

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BOŠTJAN PODKRIŽNIK

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BOŠTJAN PODKRIŽNIK

**RAZVOJ BIOANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE  
PLAZEMSKIH KONCENTRACIJ ETOPOZIDA S  
TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE  
LOČLJIVOSTI IN FLUORESCENČNO DETEKCIJO**

**DEVELOPEMENT OF A BIOANALYTICAL METHOD FOR  
DETERMINATING ETOPOSIDE LEVELS IN HUMAN  
PLASMA USING HIGH PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENT  
DETECTION**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljal na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, na Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka. Spektroskopske in kromatografske meritve sem izvajal v laboratorijih Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Tomažu Vovku za pomoč pri načrtovanju in izvajanju praktičnega dela ter za izkazano zaupanje pri samostojnem delu z aparaturo.

Zahvaljujem se tudi svojim staršem, moji puncu Maji, ter prijateljem in študijskim kolegom, ki so mi med študijem stali ob strani.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka.

Boštjan Podkrižnik

Ljubljana, september 2013

Predsednica diplomske komisije:izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič

Članica diplomske komisije: doc. dr. Nina Kočever Glavač

## VSEBINA

<b>1</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	PLJUČNI RAK .....	1
1.1.1	<i>Vzroki in nastanek pljučnega raka .....</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Vrste pljučnega raka.....</i>	<i>3</i>
1.2	ZDRAVLJENJE DROBNOCELIČNEGA PLJUČNEGA RAKA.....	4
1.2.1	<i>Neželeni učinki kemoterapije .....</i>	<i>5</i>
1.3	DNK-TOPOIZOMERAZA II .....	6
1.4	FARMAKODINAMIKA ETOPOZIDA.....	7
1.5	FARMAKOKINETIKA ETOPOZIDA .....	10
1.5.1	<i>Absorpcija in biološka uporabnost .....</i>	<i>10</i>
1.5.2	<i>Odmerjanje.....</i>	<i>10</i>
1.5.3	<i>Porazdeljevanje in vezava na plazemske proteine .....</i>	<i>11</i>
1.5.4	<i>Metabolizem in izločanje.....</i>	<i>12</i>
1.6	PREGLED ANALIZNIH METOD ZA DOLOČANJE ETOPOZIDA V PLAZMI.....	13
<b>2</b>	<b>NAMEN DELA .....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN OPREMA.....</b>	<b>17</b>
3.1	BIOLOŠKI MATERIAL.....	17
3.2	STANDARDI.....	18
3.3	REAGENTI IN TOPILA .....	18
3.4	NAPRAVE IN PRIBOR .....	19
<b>4</b>	<b>METODE .....</b>	<b>21</b>
4.1	PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN IN TOPIL .....	21
4.1.1	<i>Osnovne raztopine etopozida.....</i>	<i>21</i>
4.1.2	<i>Osnovni raztopini tenipozida (IS).....</i>	<i>22</i>
4.1.3	<i>Delovne raztopine (WS).....</i>	<i>22</i>
4.1.4	<i>Priprava plazemskih vzorcev .....</i>	<i>23</i>
4.1.5	<i>Priprava in shranjevanje osnovnih in delovnih raztopin.....</i>	<i>24</i>
4.2	PRIPRAVA MOBILNIH FAZ.....	25
4.3	OPTIMIZACIJA DETEKCIJE .....	25
4.3.1	<i>Določanje ekscitacijske in emisijske valovne dolžine.....</i>	<i>25</i>
4.3.2	<i>Optimizacija ojačitve fotopomnoževalke .....</i>	<i>25</i>
4.4	RAZVOJ TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE (HPLC) .....	26
4.4.1	<i>Izbor stacionarne faze .....</i>	<i>26</i>
4.4.2	<i>Shranjevanje kolone (spiranje) .....</i>	<i>26</i>
4.4.3	<i>Volumen injiciranja.....</i>	<i>27</i>
4.4.4	<i>Izbira optimalne mobilne faze.....</i>	<i>27</i>
4.4.5	<i>Vrsta detekcije.....</i>	<i>28</i>

4.5	RAZVOJ METODE ZA EKSTRAKCIJO IZ PLAZEMSKIH VZORCEV .....	28
4.5.1	<i>Izbor topila za ekstrakcijo tekoče-tekoče</i> .....	28
4.5.2	<i>Vpliv zamrzovanja plazme</i> .....	29
4.5.3	<i>Vpliv nakisanja plazme</i> .....	29
4.5.4	<i>Izboljšanje ločitve vrha etopozida</i> .....	29
4.6	SUŠENJE EKSTRAKTA IN RAZTAPLJANJE SUHEGA OSTANKA .....	30
4.7	VALIDACIJA .....	30
4.7.1	<i>Priprava standardov za kontrolo kakovosti pri validaciji</i> .....	31
4.7.2	<i>Linearnost</i> .....	31
4.7.3	<i>Točnost</i> .....	32
4.7.4	<i>Ponovljivost</i> .....	32
4.7.5	<i>Območje linearnosti</i> .....	33
4.7.6	<i>Meja kvantifikacije (LLOQ)</i> .....	33
4.7.7	<i>Selektivnost</i> .....	33
4.7.8	<i>Izkoristek ekstrakcije (Re)</i> .....	33
4.7.9	<i>Stabilnost</i> .....	34
4.8	UPORABA METODE NA REALNIH VZORCIH BOLNIKOV .....	35
<b>5</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>36</b>
5.1	OPTIMIZACIJA PRIPRAVE IN SHRANJEVANJA DELOVNIH RAZTOPIN.....	36
5.1.1	<i>Shranjevanje v zamrzovalniku</i> .....	36
5.1.2	<i>Vezava učinkovin na plastiko</i> .....	37
5.2	OPTIMIZACIJA DETEKCIJE .....	39
5.2.1	<i>Ekscitacijska in emisijska valovna dolžina</i> .....	39
5.3	OPTIMIZACIJA KROMATOGRAFIJE .....	40
5.3.1	<i>Izbor stacionarne faze</i> .....	40
5.3.2	<i>Izbor optimalne mobilne faze</i> .....	42
5.3.3	<i>Vrsta detekcije</i> .....	44
5.4	OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE .....	44
5.4.1	<i>Izbor topila in vrste ekstrakcije</i> .....	44
5.4.2	<i>Vpliv zamrzovanja plazme</i> .....	46
5.4.3	<i>Vpliv nakisanja plazme</i> .....	47
5.4.4	<i>Izboljšanje separacije vrha etopozida</i> .....	48
5.4.5	<i>Raztapljanje suhega ostanka</i> .....	50
5.5	VALIDACIJA .....	50
5.5.1	<i>Linearnost</i> .....	51
5.5.2	<i>Točnost</i> .....	52
5.5.3	<i>Ponovljivost</i> .....	53
5.5.4	<i>Meja kvantifikacije (LLOQ)</i> .....	53
5.5.5	<i>Selektivnost</i> .....	53
5.5.6	<i>Izkoristek ekstrakcije (Re %)</i> .....	54
5.5.7	<i>Stabilnost</i> .....	55
5.6	UPORABA METODE NA REALNIH VZORCIH BOLNIKOV .....	58
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>61</b>

## Povzetek

Etopozid je polsintezni derivat podofilotoksina, ki se najpogosteje uporablja za začetno kemoterapijo drobnoceličnega pljučnega raka v kombinaciji s cisplatinom. Težava pri odmerjanju etopozida je izrazita variabilnost delovanja med bolniki. Za raziskovanje dejavnikov, ki vplivajo na njegovo farmakokinetiko in tudi na farmakodinamiko, so potrebne analize metode za določanje plazemskih koncentracij etopozida v bioloških vzorcih.

V diplomski nalogi smo razvili novo analizo metodo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti ter fluorescenčno detekcijo za določanje plazemskih koncentracij etopozida. Etopozidu smo dodali tenipozid kot interni standard (IS) in ju iz plazme ekstrahirali z dietiletrom. Sledilo je sušenje dietiletra z dušikom, ter raztapljanje suhega ostanka v zmesi metanola in vode z razmerjem 1 : 1. Dobro ločitev etopozida in IS od matrice smo dosegli na reverznofazni koloni Phenomedex Luna C18 (2) 100A 150 x 4,6 mm 3  $\mu$ m, termostatirano na 50 °C, s predkolono Luna Phenomenex 4 x 2 mm C18. Volumen injiciranja je bil 25  $\mu$ L. Mobilno fazo smo sestavili iz 35 % acetonitrila in 65 % 25 mM fosfatnega puфра pH 3,0. Elucija je potekala izokratsko s pretokom od 0,7 mL/min do 1,3 mL/min. Detekcija je potekala pri ekscitacijski valovni dolžini 230 nm in emisijski valovni dolžini 330 nm.

Metodo smo na koncu še validirali po smernicah ameriške Agencije za hrano in zdravila. Dokazali smo linearnost metode v območju 0,125–30,0  $\mu$ g/mL s spodnjo mejo kvantifikacije 0,125  $\mu$ g/mL. Metodo smo potrdili kot točno (vsa odstopanja  $\leq$  10,3 %) in ponovljivo (koeficient variance je bil  $\leq$  7,22 % pri znotrajdnevni oz.  $\leq$  7,33 % pri meddnevni ponovljivosti). Izkoristek ekstrakcije je bil za etopozid relativno nizek (v povprečju 58,7 %), vendar zelo ponovljiv (CV  $\leq$  3,4 %). Plazemski vzorci etopozida so bili stabilni najmanj 24 ur, če so bili shranjeni v avtomatskem vzorčevalniku na 5 °C (vsa odstopanja  $\leq$  6,7 %). Stabilni so bili 6 ur pri shranjevanju na sobni temperaturi (vsa odstopanja  $\leq$  12,1 %) in 39 dni pri hranjenju na -20 °C (vsa odstopanja  $\leq$  13,6 %).

Po validaciji smo metodo uspešno uporabili na realnih vzorcih bolnikov z drobnoceličnim pljučnim rakom. Razvita analizna metoda je primerna za spremljanje zdravljenja z etopozidom.

## Abstract

Etoposide is a semi-synthetic derivative of podophyllotoxin, which is most commonly used for the initial chemotherapy of small cell lung cancer in combination with cisplatin. The therapy with etoposide is problematic since its therapeutic dose varies significantly between patients. In order to determine the variables that influence etoposide pharmacokinetics and pharmacodynamics analytical methods are required for its determination in biological samples.

In this thesis we have developed a new analytical method with high performance liquid chromatography and fluorescence detection for the determination of plasma concentrations of etoposide. Teniposide was added to etoposide samples as an internal standard and plasma samples were extracted in diethyl ether. Extracts were dried with nitrogen stream and dry residue was dissolved in a mixture of methanol and water in a ratio of 1 : 1. Good separation of etoposide and IS from the matrix was achieved on reversed-phase column Phenomedex Luna C18 (2) 100A 150 x 4.6 mm, 3  $\mu$ m, thermostat at 50 °C, with a guard column Phenomenex Luna 4 x 2 mm C18. Sample injection volume was 25  $\mu$ L. The mobile phase was composed of 35 % acetonitrile and 65 % of 25 mM phosphate buffer pH 3,0. Elution was carried out with the isocratic flow rate ranging from 0,7 mL/min to 1,3 mL/min. Detection was carried out at excitation wavelength of 230 nm and emission wavelength of 330 nm.

The method was in the end also validated according to the guidelines the U.S. Food and Drug Administration. The method is linear in the range from 0,125  $\mu$ g/mL to 30,0  $\mu$ g/mL with a lower limit of quantification of 0,125  $\mu$ g/mL. The method is proved to be accurate (all deviations  $\leq$  10,3 %), reproducible (coefficient of variance is  $\leq$  7,22 % for intra-day and  $\leq$  7,33 % for inter-day reproducibility). The efficiency of extraction of etoposide is relatively low (mean value 58,7 %), but highly reproducible (CV  $\leq$  3,4 %). Etoposide plasma samples were stable for at least 24 hours if they were kept in the auto sampler at 5 °C (all deviations  $\leq$  6,7 %). They were also stable at the room temperature for 6 hours (all deviations  $\leq$  12,1 %) and 39 days if stored at -20 °C (all deviations  $\leq$  13,6 %).

The validated method was successfully applied to real samples of patients with small cell lung cancer. Developed analytical method is suitable for monitoring the therapy of etoposide in patients.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ACN	Acetonitril
ATP	Adenozin trifosfat
AUC	Površina pod krivuljo
BU	Biološka uporabnost
c	Koncentracija
C <sub>max</sub>	Maksimalna koncentracija
CSF	Cerebrospinalna tekočina
CV	Koeficient variacije
CŽS	Centralni živčni sistem
DAD	Ultravijolični detektor z nizom diod
DNK	Deoksinukleinska kislina
EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina
Em	Emisijska valovna dolžina
Ex	Ekscitacijska valovna dolžina
FD	Farmakodinamika
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila
FK	Farmakokinetika
FLD	Fluorescenčni detektor
GIT	Gastrointestinalni trakt
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IS	Interni standard
IV	Intravensko
k	Naklon premice
Konc.	Koncentracija
KT	Kemoterapija
LLE	Ekstrakcija tekoče-tekoče
LLOQ	Spodnja meja kvantifikacije
LOD	Spodnja meja detekcije
LU	Luminiscenca



MF	Mobilna faza
MS	Masni spektrometer
mv	Moteči vrh
n	Odsek na ordinati
nm	Nanometer
NSCLC	Nedrobnocelični pljučni rak
Povpr.	Povprečno
QC (l, m, h)	Kontrolni vzorec (nizki, srednji, visoki)
r	Pearsonov koeficient
R <sup>2</sup>	Determinacijski koeficient
Re%	Izkoristek ekstrakcije v odstotkih
RSD	Relativna standardna deviacija
SCLC	Drobnocelični pljučni rak
SD	Standardna deviacija
SPE	Ekstrakcija na trdnem nosilcu
T	Temperatura
t <sub>0</sub>	Točka ob času 0
TDM	Terapevtsko spremljanje koncentracij zdravil
t <sub>max</sub>	Čas za doseg maksimalne koncentracije v plazmi
Tr	Retencijski čas
Točn.	Točnost
UV	Ultravijolično
WS	Delovna raztopina
X-žarki	Rentgenski žarki
y	Odziv (površina pod kromatografskim vrhom)

# 1 UVOD

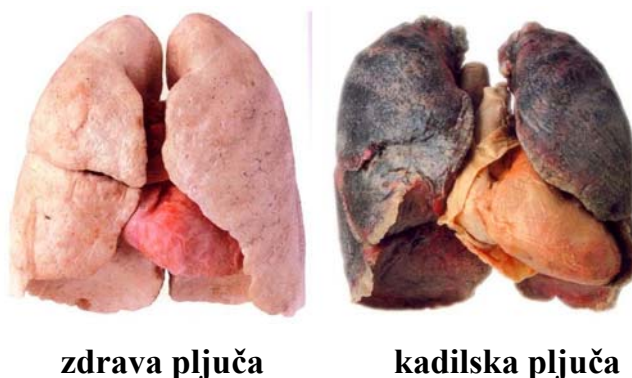
## 1.1 Pljučni rak

V svetovnem merilu vsako leto zboli 1,4 milijona ljudi za pljučnim rakom, kar predstavlja 12 % vseh novih primerov raka in ga uvršča med eno najpogostejših oblik raka. Pri tem drobnocelični pljučni rak predstavlja 13 % novoodkritih primerov pljučnega raka. Prognoza pri tej vrsti raka je slaba: dvoletno preživetje je pri bolnikih z omejeno obliko bolezni približno 20- do 40-odstotno, pri bolnikih z razširjeno obliko bolezni pa 5-odstotno (1).

Po podatkih za Slovenijo za leto 2009 predstavlja pljučni rak 9,8 % vseh rakov in je tako na četrtem mestu. Pri moških je bil na četrtem mestu z 12,7 %, pri ženskah pa je pogostost veliko manjša, in sicer 6,7 %. Časovni trend pogostejših rakov pri moških kaže, da se je incidenčna stopnja pljučnega raka večala vse do začetka devetdesetih let prejšnjega stoletja. Med leti 1967 in 2004 je bila to najpogostejša oblika raka, zadnja leta pa pada predvsem zaradi zmanjšanja kajenja, ki je glavni razlog za nastanek pljučnega raka. Statistika govori, da spada rak na pljučih in sapniku med rake z najmanjšim odstotkom preživetja v prvih 5 letih, z 12 % pri moških in 17 % pri ženskah. Slabši odstotek preživetja bolnikov imajo le še rak na jetrih, požiralniku in rak trebušne slinavke (2).

### 1.1.1 Vzroki in nastanek pljučnega raka

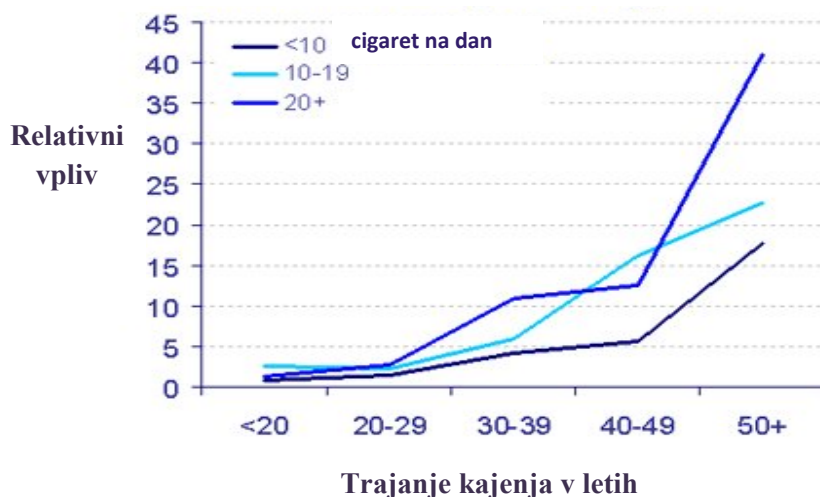
Rak se razvije na podlagi genetskih okvar DNK. Genetske napake prizadenejo običajne funkcije celice, vključno s celično proliferacijo, programirano celično smrt (apoptozo) in popravilo DNK. Več kot se škode nabira, večje tveganje je za nastanek raka. Človek z največjim tveganjem za obolenje s pljučnim rakom je moški, dolgotrajni kadilec, star med 50 in 65 let, ki živi v mestu ali območju s težko industrijo (3).



Slika 1: Razlika v izgledu zdravih pljuč in pljuč kadilca (4).

Glavni vzroki za nastanek pljučnega raka so zato dolgotrajno kajenje, vdihavanje onesnaženega zraka, predvsem z radonom, azbestom, arzenom, železovim oksidom ... Kajenje, zlasti cigaret, daleč največ prispeva k nastanku pljučnega raka. Cigaretetni dim vsebuje več kot 60 znanih rakotvornih snovi, vključno z radioizotopom radona, nitrozamini in benzopirenom. Poleg tega nikotin vpliva na zmanjšanje imunskega odziva na maligno rast v izpostavljenem tkivu (3). Navedeni podatki in Slika 2 nazorno pokažejo, kako nevarno je kajenje za nastanek pljučnega raka. Pri moških bolnikih s pljučnim rakom je za kar 90 % smrti krivo kajenje. Pri ženskah je ta odstotek nekoliko nižji, vendar še vedno izjemno visok, 71 % (5).

**Relativni vpliv pljučnega raka glede na trajanje in količino pokajenih cigaret**



**Slika 2: Odstotek tveganja nastanka pljučnega raka pri moških v odvisnosti od pokajenih cigaret na dan in časa kajenja (6).**

Nastanek pljučnega raka lahko razdelimo v zaporedje 5. dogodkov.

1. Reaktivne spojine iz zraka (cigaretetni dim, smog ...) povzročijo vnetje celic sluznice, ki obdajajo dihalno pot. Zaradi vnetja pride do propada normalnih celic sluznice, ki čistijo sluz v dihalnih poteh, hkrati pod njimi pride do hitrega kopičenja globljih osnovnih celic.
2. Zdrave celice sluznice se sploščijo, to imenujemo metaplazija. Te celice nič več ne čistijo dihalnih poti.
3. V naslednji fazi intenzivno in hitro nastajajo nenormalne displastične epitelijske celice, ki jih najdemo pri 90 % kadilcev, pri 6 % kadilcev, ki so prenehali, po 5 letih in pri manj kot 1 % nekadilcev. Te celice so reverzibilne in ne pomenijo neizogibno nastanka raka.

4. Naslednja stopnja se imenuje »rak *in situ*«. To je majhen in lokalni rak, ki se še ni razrastlel oz. razširil. Pojavi se nekje v področju displastičnih celic, lahko je dolg nekaj centimetrov in zaseda celotno širino sluznice dihalne poti. Pojavi se pri 25 % kadilcev.
5. Neznani dogodki v telesu povzročijo spremembo majhnega lokalnega raka v invazivnega. Tumor se začne razraščati v sosednja tkiva, bezgavke in ostala tkiva po telesu, najpogosteje so to možgani, kosti in jetra. Tak pljučni rak se imenuje maligni karcinom (7).

Glede na stopnjo razraščenosti v pljučih ali celo izven njih delimo bolezen na stadije oz. stopnje.

### **1.1.2 Vrste pljučnega raka**

Pljučni rak ni ena sama bolezen, pojavijo se lahko različne vrste, ki jih razvrščamo glede na histološki tip ter velikost in videz malignih celic. Nastanek pljučnega raka je pri vseh vrstah podoben, razlika je v obliki razraščenih malignih celic. Ta razvrstitev ima pomembne posledice za klinično zdravljenje in prognozo bolezni. Zato za pravilno izbiro zdravljenja delimo pljučne rake v dva glavna razreda:

- nedrobnocelični pljučni rak (NSCLC), 80 % celotnega pljučnega raka in
- drobnocelični pljučni rak (SCLC), 15 % celotnega pljučnega raka (7).

Tretji tip pljučnega raka, ki se močno razlikuje od zgornjih dveh, je maligni mezoteliom. Je najmanj pogost, njegova prevalenca je manj kot 5 %. Azbest je edini znani dejavnik tveganja za maligni mezoteliom. Mezoteliom prizadene tkiva sluznice pljuč (plevralne) ali trebuha (peritonej). Maligni mezoteliom ni povezan s kajenjem cigaret, je pa močno povezan s stopnjo izpostavljenosti azbestu, zato se ga tudi zdravi na drugačen način (8).

Zgornje opisane vrste pljučnega raka so primarnega tipa, ker nastanejo v pljučih. V njih lahko na drug način nastane rak, ki se razraste iz drugih delov telesa. Take vrste raka ne imenujemo pljučni rak, ampak sekundarni tumor v pljučih. Ti tumorji se ne zdravijo kot primarni pljučni rak, ampak kot rak od koder izhaja (7).

### **1.1.2.1 Nedrobnocelični pljučni rak (NSCLC)**

Je najpogostejša oblika pljučnega raka, delimo ga še na tri podvrste, glede na obliko tumorskih celic:

- Ploščatocelični (skvamozni) karcinom: Je najpogostejša oblika te vrste raka, celice sluznice so sploščene. Bolniki so večinoma kadilci, nastane vedno v velikih bronhih, od koder se razrašča v okoliška tkiva, bezgavke in krvni sistem.
- Adenokarcinom: Izhaja iz žleznega tkiva pod celicami sluznice dihalnih poti. Pogosteje se pojavi na obrobju pljuč kot v centru. Kajenje nima tako velikega vpliva na nastanek.
- Velikocelični karcinom: Nastane pri kadilcih, ne tvori žlez in nastane v centru ali na periferiji pljuč.

Pri zdravljenju NSCLC se poslužujemo vseh treh metod: kirurgije (odstranitve), radioterapije in kemoterapije. Pogosto ima prednost kombinacija vseh treh metod (7).

### **1.1.2.2 Drobnocelični pljučni rak (SCLC)**

Drobnocelični pljučni rak izvira iz nevroendokrinih celic. Za SCLC je značilna zelo agresivna patologija, razširjene metastaze ter posledično slaba prognoza. Difuzna narava SCLC predstavlja problem za kirurško zdravljenje, vendar je v nasprotju z NSCLC zelo občutljiv na kemoterapijo. Celice so zelo majhne in krhke, podobne ovsenim zrnom. Ta vrsta pljučnega raka je vedno posledica kajenja, še bolj kot pri nedrobnoceličnem pljučnem raku (7). Faze drobnoceličnega pljučnega raka so:

- Omejena faza: v tej fazi se rak nahaja na eni strani prsnega koša, ki vključuje samo en del pljuč in bližnje bezgavke.
- Obsežna faza: v tej fazi se je rak razširil na druge regije v prsnem košu ali drugih delih telesa (9).

