

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA KOKOT

**RAZVOJ ANALIZNE METODE ZA DOLOČEVANJE
KRVNIH KONCENTRACIJ ETOPOZIDA V POSUŠENIH
KRVNIH MADEŽIH S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO
VISOKE LOČLJIVOSTI IN FLUORESCENČNO
DETEKCIJO**

**DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR
DETERMINATION OF BLOOD CONCENTRATIONS OF
ETOPOSIDE IN DRIED BLOOD SPOTS WITH HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND
FLUORESCENCE DETECTION**

Ljubljana, 2014

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

Zahvala

Za mentorstvo in pomoč pri načrtovanju in izvajanju eksperimentalnega dela se iskreno zahvaljujem doc. dr. Tomažu Vovku. Hvala tudi vsem sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi bili tekmo eksperimentalnega dela v veliko pomoč.

Zahvaljujem se svojim staršem in bratu, fantu Alenu ter prijateljem in sošolcem za podporo na moji študijski poti.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka.

Eva Kokot

Ljubljana, julij 2014

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh

Član diplomske komisije: asist. dr. Ilija Ilić

1 KAZALO

1	UVOD	1
1.1	RAZVOJ.....	1
1.2	PRIPOROČILA EBF ZA UPORABO DBS TEHNIKE:.....	2
1.2.1	Vpliv hematokrita na krvni madež in ekstrakcijo	2
1.2.2	Stabilnost krvi pred obogatenjem in njena stabilnost na papirčkih	2
1.2.3	Dodatek internega standarda (IS) vzorcem.....	3
1.2.4	Postopek redčenja vzorca.....	4
1.2.5	Homogenost vzorca DBS.....	5
1.3	PRIPRAVA VZORCEV DBS	5
1.3.1	POZITIVNE LASTNOSTI DBS VZORCEV	6
1.3.2	NEGATIVNE LASTNOSTI DBS VZORCEV	6
1.3.3	FARMAKOKINETIČNO STALIŠČE	6
1.4	ETOPOZID	11
1.4.1	ABSORPCIJA.....	11
1.4.2	PORAZDELITEV.....	12
1.4.3	METABOLIZEM IN IZLOČANJE.....	13
2	NAČRT ZA DELO ALI DELOVNA HIPOTEZA	15
3	MATERIALI IN OPREMA.....	16
3.1	BIOLOŠKI MATERIAL.....	16
3.2	STANDARDI.....	16
3.3	REAGENTI IN TOPILA	17
3.4	NAPRAVE IN PRIBOR	17
4	METODE.....	19
4.1	PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN IN MOBILNE FAZE	19
4.1.1	Priprava raztopin etopozida	19

EVA KOKOT - Diplomska naloga

4.1.2	Priprava raztopin danzil-treonina.....	19
4.1.3	Priprava delovnih raztopin in obogatenih krvnih vzorcev	20
4.1.4	Priprava mobilne faze	21
4.2	RAZVOJ EKSTRAKCIJSKE METODE	22
4.2.1	Izbor papirčka za nanos krvnih vzorcev	22
4.2.2	Izbor topila za ekstrakcijo	22
4.2.3	Izbor IS.....	22
4.2.4	Izbor topila za rekonstitucijo suhega ostanka	24
4.2.5	Vpliv zmrznjene in sveže krvi pri pripravi krvnih vzorcev	24
4.2.6	Vpliv časa priprave obogatene krvi na odziv etopozida	24
4.2.7	Optimalna metoda.....	25
4.3	RAZVOJ KROMATOGRAFSKE METODE	25
4.3.1	Osnovna metoda Podkrižnik	25
4.3.2	Optimizacija sestave mobilne faze.....	26
4.3.3	Optimalna metoda.....	26
4.4	VALIDACIJA	26
4.4.1	Priprava standardov za kontrolo kakovosti.....	27
4.4.2	Območje linearnosti	27
4.4.3	Točnost.....	28
4.4.4	Ponovljivost	28
4.4.5	Meja kvantifikacije (LLOQ)	29
4.4.6	Selektivnost.....	29
4.4.7	Delež ekstrakcije etopozida iz papirčka.....	29
4.4.8	Stabilnost etopozida.....	31
4.5	UPORABA RAZVITE METODE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJ ETOPOZIDA PRI PACIENTIH.....	32
4.5.1	Vpliv hematokrita na koncentracije etopozida v krvnih vzorcih	32

EVA KOKOT - Diplomska naloga

4.5.2	Primerjava krvnih in plazemskih koncentracij etopozida pri bolnikih s pljučnim rakom	33
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	34
5.1	RAZVOJ EKSTRAKCIJSKE METODE	34
5.1.1	Izbor papirčka za nanos krvnih vzorcev	34
5.1.2	Izbor topila za ekstrakcijo	35
5.1.3	Izbor IS.....	37
5.1.4	Izbor topila za rekonstitucijo suhega ostanka	40
5.1.5	Vpliv zmrznjene in sveže krvi pri pripravi krvnih vzorcev	42
5.1.6	Vpliv časa priprave obogatenih krvnih vzorcev na odziv etopozida	42
5.2	RAZVOJ KROMATOGRAFSKE METODE	43
5.2.1	Optimizacija sestave mobilne faze.....	43
5.3	VALIDACIJA	44
5.3.1	Območje linearnosti	44
5.3.2	Točnost.....	46
5.3.3	Ponovljivost	47
5.3.4	Meja kvantifikacije (LLOQ)	47
5.3.5	Selektivnost.....	48
5.3.6	Delež ekstrakcije etopozida iz papirčka.....	48
5.3.7	Stabilnost etopozida	50
5.4	UPORABA RAZVITE METODE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJETOPOZIDA NA BOLNIKIH	52
5.4.1	Vpliv hematokrita na koncentracije etopozida v krvnih vzorcih	52
5.4.2	Primerjava krvnih in plazemskih koncentracij etopozida pri bolnikih s pljučnim rakom	53
6	SKLEPI.....	57
7	LITERATURA	58

Preglednica I: Odločitvena tabela izbora matrice (21).....	10
Preglednica II: Način označevanja realnih vzorcev bolnikov s pljučnim rakom	16
Preglednica III: Priprava osnovnih raztopin etopozida.....	19
Preglednica IV: Priprava osnovnih raztopin danzil-treonina	20
Preglednica V: Priprava metanolnih raztopin etopozida in obogatenih krvnih vzorcev	21
Preglednica VI: Izbor topila za ekstrakcijo.....	22
Preglednica VII: Izračunane logaritemske vrednosti porazdelitvenih koeficientov danzil aminokislin, etopozida in tenipozida	23
Preglednica VIII: Izbira primerenega rekonstitucijskega topila	24
Preglednica IX: Priprava delovnih raztopin etopozida in standardov za kontrolo kakovosti (QC)	27
Preglednica X: Priprava vodnih raztopin etopozida za izračun deleža ekstrakcije ..	30
Preglednica XI: Podaljšan čas ultrazvočne kadičke	30
Preglednica XII: Priprava standardov za kontrolo kakovosti dolgoročne stabilnosti	31
Preglednica XIII: Priprava krvi z ustreznim deležem hematokrita	32
Preglednica XIV: Odločitvena tabela izbora ekstrakcijskega topila	35
Preglednica XV: Izbor ekstrakcijskega topila	37
Preglednica XVI: Iskanje primerenega internega standarda	38
Preglednica XVII: Izbor internega standarda	39
Preglednica XVIII: Vpliv deleža vode na simetrijo vrha	40
Preglednica XIX: Vpliv časa priprave obogatenih krvnih vzorcev na odziv etopozida	43
Preglednica XX: Odziv etopozida v odvisnosti od pH-ja vodne faze	44
Preglednica XXI: Točnost umeritvene premice razmerja etopozida in IS prvega validacijskega dne $y = 0,0714 \cdot x - 0,0163$ ($R^2 = 0,998$)	45
Preglednica XXII: Točnost umeritvene premice razmerja etopozida in IS drugega validacijskega dne $y = 0,0748 \cdot x + 0,00409$ ($R^2 = 0,996$)	45
Preglednica XXIII: Točnost umeritvene premice razmerja etopozida in IS tretjega validacijskega dne $y = 0,0644 \cdot x + 0,00509$ ($R^2 = 0,990$)	46
Preglednica XXIV: Točnost razmerja odzivov etopozida in IS QC-jev tekom treh dni validacije	46

Preglednica XXV: Dnevna ponovljivost standardov za zagotavljanje kakovosti (QC) tekom treh dni validacije	47
Preglednica XXVI: Meddnevna ponovljivost standardov za zagotavljanje kakovosti (QC) tekom treh dni validacije	47
Preglednica XXVII: Ponovljivost razmerja etopozida in IS pri spodnji meji kvantifikacije	47
Preglednica XXVIII: Delež ekstrakcije etopozida iz papirčka Whatman 903	48
Preglednica XXIX: Vpliv podaljševanja časa ultrazvočne kadičke na odziv etopozida	49
Preglednica XXX: Vpliv omočitve posušenih krvnih madežev na odziv etopozida...	49
Preglednica XXXI: Postpreparativna stabilnost vzorcev DBS - avtomatski vzorčevalnik na 5 °C	50
Preglednica XXXII: Odziv etopozida v času 0	51
Preglednica XXXIII: Dolgoročna stabilnost etopozida na papirčku pri treh različnih temperaturah (40 °C, sobni temperaturi (RT) in -20 °C)	51
Preglednica XXXIV: Vpliv hematokrita na odziv etopozida.....	53
Preglednica XXXV: Koncentracija etopozida v polni krvi pri bolnikih s pljučnim rakom	54

Slika 1: Prikaz različnih tehnik dodatka IS (20).....	4
Slika 2: Prehajanje zdravilne učinkovine (21)	7
Slika 3: Struktura etopozida (4'-dimetil-epipodofilotoksin 9-[4,6-O-(R)-etiliden-beta-D-glukopiranozid], 4' -(dihidrogenfosfat)) (24).....	11
Slika 4: Kromatogram slepega vzorca in zgoraj pomanjšano vzorca DBS na papirčku Whatman 903	34
Slika 5: Kromatogram slepega vzorca in zgoraj pomanjšano vzorca DBS na papirčku DMPK-C	34
Slika 6: Kromatogram vzorca DBS s koncentracijo 15 µg/ml, kjer smo kot ekstrakcijsko in rekonstitucijsko topilo uporabili AcCN/H₂O = 1/1.....	36
Slika 7: Kromatogram vzorca DBS s koncentracijo 15 µg/ml, kjer smo kot ekstrakcijsko in rekonstitucijsko topilo uporabili MeOH/AcCN/H₂O = 25/25/50.....	36
Slika 8: Oblika vrha etopozida pri 80 % in 70 % MeOH (zgoraj pomanjšano).....	40
Slika 9: Oblika vrha etopozida pri 80 % in 50 % AcCN (zgoraj pomanjšano)	41
Slika 10: Kromatogram vzorca DBS s koncentracijo 30 µg/ml, kjer smo kot rekonstitucijsko topilo uporabili AcCN/H₂O = 2/3	41
Slika 11: Kromatogram vzorca DBS s koncentracijo 30 µg/ml, kjer smo kot rekonstitucijsko topilo uporabili MeOH/H₂O = 1/1.....	42
Slika 12: Kromatogram pri 33 % AcCN (čas analize 10 minut)	43
Slika 13: Kromatogram levo pri 35 % AcCN (čas analize 9 minut) in desno pri 37 % AcCN (čas analize 8 minut)	44
Slika 14: Kromatograma vzorca DBS s koncentracijo 25 µg/ml (UZ = 5 minut) s predhodnim omočenjem in brez njega (pomanjšana slika)	49
Slika 15: Primerjava plazemskih koncentracij etopozida ter koncentracij etopozida v polni krvi pri bolnikih s pljučnim rakom	55
Slika 16: Bland-Altmanov diagram razlik metod določanja etopozida v plazemskih vzorcih in posušenih krvnih madežih bolnikov s pljučnim rakom	56

POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo spoznali značilnosti in problematiko protitumorne učinkovine etopozida ter v 60. letih prejšnjega stoletja razvite tehnike posušenega krvnega madeža. Na osnovi spoznanj smo razvili ter optimizirali metodo določanja etopozida v posušenih krvnih madežih, ki smo jo uporabili tudi za določanje koncentracij etopozida v posušenih krvnih madežih bolnikov s pljučnim rakom.

Pri razvoju metode smo sprva izvedli ekstrakcijo etopozida iz posušenega krvnega madeža z uporabo ekstrakcijskega topila ($\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 35/35/30$) in dodatka internega standarda (danzil-treonin). Nato smo s pomočjo mešalnika in ultrazvočne kadičke ekstrahirali analit. Po centrifugiranju smo dobljeno bistro raztopino z dušikom posušili do suhega. V zadnjem koraku smo suhi ostanek raztopili v mešanici topil $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 1/1$. Za separacijo analitov iz vzorcev posušenih krvnih madežev smo uporabili na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ termostatirano reverzno-fazno kolono Phenomedex Luna C18 (2) 100A 150 x 4,6 mm 3 μm s predkolono Phenomenex 4 x 3 mm C18. Za izvajanje analize smo injicirali 50 μl vzorca. Analiza je pri konstantnem pretoku mobilne faze (33 % acetonitril, 67 % fosfatni pufer $\text{pH}=3$) 0,7 ml/min trajala 12 minut. Detekcija je potekala pri ekscitacijski valovni dolžini 230 nm in emisijski valovni dolžini 330 nm.

Razvito metodo smo na koncu validirali po smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila ter s tem preverili njeno ustreznost. Uspešno smo dokazali linearnost metode znotraj intervala 0,5 in 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ter določili spodnjo mejo kvantifikacije pri 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Metoda je ustreza tudi ostalim preizkušenim validacijskim parametrom, kot so točnost (vsi rezultati znotraj bioanalitične sprejemljivosti $\pm 15\%$), ponovljivost ($\text{RSD} \leq 10,1\%$) in selektivnost. Dobili smo relativno nizek delež ekstrakcije etopozida iz papirčka 43 – 48 %, ki pa je izredno ponovljiv ($\text{RSD} \leq 2,47\%$). Najprimernejša temperatura za shranjevanje papirčkov s posušenimi krvnimi madeži je $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (vsi rezultati znotraj $\pm 15\%$), najmanj primerna $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (vsi vzorci QCL z izjemo 1. tedna padejo izven meja bioanalitične sprejemljivosti). Pri preizkušanju postpreparativne stabilnosti se je izkazalo, da so bili vzorci posušenih krvnih madežev (DBS) stabilni vsaj 24 ur pri shranjevanju v avtomatskem vzorčevalniku pri temperaturi $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ključne besede: etopozid, posušeni krvni madež, pljučni rak, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, fluorescenčni detektor

ABSTRACT

As part of the thesis we have learned the features and issues of anti-tumor substance etoposide and in the 1960s developed technique, dried blood spot (DBS). Based on the findings, we have developed and optimized method for determination of etoposide in dried blood spot, which was also used to determine concentrations of etoposide in dried blood spot in patients with lung cancer.

