, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2014) 1756–1762.

[3] K.M. Matar, M.E. Abdel-Hamid, Quantification of vigabatrin in human plasma by liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 28 (2005) 395–406.

[4] U. Mandal, A.K. Sarkar, K.V. Gowda, S. Agarwal, A. Bose, U. Bhaumik, D. Ghosh, T.K. Pal, Determination of pregabalin in human plasma using LC–MS–MS, *Chromatographia* 67 (2008) 237–243.

[5] G.R. Shah, C. Ghosh, B.T. Thaker, Determination of pregabalin in human plasma by electrospray ionisation tandem mass spectroscopy, *J. Adv. Pharm. Tech. Res.* 1 (2010) 354–357.

- [6] G. Uma, M. Manimala, M. Vasudevan, S. Karpagam, Deecarman, LC–MS–MS method for the determination of pregabalin in human plasma. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4 (Suppl. 3) (2012) 108–112.
- [7] A. Chahbouni, A. Sinjewel, J.C.G. den Burger, R.M. Vos, A.J. Wilhelm, A.I. Veldkamp, E.L. Swart, Rapid quantification of gabapentin, pregabalin, and vigabatrin in human serum by ultraperformance liquid chromatography with mass-spectrometric detection, *Ther. Drug Monit.* 35 (2013) 48–53.
- [8] M. Shibata, S. Hashi, H. Nakanishi, S. Masuda, T. Katsura, I. Yano, Detection of 22 antiepileptic drugs by ultraperformance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 1519–1528.
- [9] R. Oertel, N. Arenz, J. Pietsch, W. Kirch, Simultaneous determination of three anticonvulsants using hydrophilic interaction LC–MS, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 238–243.
- [10] P. Hušek, Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents, *J. Chromatogr. B*, 717 (1998) 57–91.
- [11] S. Kawana, K. Nakagawa, Y. Hasegawa, S. Yamaguchi, Simple and rapid analytical method for detection of amino acids in blood using blood spot on filter paper, fast-GC/MS and isotope dilution technique, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 3113–3118.
- [12] Z. Švagera, D. Hanzlíková, P. Šimek, P. Hušek, Study of disulfide reduction and alkyl chloroformate derivatization of plasma sulfur amino acids using gas chromatography – mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2953–2963.
- [13] B. Cavaliere, B. Macchione, M. Monteleone, A. Naccarato, G. Sindona, A. Tagarelli, Sarcosine as a marker in prostate cancer progression: a rapid and simple method for its quantification in human urine by solid-phase microextraction – gas chromatography – triple quadrupole mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2903–2912.

- [14] J. Cimlová, P. Kružberská, Z. Švagera, P. Hušek, P. Šimek, *In situ* derivatization – liquid liquid extraction as a sample preparation strategy for the determination of urinary biomarker prolyl-4-hydroxyproline by liquid chromatography – tandem mass spectrometry, *J. Mass. Spectrom.* 47 (2012) 294–302.
- [15] X. Gao, E. Pujos-Guillot, J.F. Martin, P. Galan, C. Juste, W. Jia, J.L. Sebedio, Metabolite analysis of human fecal water by gas chromatography/mass spectrometry with ethyl chloroformate derivatization, *Anal. Biochem.* 393 (2009) 163–175.
- [16] V. Košťál, J. Korbelová, J. Rozsypal, H. Zahradníčková, J. Cimlová, A. Tomčala, P. Šimek, Long-term cold acclimation extends survival time at 0 °C and modifies the metabolomic profiles of the larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster*, *PLoS ONE* 6 (2011) e25025.
- [17] M.K.R. Mudiam, A. Chauhan, R. Jain, R. Ch, G. Fatima, E. Malhotra, R.C. Murthy, Development, validation and comparison of two microextraction techniques for the rapid and sensitive determination of pregabalin in urine and pharmaceutical formulations after ethyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography – mass spectrometric analysis, *J. Pharmaceut. Biomed.* 70 (2012) 310–319.
- [18] J. Wang, Z.-H. Huang, D.A. Gage, J.T. Watson, Analysis of amino acids by gas chromatography – flame ionization detection and gas chromatography – mass spectrometry: Simultaneous derivatization of functional groups by an aqueous-phase chloroformate-mediated reaction, *J. Chromatogr. A* 663 (1994) 71–78.
- [19] S.L. Durham, J.F. Hoke, T.M. Chen, Pharmacokinetics and metabolism of vigabatrin following a single oral dose of [¹⁴C]vigabatrin in healthy male volunteers, *Drug Metab. Dispos.* 21 (1993) 480–484.

Д. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Радови објављени у часописима међународног значаја

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

Радови саопштени на скуповима међународног значаја штампани у изводу

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

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

Усмена излагања

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

Е. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

У овој докторској дисертацији, из научне области – Аналитика лекова, највећа пажња посвећена је цвитерјонским антиепилептицима и анализи узорака биолошког материјала.

Кроз фундаментална истраживања испитан је утицај различитих комбинација парова *n*-алкилхлороформата и *n*-алкохола, као реагенса за дериватизацију, на измерени сигнал дериватизованих антиепилептика у LC–ESI–MS/MS систему. Поред тога, применом експерименталног дизајна остварено је значајно унапређење параметара масеног спектрометра, као и параметара методе течне хроматографије. Експериментални услови, дефинисани фундаменталним истраживањима, верификовани су кроз поступак валидације, како би се потврдило да је метода погодна за одређивање одабраних антиепилептичких лекова у узорцима биолошког материјала користећи DBS и DPS као поступак за њихово сакупљање. Применљивост постављених метода доказана је анализом узорака крви и плазме прикупљених од пацијената Клинике за неурологију и психијатрију за децу и омладину у Београду, а који су на терапији поменути антиепилептицима.

На основу резултата приказаних у овој докторској дисертацији, као и из четири објављена научна рада у водећим међународним часописима (*Talanta, Journal*

of Mass Spectrometry, Journal of Chromatography B и *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*), три саопштења и једног усменог излагања на међународним научним скуповима, може се закључити да ова докторска дисертација представља значајан научни допринос у анализи цвитерјонских антиепилептика из узорака биолошког материјала.

Комисија предлаже члановима Наставно–научног већа Фармацеутског факултета Универзитета у Београду да прихвате позитивну оцену завршене докторске дисертације под насловом *Биоаналитика антиепилептика цвитерјонске структуре након дериватизације п-алкилхлороформатима применом течне хроматографије с масеном детекцијом*, кандидата дипл. фарм. НАЂЕ КОСТИЋ.

*Комисија за оцену и одбрану
завршене докторске дисертације кандидата
дипл. фарм. Нађе Костић*

Др Анђелија Маленовић, ванредни професор, ментор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет, Србија

Др Небојша Јовић, редовни професор, ментор
Универзитет у Београду – Медицински факултет, Србија

Dr Yannis Dotsikas, доцент
Универзитет у Атини – Фармацеутски факултет, Грчка