## **1.2 Zdravljenje drobnoceličnega pljučnega raka**

Za obolele z SCLC, ne glede na stopnjo, je kemoterapija bistveni del zdravljenja. Zdravljenje z obsevanjem lahko vedno uporabimo, ne glede na stopnjo raka, poteka z odmerjanjem zdravila v obliki infuzije ali tablet ali kombinacije obojega. Ta zdravila vstopijo v krvni obtok in delujejo po vsem telesu, zaradi česar je to koristno za zdravljenje raka, ki se je razširil (metastaziral) v organe poleg pljuč.

Za bolnike z omejeno stopnjo SCLC je priporočljivo zdravljenje s kombinacijo kemoterapije in radioterapije. Hkrati poleg zdravljenja z zdravili uporabimo visoko energijske X-žarke. Kemoterapija drobnoceličnega pljučnega raka na splošno vsebuje kombinacijo dveh zdravil. Istočasna kombinacija treh zdravil se ne uporablja, ker se samo poveča število neželenih učinkov (7, 9). Kombinacije zdravil, ki se najpogosteje uporabljajo za začetno kemoterapijo drobnoceličnega pljučnega raka, so:

- cisplatin in etopozid, znano kot EP-režim (E=Etoposide, P=Platinol® ali cisplatin),
- karboplatin in etopozid,
- cisplatin in irinotekan,
- karboplatin in irinotekan,
- ciklofosfamid, doksorubicin (Adriamycin®) in vinkristin.

**Preglednica I: Terapija najpogosteje uporabljenih kemoterapevtikov za zdravljenje SCLC (7).**

Učinkovina	Običajno trajanje in urnik apliciranja infuzije
etopozid	1 uro dnevno, 3 dni, na vsakih 21 dni
cisplatin	1–2 uri na vsakih 21 dni s hidratacijo
karboplatin	1 uro na vsakih 21 dni

Zdravniki izvajajo kemoterapijo v ciklih, nato sledi premor, da si telo opomore. Ciklov kemoterapije je običajno od 4 do 6 in se izvajajo na približno 3 do 4 tedne. Kemoterapija pogosto ni priporočljiva za bolnike v slabem zdravstvenem stanju, vendar pa visoka starost sama po sebi ni ovira za uporabo kemoterapije.

Za bolnike z obsežnim stadijem pljučnega raka se uporablja samo kemoterapija z uporabo režima EP kot standardno zdravljenje. Vendar pa obstajajo še drugi režimi, ki se uporabljajo predvsem, kadar je rak med zdravljenjem napredoval ali se je ponovno pojavil v 2 do 3 mesecih po končanem zdravljenju. Te učinkovine so: topotekan, paklitaksel, docetaksel, gemcitabin, davnorubicin in vinorelbin (7).

Za tiste bolnike, katerih rak se je že razširil na možgane, se lahko uporablja tudi obsevanje možganov pred kemoterapijo ali po njej. Zelo majhen odstotek ljudi, ki imajo omejeno stopnjo pljučnega raka in ne tumorjev na bezgavkah, lahko koristi operacijo, po kateri se izvaja pomožna kemoterapija (9).

### 1.2.1 Neželeni učinki kemoterapije

Kemoterapevtiki delujejo tako, da napadajo celice, ki se hitro množijo. Sem ne spadajo samo rakave celice, ampak tudi druge celice v telesu, ki se hitro delijo. To so npr. celice

kostnega mozga (kjer nastajajo krvničke), oblog v ustih in črevesju in lasnih mešičkov. Kemoterapija te celice prizadene, kar lahko privede do neželenih učinkov:

- povečana možnost okužbe (zmanjša se število levkocitov),
- trombocitopenija, modrice ali krvavitve (zmanjša se število trombocitov),
- anemija in utrujenost (zmanjša se število eritrocitov),
- izpadanje las in ustne razjede in
- izguba apetita, driska ali zaprtje, slabost in bruhanje (7).

Ti neželeni učinki so običajno kratkotrajni in izginejo po končanem zdravljenju. Pogosto pri kemoterapiji uporabljamo zdravila za preprečevanje slabosti in bruhanja (pomožno zdravljenje).

Nekateri neželeni učinki so lahko bolj dolgotrajni. Na primer, zdravila, kot so cisplatin, vinorelbin, docetaksel ali paklitaksel, povzročajo poškodbe živcev. To lahko včasih povzroči simptome, kot so bolečina, pekoč občutek ali mravljinčenje, občutljivost na mraz in vročino. Te znake imenujemo periferna nevropatija. Prav tako lahko cisplatin povzroči poškodbe ledvic (imenovane nefropatija). Da bi to preprečili, dajemo zdravilo i. v. z veliko tekočine pred vsakim odmerkom zdravila in po njem (7).

### **1.3 DNK-topoizomeraza II**

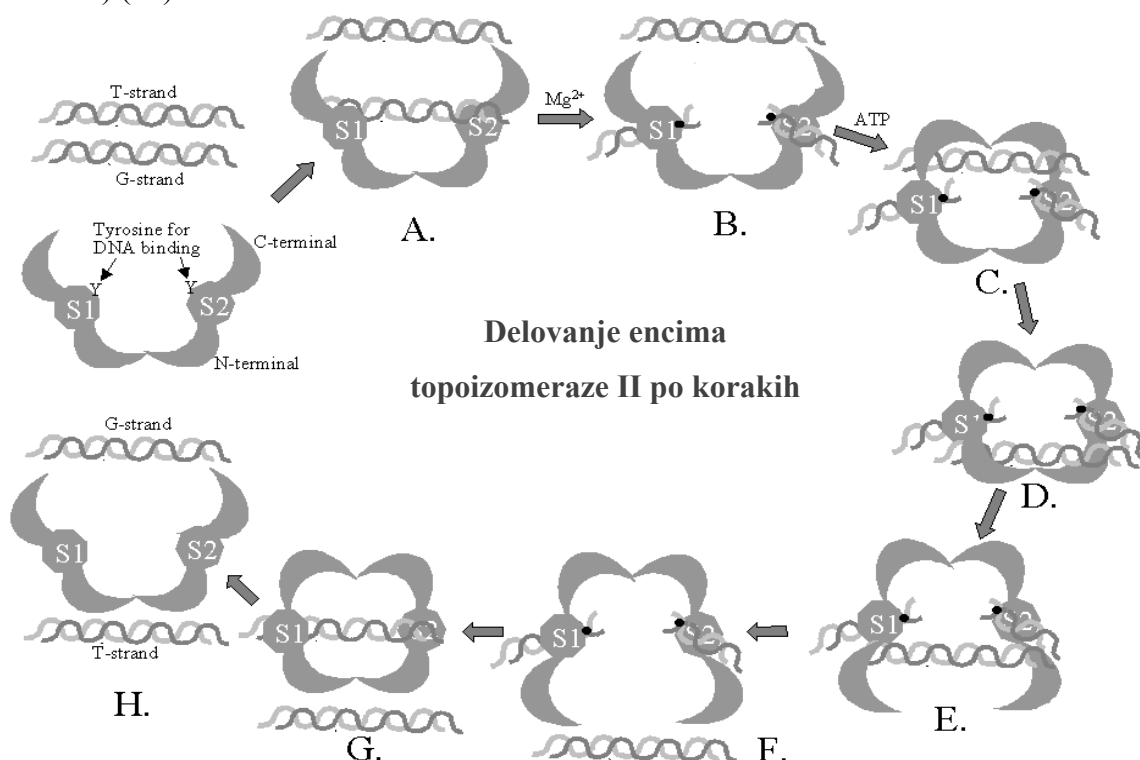
Skupina encimov, imenovanih topoizomeraze, so encimi, ki so potrebni za superzvijanje in sprostitve deoksiribonukleinske kisline (DNK) med podvajanjem in prepisovanjem. Tako jih imenujemo, ker spreminjajo topološko stanje krožne DNK oz. število njihovih zavojev, vendar ne njihove strukture navzven. Poznamo dva tipa encimov:

- topoizomeraze tipa I, ki delujejo tako, da začasno prekinejo le eno verigo v DNK in
- topoizomeraze tipa II, ki delujejo tako, da začasno prekinejo dve verigi v DNK (7).

Topoizomeraze tipa II so encimi, sestavljeni iz večih podenot, ki za svoje delovanje nujno potrebujejo energijo ATP, magnezijeve ione in dve molekuli DNK.

Mehanizem delovanja topoizomeraze II lahko razdelimo na več korakov. Začetek z vezavo ene verige DNK (sklop G) z obema podenotama encima (korak A). Naslednji korak je odvisen od prisotnosti magnezija, kjer topoizomeraza II razcepi molekulo DNK (korak B). V naslednjem, od ATP odvisnem koraku, topoizomeraza II s spremembo konformacije encima ujame drugo molekulo DNK (sklop T) (korak C), ki se prenese mimo razcepljene molekule sklopa G (korak D), kar privede do konformacijske spremembe encima (korak E)

in izstopa sklopa T (korak F). V naslednjem koraku delovanja topoizomeraze II pride do spojitve sklopa G DNK (korak G) in hidrolize ATP, kar omogoči še izstop sklopa G DNK (korak H) (10).



Slika 3: Shema delovanja DNK topoizomeraze II in mesta, kjer učinkovine lahko zavirajo encim (10).

#### 1.4 Farmakodinamika etopozida

Inhibitorji topoizomeraze II so ena najpomembnejših skupin učinkovin za zdravljenje pljučnega raka oz. vseh oblik raka. Glede na mehanizem delovanja jih razdelimo v dve skupini. Prvi se imenujejo ATP inhibitorji, ki zaustavljajo ATP-azno aktivnost topoizomeraze II (korak C). S tem se zmanjša celotna aktivnost topoizomeraze II, kar pomeni, da posledično zastane podvajanje in transkripcija DNK (11).

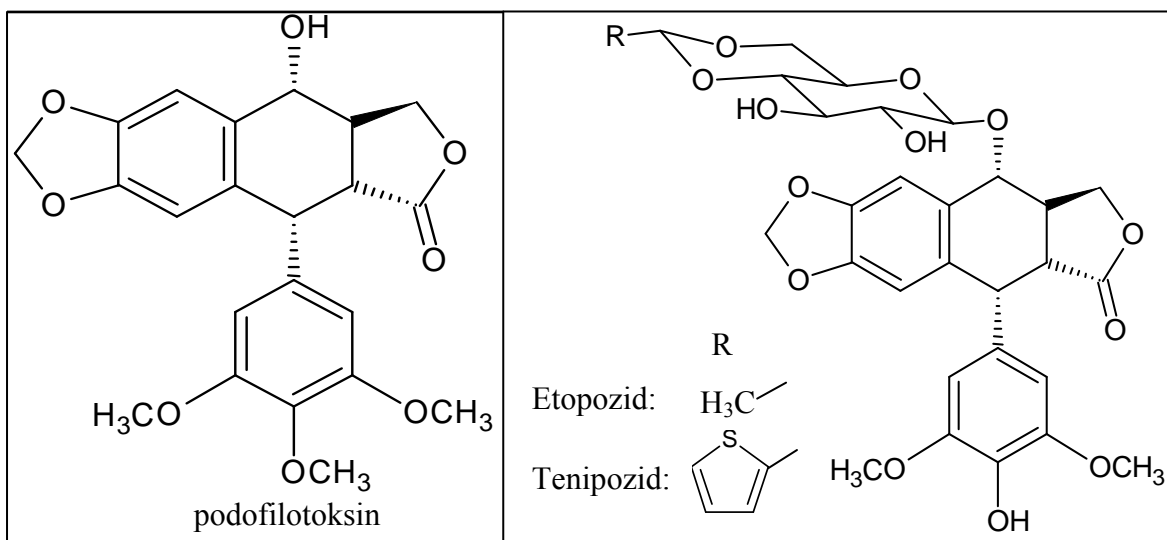
Drugi tip inhibitorjev pa imenujemo TOPO-2 ireverzibilni inhibitorji (etopozid (Preglednica II), tenipozid, doksorubicin, davnorubicin). Delujejo tako, da se kovalentno vežejo na odcepljen intermediat G-sklop DNK-encim (korak F). S tem blokirajo spojitve verig molekule DNK in sprostitev encima topoizomeraza II iz kompleksa (korak G in H). Tako nastane DNK s stalno dvojno vijačnico, ki je topoizomeraza II več ne more odviti. To pomeni, da je DNK ireverzibilno poškodovana, kar povzroči napake pri podvajanju rakavih celic in celično smrt. Etopozid zavira sposobnost topoizomeraze II s formiranjem radikalov ali z nastankom in stabilizacijo trikomponentnega kompleksa topoizomeraza II–etopozid–DNK (10, 12).





Učinkovina etopozid (Vepesid®), poznana tudi kot VP-16-213 ali VP-16, je polsintezni derivat podofilotoksina, ki se uporablja za zdravljenje nekaterih malignih bolezni. Povzroča zaustavljanje delitve celic v metafazi, kot kaže pa je najpomembnejše njegovo delovanje na pozno S in zgodnjo fazo G2 delitve celice (12, 13).

Farmakoterapevtska skupina etopozida: zdravilo z delovanjem na novotvorbe (citostatik), rastlinski alkaloidi in druge naravne učinkovine (zaviralci mitoze), derivati podofilotoksina, oznaka ATC: L01CB01 (13).



Slika 4: Kemijske strukture podofilotoksina in njegovih dveh derivatov etopozida in tenipozida.

Aktivnost etopozida je odvisna od odmerka in časovnega razporeda, njegova učinkovitost se opazno izboljša s ponavljajočim zdravljenjem. Ima dvojno, od odmerka odvisno delovanje. Pri višjih koncentracijah (10 µg/mL ali več) pride do lize celic, ki vstopajo v mitozo. Pri nižjih koncentracijah (0,3 do 10 µg/mL) pa celicam prepreči vstop v profazo. Pri visokih koncentracijah ima citotoksični učinek, verjetno zaradi oslabitve mehanizmov, ki so odgovorni za popraviljanje DNK, kar vodi do celične smrti. Odvisno od odmerka etopozid povzroči prelom le ene ali obeh verig DNK. Poleg tega je inhibicija topoizomeraze II reverzibilna, prekinitvev trikomponentnega kompleksa omogoča hitro popravilo DNK in zmanjšuje citotoksičnost etopozida. Zato je tudi mogoča dolgotrajna izpostavljenost etopozidu, kar poveča njegov učinek proti raku. Vendar pa je pri načrtovanju kemoterapije vseeno potrebno upoštevati tudi toksičnost etopozida na zdrave celice (14).

## 1.5 Farmakokinetika etopozida

### 1.5.1 Absorpcija in biološka uporabnost

Tako po intravenski kot po peroralni uporabi opazimo izrazito variabilnost najvišjih plazemskih koncentracij ( $C_{max}$ ) in površine pod koncentracijsko krivuljo (AUC), tako pri posamezniku kot med posameznimi bolnikih. Pri peroralni uporabi so bile  $C_{max}$  etopozida dosežene v 0,5-4 urah, povprečna biološka uporabnost (BU) je bila v razponu od 40-90 %. Razlika v BU etopozida med nizkimi (25-200 mg/dan) in visokimi (300-600 mg/dan) odmerki jasno kaže, da je absorpcija etopozida nasitljiva. Ugotovljeno je bilo nelinearno razmerje med BU in odmerkom, kjer je povprečna BU pri odmerku 100 mg 76 % (razpon 34-100 %) in pri 400 mg 48 % (razpon 24-78 %). Nižji odmerki etopozida so običajno povezani z višjo BU, ampak tudi pri nizkih odmerkih variabilnost ostaja visoka. To kaže, da je optimizacija odmerka posamezniku, ki temelji le na povprečni BU populacije (tj. 50 %) neprimerna, saj bi lahko zagotovila neučinkovite ali celo smrtne koncentracije etopozida v plazmi posameznika. Glavna vzroka variabilnosti sta slaba kemična stabilnost etopozida v telesnih tekočinah in prepustnost skozi črevesno sluznico (15). Velik vpliv na variabilnost ima tudi naravni mehanizem rakavih celic, ki črpa etopozid iz celic in tako zmanjšuje njegovo znotrajcelično koncentracijo, še preden bi bila ta dovolj visoka, da bi celico ubila. Omenjeni pojav poznamo pod imenom »Multi-drug resistance« ali MDR. Največja skupina MDR-prenašalcev so prenašalci ABC (ang. ATP binding cassette), kamor spada glikoprotein P (16). Študije so pokazale, da ima razlika izražanja teh membranskih transporterjev v enterocitih lahko velik vpliv na absorpcijo in biološko uporabnost etopozida pri bolnikih z rakom (15).

### 1.5.2 Odmerjanje

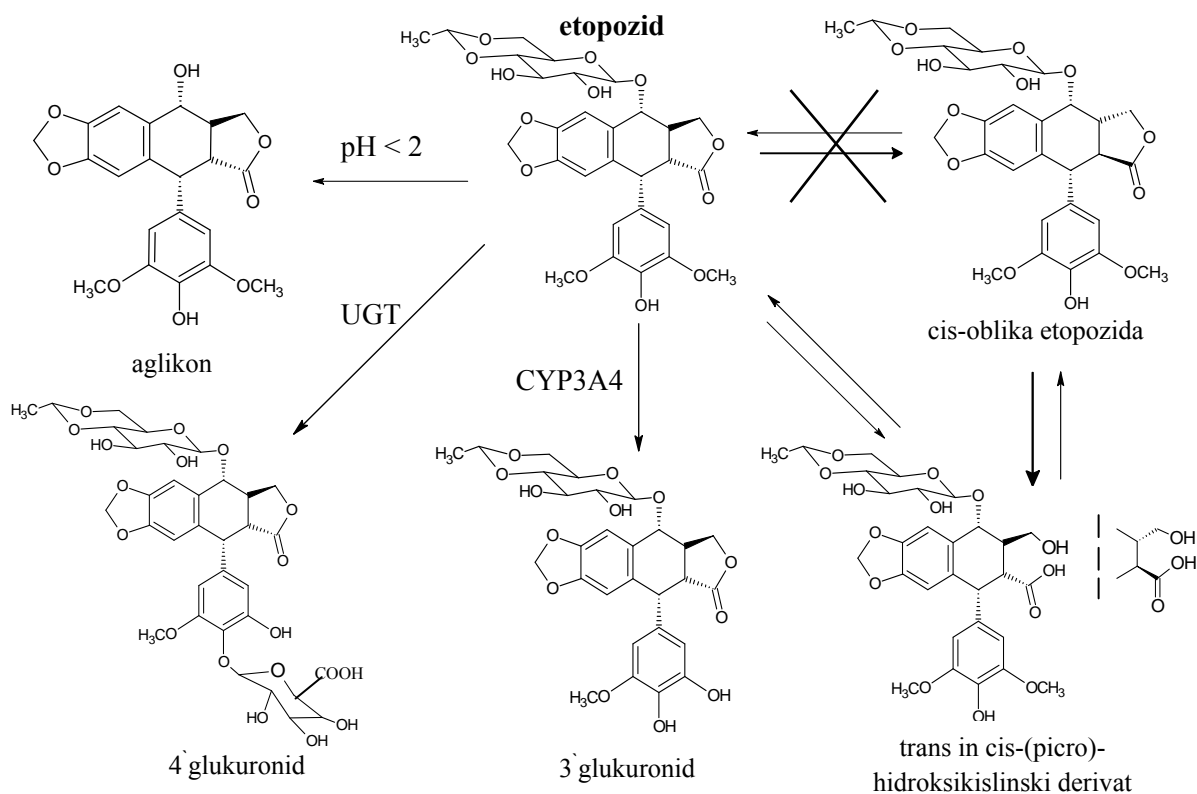
Zdravljenje z etopozidom se vedno izvaja v ciklih, ki se običajno ponovijo vsake 3 do 4 tedne. Pri odraslih je običajni peroralni odmerek etopozida 100 do 200 mg/m<sup>2</sup>/dan, od 1. do 5. dne, ali 200 mg/m<sup>2</sup>/dan, 1., 3. in 5. dan vsakega cikla, v kombinaciji z drugimi kemoterapevtiki. Peroralni odmerek etopozida je izračunan iz priporočenih parenteralnih (i. v.) odmerkov ob upoštevanju podatkov o BU etopozida, ki je odvisna od odmerka.  $C_{max}$  in AUC peroralnega odmerka 100 mg sta primerljiva s 75 mg i. v. odmerkom, peroralnega odmerka 400 mg pa z 200 mg i. v. (13).

### 1.5.3 Porazdeljevanje in vezava na plazemske proteine

Srednji volumen porazdelitve v stanju ravnotežja je od 18 do 29 L ali od 7 do 17 L/m<sup>2</sup>, tako za peroralno kot za intravensko uporabo. Etopozid slabo prehaja v tumor in cerebrospinalno tekočino (CSF). V tumorju je le med 20-50 % plazemske koncentracije. Prehod etopozida v CSF je po intravenski uporabi zelo različen, od nezaznavne do 2,5 µmol/L in doseže vrh po 1-4 urah od konca infuzije. Po peroralni uporabi doseže C<sub>max</sub> v plazmi v 2 urah in po 4-6 urah v CSF. Razmerje med koncentracijo etopozida v CSF in koncentracijo v plazmi po p. o. uporabi je podobno razmerju, ki ga najdemo po intravenski. Odstotek vezave na plazemske proteine je pomembna spremenljivka za načrtovanje odmerjanja vsake učinkovine (14, 15). V plazmi se etopozid močno veže na albumine in v manjši meri na kisle glikoproteine α<sub>1</sub>. Povprečna stopnja vezave etopozida je 93–98-odstotna in je v večini odvisna od koncentracije albuminov in bilirubina v plazmi. Razmerje med vezano obliko etopozida je v korelaciji s koncentracijo albumina, medtem ko so visoke vrednosti bilirubina v plazmi povezane z visokim deležem proste oblike etopozida. Kaže, da obstaja direktna obratna korelacija med koncentracijo plazemskih albuminov in deležem prostega etopozida. *In vitro* študije so pokazale, da so potrebne visoke koncentracije bilirubina v 15-30 mg/dL, da izpodrine etopozid iz albuminov, kar kaže na tekmovanje bilirubina in etopozida za istimi vezavnimi mesti na albuminu. Poleg bilirubina sta le fenilbutazon in acetilsalicilna kislina, v koncentracijah, ki se navadno dosežejo *in vivo*, sposobna izpodriniti etopozid s humanih serumskih proteinov. Prosta oblika etopozida je tista, ki lahko prehaja skozi celične membrane in vstopa v interakcije s tarčnim mestom delovanja in zato predstavlja aktivno obliko etopozida. Zato le majhna sprememba v vezavi etopozida na proteine lahko povzroči veliko spremembo v koncentraciji prostega etopozida in s tem povečanje farmakoloških ali celo toksičnih učinkov standardnih odmerkov etopozida. Ugotovljeno je bilo, da ima koncentracija prostega etopozida v plazmi boljšo napovedno vrednost za optimizacijo odmerjanja od celokupne koncentracije etopozida, še posebej pri bolnikih z veliko razliko v vezavi etopozida na plazemske proteine (14, 15).

### 1.5.4 Metabolizem in izločanje

Metabolizem etopozida lahko poteka po različnih poteh, ki omogočajo nastanek še bolj hidrofilne oblike. Ta oblika se namreč lažje izloča iz telesa (metabolne poti etopozida so grafično prikazane na sliki 5). V urinu odraslih in otrok najdemo trans in cis-(picro)-hidroksikislinski derivat, ki nastane z odprtjem oz. hidrolizo laktonskega obroča. Nahaja se tudi v plazmi, verjetno v obliki trans izomera. Z urinom se izločajo tudi glukuronidi in/ali sulfatni konjugati etopozida. Poleg tega z 3-*O*-demetiliranjem dimetoksifenolnega obroča prek izoenzima CYP450 3A4 nastane ustrezen katehol. Pri  $\text{pH} < 2$  se odstrani etiliden  $\beta$ -glukopiranozilna skupina in tako nastane aglikonski metabolit. Ni dokazov, da bi pri etopozidu prišlo do učinka prvega prehoda. Prav tako ni dokazov o razlikah v presnovi in izločanju etopozida po peroralni uporabi kapsul in intravenski uporabi (15).



Slika 5: Presnove poti etopozida v telesu.

Etopozid 3-*O*-demetilacija se *in vitro* lahko zavira z različnimi substrati CYP3A4, vključno z verapamilom in ciklosporinom. Kombinacijo vseh treh učinkovin so uporabljali v kliničnih raziskavah z namenom vpliva na metabolizem etopozida. Ko so ciklosporin in etopozid uporabljali sočasno intravensko, je prišlo do znatnega povečanja AUC-ja

etopozida. Opazili so 65-odstotno zmanjšanje telesnega in 52-odstotno zmanjšanje ledvičnega očistka etopozida (15).