For etoposide extraction we used a mixture of methanol/acetonitrile/water 35/35/30 v/v/v, respectively with the addition of internal standard (dansyl-threonine). Analytes were extracted with a use of vortex mixer and ultrasound bath. After centrifugation, the supernatant was dried out with nitrogen and the dry residue was dissolved in a solvent mixture methanol/water 1/1 v/v.

Reverse-phase column Phenomedex Luna C18 (2) 100A 150 x 4,6 mm 3 µm, heated at 50 °C, with a guard column Phenomenex Luna 4 x 3 mm C18 was used for the separation of analytes in dried blood spots samples. The volume of injected samples was 50 µl. The analysis lasted 12 minutes at a constant flow rate of the mobile phase (33 % acetonitrile, 67 % phosphate buffer pH = 3) 0,7 ml/min. Detection was carried out at excitation wavelength of 230 nm and emission wavelength of 330 nm.

The developed method was finally validated according to the guidelines of Food and Drug Administration to test adequacy. We have successfully demonstrated linearity of method within an interval between 0,5 and 20 µg/ml and the lower limit of quantification of 0,5 µg/ml. Method corresponded to other validation parameters, such as accuracy (all results are within the bioanalytical acceptability of ± 15 %), reproducibility ($RSD \leq 10,1\%$) and selectivity. We got a relatively low percentage of extraction of etoposide from filter paper 43 – 48 %, which is highly reproducible ($RSD \leq 2,47\%$). The preferred storage temperature of filter paper with dried blood spots is 40 °C (all results are within ± 15 %), at least adequate -20 °C (all QCL samples with the exception of week 1 fall outside the limit of bioanalytical acceptability). When testing postpreparative stability, it has been shown that DBS samples were stable for at least 24 hours when stored in the automatic sampler at a temperature of 5 °C.

Key words: etoposide, DBS = dried blood spot, lung cancer, high performance liquid chromatography, fluorescence detector

SEZNAM OKRAJŠAV

A	površina
A/A	razmerje odzivov (površina pod vrhom) etopozida in internega standarda
AcCN	acetonitril
AUC	površina pod krivuljo
BU	biološka uporabnost
C	plazemska koncentracija ZU
c	koncentracija
C _{ALB-ser}	serumska koncentracija albumina
C _{BIL-tot}	celokupna koncentracija bilirubina
Ck	koncentracija ZU v krvi
c _{max}	maksimalna koncentracija ZU v plazmi
Cu	plazemska koncentracija proste ZU
CYP	citokrom
DBS	dried blood spot = posušeni krvni madež
EBF	Evropski bioanalizni forum
Ekstrak. topilo	ekstrakcijsko topilo
Em	emisijska valovna dolžina
EMA	European Medicines Agency = Evropska agencija za zdravila
Eto	etopozid
Ex	ekscitacijska valovna dolžina
FD	farmakodinamika
FDA	Food and Drug Administration = Ameriška agencija za hrano in zdravila
FK	farmakokinetika
FLD	fluorescenčni detektor
fu	nevezan delež v plazmi
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
Ht	hematokrit
IS	interni standard
izrač.	izračunano

EVA KOKOT - Diplomska naloga

k	naklon premice
KT	kemoterapija
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
LLOQ	spodnja meja kvantifikacije
logP	logaritem porazdelitvenega koeficiente
MDR	»multi drug resistance«
MeOH	metanol
MS	masna spektrometrija
MS/MS	tandemska masna spektrometrija
n	odsek na ordinati
nm	nanometer
PCR	verižna reakcija s polimerazo
povp.	povprečje
QC (L/M/H)	standardi za kontrola kakovosti (nizek/srednji/visok)
R	koncentracijsko razmerje ZU v krvi in plazmi
R ²	determinacijski koeficient
razt.	raztopina
Rekon. topilo	rekonstitucijsko topilo
RSD	relativna standardna deviacija
RT	sobna temperatura
SD	standardna deviacija
SCLC	drobnocelični pljučni rak
T	temperatura
t _{1/2}	razpolovni čas
tr	retencijski čas
UZ kadička	ultrazvočna kadička
V	volumen
Vz.	vzorec
ZU	zdravilna učinkovina
y	razmerje med odzivoma etopozida in IS (danzil-treonin)
ρ	porazdelitev zdravilne učinkovine v krvne celice

1 UVOD

1.1 RAZVOJ

Robert Guthrie je v zgodnjih 60-ih letih prejšnjega stoletja razvil tehniko posušenega krvnega madeža angleško »dried blood spot« (DBS), ki so jo sprva poimenovali kar Guthrie-jeve kapljice. Uporabljala se je kot presejalni test za zdravljenje fenilketonurije pri novorojenčkih. Fenilketonurija je dedna presnovna bolezen, ki nastopi zaradi pomanjkanja encima fenilalanin hidrolaze, ki je nujno potreben za presnavljanje aminokisline fenilalanin v tirozin. Zaradi pomanjkanja omenjenega encima se fenilalanin pretvori do nevrotoksične fenilpiruvične kisline, ki se akumulira v možganih in privede do mentalne zaostalosti in napak pri razvoju (1).

Tehniko so kasneje uporabili za ugotavljanje številnih metaboličnih in generičnih nepravilnosti kot so hemoglobinopatije (1973), hipotiroidizem (1985) in Duchennovo mišično distrofijo (1990) (2). Njena uporaba je bila zaradi omejitve občutljivosti in specifičnosti analiziranja tako majhnih volumnov krvi (5 µl do 10 µl) omejena kar nekaj let. Z napredkom tehnologije v zadnjem desetletju (z izdelavo monoklonskih protiteles, ekspresijo sintetičnih proteinov in verižno reakcijo s polimerazo (PCR)) ter na področju tehnologije masne spektrometrije (MS) so prebrodili veliko teh težav. Nastali so tandemski masni spektrometri (MS/MS) z bistveno večjo občutljivostjo in selektivnostjo za kvantitativno analizo številnih majhnih molekul v vzorcih DBS, s čimer je bila omogočena analiza obsežnih DBS bank (3, 4). V literaturi lahko zasledimo raznoliko uporabo tehnike DBS npr. določanja učinkovin za zdravljenje epilepsije (5, 6, 7), astme (8), virusnih okužb (9), bolečine (10, 11, 12), avtoimune bolezni (13, 14), sladkorne bolezni (15) itd.

Leta 2008 sta Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) in Evropska agencija za zdravila (EMA) potrdili validirano metodo DBS z uporabo tekočinske kromatografije sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) za terapevtsko spremljanje zdravil, toksikinetiko in farmakokinetiko, nista pa podali smernic oziroma priporočil za uporabo DBS tehnike (3). Iz tega razloga so se strokovnjaki bioanalitike poglobili v priporočila za preizkušanje metode DBS, in leta 2011 pod okriljem Evropskega bioanaliznega foruma (EBF) izdali smernice glede uporabe in validacije (16, 17).

1.2 PRIPOROČILA EBF ZA UPORABO DBS TEHNIKE:

Strokovnjaki bioanalitike so se osredotočili na pet glavnih področij:

- vpliv hematokrita na krvni madež in ekstrakcijo,
- stabilnost krvi pred obogatenjem in njena stabilnost na papirčkih,
- dodatek internega standarda (IS) vzorcem,
- postopek redčenja vzorca in
- homogenost vzorca DBS (16).

1.2.1 Vpliv hematokrita na krvni madež in ekstrakcijo

Hematokrit predstavlja volumski odstotek rdečih krvnih celic v krvi in je posredno merilo za viskoznost (18). Vpliva na velikost krvnega madeža, nehomogeno porazdelitev zdravilne učinkovine (ZU) v krvnem madežu, ter od hematokrita odvisno obnovo ekstrakcije. Hematokrit je v premem sorazmerju z viskoznostjo krvi, zaradi česar v primeru večjega in/ali hitrejšega porazdeljevanja krvi po papirčku z nizko vrednostjo hematokrita (Ht), dobimo večjo kapljico kot v primeru visoke vrednosti (16, 19).

Prišli so do ugotovitve, da je delež hematokrita najpomembnejša spremenljivka pri tehnologiji DBS, saj le-ta vpliva na obliko in velikost kapljice, homogenost, natančnost in točnost ter na obnovo svežih in staranih vzorcev. Sprememba vrednosti hematokrita signifikantno vpliva na natančnost in točnost preračunavanja koncentracije ZU. Kot referenčna vrednost nam služi odziv analita pri normalni vrednosti Ht 0,45. Razmerje odziva analita pri vrednostih hematokrita, ki so nad ali pod normalno vrednostjo (Ht med 0,2 in 0,7) z odzivom pri Ht 0,45, pade pri mnogih preiskovanih spojinah izven dovoljenih meja bioanalitične sprejemljivosti (16).

1.2.2 Stabilnost krvi pred obogatenjem in njena stabilnost na papirčkih

Trenutna izkušnja glede shranjevanja DBS na papirčkih skozi daljše časovno obdobje po vzorčenju (6 mesecev ali več), je še vedno relativno omejena. Ob upoštevanju že vidnih vplivov shranjevanja kapljic v nadzorovanih okoliščinah, moramo biti previdni in potrebujemo več podatkov o vplivih po daljšem skladiščenju, vključno z možnim učinkom temperature in vlage. To je še posebej pomembno pri izvajanju dolgotrajnejših kliničnih studij (faza III), kjer skladiščenje presega 6 mesecev. Prav tako je smiselno omeniti, da lahko staranje povzroči učinke, ki se med seboj prekrivajo. Pri dolgoročnih poskusih stabilnosti lahko pride do razpada ZU, spremembe deleža ekstrakcije zaradi dolgotrajnejšega skladiščenja filter papirčkov s posušenimi krvnimi madeži ali kombinacija obojega (16).

EVA KOKOT - Diplomska naloga

Strokovnjaki so pretehtali možnosti podaljševanja stabilnosti in prišli do sledečih idej. Stabilnost bi lahko podaljšali s prilagajanjem temperature med shranjevanjem, s konstantnim vzdrževanjem suhosti vzorcev ter z izboljšavo papirčkov (3).

a) PRILAGAJANJE TEMPERATURE

Z zniževanjem temperature shranjevanja z 22°C na 0°C kar 10-krat upočasnimo hitrost reakcij prve faze (oksidacija, redukcija in hidroliza) s čimer stabiliziramo ZU in podaljšamo stabilnost.

b) VZDRŽEVANJE SUHOSTI VZORCEV

Pri encimskih kakor tudi hidroliznih reakcijah igra voda vodilno vlogo. S sušenjem vzorcev DBS, z rednim menjavanjem sušilnih sredstev ali uporabo vakuma med skladiščenjem zmanjšamo delež vode ter tako vplivamo na povečano stabilnost.

c) IZBOLJŠAVA PAPIRČKOV

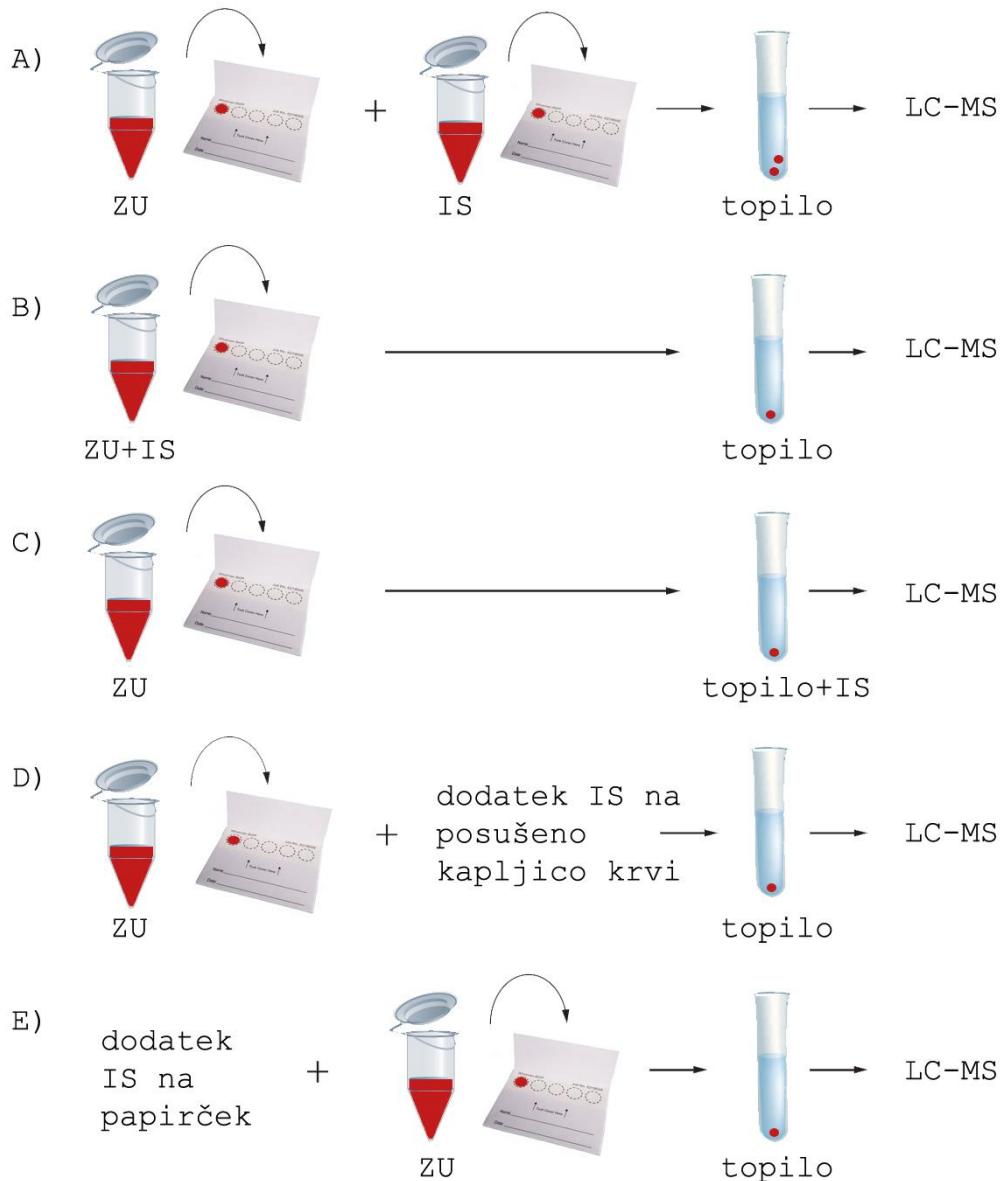
Kemično obdelani papirčki za posušene krvne madeže ob stiku z raztopino razkrojijo celice, denaturirajo proteine, preprečijo rast bakterij in drugih mikroorganizmov ter tako pripomorejo do povečane stabilizacije nestabilnih analitov. Učinek stabilnosti je odvisen od uporabljene zdravilne učinkovine (3).