Po intravenski uporabi se etopozid bifazno razporedi po telesu; razpolovni čas porazdelitve je okoli 1,5 ure, terminalni razpolovni čas izločanja pa med 4 in 11 urami. Telesni očistek etopozida je lahko od 33 do 48 mL/min ali od 16 do 36 mL/min/m<sup>2</sup> in je, podobno kot terminalni razpolovni čas izločanja, neodvisen od odmerka v razponu od 100 do 600 mg/m<sup>2</sup>. Pri istem odmernem intervalu AUC in C<sub>max</sub> linearno naraščata v odvisnosti od odmerka, brez kumulacije etopozida v plazmi. Po intravenski uporabi etopozida se 56 % odmerka izloči z urinom v 120 urah, od tega 45 % kot etopozid in 55 % kot metaboliti. Prav tako se v 120 urah po i. v. uporabi 44 % izloči z blatom. Zato je izločanje nespremenjenega etopozida ali njegovih presnovkov z žolčem zelo pomembna pot izločanja. Pri odraslih telesni očistek etopozida korelira z očistkom kreatinina, nizkimi koncentracijami plazemskih albuminov in z drugimi potmi izločanja (13).

## **1.6 Pregled analiznih metod za določanje etopozida v plazmi**

Do sedaj objavljene metode za določanje etopozida v plazmi uporabljajo ekstrakcije tekoče-tekoče ali ekstrakcijo na trdnih nosilcih. Separacija se navadno doseže s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, medtem ko se za detekcijo uporabljajo fluorescenčna, elektrokemična ali tandemska masna spektrometrija. Zaradi velike variabilnosti etopozida med bolniki je potrebno izvajati terapevtsko spremljanje koncentracije–TDM (Therapeutic Drug Monitoring). To je spremljanje koncentracij zdravila v bioloških vzorcih, s pomočjo katerega se določi režim odmerjanja, prilagojen za vsakega bolnika posebej. Za izvajanje TDM potrebujemo ustrezno metodo, s katero lahko določimo koncentracijo zdravila v plazmi.

Dosedanje metode so največkrat razvite za sočasno določanje različnih učinkovin proti raku v plazmi (11, 21, 25, 26), saj zdravljenje vedno poteka za dvema ali tremi zdravili. Veliko metod pa je takih, s katerimi se določa le koncentracija etopozida (17, 18, 20, 22, 23, 24) ali pa hkrati koncentracija etopozida in njegovega metabolita–katehola, ki nastane s 3-*O*-demetilacijo (19, 27).

V omenjenih člankih so za ločevanje učinkovin in njihovih metabolitov največkrat uporabili reverznofazno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Ločevanje analitov je potekala na nepolarni stacionarni fazi, spiranje pa z mobilno fazo, ki je največkrat kombinacija organskega topila (metanola, acetonitrila) in vode ali pufrov. Za

pripravo pufrov so se pogosto uporabljale tudi nizke koncentracije očetne kisline (0,1–0,1 %) (v/v).

Priprava vzorcev za analizo je odvisna od njihove čistosti ter vrste kromatografskega sistema. Osnovni koraki, ki jih lahko vključimo v proces priprave vzorca, so: bogatenje plazme, homogeniziranje, obarjanje, centrifugiranje, filtriranje, ekstrakcija, sušenje in »rekonstitucija« oz. raztapljanje suhega ostanka. Glede na vrsto vzorca in analizne metode se uporabljajo različne kombinacije opisanih osnovnih korakov. Najpogosteje uporabljena ekstrakcija v zgoraj naštetih analiznih metodah je bila eno- ali dvostopenjska ekstrakcija tekoče-tekoče (17, 18, 21-24, 27). Po obogatitvi plazme z etopozidom in IS so ekstrakcijo izvajali v kloroformu, redko v etru (22) ali acetonitrilu (27). Pri ostalih člankih je bila uporabljena ekstrakcija na trdnem nosilcu – SPE (Solid Phase Ekstraktion), predvsem zaradi analize kompleksnih vzorcev (20, 25, 26). Po ekstrakciji, centrifugiranju in odparitvi ekstrakcijskega topila so suhi ostanek vedno raztopili v zmesi organskega topila in vodne faze (mobilna faza, različni % metanola ali acetonitrila v vodi).

Pri obstoječih analiznih metodah je bila detekcija etopozida z različnimi detektorji v sklopu HPLC. Najpogosteje uporabljen je bil fluorescenčni detektor (17, 18, 20, 26), poleg njega pa so uporabili še elektrokemični (19, 21, 24) ali UV-detektor (22). Pri ostalih metodah so uporabili HPLC, sklopljen z masnim spektrometrom (23, 25, 27). Masni detektor je sposoben zelo natančne kvalitativne in kvantitativne analize analitov na podlagi njihove mase. Zato metode, ki imajo nizko mejo kvantifikacije za detekcijski sistem največkrat uporabijo masni detektor.

Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ) za etopozid v slednjih metodah je bila pričakovano najnižja pri uporabi masnega detektorja, kjer so se spustili celo do 1 ng/mL (25) oz. 5 ng/mL (23), medtem ko je bila najvišja zgornja meja območja 100 µg/mL, (27). Območje linearnosti je bilo najvišje pri masnem detektorju, razlika med najnižjo in najvišjo koncentracijo je bilo kar 1000-krat. V člankih brez uporabljenega masnega detektorja se je območje linearnosti gibalo od 0,05 µg/mL do 30 µg/mL.

Pri večini omenjenih razvitih in objavljenih metod je za določanje koncentracije etopozida v plazmi uporabljala razmerje med odzivom etopozida in odzivom ustreznega internega standarda. V člankih je bil zaradi velike strukturne podobnosti (glej Preglednica II) najpogosteje uporabljen interni standard tenipozid (17, 18, 24, 27). Uporabili so ga tako na fluorescenčnem kot na elektrokemičnem detektorju. Manouilov in sodelavci (20) so za

interni standard uporabili podofilotoksin, ker predstavlja izhodno spojino za sintezo etopozida (Preglednica II).



## 2 NAMEN DELA

Etopozid je polysintezni derivat podofilotoksina, ki je zaviralec topoizomeraze II. Uporablja se za zdravljenje drobnoceličnega pljučnega raka, raka testisov in limfomov. Bolniki s pljučnim rakom različno reagirajo na zdravljenje z etopozidom. Glavna vzroka variabilnosti sta slaba kemična stabilnost etopozida v telesnih tekočinah in absorpcija skozi črevesno sluznico, kar pomeni, da enaki odmerki etopozida lahko vodijo do različnih plazemskih koncentracij etopozida ter tudi do različnih učinkov.

Etopozid obstaja v dveh farmacevtskih oblikah: v obliki koncentrata za raztopino za i. v. uporabo in v obliki mehkih želatinastih kapsul za p. o. uporabo. Poznane so številne prednosti p. o. uporabe v primerjavi z i. v., tako z vidika bolnika kakor tudi z vidika optimizacije stroškov. V klinični praksi se uporablja večinoma v obliki i. v. infuzije, saj je za p. o. uporabo značilna velika variabilna absorpcija in posledično nepredvidljiva in nepopolna biološka uporabnost. Za določitev intra- in interindividualne variabilnosti farmakokinetike etopozida je potrebno odkriti dejavnike, ki vplivajo na plazemski profil etopozida. Bioanalizne metode so zato eno izmed osnovnih orodij, ki jih potrebujemo v tovrstnih raziskavah.

V sklopu diplomske naloge bomo razvili in optimizirali metodo za vrednotenje koncentracije etopozida v plazemskih vzorcih bolnikov s pljučnim rakom. Osnovne pogoje analizne metode bomo postavili na osnovi že objavljenih analiznih metod. Metodo bomo razvili v več stopnjah. Začeli bomo z iskanjem optimalne priprave in shranjevanja standardnih raztopin. V drugem delu bomo optimizirali kromatografsko ločbo na sistemu HPLC. Izbrali bomo ustrezno reverznofazno kolono ter določili optimalne pogoje na fluorescenčnem detektorju. Kot interni standard bomo izbrali molekulo, ki bo čim bolj strukturno podobna etopozidu in se bo primerljivo obnašala pri izbranih analiznih pogojih. Izbrali bomo ustrezno sestavo in pretok mobilne faze, z namenom zagotoviti čim boljšo resolucijo analitov in skrajšati čas analize. V zadnji fazi bomo optimizirali ekstrakcijo tekoče-tekoče etopozida iz plazemskih vzorcev.

Po razvoju ustrezne metode za plazemske vzorce bomo metodo validirali po smernicah ameriške Agencije za hrano in zdravila (FDA). Določili bomo točnost, natančnost, ponovljivost, mejo detekcije, mejo kvantifikacije, selektivnost in določili stabilnost naših analiziranih spojin. Optimizirano in validirano metodo bomo uporabili za določanje

koncentracij etopozida v plazemskih vzorcih bolnikov, ki se zdravijo z etopozidom, in s tem potrdili ustreznost metode za TDM.

### 3 MATERIALI IN OPREMA

#### 3.1 Biološki material

Uporabljali smo humano plazmo (antikoagulant EDTA), pridobljeno na Zavodu za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana. Imeli smo več različnih plazem, ki smo jih shranili v zamrzovalniku pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vsak dan oz. vsako pripravo umeritvene krivulje smo en alikvot zamrznjene plazme odtalili na sobni temperaturi. Pred pipetiranjem smo počakali, da se je plazma segrela na sobno temperaturo in jo nato premešali. Podatki uporabljenih plazem za bogatenje z našim analitom so predstavljeni v Preglednica II.

**Preglednica II: Oznake uporabljenih plazem za optimizacijo in validacijo metode.**

oznaka	številka	odvzem	aliquot
Plazma 1	1899220	23. 9. 2011	26. 7. 2012
Plazma 2	1697084	28. 2. 2008	8. 8. 2012
Plazma 3	1878738	23. 2. 2011	2. 3. 2012
Plazma 4	1866003	10. 4. 2011	2. 3. 2012
Plazma 5	2103144	16. 7. 2012	19. 9. 2012
Plazma 6	2103150	16. 7. 2012	19. 9. 2012
Plazma 7	1979776	20. 9. 2011	4. 10. 2011

Plazemske vzorce bolnikov, ki se zdravijo z etopozidom, smo dobili iz bolnišnice Golnik, iz klinične raziskave, ki poteka v okviru doktorske disertacije Renate Režonja, mag. farm., z naslovom Razvoj orodij za optimizacijo peroralnega odmerka etopozida pri zdravljenju bolnikov z drobnoceličnim pljučnim rakom.

V Preglednica III je na primeru razložen način označevanja realnih vzorcev bolnikov. Vsi vzorci, ki so bili analizirani, so podani pod točko 5.6.

**Preglednica III: Način označevanja realnih vzorcev bolnikov s pljučnim rakom.**

bolnik	krog	dan	čas odvzemov plazme	Oznaka vzorca
P3	KT	1	3 ure po uporabi	<b>P3 3/1/1</b>
			6 ur po uporabi	<b>P3 3/1/2</b>
			24 ur po uporabi; pred naslednjim odmerkom	<b>P3 3/1/3</b>
		2	3 ure po uporabi	<b>P3 3/2/1</b>

		6 ur po uporabi	<b>P3 3/2/2</b>
		24 ur po uporabi; pred naslednjim odmerkom	<b>P3 3/2/3</b>
	3	3 ure po uporabi	<b>P3 3/3/1</b>

### 3.2 Standardi

- ETOPOZID;  $C_{29}H_{32}O_{13}$ ,  $M=588,6$  g/mol, (Sequoia Research Products, (Pangbourne, Združeno kraljestvo Velika Britanija);  
4'-Demethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-O-Ethylidene- $\beta$ -D Glucopyranoside)
- TENIPOZID;  $C_{32}H_{32}O_{13}S$ ,  $M=656,655$  g/mol, (Sequoia Research Products, (Pangbourne, Združeno kraljestvo Velika Britanija) 4'-  
Demethylepipodophyllotoxin, 9-(4,6-O-2-thenyli- dene- $\beta$ -D-glucopyranoside)
- DEXAMETASON;  $C_{22}H_{29}FO_5$ ,  $M=392,46$  g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija); 9-Fluoro-11 $\beta$ ,17,21-trihydroxy-16 $\alpha$ -methylpregna-1,4-diene-3,20-dione

### 3.3 Reagenti in topila

- Metanol  $CH_3OH$  Chromasol V®;  $M_r$  32,04 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Acetonitril  $C_2H_3N$ ;  $M_r=41,05$  g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 85-odstotna ortofosforna kislina  $H_3PO_4$ ;  $M_r=98$  g/mol, (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Dietileter  $C_4H_{10}O$ ;  $M_r= 74,12$  g/mol, (J.T.Baker , ZDA)
- Kloroform  $CHCl_3$ ,  $M_r=119,38$  g/mol, (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Standardne pufrske raztopine pH=3,00; pH=4,00; pH=7,00; pH=10,00; (Kefolab, Ljubljana, Slovenija)
- Bidestilirana voda-mili-Q, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), specifična upornost  $> 18,2$  m $\Omega$ cm, celokupni organski ogljik (TOC)  $< 6$  ppb (pri  $T = 25^\circ C$ ), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
- Kalijev dihidrogenfosfat pro analysi  $KH_2PO_4$ ;  $M_r=136,09$  g/mol, (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 1 M raztopina natrijevega hidroksida NaOH
- Klorovodikova kislina HCl kadeča 37 % (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

### 3.4 Naprave in pribor

- Hladilnik 4 °C (LTH, Škofija Loka, Slovenija)
- Hladilnik 4 °C z zamrzovalnikom -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Zamrzovalnik Gorenje (T=-20 °C) (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Tehnica AG 245 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- Tehnica XP 105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica)
- pH meter MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- Centrifuga Eppendorf, tip: 5415R (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- Stresalnik Vortemp 56 (Tehnica®, Železniki, Slovenija)
- Turbovap®LV (Caliper, Hopkinton-MA, ZDA)
- Magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Póvoa de Varzim, Portugalska)
- Mešalnik Vibromix 114EV (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- Mešalnik LabDancer (IKA, Staufen, Nemčija)
- Ultrazvočna kadička SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- Polavtomatske pipete 2-20 µL, 20-200 µL in 200-1000 µL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- Plastične epruvete 1,5 mL (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija) in 2 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- Celulozno acetatni filter 0,45 µm (Sartorius AG, Göttingen, Nemčija)
- Programska oprema MassHunter (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- HPLC KOLONE
  - Phenomedex Gemini C18 150 x 4,6 mm 5 µm, (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
  - Phenomedex Luna C18 (2) 100A 150 x 4,6 mm 3 µm, (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
  - Zorbax Eclipse XDB-C8 150 x 4,6 mm 5µm delci (Agilent technologies, Palo Alto, ZDA)
- Predkolona za HPLC:
  - Phenomenex 4 x 2 mm C18 (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- Sistem HPLC Agilent 1100 series z UV in FLD detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)

- Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, tehtiči, merilni valji, vialo, inserti za vijale, presesalna buča in lij za presesalno bučo.
- Ostali inventar: spatule, nastavki za pipete, palčke za mešanje in Parafilm®M.

## 4 METODE

Pri razvoju metode smo se soočali s številnimi spremenljivkami, ki smo jih lahko spreminjali pri določanju naše spojine. Spremembe smo naredili v postopku priprave delovnih raztopin in ekstrakcije vzorca, v kromatografskih pogojih in detekciji analitov. Med optimizacijo smo preizkusili tudi več različnih kolon in si na koncu izbrali optimalno. Potek priprave naših vzorcev se je začel z odmrzovanjem plazme, nato smo izvedli ekstrakcijo za čiščenje pripravljenih obogatenih plazemskih vzorcev. Potem smo odpareli topilo, s katerim smo ekstrahirali vzorce, sledila je še raztapljanje suhega ostanka in injiciranje na HPLC, ki nam je na koncu podal rezultate v obliki kromatogramov.

### 4.1 Priprava standardnih raztopin in topil

#### 4.1.1 Osnovne raztopine etopozida

V Preglednica IV je prikazan postopek priprave osnovnih raztopin etopozida, iz katerih smo pripravljali delovne raztopine in plazemske vzorce.

**Preglednica IV: Priprava osnovnih raztopin etopozida.**

Osnovna raztopina: OS_E		Redčitev osnovne razt.: R1_E		Redčitev osnovne razt.: R2_E	
m (mg)	1,15	V OS_E (mL)	0,05	V R1_E (mL)	0,027
V MeOH (mL)	0,821	V H <sub>2</sub> O (mL)	0,30	V H <sub>2</sub> O (mL)	0,243
c (mg/mL)	1,40	c (mg/mL)	0,200	c (mg/mL)	0,0200
2 mL epruveta		1,5 mL epruveta		1,5 mL epruveta	

- Osnovna raztopina: OS\_E s koncentracijo 1,4 mg/mL

V 2-mililitrsko epruveto smo zatehtali približno 1 mg učinkovine, dodali ustrezen volumen metanola, da smo dobili želeno koncentracijo 1,4 mg/mL, in nato vorteksirali. Za nekaj minut smo dali epruveto tudi na ultrazvočno kadičko, da se je standard ustrezno raztopil.

- Redčitev osnovne razt.: R1\_E s koncentracijo 0,2 mg/mL

V 1,5-mililitrsko epruveto smo odpipetirali 50  $\mu$ L osnovne raztopine OS\_E, dodali 300  $\mu$ L vode, vorteksirali in tako dobili raztopino z želeno koncentracijo.

- Redčitev osnovne razt.: R2\_E s koncentracijo 0,02 mg/mL

V 1,5-mililitrsko epruveto smo odpipetirali 27  $\mu$ L raztopine R1\_E, dodali 243  $\mu$ L vode, vorteksirali in tako dobili raztopino z želeno koncentracijo.

#### 4.1.2 Osnovni raztopini tenipozida (IS)

V Preglednica V je prikazan postopek priprave osnovnih raztopin tenipozida, ki smo jih uporabili za dodajanje k čisti plazmi in plazemskim vzorcem bolnikov kot interni standard.

**Preglednica V: Priprava osnovnih raztopin tenipozida.**

Osnovna raztopina: OS_T		Redčitve osnovne raztopine: R1_T				
m (mg)	1,44	V OS (mL)	0,318	0,08	0,07	0,04
V MeOH (mL)	1,271	V H <sub>2</sub> O (mL)	0,282	0,525	0,723	0,86
c (mg/mL)	1,133	c (mg/mL)	0,600	0,150	0,100	0,050
2 mL epruveta		1,5 mL epruveta				

- Osnovna raztopina: OS\_T s koncentracijo 1,133 mg/mL

V 2-mililitrsko epruveto smo zatehtali približno 1 mg učinkovine, dodali ustrezen volumen metanola, da smo dobili želeno koncentracijo 1,133 mg/mL, in nato vorteksirali. Za nekaj minut smo dali epruveto tudi na ultrazvočno kadičko, da se je standard ustrezno raztopil.

- Redčitev osnovne razt.: R1\_T z različnimi koncentracijami

V 1,5-mililitrsko epruveto smo odpipetirali ustrezen volumen osnovne raztopine, dodali ustrezen volumen vode in tako dobili raztopino z želeno koncentracijo. Med optimizacijo smo pripravili različne koncentracije IS zaradi moteče koelucije, ki izhaja iz tenipozida (glej točko 4.5.4).

Pri optimizaciji smo ugotovili vezavo učinkovin na plastiko epruвет (glej točko 0), zato smo pri pripravi R1\_E, R2\_E in R1\_T uporabljali namesto čiste Milli-Q vode (topilo 1), 50-odstotne (topilo 2) ali 75-odstotne raztopine metanola v vodi (topilo 3), ostala redčenja so ostala ista kot v zgornjih preglednicah. Po koncu optimizacije smo se odločili za topilo 3 in ga uporabljali pri validaciji in analizi realnih vzorcev.

#### 4.1.3 Delovne raztopine (WS)

Delovne raztopine smo potrebovali za pripravo umeritvene premice etopozida. Koncentracije delovnih raztopin so predstavljale 20-krat višje koncentracije od želenih plazemskih koncentracij. Pripravili smo jih v 1,5-mililitrskih epruветah, kamor smo odpipetirali potrebno količino osnovne raztopine in z ustreznim topilom (glej točko 4.1.2) dopolnili do 100  $\mu$ L. Izjemoma smo pripravili 150 ali 200  $\mu$ L WS, če smo za pripravo WS potrebovali osnovno raztopino z nižjimi koncentracijami. S tem smo se izognili pipetiranju volumnov, manjših od 20  $\mu$ L, in si tako zagotovili bolj natančno pipetiranje. Izjema je tudi najvišja točka umeritvene premice, kjer smo pripravili le 50  $\mu$ L delovne raztopine, zaradi manjše porabe osnovne raztopine. Vse te raztopine so v tabeli označene z zvezdico (\*).

Postopek priprave delovnih raztopin je prikazana v Preglednica VI.

**Preglednica VI: Priprava delovnih raztopin etopozida in obogatenih plazemskih vzorcev.**

Delovne raztopine (WS)					Obogateni plazemski vzorci			
Osnovna	V Osnovne (mL)	V H <sub>2</sub> O (mL)	V cel (mL)	c WS (µg/mL)	V plazme (mL)	V WS (mL)	V R1_T(mL)	c plazma (µg/mL)
H <sub>2</sub> O	/	0,1	0,1	0	0,45	0,025	0,025	0
R2_E	0,025	0,175	<b>0,2*</b>	2,5	0,45	0,025	0,025	0,125
R2_E	0,025	0,075	0,1	5	0,45	0,025	0,025	0,25
R2_E	0,05	0,05	0,1	10	0,45	0,025	0,025	0,5
R2_E	0,075	0,025	0,1	15	0,45	0,025	0,025	0,75
R1_E	0,02	0,18	<b>0,2*</b>	20	0,45	0,025	0,025	1
R1_E	0,02	0,08	0,1	40	0,45	0,025	0,025	2
R1_E	0,04	0,06	0,1	80	0,45	0,025	0,025	4
R1_E	0,06	0,04	0,1	120	0,45	0,025	0,025	6
R1_E	0,08	0,02	0,1	160	0,45	0,025	0,025	8
OS_E	0,0214	0,1286	<b>0,15*</b>	200	0,45	0,025	0,025	10
OS_E	0,0214	0,0786	0,1	300	0,45	0,025	0,025	15
OS_E	0,0286	0,0714	0,1	400	0,45	0,025	0,025	20
OS_E	0,022	0,028	<b>0,05*</b>	600	0,45	0,025	0,025	30

Pri optimizaciji smo ugotovili vezavo učinkovin na plastiko epruvet (glej točko 0), zato smo pri pripravi delovnih raztopin uporabljali namesto čiste Milli-Q vode (topilo 1) 50-odstotne (topilo 2) ali 75-odstotne raztopine metanola v vodi (topilo 3), ostala redčenja so ostala ista kot v Preglednica VI.

#### 4.1.4 Priprava plazemskih vzorcev

- *Priprava obogatenih standardnih vzorcev za umeritveno krivuljo:*

450 µL odmrznjene, čiste plazme zdravih prostovoljcev smo odpipetirali v ustrezno označene 1,5-mililitrske epruvete in ji nato dodali 25 µL delovne raztopine ustrezne koncentracije ter 25 µL R1\_T (tenipozida-IS) z različnimi koncentracijami (glej točko 4.1.2). Obogateno plazmo smo nato 15 sekund vorteksirali in s tem zagotovili porazdelitev etopozida in IS po celotnem volumnu plazme.



- *Priprava realnih plazemskih vzorcev:*

450  $\mu\text{L}$  odmrznjene plazme bolnikov smo odpipetirali v ustrezno označene 1,5-mililitrske epruvete in ji nato dodali 25  $\mu\text{L}$  topila 3 ter 25  $\mu\text{L}$  R1\_T (tenipozida-IS) s koncentracijo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Plazmo smo pred ekstrakcijo še 15 sekund vorteksirali.

#### **4.1.5 Priprava in shranjevanje osnovnih in delovnih raztopin**

##### **4.1.5.1 Shranjevanje v zamrzovalniku**

Natehtali smo etopozid in tenipozid in pripravili osnovne raztopine v čistem metanolu. Iz osnovnih raztopin smo isti dan pripravili še R1, R2 etopozida ter R1 tenipozida (glej točko 4.1.1 in 4.1.2). Vse raztopine smo shranili v hladilniku na 5 °C. Po 4 tednih smo po analizi opazili močno znižanje odzivov, predvsem tenipozida. Zato smo se odločili, da osnovne raztopine R1\_E, R2\_E in R1\_T ter delovne raztopine (WS) pred vsako analizo pripravimo sveže iz OS\_E in OS\_T, saj smo ugotovili, da niso dovolj stabilne (glej poglavje 5.1.1). Osnovni raztopini OS\_E in OS\_T smo shranili v zamrzovalniku na -20 °C. Da nismo vsako analizo raztopin jemali iz zamrzovalnika, smo jih razdelili v alikvote s količino za enkratno analizo in jih shranili v njem, dokler jih ni zmanjkalo oz. najdlje 1 mesec.

##### **4.1.5.2 Vezava učinkovin na plastiko**

Prvi poizkus: Med optimizacijo smo opazili, da se izmerjen odziv standarda poveča, če izpustimo en korak stika učinkovin s plastičnimi epruvetami. Naredili smo dva vzporedna poizkusa pravilnosti te teze:

1. Pripravili smo delovne standarde umeritvene premice po osnovnem postopku (glej točko 4.1.3).
2. Osnovni raztopini R2\_E in R1\_E smo direktno uporabili za pripravo plazemskih standardov s konc. 1 in 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (brez priprave delovnih raztopin s koncentracijo 20 in 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tako smo izpustili en korak pri pripravi standarda in skrajšali stik učinkovine s plastiko.

Drugi poizkus: Vezava na plastiko pri redčitvah. Pripravili smo plazemske vzorce s koncentracijo 15, 20 in 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , jih po raztapljanju v mobilni fazi redčili na pol ter jih primerjali s plazemskimi vzorci 7.5, 10 in 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  brez redčenja.

Za zmanjšanje izgube učinkovine na plastiko smo preizkusili topilo 1 (čisto vodo), topilo 2 (50-odstotni MeOH) in topilo 3 (75-odstotni MeOH).

## 4.2 Priprava mobilnih faz

Mobilno fazo smo pripravljali vsak dan svežo, tako vodno kot organsko fazo. Med optimizacijo smo za vodno komponento mobilne faze pripravili 25 mM fosfatni pufer s pH 3,0, 4,0 in 7,4. Za pripravo teh fosfatnih pufrov smo zatehtali 3,402 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 1000-mililitrsko bučo in dopolnili z Milli-Q vodo malo pod oznako. Da smo dobili pufera s pH 3,0 in 4,0, smo umerili pH meter med 3 in 4 s standardnimi pufrskimi raztopinami in nato našo raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  nakisali do pH 3,0 oz. 4,0 s pomočjo koncentrirane ortofosforne kisline. To raztopino smo dopolnili z vodo do 1000 mL. Za pripravo pufera s pH 7,4 smo umerili pH meter med 7 in 10 ter osnovno pufrsko raztopino titrirali z 1M NaOH-jem do zelenega pH-ja. Nato smo raztopine filtrirali preko 0,45  $\mu\text{m}$  celulozno acetatnega filtra s pomočjo presesalne buče in jo razplinjali 10 minut na ultrazvočni kadički. Organska komponenta je sveže razplinjena raztopina 98-odstotnega acetonitrila in 2-odstotne Milli-Q vode, zato da preprečimo polimerizacijo acetonitrila.

## 4.3 Optimizacija detekcije

### 4.3.1 Določanje ekscitacijske in emisijske valovne dolžine

Večina analitskih člankov opisuje določanje etopozida s pomočjo fluorescenčnega detektorja in s podobnim internim standardom, ki fluorescira. Potrebno je zagotoviti čim boljšo detekcijo etopozida in internega standarda tenipozida, saj je to ključnega pomena za doseganje potrebne občutljivosti analizne metode. Zato jima moramo določiti ekscitacijski in emisijski spekter. Naš detektor smo nastavili za snemanje »multiplih« valovnih dolžin in posneli kromatografski spekter za obe učinkovini. Posneli smo ekscitacijski spekter v intervalu od 310 nm do 190 nm in emisijski od 350 nm do 280 nm.

Za določitev  $E_x$  in  $E_m$  z najvišjim odzivom smo si izbrali valovne dolžine okoli maksimumov spektra ( $E_x$  205 nm in  $E_m$  328 nm), saj so teoretično tam največji odzivi. Pripravili smo umeritveno krivuljo standarda etopozida in tenipozida (glej točko 4.1.3) in posneli različne kombinacije emisijske ( $E_m$ ) in ekscitacijske ( $E_x$ ) valovne dolžine.

### 4.3.2 Optimizacija ojačitve fotopomnoževalke

V razvoju naše metode smo tudi spreminjali ojačitev fotopomnoževalke (»PMT gain«). Začeli smo z detekcijo z ojačitvijo signala 9, med razvojem pa jo zvišali na 12.

## 4.4 Razvoj tekočinske kromatografije (HPLC)

### 4.4.1 Izbor stacionarne faze

Za separacijo naših analitov od produktov iz plazme (matrice) smo se odločili za reverzno-fazno kromatografijo z uporabo kolon C18. Na voljo smo imeli več rabljenih kolon, med katerimi smo izbrali dve, po našem mnenju najbolj optimalni:

- Phenomenex Gemini C18 150 x 4,6 mm 5  $\mu$ m,
- Phenomenex Luna C18 (2) 100A 150 x 4,6 mm 3  $\mu$ m.

Optimizacijo metode smo začeli na koloni Gemini, ki je imela delce stacionarne faze velike 5  $\mu$ m. Zaradi nezmožnosti ločitve majhne koelucije ob etopozidu, smo se odločili za zamenjavo kolone z isto dolžino, vendar z manjšo velikostjo nepolarnih delcev stacionarne faze, in sicer 3  $\mu$ m.

Proučevali smo vpliv kolone na dolžino analize, predvsem na čas elucije tenipozida. Vpliv na pretok in tlak na koloni, predvsem pa vpliv na resolucijo vrhov analitov in vrhov komponent iz plazme. Za preizkus smo pripravili obogatene plazemske vzorce s koncentracijo etopozida od 0,125  $\mu$ g/mL do 20  $\mu$ g/mL in dodatkom tenipozida (glej točko 4.1.3) ter jih isti dan posneli z uporabo enake mobilne faze, spremenili smo le kolono.

### 4.4.2 Shranjevanje kolone (spiranje)

Po končanem delu smo kolono sprali in tako odstranili predvsem vezane lipofilne snovi. Uporabili smo 90 minut dolgo metodo z gradientom s pretokom 1 mL/min, ki je prikazana v Preglednica VII in spreminjali % acetonitrila s časom. Injicirali smo 100  $\mu$ L raztopine s 50 % acetonitrila in 50 % vode.

**Preglednica VII: Metoda spiranja kolone; spreminjanje % acetonitrila med čiščenjem.**

interval (min)	% acetonitrila	% vode
0–10	35	65
10–30	65	35
30–60	100	0
60–80	65	35
80–90	35	65

Če je kolona stala neuporabljena dlje časa, smo interval s 65 % acetonitrila podaljšali od 60. do 90. minute in jo shranili v 65 % acetonitrila, po navodilih proizvajalca (28).

#### 4.4.3 Volumen injiciranja

Razvoj optimizacije smo začeli z 20  $\mu\text{L}$  volumna injiciranja, vmes smo zvišali na 50  $\mu\text{L}$ , na koncu pa zaključili s 25  $\mu\text{L}$ . Za razlago spreminjanja glej točko 4.5.4.

#### 4.4.4 Izbira optimalne mobilne faze

Uporabili smo enako mobilno fazo kot v izhodiščnem članku Krogh-Madsen in sodelavci (26), ki je sestavljena iz 35 % acetonitrila in 65 % 25 mM fosfatnega pufrs s pH-jem 3,0. Kot vodni del mobilne faze smo med optimizacijo preizkusili še pufer s pH 4,0 in 7,4. Kot organski del mobilne faze smo vedno uporabljali 98 % acetonitrila in 2 % vode. Pripravili smo vodni vzorec etopozida s koncentracijo 10  $\mu\text{g/mL}$ , dodali interni standard in ga posneli pri različnih pH-jih mobilne faze, ostalih parametrov nismo spreminjali. Nadaljnji spreminljivki, ki smo ju spreminjali, sta bili pretok mobilne faze in odstotek organske faze.

##### 4.4.4.1 Izbira optimalnega odstotka organske faze

Na koloni Gemini smo preizkusili različne izokratske ločbe (odstotek organskega dela MF je ves čas konstanten), ker smo želeli s spremembo deleža organskega topila naš vrh etopozida čim bolj osamiti od ostalih motečih vrhov iz plazme. Pri retencijskem času tenipozida pa ni bilo nobenih vrhov, ki bi nam otežili integracijo. Preizkušali smo različne odstotke organskega topila acetonitrila pri 30, 32, 33, 34, 35, 36, 38 in 40 %. Pripravili smo plazemski vzorec s standardom etopozida koncentracije 1  $\mu\text{g/mL}$  in mu dodali interni standard (glej točko 4.1.3).

##### 4.4.4.2 Izbira optimalnega pretoka mobilne faze

Ker smo uporabljali koloni z različno velikostjo delcev, smo morali spreminjati tudi pretok mobilne faze. V Preglednica VIII so predstavljeni končno uporabljeni parametri na koloni Gemini, v Preglednica IX pa parametri na koloni Luna..

**Preglednica VIII: Metoda analize na koloni Gemini; sprememba pretoka tekom analize.**

interval (min)	pretok (mL/min)	Tlak (bar)	Tr etopozid (min)	Tr tenipozid (min)
0–5,5	1	70	4,5	
5,5–9,0	2	140		
9,0–12,0	1	70		10,5

**Preglednica IX: Metoda analize na koloni Luna; sprememba pretoka tekom analize.**

interval (min)	pretok (mL/min)	tlak (bar)	Tr etopozid (min)	Tr tenipozid (min)
0–7,0	0,7	90	6,5	
7,0–13,5	1,3	180		
13,5–16,0	0,8	105		14,7

#### 4.4.5 Vrsta detekcije

Ker lahko etopozidu in internemu standardu, tenipozidu, poleg fluorescence izmerimo tudi absorbanco, smo se odločili, da spremljamo odziv tudi na detektorju DAD. Pripravili smo umeritveno krivuljo (glej točko 4.1.3), poleg FLD smo vklopili še DAD in ga nastavili na 220 nm.

### 4.5 Razvoj metode za ekstrakcijo iz plazemskih vzorcev

Učinkovine iz plazme smo določali s HPLC, kjer je detekcija zelo odvisna od prisotnosti nečistot in vpliva matrice. Plazemske vzorce smo zato z namenom očiščenja preiskovanih analitov in izboljšanja linearnosti umeritvene krivulje ekstrahirali na različne načine. Preizkusili smo ekstrakcijo z različnim volumnom in vrsto topila, z nakisanjem in zamrzovanjem plazme.

#### 4.5.1 Izbor topila za ekstrakcijo tekoče-tekoče

Naslednji korak je bil izbor ustreznega organskega ekstrakcijskega topila. Preizkušali smo ekstrakcijo etopozida s koncentracijo 2  $\mu\text{g/mL}$  in tenipozida s koncentracijo 8  $\mu\text{g/mL}$  iz 500  $\mu\text{L}$  plazme v kloroformu in dietiletru (naprej topilu) pri različnih volumnih. Topila smo izbrali iz člankov, kjer so delali LLE proučevanih analitov (17, 18, 21-24, 27).

- a) *Volumen topila je 1,5 mL:* V 2-mililitrsko epruveto s 500  $\mu\text{L}$  obogatene plazme dodamo 1,5 mL topila, 30 sekund vorteksiramo, damo epruvete na stresalnik za 15 minut na 250 obratov/minuto. Sledi še 5 minut centrifugiranja pri 13000 obratih/minuto, v ohlajeni centrifugirki na 5 °C, da se vodna in organska plast lepo ločita. V novo 1,5-mililitrsko epruveto odpipetiramo iz zgornje faze točno 1000  $\mu\text{L}$  raztopine z učinkovino.
- b) *Volumen topila je 7 mL:* V 10-mililitrsko epruveto s 500  $\mu\text{L}$  obogatene plazme dodamo 7 mL topila, 30 sekund vorteksiramo in damo epruvete na stresalnik za 15 minut na 250 obratov/minuto. Sledi še 5 minut centrifugiranja pri 5000 obratih/minuto, v ohlajeni centrifugirki na 5 °C. V novo 10-mililitrsko stekleno epruveto smo odpipetirali točno 5 mL organskega topila, ga posušili in raztapljali s 300  $\mu\text{L}$  mobilne faze, kot je opisano pod točko 4.6.

#### 4.5.2 Vpliv zamrzovanja plazme

Pri odvzemu 1 mL organske faze smo imeli težave zaradi velike hlapnosti etra in posledično kapljanja med pipetiranjem, kar bi lahko vplivalo na točnost umeritvene premice. Poskusili smo z zamrzovanjem in odlitjem celotne etrne faze (približno 1,5 mL). Ekstrakcijo smo naredili na enak način kot pri točki 4.5.1. Sprememba je le ta, da po centrifugiranju damo epruvete za 45 minut v zamrzovalnik na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , da plazma zmrzne, eterna faza pa ne. V novo 1,5-mililitrsko epruveto odlijemo celotno organsko fazo ter centrifugiramo 3 minute na maksimalni hitrosti 13000 obratov/minuto, da izginejo kosmiči v organski fazi.

#### 4.5.3 Vpliv nakisanja plazme

Za boljši izkoristek ekstrakcije ter večjo natančnost etopozida smo poskusili nakisati plazmo s pH 7,4 na okoli pH 3. V članku (29) smo dobili podatek, da je pri zdravih ljudeh pufrna kapaciteta polne krvi 38,5, plazme pa 16,1 mEq/L/pH. Močno pa je odvisna od količine plazemskih proteinov in celokupnega ogljikovega dioksida (29).

K 500  $\mu\text{L}$  obogatene plazme smo dodali še 25  $\mu\text{L}$  2-molarne HCl, da nakisamo plazmo na pH 3, ter dobro premešali, da se plazemski proteini niso oborili. Nadaljevanje ekstrakcije je bilo enako, kot pri točki 4.5.1.

#### 4.5.4 Izboljšanje ločitve vrha etopozida

Ker z zamenjavo kolone in s spreminjanjem deleža acetonitrila v mobilni fazi nismo uspeli ločiti etopozida od koelucije, smo hoteli izvedeti, kaj je vzrok za koelucijo. Zato smo se odločili, da analiziramo pri identičnih pogojih:

- čisto plazmo, brez učinkovin,
- plazmo samo s tenipozidom,
- plazmo samo z etopozidom,
- plazmo z etopozidom in s tenipozidom.

Ker se koelucije nismo mogli znebiti, smo jo poskusili vsaj zmanjšati, da bo zadoščeno smernicam, ki pravijo, da je lahko višina/površina koelucije največ 20 % višine/površine najnižje koncentracije analita (etopozida) (30).

Spreminjali smo volumen injiciranja, koncentracijo IS tenipozida, LLOQ etopozida, kolono ter odstotek metanola v vodi za redčitev standardov, vse ostale kromatografske

pogoje smo pustili enake. V Preglednica X so predstavljeni kakšni so bili pogoji posameznega poizkusa izboljšanja ločitve vrha etopozida in koelucije.

**Preglednica X: Poskusi izboljšanja čistosti vrha etopozida s spreminjanjem volumna injiciranja, koncentracije R1\_T, % metanola in kolone.**

poskus	vol. injiciranja [ $\mu\text{L}$ ]	R1_T [ $\mu\text{g/mL}$ ]	% MeOH	LLOQ [ $\mu\text{g/mL}$ ]	kolona
A)	20	600	0	0,25	Gemini
B)	50	150	0	0,125	Gemini
C)	50	100	50	0,125	Gemini
D)	50	50	75	0,125	Luna
E)	25	100	75	0,125	Luna

#### 4.6 Sušenje ekstrakta in raztapljanje suhega ostanka

1 mL etrne faze smo posušili z dušikom do suhega ostanka s pomočjo aparature Turbovap. Ker je eter močno hlapen, je zadostovalo že 10 minut sušenja na 35 °C. Na začetku smo imeli pritisk dušika le 1 psi, nato pa ga postopoma povečali na 5 psi.

Ostanek v epruveti smo raztapljali v 200  $\mu\text{L}$  mobilne faze in vorteksirali 60 sekund. Potem smo raztopino napolnili v steklene inserte, jih vstavili v vialo ter prenesli v avtomatski vzorčevalnik, ohlajen na 5 °C. Raztopina v insertih je izgledala malo motno in že po nekaj urah so se v njih pojavili majhni kosmiči.

*Inserti brez oborine:* suh ostanek smo raztopili v 200  $\mu\text{L}$  50 % acetonitrila in 50 % vode. Vzorce smo nato centrifugirali 3 minute na maksimalni hitrosti 13000 obratov/minuto. Iz epruvete smo previdno odpipetirali bistro raztopino in jo napolnili v inserte. Tako se tudi po enem tednu na 5 °C v insertih ni pojavila nobena oborina več. Po tem postopku smo izvedli validacijo in analizo plazemskih vzorcev bolnikov.

#### 4.7 Validacija

Validacija je dokumentiran postopek preizkušanja in potrjevanja, da naša metoda, uporabljena pri razvoju, dosega predpisane rezultate. Metodo smo validirali po smernicah za validacijo bioanaliznih metod, ki jih je za industrijo predpisala ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA) (31). Vrednotili smo naslednje zahtevane validacijske parametre: linearnost, točnost, ponovljivost (natančnost), območje, mejo kvantifikacije (LLOQ), selektivnost, izkoristek ekstrakcije in več vrst stabilnosti. Za postopek validacije smo potrebovali in pripravili 13 obogatenih plazemskih standardov etopozida za umeritveno premico ter slep vzorec brez etopozida (namesto njega smo dodali isti volumen topila) in

tenipozid (glej točko 4.1.3). Standardom smo dodali še 3 koncentracije za kontrolo kakovosti, vsako po 5 paralelk, ki pokrivajo celotno območje umeritvene premice.

#### 4.7.1 Priprava standardov za kontrolo kakovosti pri validaciji

**Preglednica XI: Priprava delovnih raztopin etopozida in obogatenih plazemskih standardov za kontrolo kakovosti (QC).**

Delovne raztopine standarda (WS)					Standard za kontrolo kakovosti (QC)			
Osnova	V osnovne (mL)	V topila (mL)	V cel (mL)	c WS (µg/mL)	V plazme (mL)	V WS (mL)	V R1_T(mL)	c QC (µg/mL)
R2_E	0,06	0,14	0,2	6	0,45	0,025	0,025	0,3
R1_E	0,06	0,14	0,2	60	0,45	0,025	0,025	3
OS_E	0,027	0,118	0,145	260	0,45	0,025	0,025	13

Kontrolne in standardne vzorce za umeritveno premico smo od obogatjenja plazme do prenosa v inserte pripravili na enak način, kot je opisano v točkah 4.5 in 4.6. Tako smo pripravili slepi in 13 standardov za umeritveno premico ter 5 paralelk kontrolnih vzorcev (skupaj 15) in jih analizirali na HPLC.

Validacija je potekala tri dni, zato smo vsak dan validacije pripravili sveže standarde za celotno umeritveno premico in vse kontrolne standarde (QC).

#### 4.7.2 Linearnost

Linearnost je sposobnost metode, da znotraj določenega intervala (območja) daje odzive, ki so premosorazmerni s koncentracijo analizirane substance v vzorcu. Linearnost preverimo s statistično obdelavo analize standardov.

Linearnost opredelimo s pomočjo statistične obdelave odzivov standardnih vzorcev, in sicer z metodo linearne regresije določimo umeritveno premico z enačbo  $y = k \cdot x + n$ , pri čemer je  $y$  odziv (razmerje površine kromatografskega vrha analita in IS),  $x$  koncentracija analita v vzorcu,  $k$  naklon premice in  $n$  odsek na ordinati. Korelacijo med koncentracijo in odzivom podajamo s Pearsonovim koeficientom ( $r$ ) oz. determinacijskim koeficientom ( $R^2$ ) (31).

Za določanje umeritvene premice in linearnosti se zahteva slepi standard (brez analita in IS), nični standard (matriks z IS), LLOQ in še 6 do 8 standardov, ki pokrivajo celotno umeritveno premico. Vsaj 75 % (štirje standardi od šestih), vključno s standardom pri spodnji meji kvantifikacije (LLOQ) in pri najvišji koncentraciji, sme odstopati za manj kot 15 % od pričakovanega odziva in manj kot 20 % pri LLOQ. Za določanje linearnosti pa



mora biti  $R^2$  vsaj 0,998. V nasprotnem primeru metoda ne ustreza smernicam FDA glede linearnosti v danem območju (31).

Odstop predstavlja razliko med dejanskim odzivom analita oz. njegovega razmerja z IS ( $y$ ) in izračunano vrednostjo odziva oz. njegovega razmerja z IS ( $y'$ ) s pomočjo parametrov premice ( $k, x, n$ ).

Izračunamo ga po enačbi:

$$\text{odstop}[\%] = \frac{y}{y'} = \left[ \left( \frac{y}{k \cdot x + n} \right) - 1 \right] * 100\% \quad (\text{enačba 1})$$

#### 4.7.3 Točnost

Točnost analize metode izraža ujemanje vrednosti s sprejeto pravo (referenčno) vrednostjo. Točnost določamo z analizo kontrolnih vzorcev z znano koncentracijo analita (vsaj tri različne koncentracije QC vzorcev, ki pokrivajo celotno območje metode, in vsaj pet ponovitev pri vsaki koncentraciji). Iz odziva vsakega QC vzorca s pomočjo umeritvene premice  $y = k \cdot x + n$  izračunamo njegovo koncentracijo. Nato izračunamo povprečno koncentracijo petih ponovitev pri posamezni koncentraciji QC ter jo primerjamo z dejansko (referenčno), kot je prikazano v enačbi.

$$\text{odstop}[\%] = \left[ \left( \frac{c_{\text{izračunana}}}{c_{\text{referenčna}}} \right) - 1 \right] * 100\% \quad (\text{enačba 2})$$

Povprečna vrednost sme odstopati manj kot 15 % od dejanske vrednosti oz. manj kot 20 % pri LLOQ (31).

#### 4.7.4 Ponovljivost

Ponovljivost je sposobnost metode, da daje vedno enake rezultate pri istem homogenem vzorcu. Običajno jo izražamo kot standardni odklon (SD) ali koeficient variance (CV) oz. relativni standardni odklon (RSD). Ponovljivost določamo z analizo kontrolnih vzorcev z znano koncentracijo analita (vsaj tri različne koncentracije QC vzorcev, ki pokrivajo celotno območje metode in vsaj pet ponovitev pri vsaki koncentraciji). CV petih ponovitev pri posamezni koncentraciji QC ne sme biti večji od 15 % oz. 20 % pri LLOQ. Navadno določamo znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost. Znotrajdnevna ponovljivost je podana kot RSD oz. CV odzivov alikvotov istih QC vzorcev, ekstrahiranih in analiziranih znotraj enega dneva. Meddnevna ponovljivost pa je podana kot RSD oz. CV odzivov istih QC vzorcev, ekstrahiranih in analiziranih v vseh treh različnih dneh validacije (31). Ponovljivost izračunamo po enačbi:

$$CV = RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (\text{enačba 3})$$

#### 4.7.5 Območje linearnosti

Območje analize metode je interval med najnižjo in najvišjo koncentracijo analita v vzorcu, za katerega so bile dokazane točnost, ponovljivost in linearnost. Običajno ga določimo iz območja linearnosti. Pogoj linearnosti je izpolnjen, če je  $R^2$  na danem intervalu večji od 0,998 (31).

#### 4.7.6 Meja kvantifikacije (LLOQ)

Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ) je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo z metodo še lahko kvantitativno ovrednotimo z ustrežno točnostjo in natančnostjo. Po FDA smernicah je to najnižja koncentracija standarda na umeritveni premici, ki ustreza naslednjima dvema zahtevama:

- Odziv standarda pri LLOQ je vsaj 5-krat višji od odziva pri analizi slepega vzorca.
- Odziv standarda pri LLOQ mora ustrezati že prej omenjenim pogojem glede točnosti in ponovljivosti (točnost med 80 in 120 %,  $CV \leq 20$  %) (31).

#### 4.7.7 Selektivnost

Selektivnost analize metode je njena sposobnost, da nedvoumno določi analit od prisotnosti drugih komponent, za katere domnevamo, da so prisotne v vzorcu (komponente matrice, metaboliti, ostale učinkovine, ki jih jemlje bolnik ...). Kromatografski vrh našega analita mora biti brez drugih motečih komponent. To je potrebno dokazati z analizo šestih čistih plazem različnih oseb. Pri retencijskih časih naših analitov ne sme biti motečih vrhov. Moteča koelucija je dovoljena poleg vrha analita, vendar samo, če je višina za 5-krat nižja od višine analita z najnižjo koncentracijo v umeritveni krivulji (30).