1.2.3 Dodatek internega standarda (IS) vzorcem

Z ugotovitvami dobre klinične prakse dodamo IS istočasno z ekstrakcijskim topilom (slika 1, metoda C). Pri tem sicer ne zajamemo vseh želenih funkcij IS. Z uporabo drugih tehnik dodatka IS, so znanstveniki poizkušali rešiti ta problem, vendar se je izkazalo, da imajo vse preizkušene tehnike analitične in postopkovne prednosti in slabosti (16).

Preizkusili so 5 različnih metod, ki so jih poimenovali s črkami od A do E (slika 1). Pri metodi A so pripravili dvojne krvne madeže, pri čemer so eni imeli dodatek ZU ter drugi dodatek IS. Prednost metode je identičen postopek ekstrakcije IS in preiskovanega analita ter možnost predpriprave krvnih madežev z IS v bioanalitičnih laboratorijih s strani usposobljenega osebja. Zaradi zamudnosti metode pri pripravi dvojnih krvnih madežev in nezadovoljivih rezultatov je metoda neprimerna za rutinsko uporabo. V primeru metode B so obogateni krvi (t.j. kri, ki ji je dodana ZU) dodali IS. Metoda se je izkazala kot najnatančnejša a je ob enem tudi nepraktična, saj je ključnega pomena natančno pipetiranje IS v obogateno kri na samem mestu vzorčenja s strani neusposobljenega osebja. Metodi D in E se med seboj razlikujeta le v časovnem sosledju. Pri metodi D sprva na papirček kanemo obogateno kri, počakamo da se posuši ter nato na isto mesto še IS. Pri metodi E pa je postopek ravno obrnjen, tako da prvo na papirček kanemo IS, počakamo da se posuši ter na

isto mesto kasneje kanemo še obogateno kri. Pri metodi D so opazili težavo s homogenostjo porazdeljevanja IS na posušenem krvnem madežu. Pri metodi E težav s homogenostjo niso imeli, pričakovali pa so tudi manjšo variabilnost, ki pa ni bila dovolj majhna da bi podala zadovoljive rezultate (20). Slikovni prikaz različnih tehnik dodatka IS je ponazorjen v sliki 1.



Slika 1: Prikaz različnih tehnik dodatka IS (20)

1.2.4 Postopek redčenja vzorca

Pri tekočih in DBS vzorcih uporabljamo ista načela redčenja. Med samo validacijo metode je potrebno dokumentirati tudi validacijo redčenja. Zaradi posebnih omejitev tehnike, DBS vzorca ni mogoče enostavno redčiti, kot je to v primeru tekočih vzorcev. Ena možnost je, da

EVA KOKOT - Diplomska naloga

vzorec redčimo po izvedeni ekstrakciji iz posušenih krvnih madežev z ekstraktom slepega DBS vzorca. Alternativo omenjenega postopka redčenja s slepim ekstraktom DBS, ki je lahko draga ali nepraktična in zahteva veliko slepih DBS vzorcev, je mogoče ovrednotiti in jo nato potrditi. Pri čemer je potrebno razumeti, da je pri uporabi alternativnih pristopov, potrebno upoštevati tudi potencialni učinek na druge validacijske parametre (npr. stabilnost ekstrakcije vzorca, vpliv matrice in selektivnost), ki jih je potrebno validirati v okviru testiranja redčenja (17).

1.2.5 Homogenost vzorca DBS

Na homogenost vzorca DBS vpliva veliko dejavnikov, pri čemer so najpomembnejši stabilnost, vrsta papirčka na katerega kanemo vzorec ter delež hematokrita. Slednja dva dejavnika imata tako velik vpliv na točnost in natančnost, da padejo vrednosti izven meja bioanalitične dopustnosti $\pm 15\%$. Težavo s homogenostjo kapljice lahko rešimo tako, da za analizo uporabimo celotno kapljico in ne le njen delček (16).

1.3 PRIPRAVA VZORCEV DBS

Osebi odvzamemo kapljico periferne krvi iz pete ali prstne blazinice. Dobra klinična praksa priporoča zavrnjenje prve kapljice zaradi možne kontaminacije vzorca z intersticijsko tekočino. Naslednjo kapljico pa previdno nanesemo na označeno mesto na papirčku. Pri tem se izogibamo mesta dotika, kamor nanesemo kapljico krvi vse do časa ko se kapljica popolnoma ne posuši. Papirček pustimo na zraku približno dve uri, do popolne suhosti kapljic. Nato ga shranimo v vrečko z nizko prepustnostjo plinov ter dodamo sušilno sredstvo, ki zagotavlja konstantne pogoje vlažnosti. Tako dobljene vzorce lahko testiramo takoj ali čez določeno časovno obdobje (3, 4, 21).

Za kvantitativno analizo vzorcev DBS potrebujemo mikrotitrsko ploščico ali epice različnih velikosti, kamor vstavimo natančno obrezan papirček s krvnim madežem ter ekstrakcijsko topilo. Ekstrakcijo izvedemo z dodatkom določene količine ekstrakcijskega topila (metanol, acetonitril ali zmes vode in organskega topila) in IS. Ekstrakcijsko topilo mora biti dovolj močno, da prekine vezavo analita in beljakovine na matrici ali papirčku. Z uporabo mešalnika ekstrahiramo analit ter za boljši izkoristek ekstrakcije uporabimo še ultrazvočno kadičko. Po centrifugiranju avtomatsko ali ročno prenesemo čim večji volumen ekstrakcijskega topila v epico ali mikrotitrsko ploščico. Tako dobljene raztopine lahko neposredno analiziramo s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) ali

MS analizatorja ali jih sprva posušimo in jih naknadno pred analizo raztopimo s primernim topilom (3).

1.3.1 POZITIVNE LASTNOSTI DBS VZORCEV

- Manjši volumen vzorcev,
- manjše število testnih živali za farmakokinetične študije,
- zmanjšani stroški transporta in shranjevanja vzorcev, saj se vzorci shranjujejo pri sobni temperaturi,
- enostaven odvzem krvi ter kapljanje na ustrezen papirček s strani pacienta samega ali njegovega skrbnika z namenom terapevtskega spremljanja zdravil (21),
- manj invazivno vzorčenje, saj je kapljica krvi odvzeta iz pete ali prstne blazinice,
- zmanjšana možnost okužb s HIV/AIDS in drugimi patogeni in
- uporabo ostalih bioloških vzorcev (matric) npr. plazme, slino, solzne tekočine, urina, sklepne tekočine in drugih (3).

1.3.2 NEGATIVNE LASTNOSTI DBS VZORCEV

- Možnost določanja le tistih učinkovin, ki so stabilne na zraku,
- potreben je zelo občutljiv sistem detekcije, saj so volumni krvi za določevanje zelo majhni (3),
- možna kontaminacija z intersticijsko tekočino ob odvzemu krvi in
- možna kontaminacija s hrano ali izločki v primeru vzorčenja živalskih vzorcev.
- Težava pri primerjavi rezultatov. V primeru, da vzorčno kapljico iz prstne blazinice ali pete prenesemo direktno na papirček, le-ta ne bo vsebovala antikoagulant, standardi za zagotavljanje kakovosti pa bodo vsebovali antikoagulant (21).

1.3.3 FARMAKOKINETIČNO STALIŠČE

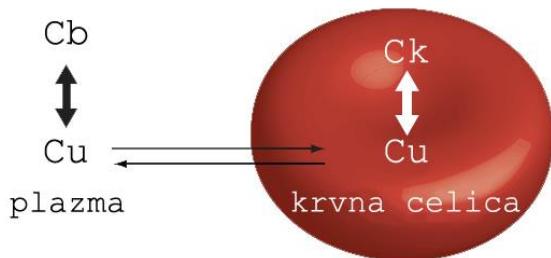
Kapljica krvi odvzeta s pete ali prstne blazinice je mešanica arterijske in venske krvi. Kadar mesto vboda predhodno potopimo v toplo vodo, s tem olajšamo krvni pretok, zaradi česar krvni vzorec bolj odraža lastnosti arterijske krvi. Mesto vboda je v primeru zbiranja kapilarne ali venske krvi različno, kar vpliva na koncentracijo zdravilne učinkovine, ki pa je vidna le kratek čas po aplikaciji.

Posušeni krvni madeži so praktično identični vzorcem polne krvi. Zato si v primeru ocene in interpretacije farmakokinetičnih (FK) parametrov zastavljam ista vprašanja. Celokupna koncentracija ZU, sestavljena iz vezane in proste oblike, je tako pri plazemskih kakor tudi

EVA KOKOT - Diplomska naloga

vzorcih DBS upoštevana kot nadomestek za prosto plazemsko koncentracijo ZU (Cu), ki je boljši pokazatelj FK in farmakodinamike (FD) v telesu. V določenih okoliščinah je merjenje ZU v krvi primernejše od plazme, vendar je po drugi strani delo z njo težje. Izkazalo se je tudi, da je rutinsko merjenje Cu težko izvedljivo. Zaradi zgoraj naštetih pomanjkljivosti je bila plazma do nedavnega osnovni biološki vzorec (matrica) pri razvoju zdravil.

Pojavlja se ključno vprašanje katera matrica je primernejša, polna kri (posušeni krvni madež) ali plazma? Kakšni ukrepi so potrebni, za ustrezne popravke? Če želimo dobiti odgovore na zastavljeni vprašanji moramo sprva razumeti korelacijo med Cu in celokupno koncentracijo ZU v plazmi in krvi kot je prikazano na sliki 2.



Slika 2: Prehajanje zdravilne učinkovine (21)

Obseg in kinetika porazdeljevanja v celice je odvisna od prepustnosti celične membrane ter afinitete spojine do sestavin v plazmi in v krvni celici.

Cb: plazemska koncentracija vezane oblike ZU

Cu: koncentracija proste oblike ZU

Ck: koncentracija vezane oblike ZU v krvni celici

Enačba 1 predstavlja razmerje za plazemske vzorce, *enačba 2* za DBS vzorce (21).

$$C = \frac{Cu}{fu} \quad \text{enačba 1}$$

$$Ck = \left(\frac{1-Ht}{fu} + Ht \cdot \rho \right) Cu \quad \text{enačba 2}$$

C (celokupna) plazemska koncentracija ZU

Cu plazemska koncentracija proste ZU

fu delež proste oblike v plazmi

Ck (celokupna) koncentracija ZU v krvi

Ht hematokrit

ρ porazdelitev ZU v krvne celice

EVA KOKOT - Diplomska naloga

Iz *enačbe 1* je razvidno premo sorazmerje med celokupno plazemsko koncentracijo (C) in plazemsko koncentracijo proste ZU (Cu), v primeru konstantne vrednosti nevezanega deleža v plazmi (ρ). Prav tako imamo pri *enačbi 2* premo sorazmerje med celokupno koncentracijo v krvi (C_k) in Cu v primeru konstantnih vrednosti ρ , hematokrita (Ht) in porazdelitve ZU v krvne celice (ρ). V mnogih primerih so ti pogoji dosti dobro izpoljeni, vendar ne vedno. Bodisi ZU v plazmi ali v krvi lahko odraža koncentracijo proste oblike ZU.

Za ugotavljanje primerne tehnike in matrice so pomembni številni parametri med katere spadajo ρ , fu, Ht in koncentracijsko razmerje ZU v krvi in plazmi (R). Slednji je podan kot razmerje med enačbama 2 in 1.

a) $0,55 \leq R \leq 0,6$:

Za terapevtske proteine, hidrofilne ZU in kisle ZU z visoko afiniteto do plazemskih proteinov velja, da ne prehajajo oziroma minimalno prehajajo v eritrocite, zato le-ti delujejo kot topilo. V zgoraj opisanem primeru lahko kot matrico uporabimo tako plazmo kot tudi DBS. V primeru uporabe DBS je potrebno posebno pozornost nameniti vrednosti hematokrita.

Normalna vrednost Ht znaša pri moških 0,45, pri ženskih je vrednost malce nižja, pri novorojenčkih pa malce višja. Težava nastopi z ekstrapolacijo FK z zdravih posameznikov na bolnike z različnimi vrstami in stopnjami anemije ter v primeru ko sama ZU vpliva na delež hematokrita (21).

b) $R = 1$:

Določene ZU, kamor spadajo kofein, glikozidni antibiotiki in alkohol, vstopajo v eritrocite vendar se na proteine v eritrocitih in plazmi ne vežejo (21, 22). V takem primeru je celokupna koncentracija krvi (C_k) skoraj identična Cu, zaradi česar uporaba DBS ni vprašljiva.