#### 4.7.8 Izkoristek ekstrakcije (Re)

Uspešnost ekstrakcije za posamezen analit smo določili iz razmerja odziva ekstrahirane obogatene plazme in odziva neekstrahirane naknadno obogatene plazme pri treh različnih koncentracijah, ki pokrivajo celotno območje (QCl, QCm, QCh). Ekstrahirani plazemski vzorec smo pripravili tako, kot je opisano v poglavju 4.5.1. Neekstrahirani vzorec pa smo pripravili tako, da smo k 450  $\mu$ L slepe plazme dodali 50  $\mu$ L topila in ekstrahirali, centrifugirali, posušili po postopkih, opisanih v poglavjih 4.5.1 in 4.6. K suhemu ostanku čiste plazme smo dodali enak volumen (25  $\mu$ L) etopozida in tenipozida enake

koncentracije kot v ekstrahiran vzorec in ga analizirali na HPLC. Odziv tega vzorca je predstavljal 100-odstotni izkoristek. Ker nas je zanimala tudi ponovljivost ekstrakcije, smo vsako koncentracijo delali v treh paralelkah (31). Uspešnost ekstrakcije smo izračunali po enačbi:

$$R_e[\%] = \frac{\text{odziv(ekstrahirana obogatena plazma)} \times 1,5}{\text{odziv(naknadno obogatena ekstrahirana slepa plazma)}} \quad (\text{enačba 4})$$

#### 4.7.9 Stabilnost

##### 4.7.9.1 Stabilnost pri sobni temperaturi

Stabilnost pri sobni temperaturi smo določili obogatenim plazemskim vzorcem in osnovnim raztopinam etopozida in IS (v 75-odstotnem metanolu v vodi) s pomočjo FLD.

- Stabilnost osnovnih raztopin

Iz osnovnih raztopin smo naredili po predpisu (glej poglavje 4.7.1) dve paralelki delovnih raztopin vseh treh QC-jev, vsak QC po 3 vzorce. Vzorce smo analizirali v času 0 in po 6h. Ves ta čas so bili vzorci na sobni temperaturi.

- Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin

Za stabilnost plazemskih vzorcev smo pripravili dve paralelki obogatenih plazemskih QC-jev, vsak QC po 3 vzorce po predpisu (glej poglavje 4.7.1). Vzorce smo analizirali v času 0 in po 6h. Ves ta čas so bili vzorci na sobni temperaturi.

##### 4.7.9.2 Stabilnost med zamrzovanjem in odtajevanjem

Določili smo stabilnost etopozida in IS v obogatenih plazemskih raztopinah med procesi zamrzovanja in odtajanja. Pripravili smo dve paralelki treh QC-jev, vsak QC po 3 vzorce (glej poglavje 4.7.1) in jih podvrgli trem ciklom zamrzovanja in odtajanja: zamrznili smo jih za najmanj 6h, jih pustili na sobni temperaturi, da so se sami odtalili in jih ponovno zamrznili. Vzorce smo v dveh paralelah analizirali, enkrat v času 0 in drugič po zadnjem ciklu zamrzovanja in odtajanja, to je bilo po 25 urah od priprave.

##### 4.7.9.3 Postpreparativna stabilnost

- Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin

Hoteli smo dokazati, da so plazemski vzorci stabilni vsaj 24 ur v avtomatskem vzorčevalniku pri 5 °C. Vse 3 različne koncentracije QC prvega dneva validacije smo pustili v vzorčevalniku 24 ur in vsakega posneli v 5. paralelkah še enkrat, da smo dobili postpreparativno stabilnost vzorcev.

- Stabilnost delovnih raztopin

Preverili smo tudi stabilnost delovnih raztopin umeritvene krivulje v avtomatskem vzorčevalniku pri 5 °C. Pripravili smo delovne raztopine v treh paralelah QCl, QCm in QCh ter jih ob časih 0, 3, 6, 9 in po 24 urah posneli na HPLC.

#### **4.7.9.4 Dolgoročna stabilnost**

- Stabilnost osnovnih raztopin

Natehtali smo naši učinkovini in pripravili osnovni raztopini po postopku (glej točki 4.1.1 in 4.1.2). Iz njiju smo pripravili vse tri QC-je etopozida z IS, vsak QC po 3 vzorce (glej točko 4.7.1) in jih takoj analizirali na HPLC. Osnovni raztopini etopozida in tenipozida smo dali v zamrzovalnik in čez 50 dni ponovili postopek, pripravili smo enako, trikrat po 3 QC-je, in primerjali odzive.

- Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin

Pripravili smo tri paralelke vseh treh QC-jev (glej točko 4.7.1), vsak QC po 3 vzorce. Eno paralelko smo takoj ekstrahirali, centrifugirali in injicirali na kolono, drugi dve pa smo dali v zamrzovalnik na –20 °C. Po 18 dneh smo drugo paralelko odtalili in naredili enako kot s prvo. Po 39 dneh pa smo odtalili še tretjo paralelko treh QC-jev in naredili enako kot s prvima dvema.

## **4.8 Uporaba metode na realnih vzorcih bolnikov**

Z metodo, ki smo jo razvili, smo analizirali plazemske vzorce 4 bolnikov po različnih krogih in dnevih uporabe zdravila z učinkovino etopozid (glej točko 5.6). Vsi bolniki so dobili enak odmerek, v enakih časovnih intervalih in z enako vrsto uporabe.

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 Optimizacija priprave in shranjevanja delovnih raztopin

#### 5.1.1 Shranjevanje v zamrzovalniku

Po 4 tednih hranjenja raztopin smo opazili močno znižanje odzivov, predvsem tenipozida. V Preglednica XII lahko vidimo koliko etopozida, v Preglednica XIII pa koliko tenipozida je razpadlo v različnih osnovnih raztopinah pri 5 °C.

**Preglednica XII: Razpad osnovnih raztopin etopozida tekom shranjevanja v hladilniku na 5 °C.**

etopozid	R2_E →(1 µg/mL) odziv	R1_E →(10 µg/mL) odziv	OS_E →(20 µg/mL) odziv
sveža priprava	49,7	560,4	1168,2
po 4 tednih	35,5	500,3	1113,4
razpad v %	28,6	10,7	4,7

**Preglednica XIII: Razpad osnovnih raztopin tenipozida tekom shranjevanja v hladilniku na 5°C.**

tenipozid	sveže	po 4 tednih	razpad v %
R1_T odziv	1299,9	7,1	99,5
OS_T* odziv	1299,9	1119,4	13,9

\* Iz shranjene OS\_T smo pripravili R1 in jo analizirali na HPLC.

Iz vsake shranjene osnovne raztopine analita smo pripravili delovne raztopine po postopku priprave umeritvene premice (glej točko 4.1.5.1), katerih odzivi so predstavljeni v zgornjih dveh preglednicah.

Pri etopozidu vidimo, da se razpad pri shranjevanju najbolj opazi pri raztopini R2, manj pri R1, pri osnovni pa skoraj ne. Učinkovina pri nizkih koncentracijah relativno hitreje razpada kot pri višjih.

Pri tenipozidu vidimo, da shranjena raztopina s koncentracijo 0,6 mg/mL (R1\_T) v 4 tednih na 5 °C skoraj popolnoma razpade, medtem ko OS\_T s koncentracijo 1,4 mg/mL razpade komaj za 14 %.

Zato smo se odločili, da delovne raztopine etopozida in tenipozida pripravljamo vsak dan sveže iz osnovnih, ki smo jih hranili v zamrzovalnik na -20 °C. Tako smo odpravili težave razpada učinkovin. Osnovne raztopine hranjenje na -20 °C, so bile stabilne vsaj en mesec (glej točka 5.5.7.4).

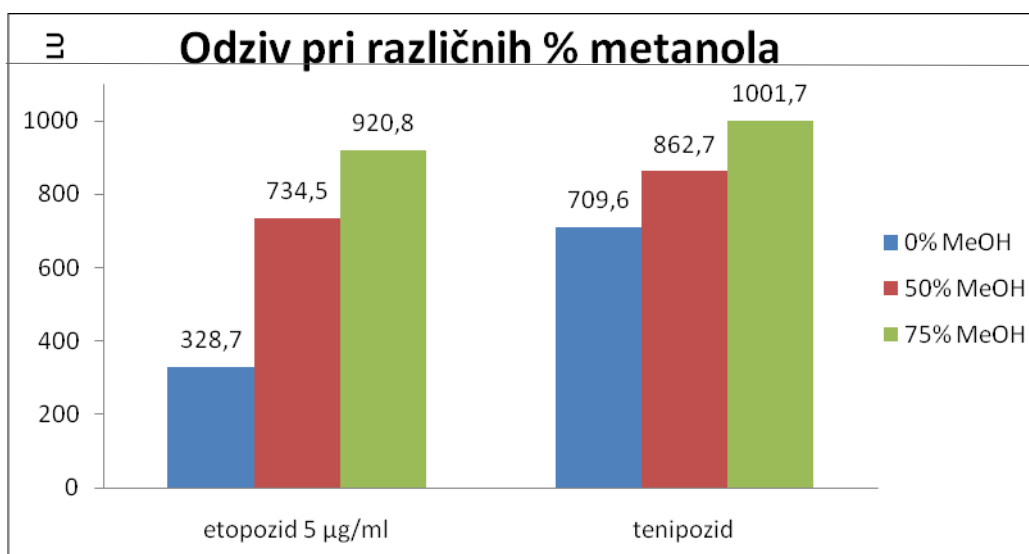
### 5.1.2 Vezava učinkovin na plastiko

Oba poizkusa sta dokazala, da se nam učinkovini tekom priprave standardov za umeritveno premico res v različnih merah vežeta na plastiko epruvet. V Preglednica XIV so prikazani odzivi plazemskih vzorcev drugega poizkusa (glej točko 0). Pri redčenih plazemskih standardih iste koncentracije smo vedno dobili višje odzive, saj se relativno manjši delež učinkovine veže na plastiko pri višjih koncentracijah kot pri manjših.

**Preglednica XIV: Odzivi standardov etopozida brez redčenja in standardov z dvakratno koncentracijo po redčenju na pol.**

c (µg/mL)	ETO odziv	[2*ETO/2] odziv	razmerje v %
7,5	743,7	828,2	111,4
10	985	1047,5	106,3
15	1638,6	1708,9	104,3

Učinkovini sta lipofilni, zato se raje vežeta na lipofilno plastiko, kot da sta raztopljeni v hidrofilnem mediju (vodi). Vezavo na plastiko lahko zmanjšamo le, če uporabimo dovolj lipofilen medij. V tem primeru bo tendenca lepljenja učinkovine na plastiko manjša. Višja lipofilnost medija zmanjša lepljenje lipofilne učinkovine na plastiko. Izgubo učinkovine smo poskusili zmanjšati s pomočjo dodatka metanola v raztopino za redčenje standardov. Preizkusili smo topilo 1 (čisto vodo), topilo 2 (50-odstotni MeOH) in topilo 3 (75-odstotni MeOH). Na Slika 6 je predstavljeno, kako so se povprečno zvišali odzivi etopozida s konc. 6 µg/mL in tenipozida 5 µg/mL pri različnih % MeOH v raztopini za pripravo standardov.



**Slika 6: Odzivi etopozida in tenipozida pri uporabi različnih topil za pripravo delovnih raztopin standardov za umeritveno premico.**

Iz Slika 6 lahko vidimo, da se je predvsem etopozidu v povprečju močno zvišal odziv, kar za faktor 3-krat, ko smo uporabili 75% metanola, tenipozidu pa bistveno manj. Pri nizkih koncentracijah je bila ta razlika skoraj 4-kratna, pri najvišji pa 2-kratna, kar je bil v predhodnih poskusih razlog za neustrezno linearnost in točnost metode. V Preglednica XV je prikazano, kako se točnost in linearnost izboljšujeta s povečevanjem % metanola.

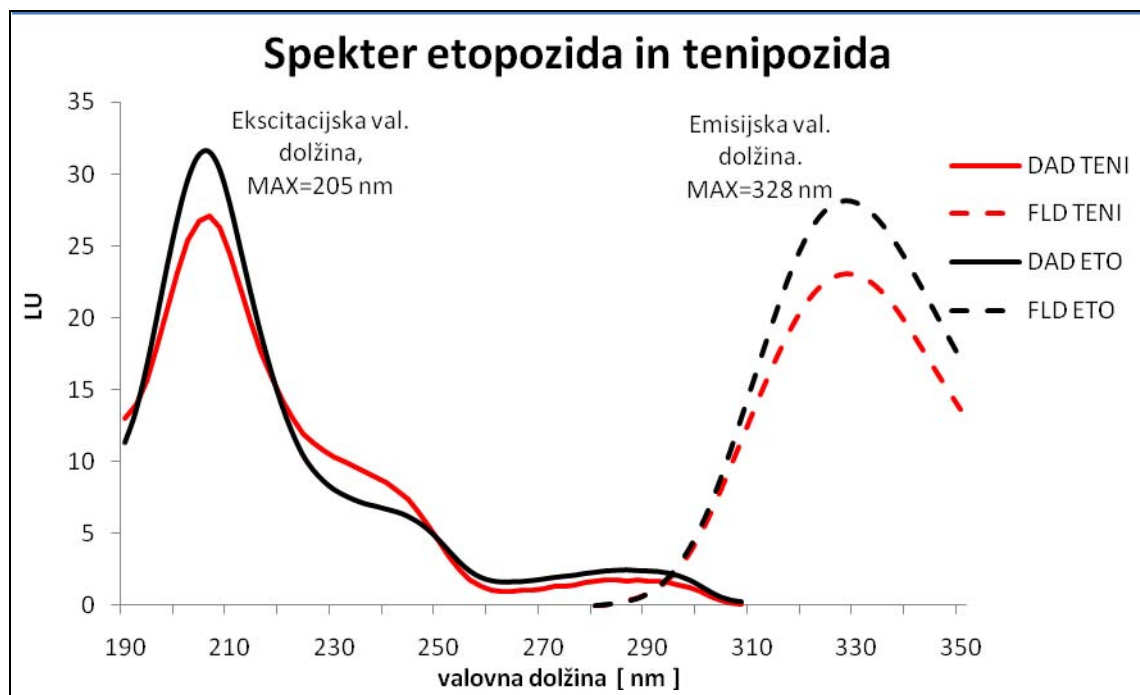
**Preglednica XV: Točnost umeritvene premice etopozida pri uporabi različnih topil za pripravo delovnih raztopin standardov.**

umeritvena premica	0 % metanola	50 % metanola	75 % metanola
c (µg/mL)	točnost	točnost	točnost
0,125		137,2	102,5
0,25	251,5	118,5	92,1
0,5	139,8	106,0	91,1
0,75	129,7	98,6	98,8
1	112,7	107,0	98,7
2	105,4	103,6	95,4
4	95,2	98,8	99,0
6	93,7	93,2	100,4
8	96,0	100,9	103,5
10	98,6	100,3	100,5
15	96,8	100,7	99,4
20	102,8	101,8	99,7
30			100,0
R <sup>2</sup>	0,98927	0,99915	0,99990

Zaradi povečanja odziva in izboljšanja linearnosti smo znižali mejo detekcije in povečali območje linearnosti.

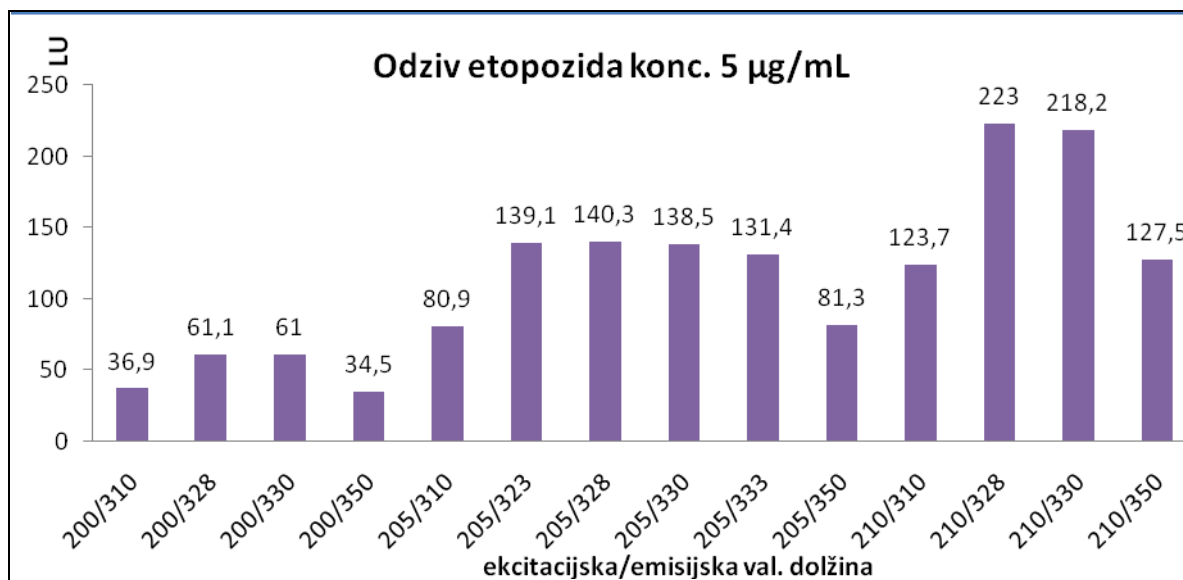
## 5.2 Optimizacija detekcije

### 5.2.1 Ekscitacijska in emisijska valovna dolžina



Slika 7: Ekscitacijski in emisijski spekter etopozida s konc. 4 µg/mL ter tenipozida s konc. 5 µg/mL.

Iz Slika 7 lahko razberemo, da imata etopozid in tenipozid zelo podoben absorpcijski in emisijski spekter, kar ni presenetljivo, saj sta si tudi strukturno zelo podobna (glej Slika 4).



Slika 8: Iskanje najustrežnejše kombinacije Ex in Em, ki nam da pri enaki koncentraciji standarda etopozida najvišje odzive.



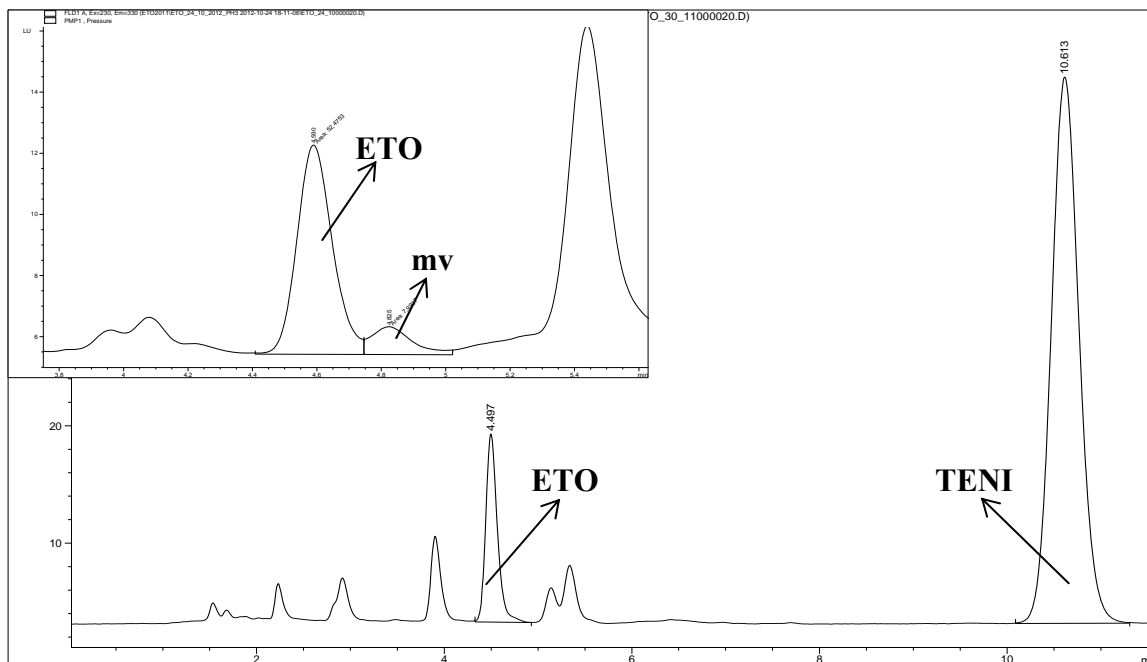
Odločili smo se preizkušati različne kombinacije Ex in Em s ciljem najti največji odziv. Zaradi večje preglednosti so v Slika 8 predstavljeni odzivi le za standard 5 µg/mL. Zanimal nas je tudi vpliv različnih valovnih dolžin na točnost umeritvene premice etopozida. Iz rezultatov smo ugotovili, da spremembe v valovnih dolžinah ne vplivajo na točnost in linearnost, razpon je bil za točnost: 77,3-310,8%;  $R^2$ : 0,9832-0,9968. Pri isti Em valovni dolžini je bil odziv vedno najvišji pri 328 nm, kar je pričakovano, saj je tam tudi emisijski maksimum. Vendar je bila ponovljivost pri 330 nm veliko boljše, po odzivu pa ni bilo opaziti signifikantne razlike, zato smo jo tudi izbrali kot najbolj optimalno. Pri Ex pa presenetljivo nismo dobili najvišjih odzivov pri absorpcijskem maksimumu (205 nm), ampak se je pokazala za najbolj optimalna valovna dolžina višja od 210 nm. Zato smo se odločili še enkrat preizkušati le Ex nad 210 nm, Em pa smo pustili na 330 nm. Kot najugodnejša se je na koncu izkazala kombinacija ekscitacijske valovne dolžine 230 nm in emisijske valovne dolžine 330 nm. To kombinacijo detekcije smo tudi uporabili pri vseh naslednjih poizkusih razvoja in validacije metode.

### **5.3 Optimizacija kromatografije**

Ker se je tenipozid eluiral iz kolone veliko kasneje kot etopozid, smo poskusili čim bolj skrajšati čas analize, hkrati pa obdržati dobro resolucijo. Zato smo pri analizi uporabili gradientno ločbo, kjer smo spreminjali le pretok mobilne faze. Pri koloni Luna smo morali imeti, dokler se ni eluiral etopozid, nizek pretok za čim boljše ločbo od motečih vrhov. Nato smo dvignili pretok, dokler ni tlak na koloni dosegel 200 barov. Da sta se analita eluirala pri približno istih pogojih, smo na koncu znižali pretok na 0,8 mL/min, ker smo pri 0,7 mL/min dobili zelo razvlečen vrh tenipozida (glej točko 4.4.4.2).

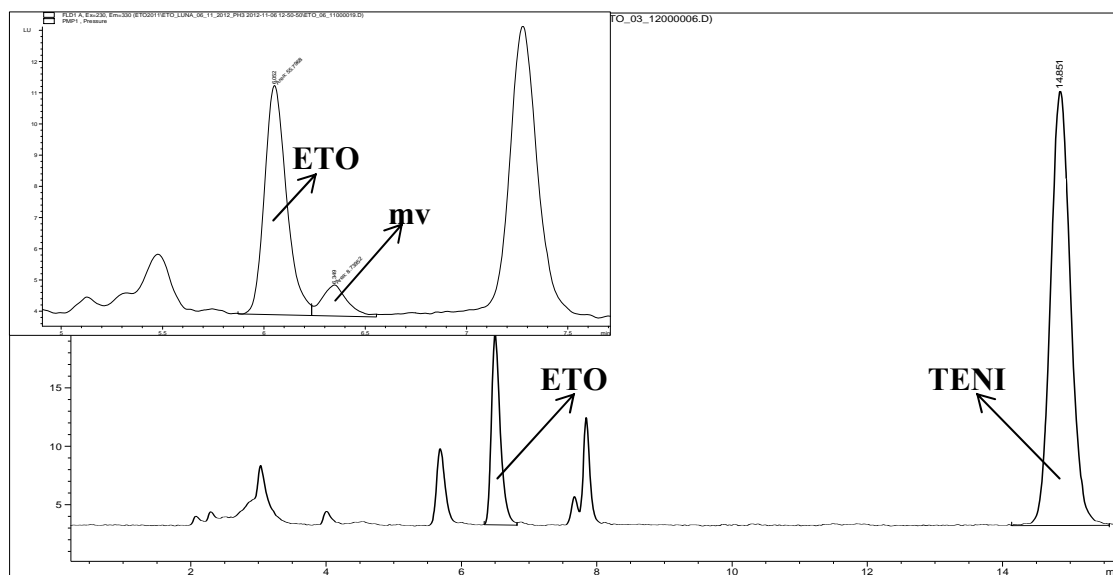
#### **5.3.1 Izbor stacionarne faze**

Na Slika 9 lahko vidimo kromatograma istega vzorca s koncentracijo 1 µg/mL pri koloni Gemini s 5-mikrometrskimi delci, na Slika 10 pa pri koloni Luna s 3-mikrometrskimi delci. Pri vsaki koloni je prikazan tudi kromatogram etopozida z najnižjo koncentracijo 0,125 µg/mL, kjer je lepo opažena koelucija.



Slika 9: Kromatogram na koloni Gemini plazemskega vzorca s koncentracijo 1  $\mu\text{g/mL}$ . Zgoraj pa približan kromatogram na isti koloni plazemskega vzorca s koncentracijo 0,125  $\mu\text{g/mL}$ .

Iz primerjave kromatogramov vidimo lepšo obliko vrhov ter boljšo separacijo etopozida od okoliških vrhov iz plazme na koloni Luna kot na Gemini. Zaradi manjših delcev pri koloni Luna se nam je pri istem pretoku povečal tlak. Posledično smo morali prilagoditi kromatografske pogoje: zmanjšati smo morali pretok skozi kolono in posledično se nam je podaljšal čas analize. Upali smo, da bomo uspeli ločiti vrh etopozida od majhne koelucije, vendar se to na koloni Luna ni zgodilo. Vseeno pa se je ločba na koloni Luna izboljšala, zato smo jo uporabili za nadaljnje eksperimente.

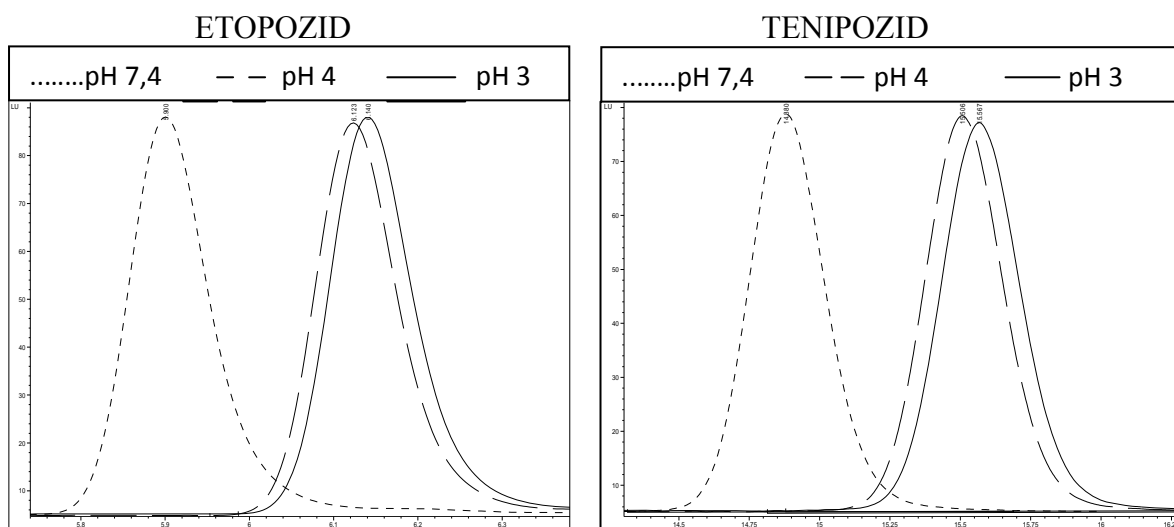


Slika 10: Kromatogram na koloni Luna plazemskega vzorca s koncentracijo 1 µg/mL. Zgoraj pa približan kromatogram na isti koloni plazemskega vzorca s koncentracijo 0,125 µg/mL.

### 5.3.2 Izbor optimalne mobilne faze

#### 5.3.2.1 pH pufru

Želeli smo preizkušati, če pH fosfatnega pufru vpliva na retencijski čas, obliko vrhov (simetrijo) in površino odziva. Primerjali smo začetno metodo z mobilno fazo pH 3,0; 4,0 ter 7,4 (glej točko 4.4.4).



Slika 11: Oblika vrhov etopozida in tenipozida pri različnih pH-jih mobilne faze.

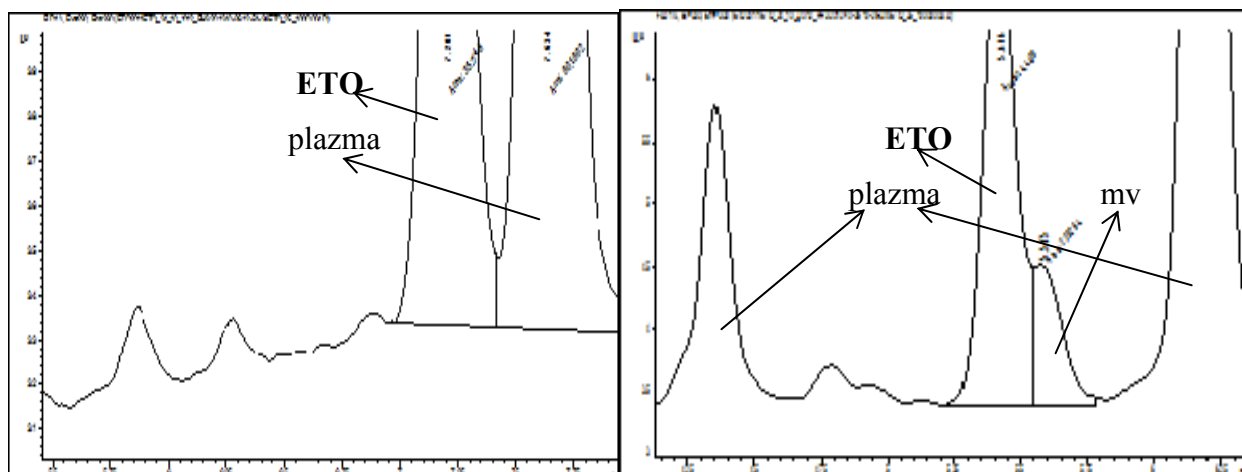
Iz Slika 11 opazimo, da se retencijski čas pri različnih pH-jih spreminja, ni pa vpliva na resolucijo, obliko ter simetrijo vrhov naših dveh analitov. PH 7,4 je odstopal po retencijskem času od ostalih dveh, ni pa prinesel nobenih izboljšav, zato smo se odločili, da za naslednje poskuse vedno pripravimo 25-milimolarni fosfatni pufer s pH 3,0.

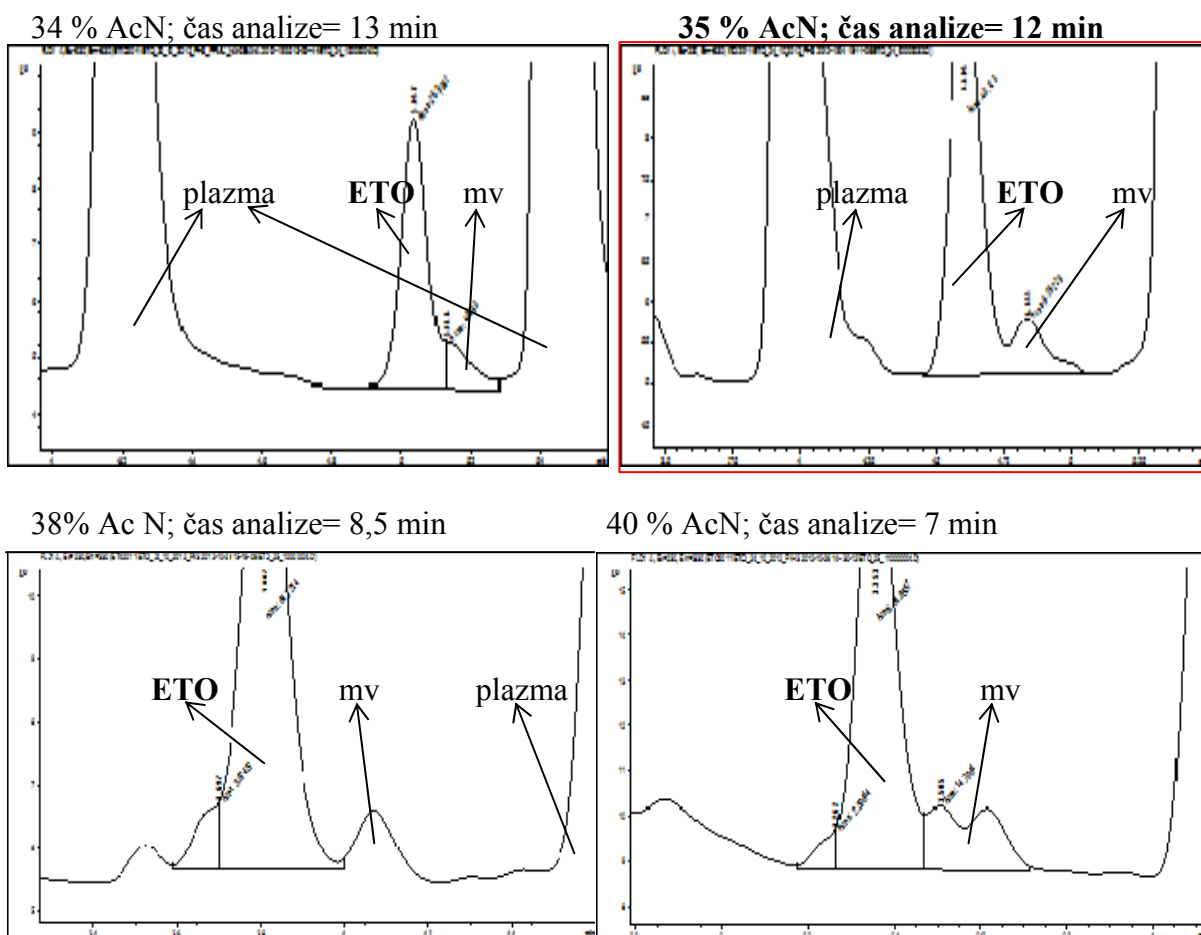
#### 5.3.2.2 Delež acetonitrila

Za razlago optimizacije so na Slika 12 predstavljeni le pomembnejši kromatogrami različnih deležev acetonitrila.

30 % AcN; čas analize= 20 min

33 % AcN; čas analize= 14 min





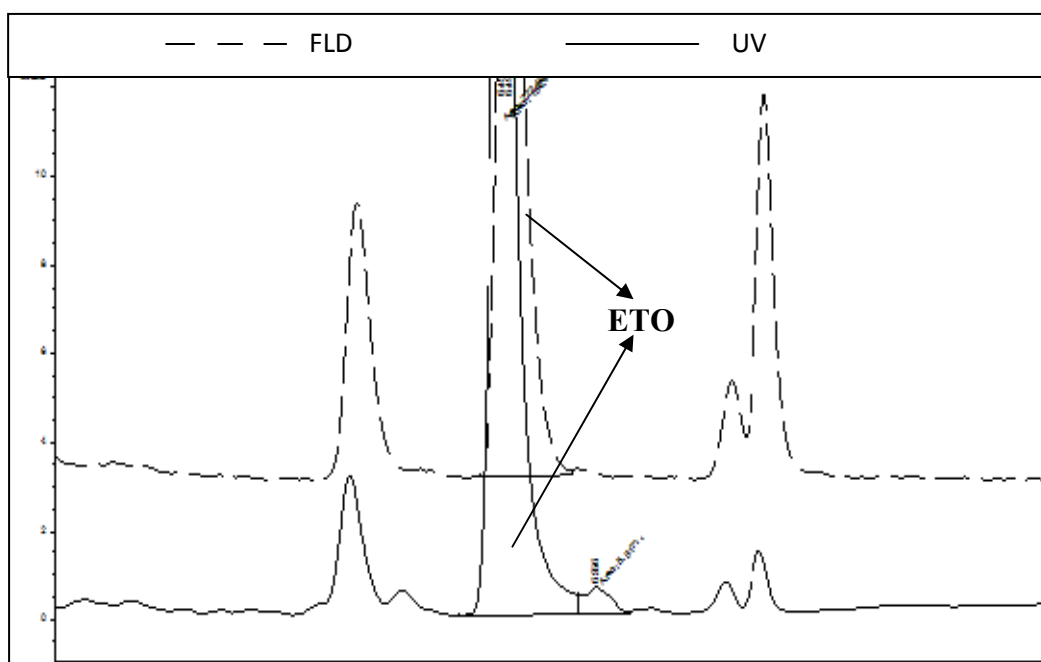
Slika 12: Kromatogrami v okolici retencijskega časa etopozida pri različnih % AcN v mobilni fazi.

Dobro ločbo etopozida od visokih motečih vrhov iz plazme smo dobili pri % acetonitrila nad 33, kar je ugodno tudi zaradi časa analize enega vzorca, saj se takrat učinkovina manj časa zadržuje na nepolarni koloni in se hitreje eluira iz sistema.

Pri več kot 36 % acetonitrila so nam problem predstavljali nizki vrhovi koelucij, ki so nam delno prekrili vrh etopozida, zaradi česa bi imeli veliko napako pri integraciji nizkih koncentracij. Na koncu smo izbirali le med 34 in 35 % acetonitrila. Ker se je pri slednjemu lepše ločila majhna koelucija ob etopozidu, ki je nismo uspeli ločiti z uporabljenimi kolonami Gemini, smo se odločili za mobilno fazo iz 35 % acetonitrila in 65 % 25 mM fosfatnega pufru pH 3,0, ki smo jo uporabljali do konca optimizacije in validacije metode.

### 5.3.3 Vrsta detekcije

Med optimizacijo smo primerjali odzive in kromatograme na FLD in DAD. Ugotovili smo, da je odziv na DAD večji, nekoliko se je izboljšala tudi točnost ter linearnost v primerjavi s FLD. Večja razlika se je pokazala v kromatogramih, kjer smo pri FLD dobili manj motečih vrhov kot pri DAD, kar kaže Slika 13 plazemskega standarda s koncentracijo 5  $\mu\text{g/mL}$ . Zato smo se odločili, da ostanemo na fluorescenčnem detektorju in poskusimo z drugimi metodami izboljšave resolucije etopozida.



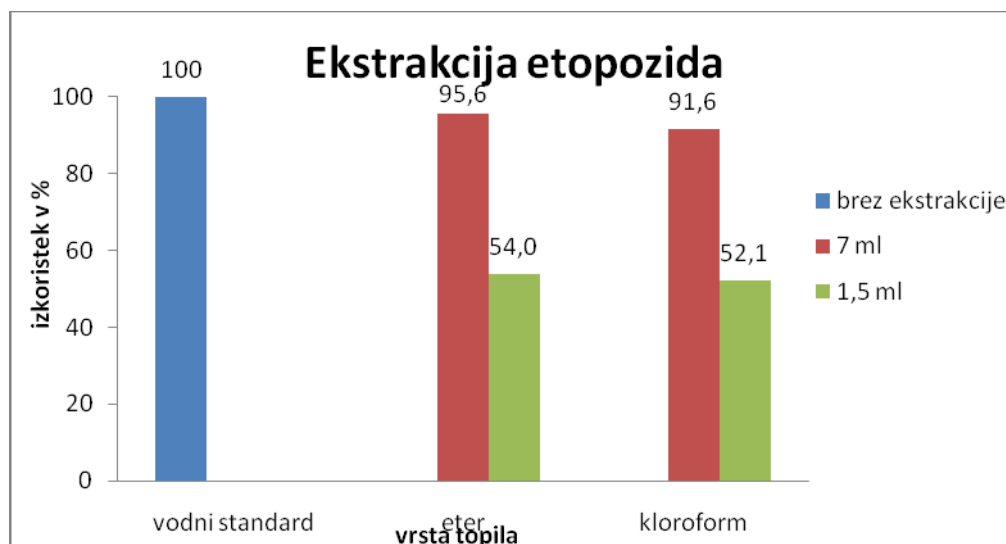
Slika 13: UV- in FLD-kromatogram istega plazemskega vzorca.

## 5.4 Optimizacija ekstrakcije

Ekstrakcijo tekoče-tekoče smo izbrali, ker je ta bolj enostavna in veliko hitrejša od ekstrakcije na trdnih nosilcih. Izkazala se je za ustrezno, z dobrima ločbo in izkoristkom, saj nismo imeli preveč kompleksnih vzorcev z veliko učinkovinami.

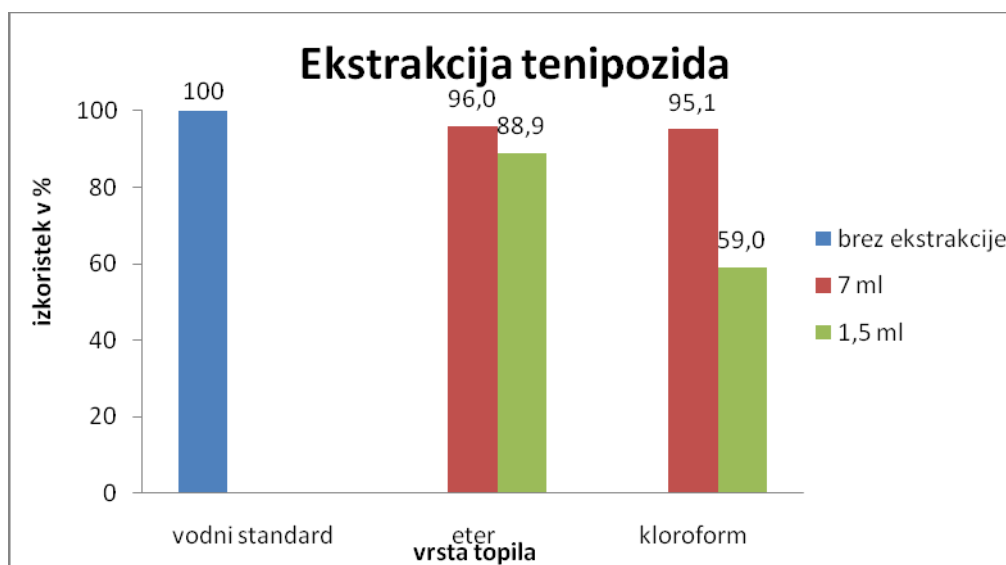
### 5.4.1 Izbor topila in vrste ekstrakcije

Preizkušali smo ekstrakcijo etopozida s konc. 2  $\mu\text{g/mL}$  in tenipozida s konc. 8  $\mu\text{g/mL}$  iz 500  $\mu\text{L}$  plazme enkrat v kloroformu in drugič v dietiletru pri različnih volumnih topila (glej točko 4.5.1).



Slika 14: Izkoristek ekstrakcije etopozida pri etru in kloroformu ter pri različnih volumnih topila.

Na Slika 14 so prikazani izkoristki etopozida v različnih topilih in volumnih glede na vodni standard iste koncentracije, ki predstavlja 100 % izkoristek, na Slika 15 pa za tenipozid.

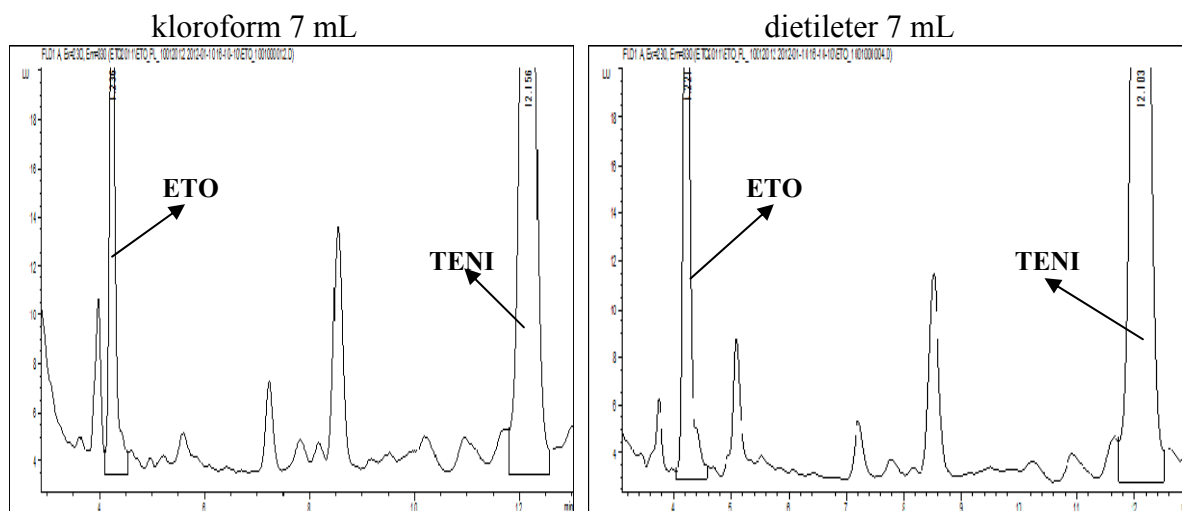


Slika 15: Izkoristek ekstrakcije tenipozida pri etru in kloroformu, ter pri različnih volumnih topila.

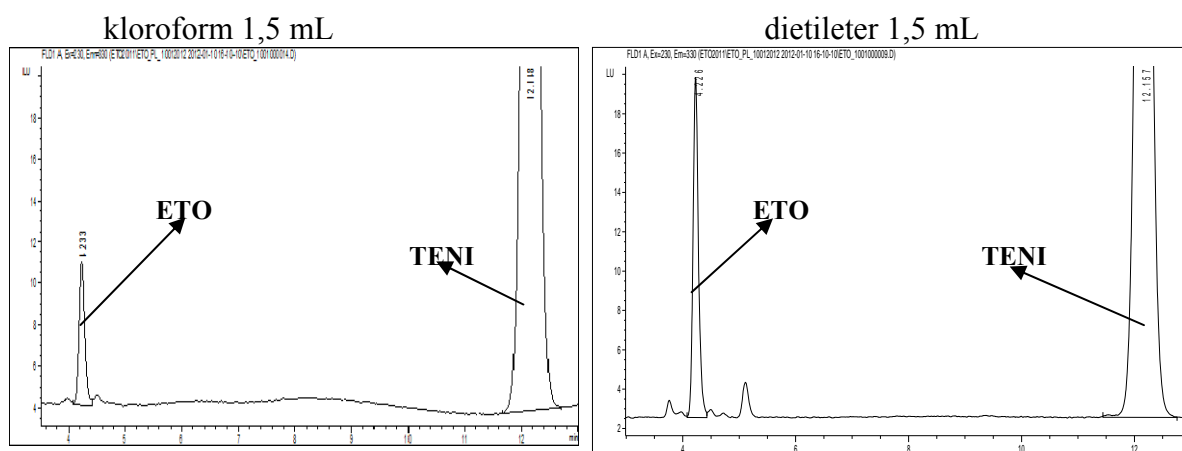
Iz Slika 14, grafikona etopozida lahko vidimo, da je izkoristek ekstrakcije vedno boljši pri etru, najbolj pa se razlika opazi pri tenipozidu. Kloroform je tudi veliko bolj nevaren za naše zdravje, zato se ga poskušamo čim bolj izogibati.

Za ekstrakcijo s 7 mL dietiletra se nismo odločili, saj je izkoristek pri 1,5 mL dietiletra dovolj visok. Pri izkoristku ekstrakcije je v tem primeru bolj pomembna ponovljivost kot pa 100-odstotni izkoristek. S povečanjem volumna tvegamo težjo integracijo in izvedbo, večje vsebnike, daljše sušenje ...

Na Slika 16 in Slika 17 se tudi opazi, koliko več motečih vrhov se ekstrahira pri 7 mL topila, ki nam močno motijo integracijo. Še več motečih vrhov se pojavi pri uporabi kloroforma, izkoristek pa je manjši. Na koncu smo se odločili za ekstrakcijo v etru z 1,5 mL, saj dobimo zadovoljliv izkoristek in čistost kromatograma, poleg tega pa je tudi manj nevaren za zdravje od kloroforma.



Slika 16: Kromatogram po ekstrakciji plazemskega vzorca s 7 mL kloroforma in 7 mL dietiletra.



Slika 17: Kromatogram po ekstrakciji plazemskega vzorca z 1,5 mL kloroforma in 1,5 mL dietiletra.

#### 5.4.2 Vpliv zamrzovanja plazme

V Preglednica XVI so predstavljeni odzivi in ponovljivost analize tenipozida s koncentracijo 5  $\mu\text{g/mL}$  ter točnost celotne umeritvene premice etopozida, enkrat brez zamrzovanja in drugič z njim. Pri zamrzovanju smo celotno etno fazo odlili, zato so odzivi tenipozida za približno 1,5-krat višji kot pri poskusu brez zamrzovanja.