V primeru, da ZU prehaja v eritrocite in se veže na proteine v eritrocitih kakor tudi v plazmi, je uporabno vedeti kateri parameter fu ali ρ bolj signifikantno vpliva na razmerje proste koncentracije (Cu) in celokupne koncentracije (C) (21).

c) $R > 1,5$:

V primeru da je ρ večji od recipročne vrednosti fu, lahko *enačbo 2* preoblikujemo v obliko $C_k = Ht \cdot \rho \cdot Cu$. Iz preoblikovane *enačbe 2* je razvidno da je koncentracija krvi relativno neobčutljiva na spremembe v vezavi na plazemske proteine zaradi česar postane ρ najpomembnejši parameter med celokupno koncentracijo v krvi in prosto obliko v plazmi

EVA KOKOT - Diplomska naloga

(21, 22). Prav zaradi tega je v primeru uporabe DBS pomembno razumevanje obsega in vzroka variabilnosti ρ . V primeru minimalne variabilnosti ρ ima DBS nedvomno prednost pred plazmo. V primeru, kjer je vrednost R zaradi visoke afinitete do znotrajceličnih vezavnih mest v eritrocitih višja od 2, je vrednost ρ spremenljiva. ρ se v primeru ciklosporina spremeni zaradi saturacije eritrocitov v območju terapevtskih koncentracij. V opisanem primeru je potrebna previdnost pri interpretaciji FK, pri čemer še vedno obstaja razlog za uporabo DBS in ne plazme.

Eden od razlogov je hemoliza, ki lahko nastane med samo pripravo plazemskih vzorcev. Leta je odgovorna za signifikantno napako pri merjenju plazemske koncentracije. Drugi razlog, ki daje prednost DBS tehniki pred plazemsko, je temperaturna in časovna odvisnost vezave na eritrocite (21).

Tudi porazdeljevanje ZU v eritrocitih je časovno odvisno. Po navadi je ta proces izjemno hiter zaradi česar nima praktičnega pomena, občasno pa je relativno počasen, zaradi česar lahko vpliva na interpretacijo rezultatov dobljenih z DBS ali plazmo (21). Na čas vzpostavitve ravnotežja vpliva afiniteta vezave ZU na krvne celice in plazemske proteine ter permeabilnost celične membrane (22). Pri ciklosporinu in podobnih substancah je za dosego ravnotežja porazdeljevanja potrebnih nekaj minut, pri klortalidonu pa kar nekaj ur. V takšnih ekstremnih primerih, ko je odziv pred dosegom ravnotežja porazdeljevanja med plazmo in krvnimi celicami v boljši povezavi s prosto ZU v plazmi, je plazma primernejša matrica. V primeru, da razmišljamo o uporabi DBS in nimamo konstantne vrednosti ρ moramo preučiti in po potrebi oceniti vsakega od dejavnikov, ki lahko privedejo do spremembe ρ . Ti dejavniki so čas, temperatura in koncentracija ZU v kombinaciji z možnimi demografskimi spremenljivkami kot so bolezen, dednost, spol, sočasno jemanje zdravil itd.

Ocenjevanje bioekivalentnosti je ključnega pomena mnogih študij povezanih s farmakokinetiko. Na dobljen rezultat vpliva izbira plazme ali DBS. Osnova bioekivalentnih študij je razmerje površin pod krivuljo (AUC) med ekstravaskularnim in intravenskim odmerkom ali dvema ekstravaskularnima odmerkoma, s ključno predpostavko, da je očistek med periodami konstanten. V primeru, da se zaradi porazdeljevanja ZU v krvne celice očistek spremeni, AUC-ji dobljeni z DBS ne zagotavljajo več natančne ocene bioekivalentnosti. ρ kaže koncentracijsko odvisnost na primeru ciklosporina, pri čemer je plazma boljša izbira matrice za določanje bioekvalence, saj je plazemski očistek konstanten, krvni pa ne. V primeru bioekvalence, kjer se primerjata profila koncentracija-čas dveh podobnih formulacij je uporaba obeh matric enako sprejemljiva.

V preglednici I je podan strnjen pogled na izbiro ustrezne matrice (21).

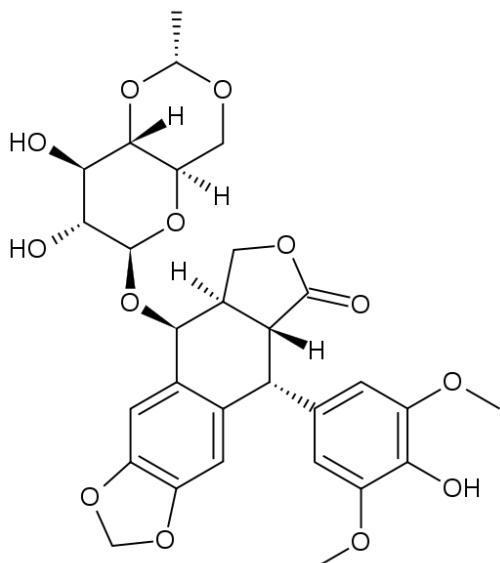
Preglednica I: Odločitvena tabela izbora matrice (21)

Koncentracijsko razmetitev ZU v krvi in plazmi (R)	Konstantna vrednost hematokrita (Ht)*	Konstantna vrednost prostega deleža v plazmi (fu)	Konstantna porazdelitev ZU v krvne celice (ρ)	DBS in/ali plazma
0,55 < 2,0	DA	DA	DA	Možna uporaba tako DBS kakor plazme.
0,55 < 2,0	DA	NE	DA	Lahko uporabimo plazmo ali DBS, pri čemer moramo razumeti razloge za variabilno vezavo na plazemske proteine.
$\geq 2,0$	DA	DA	DA	Zaradi vpliva hemolize je primernejša matrica DBS.
$\geq 2,0$	DA	NE	DA	Zaradi vpliva hemolize je primernejša matrica DBS.
$\geq 2,0$	DA	DA	NE	Možna je uporaba tako DBS kakor tudi plazme. V primeru uporabe DBS je potrebno razumeti razloge za variabilnost porazdelitve ZU v krvne celice (ρ).
0,55-2,0	NE	DA/NE	DA/NE	Na odločitev izbora matrice vpliva vrednost R ter korekcija hematokrita pri DBS kadar se slednja vrednost približa 0,55 oziroma je večja ali enaka 2,0.

*Konstantna vrednost parametra pomeni, da vrednost parametra variira v majhnem obsegu, ki bistveno ne vpliva na odnos med koncentracijo proste ZU v plazmi in celokupno koncentracijo.

1.4 ETOPOZID

Etopozid je polsintezi derivat podofilotoksina iz skupine rastlinskih alkaloidov. Je eden najaktivnejših protitumorskih zdravil uporabljenih v klinični praksi ter pomemben sestavni del kemoterapije za zdravljenje rakovih obolenj pri otrocih in odraslih. Etopozid lahko uporabljamo samostojno ali v kombinaciji z dodatno protitumororno učinkovino za zdravljenje ali paliativno zdravljenje različnih neoplazem, zarodnih tumorjev, Kaposijevega sarkoma in kot del preparativnega procesa presaditve kostnega mozga. Je tudi prva izbira zdravila za zdravljenje drobnoceličnega pljučnega raka (SCLC). Kljub njegovi dolgotrajni uporabi, optimizacija režima odmerjanja in način aplikacije nista povsem določena (23).



Slika 3: Struktura etopozida (4'-dimetil-epipodofilotoksin 9-[4,6-O-(R)-etiliden-beta-D-glukopiranozid], 4' -(dihidrogenfosfat)) (24)

1.4.1 ABSORPCIJA

Zgodnje študije so pokazale nepopolno in izredno nenapovedljivo absorpcijo etopozida, ki sta v povezavi s slabo topnostjo hidrofobnih kapsul, uporabljenih v prvih kliničnih študijah. Za izboljšanje biološke uporabnosti (BU) so uporabili peroralne raztopine za injiciranje ter nove hidrofilne želatinaste kapsule, ki so vsebovale raztopino etopozida z boljšimi absorpcijskimi karakterističnimi značilnostmi. Razpolovni čas ($t_{1/2}$) absorpcije etopozida znaša 0,2 - 0,4 ure ter čas potreben za doseg maksimalne koncentracije etopozida v plazmi (c_{max}) 0,5 - 4 ure. Farmakokinetične študije so pokazale povprečno biološko razpoložljivost med 40 in 90 %, z visoko inter- in intra-populacijsko variabilnostjo. Razlika pri izpostavljenosti etopozidu pri nizkih (25 - 200 mg/dan) in visokih odmerkah (300 - 600 mg/dan) nakazuje na to, da je absorpcija etopozida nasitljiva.

EVA KOKOT - Diplomska naloga

Razlog velike variabilnosti absorpcije etopozida do danes še ni popolnoma razjasnjen, saj lahko nanj vplivajo številni dejavniki. Glavna vzroka variabilnosti sta zmanjšana kemična stabilnost etopozida v črevesnih in želodčnih tekočinah ter spremenljiva permeabilnost črevesne sluznice (23). Pomemben vzrok variabilnosti pri rakavih bolnikih je tudi lastnost rakavih celic, pri kateri se število transporterjev za črpanje ZU iz celice ali aktivnost prenašalcev še poveča s čimer postanejo celice odporne na večje število citostatičnih učinkovin. Tej sposobnosti rakavih celic pravimo tudi multi drug resistance ali MDR (25, 26, 27). Največja skupina MDR prenašalcev so ABC proteini, kamor spada tudi P-glikoprotein (23, 27).

Vrsta znanstvenikov z Fujiwara-o na čelu so predlagali, da je variabilnost BU pri nizkih odmerkih etopozida najverjetneje posledica velike variabilnosti metabolizma učinkovine med pacienti. Poleg dednih razlik v aktivnosti citokromov (CYP), ki je ena najbolj znanih farmakogenetskih variabilnosti, najverjetneje na BU etopozida vplivajo tudi rasne razlike (23).

1.4.2 PORAZDELITEV

Volumen porazdelitve etopozida v stanju dinamičnega ravnovesja znaša med 3 in 21 l/m² tako za intravensko kot peroralno aplikacijo. Opazovane vrednosti so malce nižje v primeru otrok. Predklinične preiskave na miših so pokazale visoko porazdeljevanje v črevesje, jetra in ledvica v primerjavi z ostalimi tkivi (23).

Pomembna spremenljivka pri FK in FD etopozida je delež vezave na proteine. Etopozid se v plazmi močno veže na albumine ter v manjšem obsegu tudi na α 1-kisle glikoproteine. Povprečna vezava etopozida je predvsem odvisna od plazemskih koncentracij bilirubina in albumina ter znaša med 93 in 98 %. Kaže, da obstaja obratno sorazmerje med koncentracijo prostega (nevezanega) etopozida in koncentracijo serumskih albuminov ter premosorazmerje med prostim etopozidom in koncentracijo bilirubina pri rakavih bolnikih. *In vitro* študije so pokazale, da je potrebna visoka koncentracija bilirubina (15 - 30 mg/ml) za izpodrivanje etopozida z albumina, kar kaže na tekmovanje za vezavna mesta na albuminu (23). Serumski albumin in celokupna koncentracija bilirubina sta najpomembnejši spremenljivki, ki opisujeta vezavo etopozida na proteine pri rakavih bolnikih. Razvili so model za napovedovanje vezave etopozida na proteine, ki temelji na celokupni koncentraciji bilirubina (C_{BIL-tot}) in serumski koncentraciji albumina (C_{ALB-ser}). Povezava je pokazana z *enačbo 3.*

$$delež\ proste\ ZU(\%) = 1,4 \cdot C_{BIL-tot} \left(\frac{mg}{dl} \right) - 6,8 \cdot C_{ALB-ser} \left(\frac{g}{dl} \right) + 34,4 \quad enačba\ 3$$

Ugotovili so, da je model za napovedovanje vezave etopozida na proteine pri rakavih bolnikih s hiperbilirubinemijo ($C_{BIL-tot} > 1,5\text{mg/dl}$) in hipoalbuminemijo ($C_{ALB-ser} < 3,3\text{g/dl}$) dovolj točen in natančen (28).

Kot je že splošno znano prosta oblika ZU predstavlja aktivno obliko ZU in je odgovorna za farmakološke učinke. Spremenljiva vezava etopozida na proteine lahko doprinese do velikih sprememb sistemskih izpostavljenosti proste ZU in povečane farmakološke učinke ali celo toksične učinke standardnih odmerkov etopozida. Ugotovili so, da ima plazemska koncentracija proste oblike etopozida boljšo napovedljivo vrednost za optimizacijo odmerjanja od celokupne plazemske koncentracije, predvsem pri bolnikih z variabilno vezavo etopozida na proteine (23).

1.4.3 METABOLIZEM IN IZLOČANJE

Za etopozid velja linearna farmakokinetika pri intravenskih odmerkih med 100 in 600 mg/m² in peroralnih odmerkih med 200 in 300 mg/m². Zmanjšan interval linearnosti v primeru peroralne aplikacije je posledica nasiljive absorpcije. Večkratne intravenske in peroralne aplikacije ZU ne privedejo do akumulacije. Po intravenski aplikaciji 100 - 124 mg/m² etopozida, se približno 50 % odmerka v času 24 ur izloči z urinom v obliki etopozida ali v obliki etopozid glukuronida, ki predstavlja glavni presnovek urinarnega in biliarnega trakta pri odraslih in otrocih.

Ena od presnovnih poti etopozida je reakcija pri kateri CYP3A4 katalizira 3-O-demetiliranje dimetoksifenoelnega dela etopozida, pri čemer nastane ustrezni katehol. Znanstveniki so odkrili pomembno FK povezavo med inhibicijo CYP3A4 in porastom AUC etopozida. Zaradi tega spoznanja so v kliničnih študijah z etopozidom kot MDR modulatorja uporabili inhibitorja CYP3A4, verapamil ali ciklosporin. V nasprotnem primeru ob sočasnem jemanju etopozida in učinkovine (fenitoin, fenobarbital), ki inducira metabolične encime, se sistemski očistek etopozida poveča, kar privede do zmanjšane sistemskih izpostavljenosti (23).

1.4.3.1 Prilagajanje odmerka

Jetrni metabolizem etopozida ni pomemben le s strani sistemskega izločanja ZU, temveč tudi biološke uporabnosti oralno aplicirane ZU. V zgodnjih kliničnih študijah so prilagajali odmerek etopozida jetrni funkciji bolnika, nato pa so prišli do ugotovitev, da okvarjena jetrna funkcija ne vpliva na očistek etopozida. Odmerek je potrebno prilagoditi kadar ima

EVA KOKOT - Diplomska naloga

pacient okvaro jeter in zaznano hipoalbuminemijo, hiperbilirubinemijo ali hipoalbuminemijo s hiperbilirubinemijo (23).

Pri bolnikih z ledvično okvaro je potrebno prilagoditi odmerek etopozida, saj ledvice močno vplivajo na očistek. Zgodnje študije poročajo o korelaciji med celokupnim očistkom etopozida in serumsko koncentracijo kreatinina (23). Bolniki s povišano vrednostjo kreatinina imajo znižano vrednost očistka etopozida, podaljšan terminalen razpolovni čas izločanja, povečan AUC in zmanjšan volumen porazdelitve v stanju ravnotežja (23, 29).