**Preglednica XVI: Povprečni odziv in nihanje tenipozida, točnost ter linearnost etopozida za celotno umeritveno krivuljo pri ekstrakciji plazemskih vzorcev z zamrzovanjem plazme in brez.**

	brez zamrzovanja	z zamrzovanjem
povprečni odziv tenipozida	500,83	725,42
RSD v %	3,20	3,79
točnost etopozida v %	97,3-106,1	91,1-182,1
R <sup>2</sup>	0,9997	0,9989

Opazimo, da se ponovljivost analize tenipozida zaradi zamrzovanja ne izboljša, kar nam kaže RSD. Se pa zato poslabšata linearnost ter točnost celotne umeritvene premice etopozida. Optimizacijo smo nadaljevali brez zamrzovanja. Po zamrzovanju smo v etru opazili tudi kosmiče oborine, ki so se po centrifugiranju raztopili in se spet pojavili po nekem času v insertih, kar je slabo vplivalo na ponovljivost injiciranja in privedlo do netočnosti. Če smo etrno fazo le odpipetirali, brez zamrzovanja, je bilo teh kosmičev v insertih bistveno manj, zato smo to idejo po nekaj poskusih opustili in do konca optimizacije ter pri validaciji nadaljevali brez zamrzovanja.

#### 5.4.3 Vpliv nakisanja plazme

Izračun količine kisline, ki zniža pH plazme iz 7,4 na pH 3:

16,1 mEq/L/pH= 16,1 mmol kisline, ki zniža pH za 1 enoto na 1 L plazme (29)

V plazme = 0,5 mL

$\Delta\text{pH} = 4,4$  enote ( iz 7,4 na 3,0)

$$n = 16,1 \text{ mmol} \times \frac{1000 \text{ mL}}{0,5 \text{ mL}} = 0,00603 \text{ mmol} \times 4,4 = 0,03542 \text{ mmol kisline}$$

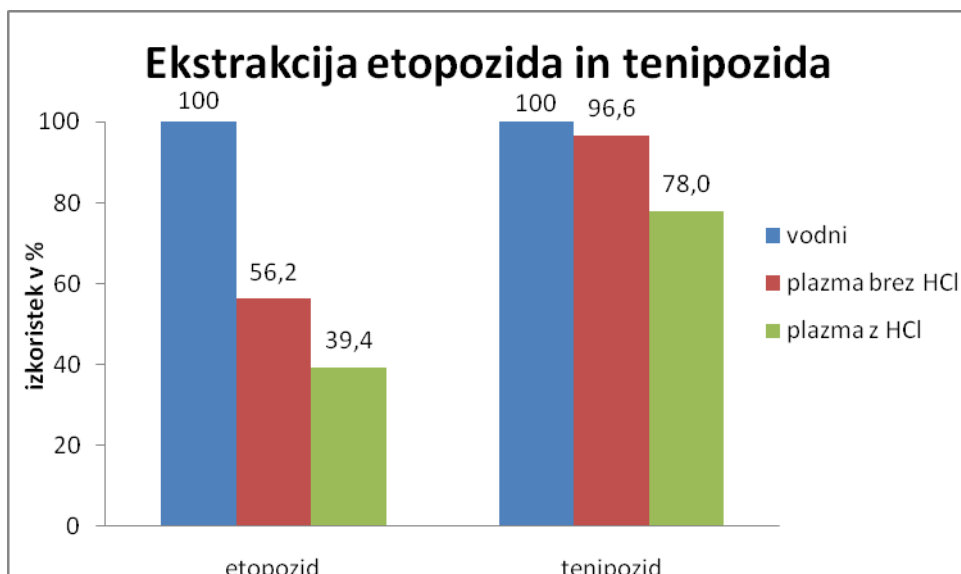
Ker nismo smeli preveč povečati skupnega volumna, smo poskusili z 2-molarno HCl:

$$V = \frac{0,03542 \text{ mmol} \times \text{mL}}{2 \text{ mmol}} = 0,0177 \text{ mL} \times 1000 = 17,7 \mu\text{L}$$

Ta količina kisline je nakisala plazmo le na pH 4, zato smo povečali volumen na 25  $\mu\text{L}$  2-molarne HCl, ki je nakisala plazmo na želeni pH 3, brez da bi povzročila obarjanje plazemskih proteinov.

Iz Slika 18 je lepo razvidno, kako nakisanje plazme močno zniža odziv etopozida za 30 % in tenipozida za 20 %. Razlog sta lahko slabša ekstrakcija ali manjša stabilnost učinkovin. Opazili smo tudi povečanje oborine v etrni fazi, podobno kot pri zmrzovanju, zato smo tudi to idejo za nadaljevanje optimizacije opustili.

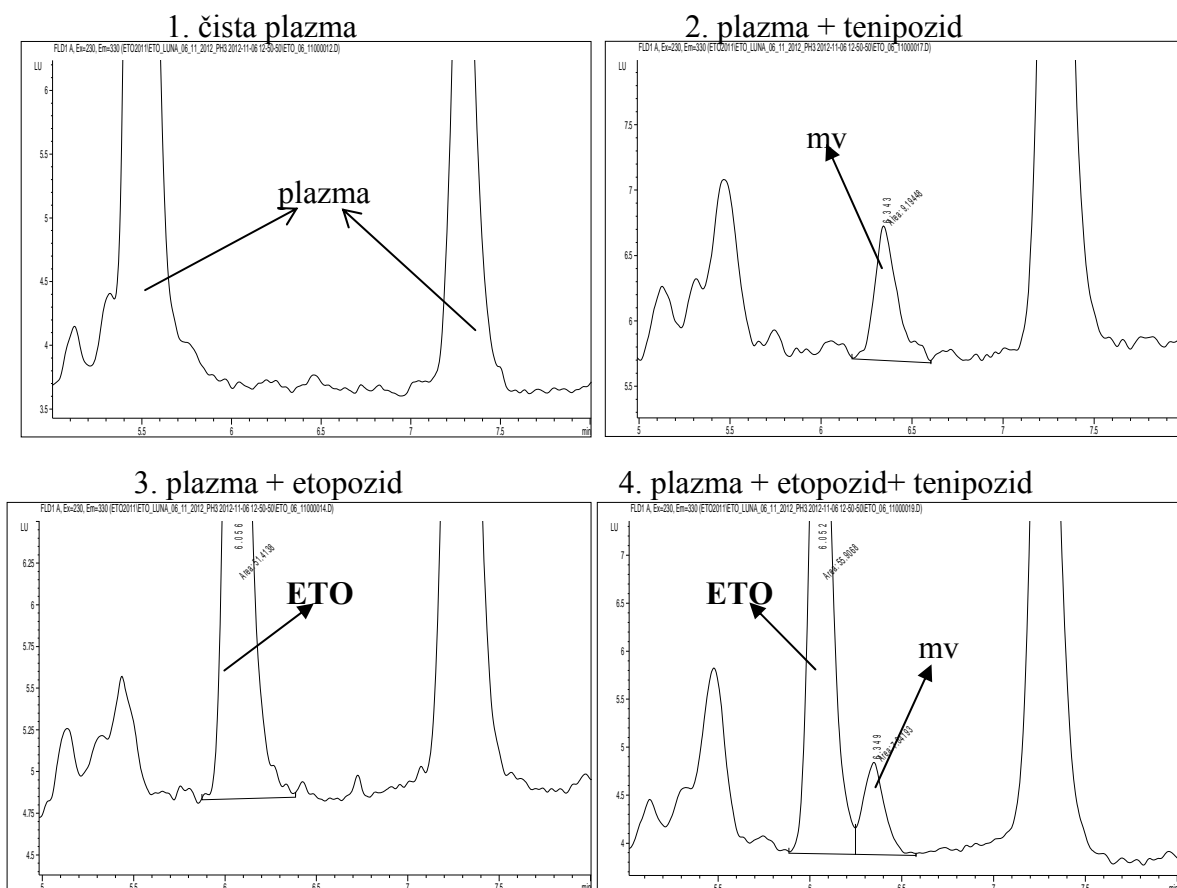




Slika 18: Ekstrakcija etopozida in tenipozida iz plazme z nakisanjem na pH 3 in iz plazme brez kisline.

#### 5.4.4 Izboljšanje separacije vrha etopozida

Ugotovili smo, da koelucija etopozida izvira iz osnovne raztopine tenipozida, saj je v čisti plazmi in v plazmi s samim etopozidom ni bilo, kar je razvidno iz Slika 19. Strukturno sta si etopozid in tenipozid zelo podobna, vendar jih kromatografsko lepo ločimo. Koelucija mora biti nečistota tenipozida, ki je po strukturi skoraj identična etopozidu.



**Slika 19: Kromatogrami v območju retencijskega časa etopozida pri čisti plazmi (1.), pri plazmi in tenipozidu (2.), pri plazmi in etopozidu (3.) ter pri plazmi z etopozidom in tenipozidom (4.).**

V Preglednica XVII so podani rezultati, ki smo jih dobili iz poskusov na plazemskih standardih, med optimizacijo izboljšanja resolucije med etopozidom in koelucijo; za pogoje posameznega poskusa glej točko 4.5.4.

**Preglednica XVII: Rezultati po optimizaciji izboljšanja resolucije med etopozidom in koelucijo pri različnih poskusih.**

poskus	površina [LU]			
	tenipozid	koelucija	etopozid	koelucija/eto
A)	1372,6	5,3	11,6	0,457
B)	710,9	2,1	14,4	0,146
C)	1027,4	2,2	19,1	0,115
D)	532,9	2,7	28,0	0,096
E)	471,4	1,3	14,5	0,090

Pri poskusu A smo imeli visok vrh koelucije zaradi visoke koncentracije tenipozida in zelo nizek odziv etopozida, 0,25 µg/mL, zaradi majhnega volumna injiciranja. Razmerje med višino koelucije in etopozida je bilo popolnoma nesprejemljivo v primerjavi z zahtevami, ki jih postavljajo smernice (30).

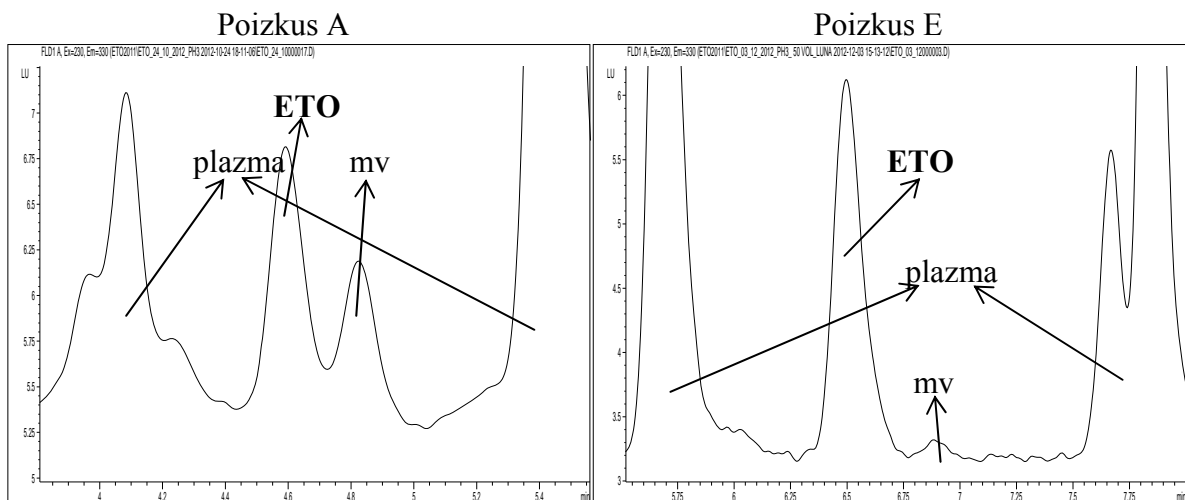
Zato smo pri poskusu B povečali volumen injiciranja z 20 na 50 µL ter znižali koncentracijo tenipozida s 600 na 150 µg/mL. Tako smo znižali tudi mejo kvantifikacije na 0,125 µg/mL etopozida in odziv motečega vrha za več kot polovico, vendar je bila površina koelucije še vedno moteča.

Pri poskusu C smo zato še znižali koncentracijo tenipozida na 100 µg/mL in za redčenje uporabili raztopino iz 50 % vode in 50 % metanola. Vsi odzivi so se močno povečali, tudi odziv koelucije, tukaj je bila težava še neustrezna linearnost umeritvene premice.

Zato smo pri poskusu D še zvišali % metanola na 75 %, odzivi so se še zvišali, razen za tenipozid, saj smo koncentracijo zmanjšali za polovico na 50 µg/mL, ker smo že pri poskusu C dobili dovolj visok odziv tenipozida, ki je potreben za dovolj natančno integracijo.

Linearnost premice je bila ustrezna, prav tako smo uspešno znižali odziv koelucije, zato smo pri poskusu E le še znižali volumen injiciranja s 50 na 25 µL, ker je LLOQ dovolj nizka in ne potrebujemo tako visokih odzivov etopozida.

Na Slika 20 lahko vidimo primerjavo v LLOQ med začetkom (poizkus A) in koncem optimizacije (poizkus E).



**Slika 20: Kromatogram LLOQ plazemskega vzorca na začetku in po koncu optimizacije čistosti vrha etopozida.**

#### 5.4.5 Raztapljanje suhega ostanka

Ko smo suhi etni ostanek raztapljali v mobilni fazi, so se v insertih že po nekaj urah na 5 °C pojavili majhni kosmiči, najverjetneje so to plazemski proteini, ki so prešli v organsko fazo. Ti so motili točen volumen injiciranja v kolono, kar je privedlo do neustrezne ponovljivosti.

Ko smo raztapljali z 200 µL 50 % acetonitrila in 50 % vode, so se plazemski proteini hitro oborili in smo jih s centrifugo ločili od bistre raztopine. Tako se tudi po enem tednu shranjevanja insertov na 5 °C ni pojavila oborina.

### 5.5 Validacija

Metodo smo validirali 3 dni. Vsak dan smo pripravili novo umeritveno krivuljo plazemskih vzorcev po postopku, opisanem v poglavju 4.7. Iz površin vrhov analitov smo določili umeritveno premico in izračunali linearnost, točnost ter ponovljivost metode. Za določanje umeritvene premice z upoštevanjem IS se kot osnova namesto koncentracije analita uporablja razmerje z IS.

### 5.5.1 Linearnost

Za določitev linearnosti metode smo izmerili odzive etopozida pri različnih koncentracijah, kar je prikazano v Preglednica XVIII.

**Preglednica XVIII: Odzivi etopozida in tenipozida (umeritvene premice) tekom treh dni validacije.**

c (µg/mL)	Odziv analita (površina)					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	eto	IS	eto	IS	eto	IS
0,0	0,0	497,4	0,0	533,9	0,0	608,0
0,125	12,0	480,9	10,8	505,6	12,8	584,8
0,25	20,4	506,7	18,9	506,1	24,1	580,7
0,50	35,7	482,1	38,0	512,8	47,4	587,7
0,75	57,6	493,1	55,4	488,4	71,6	597,4
1,0	72,1	469,1	70,7	484,9	89,4	578,5
2,0	133,9	459,1	148,9	503,5	167,2	574,8
4,0	279,1	465,8	279,3	489,0	342,6	578,6
6,0	410,7	452,1	414,6	478,6	519,6	565,0
8,0	560,3	449,4	559,0	481,0	658,9	571,3
10,0	712,0	470,9	735,4	477,9	925,4	575,1
15,0	1010,6	451,0	1045,5	473,5	1294,2	535,9
20,0	1280,4	427,6	1420,2	487,2	1779,3	559,7
30,0	2100,6	466,8	2263,1	462,3	2558,9	563,0

Na podlagi odzivov iz preglednice smo izračunali naklon (k), odsek (n) in Pearsonov koeficient korelacije ( $R^2$ ) (glej Preglednica XIX).

**Preglednica XIX: Enačba umeritvene premice z internim standardom tekom treh dni validacije.**

<p>Enačba premice z upoštevanjem IS</p> <p>1. dan: <math>y = 0,150x + 0,0058</math>, <math>R^2 = 0,9999</math></p> <p>2. dan: <math>y = 0,147x + 0,0017</math>, <math>R^2 = 0,9994</math></p> <p>3. dan: <math>y = 0,155x + 0,0027</math>, <math>R^2 = 0,9985</math></p>
--

Koncentracijsko območje, kjer je bila metoda linearna, je za etopozid od 0,125 do 30 µg/mL, kar obsega celotno terapevtsko območje, kar je tudi bistvenega pomena, saj smo metodo razvili z namenom analize vzorcev bolnikov z drobnoceličnim pljučnim rakom..

Po enačba 1 (glej točko 4.7.2) smo izračunali odstotek ujemanja izračunane in dejanske vrednosti.

**Preglednica XX: Točnost umeritvene premice z internim standardom tekom treh dni validacije.**

c (µg/mL)	Točnost v %		
	1. dan	2. dan	3. dan
0,0	/	/	/
0,125	102,5	107,3	99,5
0,25	92,1	97,2	100,5
0,50	91,1	98,7	100,9
0,75	98,8	101,5	101,1
1,0	98,7	98,2	98,3
2,0	95,4	100,1	93,2
4,0	99,0	97,0	95,3
6,0	100,4	98,1	98,9
8,0	103,5	98,8	93,1
10,0	100,5	104,7	103,9
15,0	99,4	100,2	104,1
20,0	99,7	99,2	102,8
30,0	100,0	102,7	98,0

Metoda je linearna v območju od 0,125 do 30 µg/mL, saj  $R^2$  ni bil nikjer manjši od 0,998. Metoda je bila vse dni linearna in ustreza smernicam, saj od šestih koncentracijskih točk lahko odstopata dve, v našem primeru pa nobena.

### 5.5.2 Točnost

**Preglednica XXI: Točnost standardov kontrole kakovosti kot razmerje med etopozidom in IS tekom treh dni validacije.**

	Razmerje odzivov (površina pod vrhom) etopozida in IS								
	QC1 (0,3002 µg/mL)			QCm (3,002 µg/mL)			QCh (13,041 µg/mL)		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
1.	0,048	0,046	0,050	0,443	0,488	0,491	1,862	2,060	2,008
2.	0,051	0,047	0,048	0,452	0,445	0,520	1,800	2,117	2,010
3.	0,057	0,048	0,049	0,460	0,467	0,511	1,791	2,224	2,023
4.	0,049	0,047	0,048	0,440	0,469	0,527	1,889	2,032	1,957
5.	0,049	0,046	0,050	0,447	0,455	0,528	1,852	2,136	2,029
Povpr.	0,051	0,047	0,049	0,448	0,465	0,515	1,839	2,114	2,005
c [µg/mL]	0,30	0,31	0,30	2,95	3,15	3,18	12,23	14,39	12,96
Točn.(%)	<b>100,1</b>	<b>102,2</b>	<b>99,1</b>	<b>98,5</b>	<b>105,1</b>	<b>106,0</b>	<b>93,8</b>	<b>110,3</b>	<b>99,4</b>

Po *enačba 2* (glej točko 4.7.3) smo izračunali točnost QC-jev. Točnost metode je ustrezna pri vseh treh dneh validacije, saj pri nobenem kontrolnem vzorcu odstopanje ne presega dovoljenih 15 %.

### 5.5.3 Ponovljivost

Preglednica XXII prikazuje znotrajdnevno, pPreglednica XXIII pa meddnevno ponovljivost metode za določanje etopozida.

**Preglednica XXII: Znotrajdnevna ponovljivost standardov kontrole kakovosti tekom treh dni validacije.**

	QCl odziv			QCm odziv			QCh odziv		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
Povpr.	0,051	0,047	0,049	0,448	0,465	0,515	1,839	2,114	2,005
CV %	7,22	1,67	2,44	1,81	3,48	2,99	2,27	3,53	1,43

**Preglednica XXIII: Meddnevna ponovljivost standardov kontrole kakovosti tekom treh dni validacije.**

QCl		QCm		QCh	
povprečni odziv vseh treh dni	CV (%)	povprečni odziv vseh treh dni	CV (%)	povprečni odziv vseh treh dni	CV (%)
0,049	4,3	0,48	7,33	1,986	6,98

Tako znotrajdnevna (vse tri dni) kot tudi meddnevna ponovljivost sta ustrezali zahtevam smernic (31).

### 5.5.4 Meja kvantifikacije ( LLOQ)

Z koncentracijo 0,125 µg/mL je bila v vseh treh dneh validacije izračunana točnost med 80 in 120 %. Od slepega plazemskega vzorca je bila v povprečju višja 10-krat. Dosegli smo ustrezno nizko mejo kvantifikacije, saj so bili najnižji odzivi vzorcev bolnikov za vsaj 2-krat višji od LLOQ.

### 5.5.5 Selektivnost

Z analizo šestih različnih slepih plazemskih vzorcev smo dokazali, da pri retencijskih časih etopozida in tenipozida (IS) ni koelucijskih vrhov. Le pri enem slepem plazemskem vzorcu je bil prisoten majhen vrh pri retencijskem času etopozida. Kromatogram čiste plazme 2 smo že prikazali v točki 5.4.4, ki lepo pokaže, da pri retencijskem času etopozida ni nobenih koelucij. Primerjali smo naklone umeritvenih premic v petih različnih plazmah, če obstaja vpliv matriksa na določanje etopozida. Iz Preglednica XXIV lahko vidimo, da se naklone niso razlikovali za več kot 5%. Oznake plazem so razložene v točki 3.1.

**Preglednica XXIV: Nakloni umeritvene premice z uporabo IS in brez pri analizi šestih različnih plazmah.**

plazma	naklon (k)	naklon z IS (k)
2	77,068	0,1463
3	73,871	0,1586
4	72,379	0,1590
5	68,232	0,1498
6	70,677	0,1468
7	68,380	0,1511
povprečje	71,768	0,1519
<b>RSD [%]</b>	<b>4,75</b>	<b>3,69</b>

### 5.5.6 Izkoristek ekstrakcije (Re %)

Uspešnost ekstrakcije smo določali po postopku, ki je opisan v poglavju 4.7.8. Rezultati uspešnosti ekstrakcije (recovery) za etopozid in tenipozid so prikazani že v poglavju 5.4.1, vendar so se nam takrat učinkovine še vezale na plastiko.

Izkoristek ekstrakcije je lahko manjši od 100 %, bolj je pomembno, da je konstanten in ponovljiv, saj je od tega odvisna točnost in ponovljivost celotne metode. Povprečni izkoristek ekstrakcije etopozida je dokaj nizek, vendar zelo ponovljiv. Če bi hoteli povečati odstotek izkoristka obeh analitov, bi morali povečati volumen topila pri ekstrakciji (glej Slika 14 in Slika 15). S tem pa bi poslabšali čistost kromatograma in posledično natančnost pri integriranju (glej Slika 16 in Slika 17). RSD je bil pri obeh učinkovinah manjši ali enak 3,4 %, kar nam zagotavlja, da z metodo dobimo dovolj točne, natančne in ponovljive rezultate.

\*Odziv iz umeritvene premice smo množili z 1,5, ker smo od 1,5 mL etrne faze odvzeli 1 mL. Pri dodatku k suhi plazmi pa tega koraka ni bilo, zato so odzivi višji (glej Preglednica XXV).

**Preglednica XXV: Izkoristek ekstrakcije etopozida in tenipozida iz obogatene plazme.**

vzorec	umeritvena		dodatek k suhi plazmi		recovery v %	
	etopozid	tenipozid	etopozid	tenipozid	etopozid	tenipozid
QCl	26,8	539,5	68,9	863,7	58,3	93,7
QCl	26,8	560,4	69,6	880,6	57,8	95,5
QCl	27,6	569,3	67,2	863,9	61,6	98,8
QCm	258,1	538,4	670,3	859	57,8	94,0
QCm	257,1	561	636,7	874,5	60,6	96,2
QCm	257	553	674,7	847,6	57,1	97,9
QCh	1099,6	547,7	2968,2	863,9	55,6	95,1

QCh	1167,3	580,7	2870,3	864,8	61,0	100,7
QCh	1129,9	577,5	2864,6	880,5	59,2	98,4
				povprečje	58,7	96,5
				RSD %	3,4	2,5

### 5.5.7 Stabilnost

#### 5.5.7.1 Stabilnost pri sobni temperaturi (benchtop)

- Stabilnost osnovnih raztopin

V Preglednica XXVI so prikazani povprečni odzivi QC-jev ter spremembe odziva po šestih urah na sobni temperaturi, glede na čas nič (glej točko 4.7.9.1). Vidimo, da se po 6 urah odzivi celo zvišajo, kar lahko pripišemo izhlapitvi topila in posledičnemu dvigu koncentracije. Smo pa dokazali, da učinkovini ne razpadeta v tem času.