Posebno pozornost je potrebno nameniti pri dajanju etopozida starejšim bolnikom. Kljub nespremenjeni absorpciji in BU pri starostnikih, je potrebno vzeti v obzir ostale farmakokinetične parametre. Eden takih je očistek, ki je lahko pri starostnikih močno spremenjen. Delovanje ledvic je pri starostnikih po navadi zmanjšano, kar lahko privede do povečane izpostavljenosti ZU. Za prilagajanje odmerka etopozida se namesto plazemske koncentracije kreatinina uporablja očistek kreatinina. Pri bolnikih z oslabljeno ledvično funkcijo je potrebno zmanjšati odmerek glede na zmanjšanje očistka kreatinina. Pri starejših pacientih prilagoditev odmerka ne temeljiti le na FK, temveč je potrebno pri optimizaciji odmerka upoštevati tudi spremenjeno FD (23).

2 NAČRT ZA DELO ALI DELOVNA HIPOTEZA

Za etopozid je značilna visoka inter- in intra-populacijska variabilnost biološke uporabnosti, razlogi tega še do danes niso popolnoma razjasnjeni. S populacijskimi farmakokinetičnimi raziskavami želimo ugotoviti vzroke variabilnosti farmakokinetičnih parametrov. Osnovno orodje za proučevanje farmakokinetike učinkovin so ustrezne bioanalizne metode s katerimi določamo koncentracije učinkovin ali metabolitov v bioloških vzorcih. Pri shranjevanju bioloških vzorcev se vse pogosteje poslužujemo metode posušenih krvnih madežev, ki predstavlja alternativo pred krvno plazmo.

Pri izvajanju diplomske naloge se bomo poslužili metode posušenega krvnega madeža, ki je bila razvita v 60. letih prejšnjega stoletja. Glavne prednosti tega načina vzorčenja so manjši volumen vzorcev, zmanjšani stroški transporta in shranjevanja vzorcev, enostavno in manj invazivno vzorčenje ter možnost uporabe različnih bioloških matric. Namen diplomske naloge je razvoj in validacija analizne metode za vrednotenje koncentracije etopozida v posušenih krvnih madežih. Pri razvoju se bomo deloma oprli na že razvito metodo določanja etopozida v plazemskih vzorcih. Optimalno ločitev analita bomo dosegli s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z uporabo fluorescenčnega detektorja. Skozi raziskovalno delo bomo metodo tudi optimizirali. Pri tem bomo posebno pozornost namenili izboru papirčka za nanos obogatenih krvnih vzorcev, izboru najprimernejšega internega standarda, ekstrakcijskega topila, rekonstitucijskega topila, optimizaciji sestave mobilne faze in fluorescenčnega detektorja. Optimalno metodo bomo validirali po smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila. V okviru validacije bomo preverili točnost, ponovljivost, območje linearnosti, mejo kvantifikacije, selektivnost, delež ekstrakcije etopozida iz papirčka ter stabilnost metode. Metodo bomo na koncu uporabili za določanje etopozida v posušenih krvnih madežih bolnikov s pljučnim rakom. S pomočjo Bland-Altman-ovega grafa bomo razvito metodo primerjali z že razvito metodo določevanja plazemskih koncentracij etopozida pri bolnikih s pljučnim rakom.

3 MATERIALI IN OPREMA

3.1 BIOLOŠKI MATERIAL

Pri razvoju metode smo večinoma uporabili le enkrat zmrznjeno polno kri (antikoagulant EDTA), za izvajanje validacije pa svežo kri. V primeru uporabe zmrznjene krvi, ki smo jo shranjevali v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C, smo pred pipetiranjem počakali, da se je kri segrela na sobno temperaturo in jo nato dobro premešali.

Vzorce posušenih krvnih madežev bolnikov, ki se zdravijo z etopozidom smo dobili iz Univerzitetne Klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik, iz klinične raziskave, ki je potekala 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 preglednici II je na primeru razložen način označevanja realnih vzorcev bolnikov.

Preglednica II: Način označevanja realnih vzorcev bolnikov s pljučnim rakom

bolnik 20	krog KT	dan KT	čas odvzemov krvi	oznaka vzorca
P20	6	1	3 ure po aplikaciji	P20 6/1/1
			6 ur po aplikaciji	P20 6/1/2
			24 ur po aplikaciji, a pred naslednjim odmerkom	P20 6/1/3
	2	2	3 ure po aplikaciji	P20 6/2/1
			6 ur po aplikaciji	P20 6/2/2
		3	24 ur po aplikaciji, a pred naslednjim odmerkom	P20 6/2/3
		3	3 ure po aplikaciji	P20 6/3/1

3.2 STANDARDI

- ETOPOZID; C₂₉H₃₂O₁₃, M = 588,6 g/mol, (Sequoia Research Products, Pangbourne, Združeno kraljestvo Velika Britanija);
4'-Demethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-O-Ethylidene-β-D Glucopyranoside)
- N-DANZIL-L-TREONIN cikloheksilamonijeva sol; C₁₆H₂₀N₂O₅S·C₆H₁₃N, M = 451,6 g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija);
1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl-L-threonine

- TENIPOZID; C₃₂H₃₂O₁₃S, M = 656,655 g/mol, (Sequoia Research Products, (Pangbourne, Združeno kraljestvo Velika Britanija);
4'-Demethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-O-[(R)-2-thienylmethylene]- β-D-glucopyranoside)

3.3 REAGENTI IN TOPILA

- Metanol CH₃OH CHROMASOLV®, for HPLC, ≥ 99,9 %; M = 32,04 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Acetonitril C₂H₃N Chromasol V® gradient grade, for HPLC, ≥ 99,9 %; M = 41,05 g/mol, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 85 % ortofosforna kislina for analysis H₃PO₄; M = 98,00 g/mol, (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- 1 M raztopina natrijevega hidroksida NaOH
- Standardne pufrske raztopine pH = 2,00 do 9,00; (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija) in (Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija)
- Bidestilirana voda – milli-Q voda, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), specifična upornost > 18,2 mΩcm, celokupni organski ogljik (TOC) < 6 ppb (pri T = 25 °C), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana
- Kalijev dihidrogen fosfat for analysis KH₂PO₄; M = 136,08 g/mol, (Merck, Darmstadt, Nemčija)

3.4 NAPRAVE IN PRIBOR

- Hladilnik 3 °C z zamrzovalnikom -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Zamrzovalnik SANYO (T = -80 °C) (SANYO electric Co., Ltd., Osaka, Japonska)
- Zamrzovalnik Gorenje (T = -20 °C) (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Termostat kolone Varian Pro star 510 (VARIAN medical systems, Palo Alto, Kalifornija Združene države Amerike)
- Mikrotitrski čitalec Safire 2 (Tecan, Männedorf, Švica)
- 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)

EVA KOKOT - Diplomska naloga

- Centrifuga Centric 322A (Tehnica®, Železniki, Slovenija)
- Stresalnik VORTEMP 56EVC (Tehnica®, Železniki, Slovenija)
- Turbovap®LV (Caliper, Hopkinton-MA, ZDA)
- Magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Koper, Slovenija)
- Mešalnik Vibromix 10 (Tehnica®, Železniki, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička BANDELIN SONOREX (Bandelin electronic, Berlin, Nemčija)
- Polavtomatske pipete 2 - 20 µl, 20 - 200 µl, 200 - 1000 µl, 500 - 5000 µl in 1 - 10 ml (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija)
- Polavtomatska pipeta 2 - 20 µl (Sartorius Biohit Liquid Handling Oy, Helsinki, Finska)
- Plastične epruvete 1,5 in 2 ml (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija) in 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija)
- Celulozno acetatni filter 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Nemčija)
- Program za izračunavanje logaritmov porazdelitvenega koeficiente <http://www.chemicalize.org>
- Programska oprema MassHunter (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- HPLC kolona; Phenomedex Luna C18 (2) 100A 150 x 4,6 mm 3 µm, (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- Predkolona za HPLC; Phenomenex 4 x 3 mm C18 (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, Združene države Amerike)
- HPLC sistem Agilent 1100 series z UV in FLD detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA)
- Stekleni inventar: merilne bučke, čaše, tehtiči, viale, inserti za vijale, presesalna buča in lij za presesalno bučo.
- Ostali inventar: spatule, nastavki za pipete, magneti, magnetna palica za odstranjevanje magnetov, pokrovčki za viale, plastične kapalke, epruvete namenjene za vakuumski odvzem venske krvi (EDTA), lateks rokavice in Parafilm®M.

4 METODE

Tekom razvoja smo zaradi spremembe matrice, ki ima svoje značilnosti, optimirali osnovno metodo. Pri razvoju metode smo posebno pozornost namenili izboru papirčka na katerega nanesemo obogateno kri, ekstrakcijskem topilu, internemu standardu (IS), rekonstitucijskem topilu, optimizaciji sestave mobilne faze in fluorescenčnega detektorja (FLD).

4.1 PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN IN MOBILNE FAZE

4.1.1 Priprava raztopin etopozida

V preglednici III je prikazan postopek priprave osnovnih raztopin etopozida, katere smo uporabili za dodajanje polni krvi pri pripravi obogatenih krvnih vzorcev.

Preglednica III: Priprava osnovnih raztopin etopozida

Osnovna raztopina etopozida: OS	Redčitev osnovne raztopine Eto: R1_Eto	Redčitev osnovne raztopine Eto: R2_Eto	
m (mg)	1,43	V R1_Et (ml)	0,03
V MeOH (ml)	1	V MeOH (ml)	0,27
c (mg/ml)	1,43	c (mg/ml)	0,02002

- ***Osnovna raztopina etopozida s koncentracijo 1,43 mg/ml***

Za pripravo osnovne raztopine etopozida smo v 2 ml epico zatehtali približno 1,5 mg etopozida, ter dodali ustrezno količino metanola. Dobljeno raztopino smo dobro zmešali s pomočjo mešalnika.

- ***Redčitev osnovne raztopina etopozida***

Iz osnovne raztopine etopozida smo pripravili metanolne delovne standarde s koncentracijama 0,2002 mg/ml in 0,02002 mg/ml.

4.1.2 Priprava raztopin danzil-treonina

V preglednici IV je prikazan postopek priprave osnovnih raztopin danzil-treonina, katere smo uporabili za dodajanje posušenim krvnim madežem in ekstrakcijskem topilu, kot interni standard.

Preglednica IV: Priprava osnovnih raztopin danzil-treonina**Osnovna raztopina
danzil-treonina: OS**

m (mg)	1,5
V topila (ml)	1,5
c (mg/ml)	1

**Redčitev osnovne razt.
danzil-treonina: R1_Tre0**

V OS (ml)	0,06
V topila (ml)	0,94
c (mg/ml)	0,06

**Redčitev osnoven razt.
danzil-treonina: Treo_X**

V OS (ml)	0,36
V topila (ml)	1,64
c (mg/ml)	0,18

- Osnovna raztopina danzil-treonina s koncentracijo 1 mg/ml

Za pripravo osnovne raztopine danzil-treonina smo v 2 ml epico zatehtali približno 1,5 mg danzil-treonina, ter dodali ustrezno količino topila sestavljenega iz MeOH/AcCN/H₂O = 25/25/50. Dobljeno raztopino smo približno 5 minut mešali s pomočjo mešalnika.

- Redčitev osnovne raztopine danzil-treonina

Z redčenjem osnovne raztopine danzil-treonina s topilom MeOH/AcCN/H₂O = 25/25/50 smo pripravili delovni raztopini s koncentracijama 0,06 mg/ml in 0,18 mg/ml.

4.1.3 Priprava delovnih raztopin in obogatenih krvnih vzorcev

Za pripravo metanolnih raztopin etopozida (Eto) smo v 1,5 ml epico zmešali predpisani volumen osnovne raztopine Eto z ustrezno koncentracijo in metanol (MeOH). Dobljene raztopine smo vorteksirali 20 sekund. V naslednjem koraku smo v 1,5 ml epice odmerili 240 µl polne krvi odvzete z antikoagulantom EDTA ter ji dodali 10 µl ustrezne metanolne raztopine Eto. Pri tem smo pred pipetiranjem v polno kri sprva nastavek za pipetiranje le omočili z metanolno raztopino Eto, da smo preprečili morebitno lepljenje Eto na plastične nastavke za pipete. Dobljeno obogateno kri smo nato vorteksirali 30 sekund, da smo zagotovili ustrezno porazdelitev etopozida po celotnem volumnu krvi. Na koncu smo s polavtomatsko pipeto 2 - 20 µl na papirček Whatman 903 nanesli 5 - 7 kapljic z volumnom 20 µl. Krvne kapljice smo 1 uro sušili na zraku. Papirčke s posušenimi krvnimi madeži smo spravili v vrečko z nizko prepustnostjo plinov ter dodali sušilno sredstvo.

Preglednica V: Priprava metanolnih raztopin etopozida in obogatenih krvnih vzorcev

		delovne raztopine					obogateni krvni vzorci		
UMERITVENA PREMICA	osnovna raztopina etopozida	c teoretična (µg/ml)	V osnovne (ml)	V MeOH (ml)	V celokupni (ml)	c izračunana (µg/ml) = METANOLNA RAZTOPINA ETOPOZIDA	V krvi (ml)	V metanolne rast. Eto (ml)	c izrač. Eto v kapljici krvi (µg/ml)
		0	0	0,1	0,1	0	0,24	0,01	0
	R2_ETO	0,5	0,0624	0,0376	0,1	12,5	0,24	0,01	0,500
	R1_ETO	1	0,026	0,174	0,2	26,0	0,24	0,01	1,04
		2	0,025	0,075	0,1	50,1	0,24	0,01	2,00
		3	0,038	0,062	0,1	76,1	0,24	0,01	3,04
		6	0,075	0,025	0,1	150	0,24	0,01	6,01
		9	0,032	0,168	0,2	229	0,24	0,01	9,15
	OS	12	0,042	0,158	0,2	300	0,24	0,01	12,0
		15	0,026	0,074	0,1	372	0,24	0,01	14,9
		20	0,035	0,065	0,1	501	0,24	0,01	20,0
		25	0,044	0,056	0,1	629	0,24	0,01	25,2
	OS	30	0,053	0,047	0,1	758	0,24	0,01	30,3

4.1.4 Priprava mobilne faze

Mobilna faza, ki smo jo dnevno pripravljali svežo, je sestavljena iz vodne (25 mM fosfatni pufer s pH 3,0) in organske (100 % acetonitril) komponente.