**Preglednica XXVI: Stabilnost osnovnih raztopin etopozida in tenipozida pri sobni temperaturi (odzivi).**

etopozid	t = 0 h	t = 6 h	sprememba v %
QCl	27,2	30,2	+11,2
QCm	234,3	260,3	+11,1
QCh	1001,3	1149,3	+14,8
tenipozid R1_T	337,9	358,4	+6,1

n=3

- Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin

V Preglednica XXVII so prikazani povprečni odzivi QC-jev ter spremembe odziva po šestih urah na sobni temperaturi, glede na čas nič. Odziv po 6 urah se je z razliko od osnovnih raztopin znižal, saj plazma manj hlapi kot metanol. Vseeno pa je prisoten razpad, vendar je znotraj dovoljenih 15 odstotkov.

**Preglednica XXVII: Stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev etopozida in IS pri sobni temperaturi.**

etopozid	t = 0 h	t = 6 h	sprememba v %
QCl	24,8	24,1	-2,7
QCm	225,1	198,8	-11,7
QCh	945,9	831,8	-12,1
tenipozid R1_T	497,4	502,2	+1,0

n=3



**5.5.7.2 Stabilnost med zamrzovanjem in odtajevanjem**

- Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin

Analiza stabilnosti je potekala po postopku, opisanem v točki 4.7.9.2. Preglednica XXVIII prikazuje % odstopanja povprečnih odzivov etopozida in IS v obogatenih plazemskih raztopinah po treh ciklih zamrzovanja in odtajanja, glede na odziv pri času nič.

**Preglednica XXVIII: Stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev etopozida in tenipozida med zamrzovanjem in odtajevanjem.**

etopozid	t = 0 h	po odtajanju	sprememba v %
QCl	27,3	30,1	+10,1
QCm	257,6	269,5	+4,6
QCh	1133,8	1009,5	-11,0
tenipozid R1_T	559,5	560,7	+0,2

n=3

**5.5.7.3 Postpreparativna stabilnost**

- Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin

Iz Preglednica XXIX je razvidno, da so vsi QC-ji stabilni vsaj 24 ur pri 5 °C, saj so se odzivi spremenili za manj kot 15 %.

**Preglednica XXIX: Stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev etopozida in tenipozida na 5°C.**

etopozid	t = 0 h	t = 24 h	sprememba v %
QCl	24,3	23,9	-1,6
QCm	238,1	239,7	+0,6
QCh	968,5	982,4	+1,4
tenipozid R1_T	512,2	478,0	-6,7

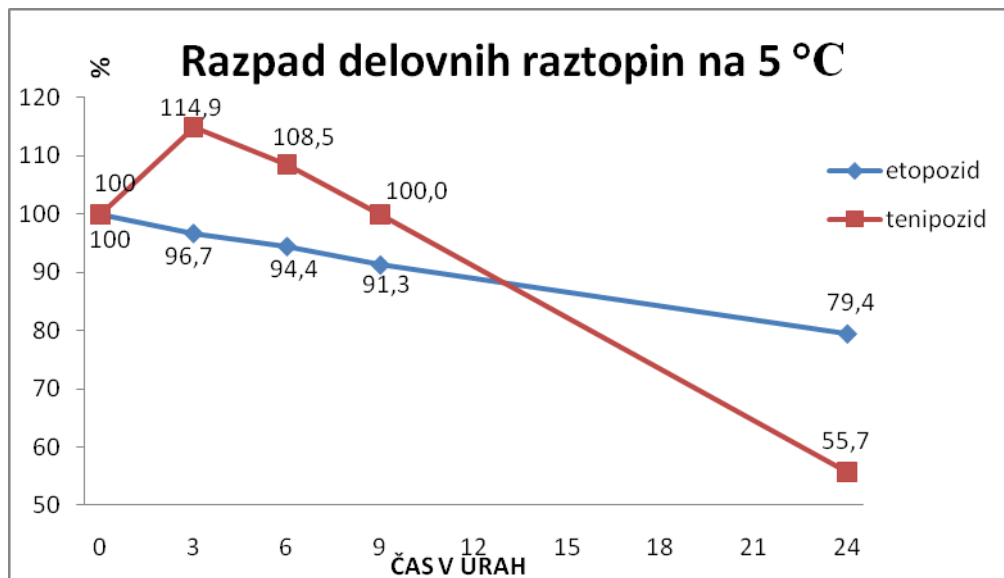
n = 5

- Stabilnost delovnih raztopin

Iz Slika 21 lahko opazimo, da etopozid v vodi konstantno razpada in z veliko večjo hitrostjo kot v plazmi. To smo opazili že pri optimizaciji shranjevanja, ko smo osnovne raztopine shranjevali v hladilniku (glej točko 5.1.1). Razpad je verjetno odvisen od pH medija, v katerem se etopozid nahaja, saj se je hitrost razpada učinkovin močno povečala v plazmi, kadar smo jo nakisali na pH 3 (glej točko 5.4.3). Pri tenipozidu pa v prvih urah koncentracija celo poraste, potem pa začne zelo hitro padati.

Kot vidimo v Preglednica XXIX, je trend stabilnosti obogatenih plazemskih vzorcev v primerjavi z delovnimi raztopinami (glej Slika 21) čisto drugačen, saj se odzivi v

obogatenih plazemskih vzorcih etopozida načeloma sploh ne spreminjajo, tenipozida pa razpade le 6,7 %.



Slika 21: Razpad delovnih raztopin etopozida in tenipozida v vodi pri shranjevanju na 5 °C.

#### 5.5.7.4 Dolgoročna stabilnost

- Stabilnost osnovnih raztopin

Kot je že opisano v točki 5.1.1, smo zaradi razpada analitov v delovnih in osnovnih raztopinah osnovne shranjevali na -20 °C. Zato smo preverili, koliko časa so te raztopine stabilne in posledično uporabne za umeritveno krivuljo. Kot vidimo v Preglednica XXX, so osnovne raztopine etopozida in tenipozida stabilne v zamrzovalniku tudi 50 dni, saj razpad ne presega 10 % začetne koncentracije.

Preglednica XXX: Stabilnost osnovnih raztopin pri dolgoročnem shranjevanju v zamrzovalniku.

etopozid	t = 0 h	t = 50 dni	sprememba v %
QCl	27,2	24,9	-8,3
QCm	260,2	234,3	-10,0
QCh	1050,7	1001,3	-4,7
tenipozid R1_T	342,7	320,2	-6,6

n = 3

- Stabilnost obogatenih plazemskih raztopin

Preglednica XXXI prikazuje stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev po 18 in 39 dneh shranjevanja pri -20 °C. Po 18 dneh se ne opazi nikakršnih sprememb v odzivih, po 39 dneh pa se spremeni in razpade skoraj 15 % učinkovine. Zato smo vzorce bolnikov pred izvedbo analize shranili v zamrzovalniku največ tri tedne.

**Preglednica XXXI: Stabilnost obogatenih plazemskih vzorcev etopozida in IS pri dolgoročnem shranjevanju v zamrzovalniku (odzivi).**

etopozid	t0	po 18 dneh	sprememba v %	po 39 dneh	sprememba v %
QCl	27,3	28,0	+2,5	26,8	-2,1
QCm	257,6	255,8	-0,7	239,7	-6,9
QCh	1133,8	1160,2	+2,3	980,6	-13,6
tenipozid	559,5	555,4	-0,7	487,3	-12,9

## 5.6 Uporaba metode na realnih vzorcih bolnikov

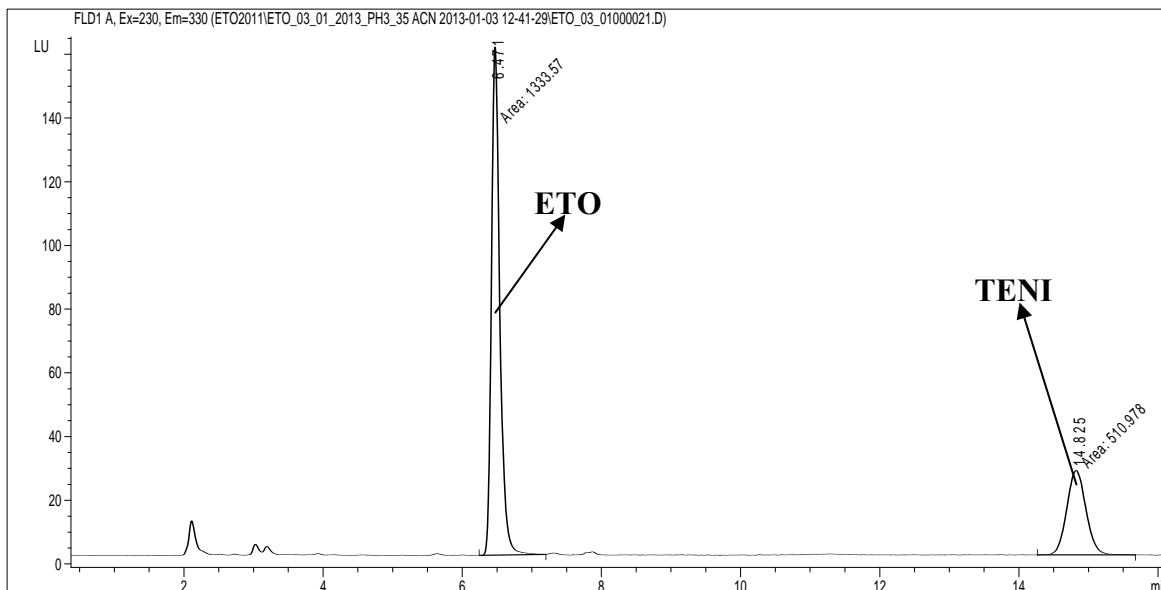
V Preglednica XXXII so predstavljeni rezultati vseh vzorcev kot koncentracija etopozida v  $\mu\text{g/mL}$  plazme pri bolnikih s pljučnim rakom. Vsak stolpec predstavlja svojega bolnika. Vse koncentracije etopozida so znotraj območja umeritvene premice (0,125-30  $\mu\text{g/mL}$ ), kar pomeni, da je metoda ustrezna za uporabo v kliničnih študijah. Razlaga oznake vzorcev je opisana v poglavju Materiali in oprema (glej točko 3.1).

**Preglednica XXXII: Rezultati koncentracije etopozida v  $\mu\text{g/mL}$  plazme v realnih vzorcih bolnikov z drobnoceličnim pljučnim rakom.**

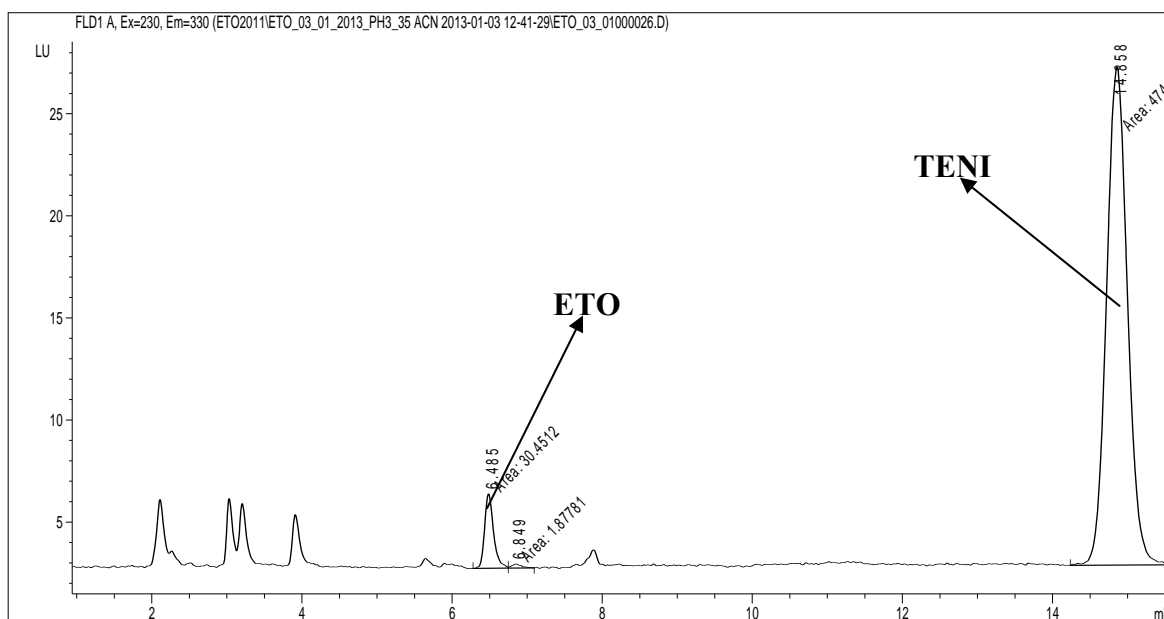
OZNAKA	P1 - BOLNIK 1 [ $\mu\text{g/ mL}$ ]	P2 - BOLNIK 2 [ $\mu\text{g/ mL}$ ]	P3 - BOLNIK 3 [ $\mu\text{g/ mL}$ ]	P4 - BOLNIK 4 [ $\mu\text{g/ mL}$ ]
1/1/1	15,5	17,3	17,1	27,3
1/1/2	6,6	7,1	6,7	10,1
1/1/3	0,3	0,4	0,4	0,6
1/2/1	17,3	18,6	17,0	26,5
1/2/2	7,3	6,6	6,2	11,3
1/2/3	0,4	0,4	0,4	1,1
1/3/1	18,8	8,0	15,0	27,4
1/3/2	7,8	4,0	7,0	12,4
2/1/1	8,1	4,3	5,2	
2/1/2	4,6	3,1	3,6	
2/1/3	0,4	0,5	0,5	
2/2/1	9,3	6,8	7,2	
2/2/2	6,0	4,2	5,0	
2/2/3	1,2	0,6	0,8	
2/3/1	6,5	5,1	6,6	
3/1/1	4,7	10,6	20,3	
3/1/2	3,3	6,5	9,9	
3/1/3	0,4	0,9	0,9	
3/2/1	6,9	17,0	12,8	
3/2/2	4,5	12,8	10,5	
3/2/3	0,7	1,7	1,1	
3/3/1	9,6	9,1	21,5	
4/1/1	9,4			
4/1/2	9,3			
4/1/3	0,9			
4/2/1	12,4			
4/2/2	7,9			
4/2/3	0,8			
4/3/1	11,4			

Iz Preglednica XXXII lahko vidimo, da so izmerjene koncentracije etopozida pri prvih treh bolnikih v prvih dveh krogih zelo primerljive. Večje razlike se opazijo v naslednjih krogih uporabe, predvsem takoj po odmerku zdravila. To potrjuje trditev o veliki variabilnosti BU etopozida med bolniki. Močno izstopa že v prvem krogu bolnik 4 z zelo visokimi

koncentracijami, v preglednici osenčeno s sivo barvo. Ta bolnik je bil tudi izključen iz študije, pokazali so se neželeni učinki.



Slika 22: Primer kromatograma z visoko koncentracijo etopozida-realni vzorec bolnika P2 1/1/1. Prvi krog in prvi dan KT, odmerek 200 mg i. v., takoj po koncu infuzije. Izračunana plazemska koncentracija etopozida je 17,27  $\mu\text{g/mL}$ .



Slika 23: Primer kromatograma z nizko koncentracijo etopozida-realni vzorec bolnika P2 1/2/3. Prvi krog in drugi dan KT, odmerek 200 mg i. v., 24 h po začetku infuzije, tik pred naslednjo infuzijo. Izračunana plazemska koncentracija etopozida je 0,42  $\mu\text{g/mL}$ .

## 6 SKLEPI

V diplomski nalogi smo razvili novo analizno HPLC-metodo s fluorescenčno detekcijo za določitev plazemskih koncentracij etopozida v vzorcih bolnikov z drobnoceličnim pljučnim rakom in izvedli njeno validacijo.

HPLC-metodo smo razvili na reverznofazni koloni Phenomedex Luna C18 (2) 100A 150 x 4,6 mm 3  $\mu$ m, termostatorirano na 50 °C, s predkolono Luna Phenomenex 4 x 2 mm C18. Mobilna faza je bila sestavljena iz 35 % acetonitrila in 65 % 25 milimolarnega fosfatnega pufru pH 3,0. Pretok mobilne faze je prvih 7 minut analize znašal 0,7 mL/min, do 13,5 minute je znašal 1,3 mL/min in do konca analize (16 minute) 0,8 mL/min. Volumen injiciranja je bil 25  $\mu$ L. Detekcija je potekala pri ekscitacijski valovni dolžini 230 nm in emisijski valovni dolžini 330 nm, faktor ojačitve fotopomnoževalke (gain) je bil 12.

Preizkusili smo tudi različne načine ekstrakcije: s kloroformom, z dietiletrom, z nakisanjem in z zamrzovanjem plazme. Za najboljšo metodo ekstrakcije se je izkazala LLE 500  $\mu$ L plazme in 1,5 mL dietiletra, brez nakisanja in zamrzovanja plazme. Izkoristek ekstrakcije je bil za etopozid v povprečju 58,7 %, za tenipozid da 96,5 %, vendar izjemno ponovljiv. Metodo smo validirali znotraj dneva in med dnevi ter ugotovili, da je točna, ponovljiva in linearna v območju 0,125–30,0  $\mu$ g/mL.

Pri študiji stabilnosti smo ugotovili, da so osnovne raztopine analitov in obogateni plazemski vzorci stabilni tako na sobni temperaturi in v zamrzovalniku, kot tudi med cikli odtajevanja in zamrzovanja. Pri študiji postpreparativne stabilnosti smo ugotovili, da so obogateni plazemski vzorci stabilni vsaj 24 ur, če so shranjeni v avtomatskem vzorčevalniku pri 4 °C, kar pa se ni izkazalo za delovne raztopine (glej točko 5.5.7.3). To smo potrdili pri analizi shranjevanja delovnih raztopin v hladilniku na 5 °C, ko smo opazili močno znižanje odzivov, predvsem tenipozida. Zato smo se odločili, da delovne raztopine pred vsako analizo pripravimo sveže iz OS\_E in OS\_T, shranjenih v zamrzovalniku. Med optimizacijo smo ugotovili vezavo naših analitov na plastične epruvete. Po uporabi 75-odstotnega MeOH v vodi, namesto same vode, za redčenje osnovnih raztopin nismo imeli več nobenih težav s točnostjo in linearnostjo umeritvene premice.

Po validaciji smo metodo uspešno aplicirali na realne vzorce bolnikov z drobnoceličnim pljučnim rakom. Razvita analizna metoda je primerna za spremljanje zdravljenja z etopozidom.

## 7 LITERATURA

1. Puglisi M, Dolly S, Faria A, et al: Treatment options for small cell lung cancer—do we have more choice? *British Journal of Cancer* 2010; 102(4): 629–38.
2. Rak v Sloveniji 2009, Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka. Register raka Republike Slovenije, 2013; 35-9.
3. Hecht S: Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews, Cancer*, volumen 3 oktober 2003: 733–44.
4. <http://healthylogica.blogspot.com/2012/08/tips-to-clean-lungs-of-smokers.html/> (dostopano 4. 8. 2013).
5. <http://www.ctsu.ox.ac.uk/~tobacco/> (dostopano 15. 8. 2013); Peto R, Lopez A, Boreham J, Thun M: Mortality from smoking in developed countries 1950-2005 (or later). March 2012.
6. <http://www.cancerresearchuk.org/cancerinfo/cancerstats/causes/lifestyle/tobacco/tobacco-and-cancer-risk> (dostopano 11. 5. 2013, ), Cancer Research UK, Angel Building, 407 St John Street, London.
7. Falk S, Williams C: Lung Cancer, third edition, Oxford University Press, New York, 2010; 3-12, 77-80.
8. <http://www.mavicevap.com/medi/sl/1439.html> (dostopano 12. 5. 2013).
9. [http://www.lungcancer.org/find\\_information/publications/163-lung\\_cancer](http://www.lungcancer.org/find_information/publications/163-lung_cancer) (dostopano 12. 5. 2013), CancerCare®, Inc.
10. Hengstler J, Heimerdinger C, Schiffer I, Gebhard S, Sagemüller J, Tanner B, Bolt H, Oesch F: Dietary topoisomerase II-poisons: contribution of soy products to infant leukemia? *EXCLI Journal* 2002; (ISSN 1611-2156); Issue 1: December 30, 2002, 8-14.
11. Chen C, Thoenb K, Uckunc F: High-performance liquid chromatographic methods for the determination of topoisomerase II inhibitors. Original Research Article; *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Volume 764, Issue 1, July 7 2001, 81-119.
12. Sinha B, Haim N, Dusre L, et al.:DNA Strand Breaks Produced by Etoposide (VP-16,213) in Sensitive and Resistant Human Breast Tumor Cells: Implications for the Mechanism of Action. *Cancer research* 48, September 15, 1988, 5096-100.

13. Vepesid 100 mg mehke kapsule, Povzetek glavnih značilnosti zdravila, odobren v Sloveniji 15. 3. 2011.
14. Rezonja R, Knez L, Cufer T, Mrhar A: Oral treatment with etoposide in small cell lung cancer–dilemmas and solutions. *Radiology and Oncology* 2013, 2 October 2013; 47(1): 1-13.
15. Toffoli G, Corona G, Basso B, et al: Pharmacokinetic Optimisation of Treatment with Oral Etoposide. *Clinical Pharmacokinetics*, 2004; 43(7): 441-66.
16. Kralj E, Žakelj S, Trontelj J, Berginc K, Pajič T, Preložnik Zupan I, Černelč P, Ostanek B, Podgornik H, Marc J, Kristl A: Določanje privzema imatiniba v levkocite kot napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja KML. Izvirni članek, *Zdravniški Vestnik*, november 2012; Letnik 81: II-189.
17. Liliemark E, Pettersson B, Peterson C, Liliemark J: High-performance liquid chromatography with fluorometric detection for monitoring of etoposide and its cis-isomer in plasma and leukaemic cells. Original Research Article; *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Volume 669, Issue 2, 21 July 1995: 311-17.
18. Robieux I, Aita P, Sorio R, Toffoli G, Boiocchi M: Determination of unbound etoposide concentration in ultrafiltered plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. Original Research Article; *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Volume 686, Issue 1, 8 November 1996: 35-41.
19. Stremetzne S, Jaehde U, Schunack W: Determination of the cytotoxic catechol metabolite of etoposide (3'O-demethyletoposide) in human plasma by high-performance liquid chromatography. Original Research Article; *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Volume 703, Issues 1-2, 5 December 1997: 209-15.
20. Manouilov K, McGuire T, Gordon B, Gwilt P: Assay for etoposide in human serum using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Volume 707, Issues 1-2, 10 April 1998: 342-6.
21. Cai X, Woo M, Edick M, Relling M: Simultaneous quantitation of etoposide and its catechol metabolite in human plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B:*



- Biomedical Sciences and Applications, Volume 728, Issue 2, 28 May 1999: 241-50.
22. Shirazi F, Bahrami G, Stewart D, Tomiak E, Delorme F, Noel D, Goel R: A rapid reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of etoposide (VP-16) in human plasma. Original Research Article; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 25, Issues 3-4, June 2001: 353-56.
  23. Chen C, Uckun F: Highly sensitive liquid chromatography–electrospray mass spectrometry (LC–MS) method for the determination of etoposide levels in human serum and plasma. Original Research Article; Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, Volume 744, Issue 1, 7 July 2000: 91-8.
  24. Zhou R, Frostvik-Stolt M, Liliemark E: Determination of etoposide in human plasma and leukemic cells by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Original Research Article; Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, Volume 757, Issue 1, 5 June 2001: 135-41.
  25. Sachin B.S, Najjar I.A, Sharma S.C, Verma M.K, Reddy M.V, Anand R, Khajuria R.K, Koul S, Johri R.K: Simultaneous determination of etoposide and a piperine analogue (PA-1) by UPLC–qTOF-MS: Evidence that PA-1 enhances the oral bioavailability of etoposide in mice. Original Research Article; Journal of Chromatography B, Volume 878, Issues 9-10, 15 March 2010: 823-30.
  26. Krogh-Madsen M, Honoré Hansen S, Hartvig Honoré P: Simultaneous determination of cytosine arabinoside, daunorubicin and etoposide in human plasma. Original Research Article; Journal of Chromatography B, Volume 878, Issue 22, 15 July 2010: 1967-72.
  27. Pang S, Zheng N, Felix CA, Scavuzzo J, Boston R, Blair IA: Simultaneous determination of etoposide and its catechol metabolite in the plasma of pediatric patients by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of mass spectrometry, July 2001; 36(7): 771-81.
  28. HPLC column protection guide version 0908, Phenomenex inc. 2008.
  29. Ellison G, Straumfjord, Jr. J. V, Hummel J. P: Buffer Capacities of Human Blood and Plasma. Department of Biochemistry, State University of Iowa, Iowa City, Ia., Vol. 4, No. 6; April 25, 1958: 452-61.

30. Guideline on bioanalytical method validation EU Committee for Medicinal Products for Human Use. European Medicines Agency, London ,United Kingdom; July 21, 2011.
31. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation U. S. Department of Health and Human Services FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD; May 2001.