Priprava vodne komponente (25 mM fosfatni pufer s pH 3,0) mobilne faze

Za pripravo vodne komponente mobilne faze smo v tehtč zatehtali 3,402 KH₂PO₄, vsebino kvantitativno prenesli v 1000 ml bučo in jo do oznake dopolnili z vodo Milli-Q. Da smo dobili pufer s pH 3,0 smo sprva pH meter umerili s standardno pufersko raztopino s pH 3 ter nato raztopino KH₂PO₄ nakisali do željenega pH s pomočjo koncentrirane ortofosforne kisline. Dobljeno raztopino smo prefiltrirali preko celulozno acetatnega filtra z velikostjo por 0,45 µm. Prefiltrirano raztopino smo prelili v stekleno posodo ter jo 10 minut razplinjali na ultrazvočni kadički.

4.2 RAZVOJ EKSTRAKCIJSKE METODE

4.2.1 Izbor papirčka za nanos krvnih vzorcev

Sprva smo želeli primerjati odzive etopozida pri dveh različnih papirčkih, in sicer Whatman 903 in DMPK-C. Poizkus smo zastavili tako, da smo na omenjena papirčka nanesli razredčeno raztopino etopozida s koncentracijo $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ ter slepa vzorca. Pri slepih vzorcih smo na papirčka nanesli identični volumen topila, v našem primeru čistega metanola. Sledila je ekstrakcija, ki je zapisana pod točko 4.2.7.1.

4.2.2 Izbor topila za ekstrakcijo

V naslednjem koraku smo želeli izbrati najprimernejše ekstrakcijsko topilo. V prvem krogu smo preizkusili organski topili acetonitril (AcCN) in MeOH ter različne mešanice organskih topil in vode $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 1/1$, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 1/1$ in $\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 25/25/50$ kot je razvidno iz preglednice VI.

Preglednica VI: Izbor topila za ekstrakcijo

Ekstrakcijsko topilo	Rekonstitucijsko topilo
AcCN	AcCN
MeOH	MeOH
$\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 1/1 (\text{v/v})$	$\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 1/1 (\text{v/v})$
$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 1/1 (\text{v/v})$	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 1/1 (\text{v/v})$
$\text{AcCN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 25/25/50 (\text{v/v/v})$	$\text{AcCN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 25/25/50 (\text{v/v/v})$
$\text{AcCN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 25/25/50 (\text{v/v/v})$	MeOH

Ker se je za najustreznejše ekstrakcijsko topilo izkazala mešanica dveh organskih topil acetonitrila in metanola ter vode smo želeli poizkusiti ekstrakcijska topila z različnimi deleži posameznih komponent, in sicer $\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 25/25/50$, $\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 35/35/30$ in $\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 45/45/10$. Za primerjavo smo preizkus izvedli tudi z ekstrakcijskima topiloma $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 3/1$ in MeOH. Za izvajanje ekstrakcije smo se držali protokola pod točko 4.2.7.1, pri čemer smo spremenjali le ekstrakcijsko topilo.

4.2.3 Izbor IS

Sprva smo s programom dostopnim na internetni strani <http://www.chemicalize.org> izračunali logaritme porazdelitvenih koeficientov ($\log P$) na fakulteti dostopnim

EVA KOKOT - Diplomska naloga

aminokislinam, s pripetim danzilnim fragmentom. Nato smo njihove logP primerjali z logP etopozida in tenipozida izračunanimi z istim programom. Vrednosti so podane v preglednici VII.

Preglednica VII: Izračunane logaritemske vrednosti porazdelitvenih koeficientov danzil aminokislin, etopozida in tenipozida

	logP	IME SPOJINE
etopozid	1,16	
tenipozid	2,78	
alanin	0,49	Dansyl-L-alanine cyclohexylammonium salt
asparginska kislina	-0,3	Dansyl-L-aspartic acid bis(cyclohexylammonium) salt
izolevcin	1,97	Dansyl-L-isoleucine cyclohexylammonium salt
levcin	1,89	Dansyl-L-leucine cyclohexylammonium salt
lizin	-0,45	Nε-Dansyl-L-lysine in Didansyl-L-lysine
fenilalanin	2,28	Dansyl-L-phenylalanine
serin	-0,63	N-Dansyl-L-serine cyclohexylammonium salt
triptofan	2,45	No-Dansyl-L-trptophan cyclohexylammonium salt
glutaminska kislina	-0,25	Dansyl-L-glutamic acid bis(cyclohexylammonium) salt
treonin	-0,17	N-Dansyl-L-threonine cyclohexylammonium salt
valin	1,48	Dansyl-L-valin cyclohexylammonium salt
metionin	1,24	Dansyl-L-methionine
prolin	0,8	Dansyl-L-proline
hidroksiprolin	-0,4	N-dansyl-trans-4-hydroxy-L-proline
cisteinska kislina	-0,44	Dansyl-L-cysteic acid
cistein	0,41	N,N'-didansyl-L-cystine
norvalin	1,56	Dansyl-norvaline
glutamin	-0,65	Dansyl-L-glutamine
tirozin	3,72	N,O-didanosyl-L-tyrosine
	1,07	Dansyl-L-α-amino-butiric acid

- a) Za izvajanje eksperimentalnega dela smo se odločili za šest z danzil kloridom označenih aminokislin (alanin, lizin, fenilalanin, serin, triptofan in valin). Vzorce smo izbrali glede na njihove vrednosti logP. Pripravili smo raztopine s koncentracijo 50 µg/ml, kjer smo kot topilo za raztopljanje in redčenje uporabili MeOH/AcCN/H₂O = 25/25/50.
- b) V naslednjem koraku smo preverili vse aminokisline s pripetim danzilom z negativnimi vrednostmi logP. V tem primeru smo pripravili raztopine s koncentracijo 10 µg/ml ter posneli spektre pri dveh različnih emisijskih valovnih dolžinah (Em) in ekscitacijskih valovnih dolžinah (Ex). Spektre smo posneli pri pogojih detekcije, ki so se v diplomski nalogi Boštjana Podkrižnika izkazali kot najugodnejši za etopozid

(Ex 230 nm, Em 330 nm) ter pogojih detekcije značilnih za danzil-aminokisline (Ex 300 nm, Em 500 nm). Kot topilo za raztopljanje in redčenje smo uporabili MeOH/AcCN/H₂O = 25/25/50. Danzil sulfonamidi najmočneje fluorescirajo pri Ex 337 nm in Em 492 nm (30).

4.2.4 Izbor topila za rekonstitucijo suhega ostanka

Tekom optimizacije ekstrakcijske metode smo želeli poiskati tudi najprimernejše rekonstitucijsko topilo. Preverili smo organski topili AcCN in MeOH z različnimi deleži vodne faze. Sprva smo iz razredčene raztopine R1_Eto pripravili raztopino etopozida s koncentracijo 33,77 µg/ml, pri čemer smo kot topilo uporabili MeOH. Za pripravo vzorca smo uporabili raztopino Eto, vodo ter organski topili MeOH ali AcCN. Postopek priprave je podan v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Izbira primernega rekonstitucijskega topila

	V (c _{Eto} =33,77 µg/ml) µl	V MeOH µl	V AcCN µl	V H ₂ O µl
80 % MeOH	20	140	/	40
70 % MeOH	20	120	/	60
60 % MeOH	20	100	/	80
50 % MeOH	20	80	/	100
80 % AcCN	20	/	140	40
70 % AcCN	20	/	120	60
60 % AcCN	20	/	100	80
50 % AcCN	20	/	80	100

4.2.5 Vpliv zmrznjene in sveže krvi pri pripravi krvnih vzorcev

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali tako zmrznjeno kot tudi svežo polno kri. Zato nas je zanimalo ali so odzivi etopozida dobljeni z zmrznjeno krvjo primerljivi s tistimi iz sveže krvi.

4.2.6 Vpliv časa priprave obogatene krvi na odziv etopozida

Tokrat smo želeli preveriti ali čas priprave obogatenih krvnih vzorcev vpliva na odziv etopozida. Po protokolu zapisanem v točki 4.1.3 smo pripravili obogateno kri s koncentracijo 3 µg/ml in 6 µg/ml. Nato smo na papirček Whatman 903 nemudoma nanesli 3 kapljice obogatene krvi z volumnom 20 µl. Vzorce krvi smo hranili na sobni temperaturi in nanos

krvi ponovili po 1 in 3 urah. Papirček s posušenimi krvnimi madeži smo spravili v vrečko z nizko prepustnostjo plinov ter dodali sušilno sredstvo. Naslednji dan smo v 2 paralelkah izvedli postopek ekstrakcije, ki je zapisan pod točko 4.2.7.1.

4.2.7 Optimalna metoda

4.2.7.1 Priprava vzorca posušenega krvnega madeža

V 2 ml epico smo vstavili natančno obrezan papirček posušenega krvnega madeža, 750 µl topila, ki je bil sestavljen iz MeOH/AcCN/H₂O v razmerju 35/35/30 (v/v/v) in 20 µl IS (danzil-treonin R1_Treo). Vsebino epice smo pol minute mešali na vibracijskem mešalu (vortex), jo za 5 minut postavili v ultrazvočno kadičko ter 5 min centrifugirali pri 11000 obrt/min. 650 µl dobljene raztopine smo odpipetirali v 1,5 ml epico in jo posušili do suhega na aparaturi TurboVap. Postopek sušenja je pri tlaku 3 do 3,5 psi trajal približno 45 minut. Suhu ostanek v epici smo rekonstituirali v 100 µl MeOH/H₂O v razmerju 1/1 (v/v) in vorteksirali 20 sekund. V zadnjem koraku smo centrifugo pohladili na 5 °C ter vanjo položili vzorce, ki smo jih pri maksimalnih obratih centrifugirali 10 minut. Celoten volumen raztopine smo prenesli v steklene inserte, jih vstavili v viale, ter prenesli v avtomatski vzorčevalnik, ohlajen na 5 °C.

4.3 RAZVOJ KROMATOGRAFSKE METODE

4.3.1 Osnovna metoda Podkrižnik

HPLC metoda za določevanje plazemskih koncentracij etopozida je bila razvita v okviru diplomske naloge Boštjana Podkrižnika. Za ločitev analitov so uporabili reverzno-fazno kolono Phenomedex Luna C18 (2) 100A 150 x 4,6 mm 3 µm termostatirano na 50 °C, s predkolono Luna Phenomenex 4 x 3 mm C18. Volumen injiciranja je znašal 25 µl. Zaradi zamudne analize so se poslužili gradientne ločbe pretoka. Pretok mobilne faze je prvih 7 minut analize znašal 0,7 ml/min, nato so pretok dvignili na 1,3 ml/min (maksimalna vrednost pri kateri tlak ni presegel vrednosti 200 bar) vse do 13,5 minute, do konca analize, ki je trajala 16 minut pa je pretok znašal 0,8 ml/min. Mobilna faza je bila sestavljena iz 65 % 25 mM fosfatnega pufra s pH 3,0 in 35 % organske faze (98 % acetonitril in 2 % vode). Odziv analitov so snemali pri Ex 230 nm in Em 330 nm.

4.3.2 Optimizacija sestave mobilne faze

Zaradi težav s koelucijo pri retencijskem času našega analita smo s spremjanjem deleža organske faze žeeli naš analit čim bolj osamiti od ostalih motečih vrhov. V HPLC smo injicirali 20 µl vzorcev DBS. Postopek priprave vzorcev je opisan pod točko 4.4.7.1. Testirali smo 3 različne deleže organske faze acetonitrila, in sicer 33 %, 35 % in 37 %.

4.3.2.1 Izbira optimalne pH vodne faze

Pri pripravi 25 mM fosfatnega pufra smo v tehtič zatehtali 3,402 KH₂PO₄, vsebino kvantitativno prenesli v 1000 ml bučo in jo do oznake dopolnili z vodo Milli-Q. Nato smo v čaše odmerili po 100 ml dobljene raztopine. Da smo dobili pufer s pH 2,0; 3,0 ali 4,0 smo pH meter umerili s standardno pufersko raztopino s pH 2; 3 ali 4 ter nato 100 ml raztopine KH₂PO₄ nakisali do želenega pH s pomočjo koncentrirane ortofosforne kisline. Da smo dobili pufer s pH 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 ali 9,0 smo pH meter umerili s standardno pufersko raztopino s pH 5; 6; 7; 8 ali 9 in nato 100 ml raztopine KH₂PO₄ naalkalili do želenega pH s pomočjo 1 M NaOH.

Na koncu smo na mikrotitrski ploščici zmešali 20 µl osnovne raztopine etopozida s koncentracijo 1,43 mg/ml, 85 µl MeOH in 195 µl fosfatnega pufra željene pH vrednosti. S pomočjo mikrotitrskega čitalca smo pri Ex 230 nm in Em 330 nm merili odzive etopozida pri različnih pH vrednostih fosfatnega pufra.

4.3.3 Optimalna metoda

Za separacijo analitov iz vzorcev posušenih krvnih madežev smo uporabili reverzno-fazno kolono Phenomedex Luna C18 (2) 100A 150 x 4,6 mm 3 µm termostatirano na 50 °C s predkolono Phenomenex 4 x 3 mm C18. Za izvajanje analize, ki je trajala 12 minut pri konstantnem pretoku mobilne faze 0,7 ml/min, smo injicirali 50 µl vzorca. Pri analizi smo uporabljali mobilno fazo sestavljeni iz 33 % acetonitrila in 67 % 25 mM fosfatnega pufra s pH 3. Detekcija je potekala pri Ex 230 nm in Em 330 nm.

4.4 VALIDACIJA

Pri izvajanju validacije smo se držali smernic Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA). V okviru validacije metode smo testirali točnost, ponovljivost, območje linearnosti, selektivnost, delež ekstrakcije etopozida iz papirčka in stabilnost. Za izvajanje validacije

smo pripravili 3 paralelke posušenih krvnih madežev umeritvene krivulje in standardov za kontrolo kakovosti (QC) iz 3 različnih zateht etopozida. Postopek priprave posušenih krvnih madežev je opisan pod točkama 4.1.3 in 4.4.1. Vsak dan validacije smo po postopku pod točko 4.2.7.1 pripravili 10 vzorcev DBS umeritvene premice in 18 vzorcev QC, ki smo jih analizirali na HPLC.

4.4.1 Priprava standardov za kontrolo kakovosti

Preglednica IX: Priprava delovnih raztopin etopozida in standardov za kontrolo kakovosti (QC)

osnovna raztopina etopozida	delovne raztopine					standardi za kontrolu kakovosti (QC)		
	c teoretična (µg/ml)	V osnovne (ml)	V MeOH (ml)	V celokupni (ml)	c izračunana (µg/ml) = METANOLNA RAZTOPINA ETOPOZIDA	V krvi (ml)	V metanolne razt. Eto (ml)	c izrač. Eto v kapljici krvi (µg/ml)
R1ETO	1,5 QCL	0,0374	0,1626	0,2	37,4	0,24	0,01	1,50
R1ETO	5 QCM	0,0624	0,0376	0,1	125	0,24	0,01	5,00
OS	17,5 QCH	0,0306	0,0694	0,1	438	0,24	0,01	17,5

Standardi za kontrolo kakovosti so sestavljeni iz 3 koncentracij (nizka, srednja in visoka) in pokrivajo celotno območje umeritvene premice. Priprava delovnih raztopin in standardov za kontrolo kakovosti je identična postopku opisanemu pod točko 4.1.3.

4.4.2 Območje linearnosti

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

Linearost 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 predstavljajo vrednosti na ordinati analitske odzive (površine kromatografskih vrhov analita ali razmerje površin kromatografskih vrhov analita in IS), vrednosti na abscisi koncentracije

analitov 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).

Za določevanje umeritvene premice in linearnosti FDA predpisuje uporabo slepega vzorca, ničelnega vzorca ter 6 do 8 (vključno s spodnjo mejo kvantifikacije (LLOQ)) vzorcev različnih koncentracij za zagotavljanje ustreznega koncentracijskega območja.

Za zagotavljanje linearnosti morajo vsaj 4 standardi od 6 (75 % standardov), vključno s standardom pri LLOQ in pri najvišji koncentraciji odstopati za manj kot 15 % od pričakovanega odziva in manj kot 20 % pri LLOQ (31).

4.4.3 Točnost

Točnost metode smo preverili tako, da smo vsak dan validacije analizirali 6 paralelk vzorcev DBS 3 različnih koncentracij, ki ustrezano kontrolnim vzorcem (QC). Priprava standardov za kontrolo kakovosti in priprava vzorcev DBS sta opisani pod točkama 4.4.1 in 4.2.7.1. Iz razmerja odzivov etopozida in IS smo iz umeritvene premice ($y = k \cdot x + n$) izračunali koncentracijo posameznega QC (referenčna vrednost). S pomočjo dobljene referenčne vrednosti smo izračunali točnost, ki je definirana kot odklon referenčne vrednosti od prave (teoretične) vrednosti. Izračunali smo ga s pomočjo *enačbe 4*.

$$\text{odklon (\%)} = \left(\frac{c_{\text{referenčna}}}{c_{\text{teoretična}}} - 1 \right) \cdot 100 \quad \text{enačba 4}$$

Povprečje referenčnih vrednost QC mora biti znotraj 15 % prave (teoretične) vrednosti, razen v primeru meje kvantifikacije (LLOQ), kjer ne sme odstopati za več kot 20 % (31).

4.4.4 Ponovljivost

Ponovljivost analitske metode opisuje ujemanje posameznih meritev analita, kadar je pri različnih alikvotih uporabljen identična metoda. Ponovljivost priporoča uporabo najmanj treh koncentracij razporejenih znotraj umeritvene krivulje, pri kateri je potrebno imeti najmanj 5 meritev (31). Za izvajanje ponovljivosti smo uporabili 6 paralelk vzorcev DBS treh različnih koncentracij ki ustrezano kontrolnim vzorcem. Izračunali smo jo s pomočjo *enačbe 5*. Preverili smo tudi dnevno in meddnevno ponovljivost QCL, QCM in QCH. Iz razmerja odzivov etopozida in IS smo iz umeritvene premice ($y = k \cdot x + n$) sprva izračunali koncentracijo posameznega QC. Nato smo v primeru dnevne ponovljivosti izračunali povprečno vrednost šestih koncentracij QC (\bar{x}) ter standardno deviacijo (SD). Meddnevno ponovljivost smo izračunali tako, da smo izračunali relativno standardno deviacijo (RSD) treh alikvotov iz treh različnih dni.

$$RSD (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

enačba 5

RSD posameznega QC ne sme preseči vrednosti 15 %, izjema je meja kvantifikacije, kjer je meja postavljena pri 20 % (31).

4.4.5 Meja kvantifikacije (LLOQ)

Spodnja meja kvantifikacije (LLOQ) predstavlja najnižjo koncentracijo analita v vzorcu s sprejemljivo točnostjo in natančnostjo. LLOQ predstavlja najnižji standard umeritvene krivulje če sta izpolnjena naslednja pogoja:

- Odziv analita pri LLOQ mora biti vsaj 5-krat višji od odziva slepega vzorca
- Odziv analita določljiv in ponovljiv z relativno standardno deviacijo 20 % in točnostjo 80 – 120 % (31).

4.4.6 Selektivnost

Selektivnost analizne metode je njena sposobnost, da nedvoumno loči analit od drugih komponent v vzorcu. Potencialno moteče snovi biološke matrice so endogene komponente matrice, metaboliti, razgradni produkti in ostale učinkovine, ki jih jemlje bolnik. Selektivnost dokažemo z analizo polne krvi šestih različnih oseb. Kromatogram pri retencijskih časih značilnih za naš analit (etopozid) in IS ne sme imeti motečih vrhov. Selektivnost mora biti zagotovljena tudi na meji kvantifikacije (LLOQ) (31).

Selektivnost smo dokazali z analizo polne krvi (antikoagulant EDTA) šestih različnih oseb, ki smo jih označili s črkami od A do F. V 1,5 ml epico smo odpipetirali 240 µl krvi ter 10 µl topila (MeOH). Dobljene raztopine smo 30 sekund vorteksirali ter po tri 20 µl kapljice nanesli na papirček Whatman 903. Papirček smo 1 uro pustili na zraku ter ga nato pospravili v vrečko z nizko prepustnostjo plinov in dodali sušilno sredstvo. Naslednji dan smo sledili postopku priprave vzorca posušenega krvnega madeža zapisanega pod točko 4.2.7.1, pri čemer smo dodali 770 µl topila (brez dodatka IS).

4.4.7 Delež ekstrakcije etopozida iz papirčka

Delež ekstrakcije etopozida smo določili iz razmerja povprečja odzivov 6 paralelk etopozida in IS (A/A) vzorcev DBS in vodnih raztopin etopozida (*enačba 6*) pri treh različnih koncentracijah (QCL, QCM in QCH). Vzorce DBS smo pripravili po postopku zapisanem v poglavjih 4.1.3 in 4.2.7.1, priprava vodnih raztopin etopozida pa je podana v preglednici X. Za pripravo vodnega vzorca etopozida s koncentracijo ki ustrez QCL smo odpipetirali 22,6

μl raztopine etopozida (R2_Eto), 101,4 μl raztopine danzil-treonina (Treo_X) (glej točko 4.1.2) in 1676 μl topila MeOH/H₂O = 1/1. Dobljeno raztopino smo vorteksirali in jo 900 μl prenesli v viale za analiziranje na HPLC. Razmerje odziva etopozida in IS pri vodnih raztopinah je predstavljal 100 % izkoristek. Ker nas je zanimala tudi ponovljivost ekstrakcije, smo vsako koncentracijo pripravili v treh paralelkah.

Preglednica X: Priprava vodnih raztopin etopozida za izračun deleža ekstrakcije

	V R2_Eto μl	V R1_Eto μl	V Treo_X μl	V MeOH/H ₂ O = 1/1 μl
QCL	22,6	/	101,4	1676
QCM	42,0	/	56,2	902
QCH	/	22,2	84,4	1393

$$\text{delež ekstrakcije (\%)} = \frac{\overline{A}/\overline{A}_{DBS \text{ vzorec}}}{A/A_{vodni \text{ vzorec}}} \cdot 100 \quad \text{enačba 6}$$

4.4.7.1 Podaljševanje časa ultrazvočne kadičke

Posušene krvne madeže s koncentracijo etopozida 0 $\mu\text{g/ml}$ in 25 $\mu\text{g/ml}$ smo natančno obrezali, vstavili v 2 ml epico, dodali ekstrakcijsko topilo in IS, vorteksirali ter jih za različno dolge čase (5, 15 in 25 minut) postavili na ultrazvočno (UZ) kadičko. Nato smo sledili postopku zapisanemu pod točko 4.2.7.1.

Preglednica XI: Podaljšan čas ultrazvočne kadičke

c $\mu\text{g/ml}$	Čas trajanja ultrazvočne kadičke (min)		
	5	15	25
0	✓		✓
25	✓	✓	✓

4.4.7.2 Omočitev obrezanih posušenih krvnih madežev z vodo

Dva posušena krvna madeža s koncentracijo etopozida 25 $\mu\text{g/ml}$ smo predhodno za 10 minut omočili s 100 μl vode. Po 10 minutah smo dodali preostanek ekstrakcijskega topila, ki ima tokrat za 100 μl manjši volumen vode. Nato smo postopali enako kot je zapisano pod točko 4.2.7.1.

4.4.8 Stabilnost etopozida

4.4.8.1 Postpreparativna stabilnost

Želeli smo preveriti stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku pri temperaturi 5 °C po 12 in 24 urah. 2. dan validacije smo v inserte vijal odpipetirali 70 µl od celokupnih 100 µl vzorca. Dobljeni vzorci so predstavljeni tri koncentracije QC-jev v času 0. Nato smo združili preostalih 30 µl 6 paralelk posameznih koncentracij QC in jih posneli po 12 in 24 urah v avtomatskem vzorčevalniku.

4.4.8.2 Dolgoročna stabilnost etopozida v posušenih krvnih madežih

Dolgoročno stabilnost smo preverili tako, da smo pripravili posušene krvne madeže dveh standardov kontrole kakovosti QCL in QCH (glej preglednico XII). Testirali smo 4-tedensko stabilnost pri 3 različnih temperaturah; temperaturi -20 °C, sobni temperaturi ter temperaturi 40 °C. Tedensko smo v treh paralelkah, dveh koncentracijah ter pri 3 različnih temperaturah merili odzive etopozida v vzorcih DBS. Postopek je opisan pod točko 4.2.7.1. Dobljene rezultate smo podajali kot razmerje med odzivom etopozida v času t in povprečno vrednostjo odzivov etopozida v času 0 v procentih.

Preglednica XII: Priprava standardov za kontrolo kakovosti dolgoročne stabilnosti

delovne raztopine						standardi za kontrolo kakovosti (QC)		
osnovna raztopina etopozida	c teoretična (µg/ml)	V osnovne (ml)	V MeOH (ml)	V celokupni (ml)	c izračunana (µg/ml) = METANOLNA RAZTOPINA ETOPOZIDA	V krvi (ml)	V metanolne razt. Eto (ml)	c izrač. Eto v kapljici krvi (µg/ml)
R1_ETO	1,5 QCL	0,0374	0,1626	0,2	37,4	0,96	0,04	1,50
OS	17,5 QCH	0,0306	0,0694	0,1	438	0,96	0,04	17,5

Postopek priprave obogatenih krvnih vzorcev (točka 4.1.3) smo pri pripravi standardov za kontrolo kakovosti dolgoročne stabilnosti morali malce spremeniti. Kot je to razvidno iz

preglednice XII smo zaradi 4-krat povečane količine obogatenih krvnih madežev pri pipetiranju metanolne raztopine Eto v polno kri uporabili drugo pipeto, in sicer 20 – 200 µl. Na koncu smo na 3 različne Whatman papirčke ($T = -20^{\circ}\text{C}$, sobna temperatura, $T = 40^{\circ}\text{C}$) nanesli po 12 kapljic z volumnom 20 µl.

4.5 UPORABA RAZVITE METODE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJ ETOPOZIDA PRI PACIENTIH

4.5.1 Vpliv hematokrita na koncentracije etopozida v krvnih vzorcih

Za določanje porazdelitve etopozida med krvnimi celicami in plazmo smo sprva svežo kri 15 minut centrifugirali pri sobni temperaturi in 2500 obratih na minuto. Pod omenjenimi pogoji je prišlo do ločitve plazme in rdečih krvnih celic. Odločili smo se, da bomo pri dveh različnih koncentracijah (QCL in QCH) in treh različnih vrednostih hematokrita (0,3; 0,4 in 0,6) merili odzive etopozida. Za pripravo krvi ustrezne vrednosti hematokrita smo v 2 ml epico natančno odmerili zahtevan volumen krvnih celic in plazme, kot je to podano v preglednici XIII.

Preglednica XIII: Priprava krvi z ustreznim deležem hematokrita

Ht	V krvnih celic (µl)	V plazme (µl)	V polne krvi (µl)
0,3	576	1344	1920
0,4	768	1152	1920
0,6	1152	768	1920

Nato smo polni krvi dodali 80 µl metanolne raztopine etopozida, ki ustreza koncentracijama QCL in QCH. Priprava raztopin je podana v preglednici XII. S polavtomatsko pipeto 2 - 20 µl smo 4-krat odpipetirali 20 µl. Vedno smo prvič tips le omočili z raztopino, ter nato šele drugič metanolno raztopino etopozida odpipetirali v polno kri. Dobljene obogatene krvi smo nežno premešali ter jih inkubirali 45 minut pri temperaturi 37°C in 20 obratih na minuto. Po končani inkubaciji smo na papirček Whatman 903 nanesli 5 krvnih kapljic z volumnom 20 µl. Preostanek obogatene krvi smo 15 minut centrifugirali pri sobni temperaturi in 2000 obratih na minuto. Po ločitvi smo vzorce plazme in rdečih krvnih celic ločeno zamrznili in hranili v zamrzovalniku pri temperaturi -80°C .

4.5.2 Primerjava krvnih in plazemskih koncentracij etopozida pri bolnikih s pljučnim rakom

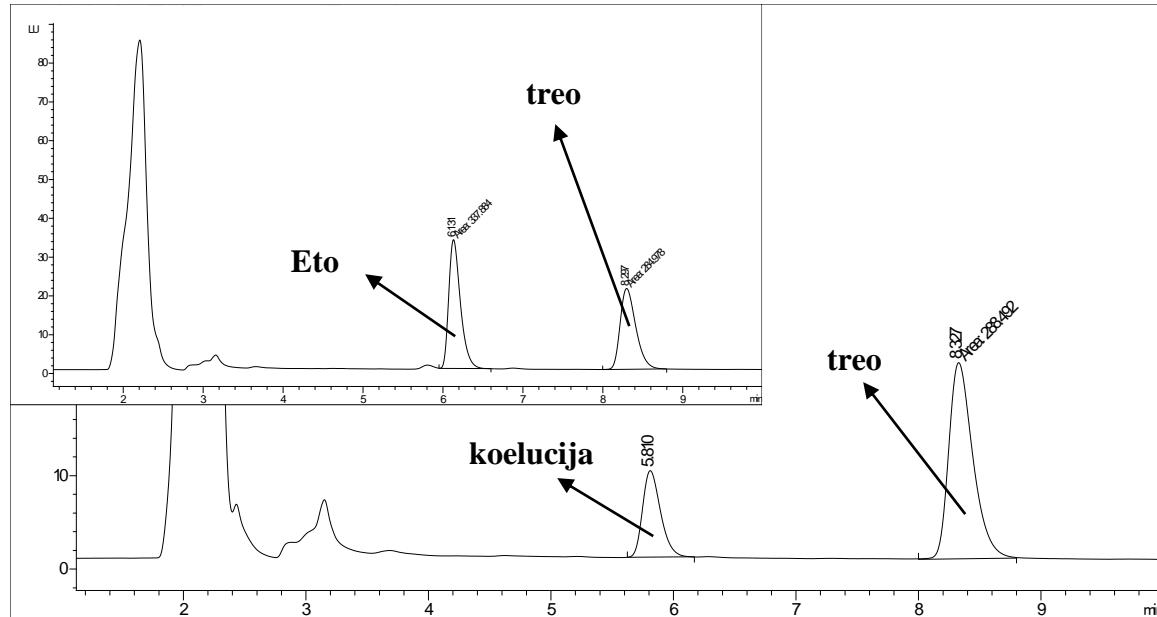
Metodo posušenega krvnega madeža, ki smo jo razvili smo preverili na 2 bolnikih po različnih krogih in časih aplikacije zdravila etopozid. Dobljene krvne koncentracije smo primerjali s plazemskimi koncentracijami.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

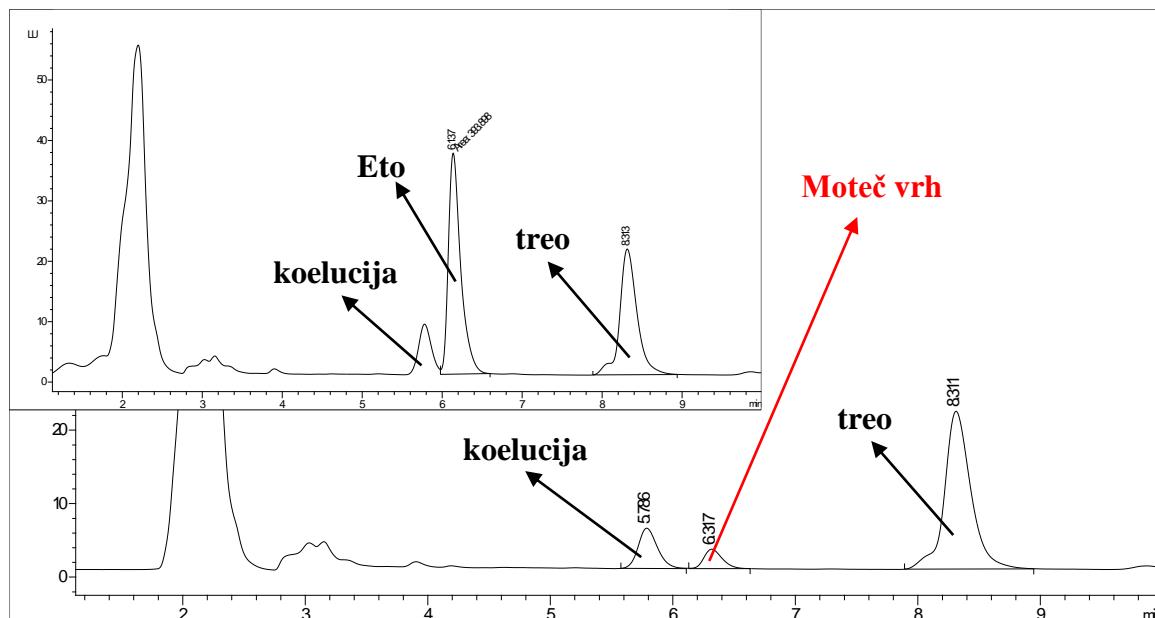
5.1 RAZVOJ EKSTRAKCIJSKE METODE

5.1.1 Izbor papirčka za nanos krvnih vzorcev

Na tržišču obstaja več tipov papirja za nanos krvnih madežev. Mi smo se odločili, da bomo preizkusili dva tipa neimpregniranih papirjev, in sicer Whatman 903 in DMPK-C (32, 33).



Slika 4: Kromatogram slepega vzorca in zgoraj pomanjšano vzorca DBS na papirčku Whatman 903



Slika 5: Kromatogram slepega vzorca in zgoraj pomanjšano vzorca DBS na papirčku DMPK-C

EVA KOKOT - Diplomska naloga

Iz slik 4 in 5 je razvidno, da uporaba DMPK-C papirčka ni ustrezna, saj dobimo pri retencijskem času (tr) značilnem za etopozid moteč vrh (označen z rdečo barvo).

5.1.2 Izbor topila za ekstrakcijo

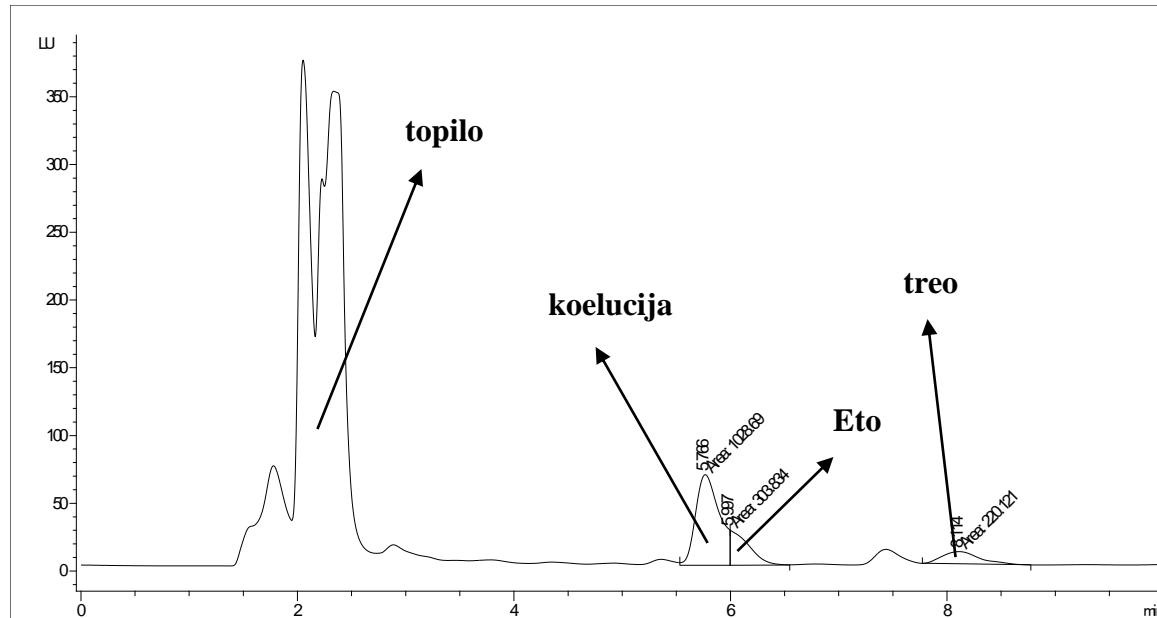
Preglednica XIV: Odločitvena tabela izbora ekstrakcijskega topila

Vz.	Ekstrak. topilo Rekon. topilo	Oborina	Koelucija	Odziv Eto / odziv IS	Kromatogram			
1.	AcCN	NE	malo	Nimamo odziva za Eto.	Čist kromatogram.			
	AcCN							
2.	MeOH	NE	NE	Odziva IS in Eto nižja od pričakovanega.	Čist kromatogram.			
	MeOH							
3.	AcCN/H ₂ O = 1/1	DA	V primeru IS ni motečih koelucij. V primeru Eto močna koelucija.	Odziv Eto višji kot pri vzorcu 1 (Vz. 1).	Več motečih endogenih vrhov.			
	AcCN/H ₂ O = 1/1							
4.	MeOH/H ₂ O = 1/1	Vzorce nismo kromatografirali, saj je prišlo do nastanka primarne oborine v fazi ekstrakcije. Po centrifugiranju se oborina ni polegla.						
	MeOH/H ₂ O = 1/1							
5.	Topilo 1	DA	Koelucija pri Eto, IS brez koelucij.	Odziva IS in Eto ustrezna.	Veliko endogenih vrhov.			
	Topilo 1							
6.	Topilo 1	NE	Koelucija z endogenim vrhom.	Nižji odziv Eto in IS (razširjena vrhova).	Precej endogenih vrhov.			
	MeOH							

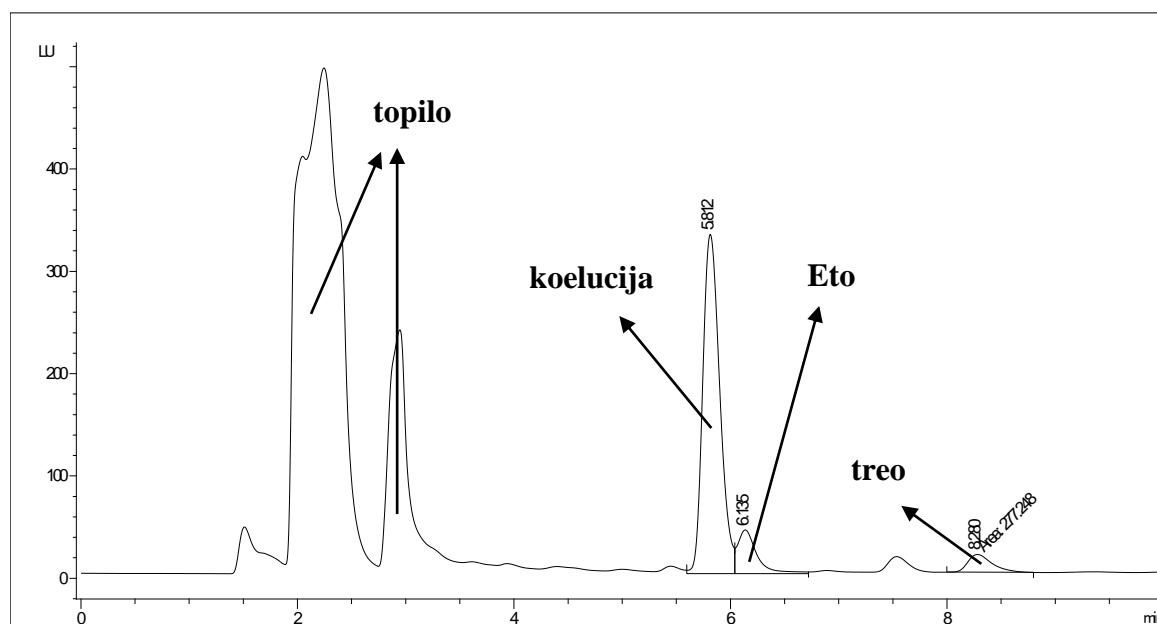
Topilo 1: MeOH/AcCN/H₂O = 25/25/50

Glede na dobljene rezultate zbrane v preglednici XIV smo ugotovili, da AcCN in MeOH nista primerna kandidata za ekstrakcijsko topilo. Največja težava omenjenih topil je nizek odziv, oziroma manjkajoč odziv našega preiskovanega analita etopozida. Z uporabo 50 % vodne in 50 % organske faze (vzorci od 3 do 5) smo dvignili odzive IS in analita. Prav tako smo lahko opazili večje število motečih endogenih vrhov, prišlo je do koelucij analita ter v primeru vzorca 4 do nastanka primarne oborine v fazi ekstrakcije. V primeru vzorca 6, kjer smo kot rekonstitucijsko topilo uporabili 100 % MeOH do nastanka oborine ni prišlo, smo

pa zaradi odsotnosti vodne faze v rekonstitucijskem topilu dobili nižje odzive in razširjena vrhova analita in IS. Iz tega smo lahko sklepali, da je za uspešno rekonstitucijo kakor tudi ekstrakcijo vzorca potreben določen delež vodne faze. Pri pregledu kromatogramov smo prišli do zaključka, da MeOH ob prisotnosti AcCN izboljša obliko vrhov etopozida in IS (slika 6 in 7).



Slika 6: Kromatogram vzorca DBS s koncentracijo 15 µg/ml, kjer smo kot ekstrakcijsko in rekonstitucijsko topilo uporabili AcCN/H₂O = 1/1



Slika 7: Kromatogram vzorca DBS s koncentracijo 15 µg/ml, kjer smo kot ekstrakcijsko in rekonstitucijsko topilo uporabili MeOH/AcCN/H₂O = 25/25/50

Zaradi sledečih ugotovitev smo želeli preizkusiti ekstrakcijska topila MeOH, MeOH/H₂O = 3/1 ter kombinacijo dveh organskih topil (MeOH in AcCN) in vode v različnih razmerjih;

$\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 25/25/50$, $\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 35/35/30$ in $\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 45/45/10$. Dobljeni rezultati so podani v preglednici XV.

Preglednica XV: Izbor ekstrakcijskega topila

c $\mu\text{g}/\text{ml}$	Ekstrak. topilo	Rekon. topilo	A eto	A treo	A koelucije
20	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 3/1$	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 1/1$	262,3	268,8	26,7
20	MeOH	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 1/1$	274,3	277,0	44,0
20	$\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 25/25/50$	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 1/1$	474,6	283,8	740,0
20	$\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 35/35/30$	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 1/1$	435,4	294,6	57,8
20	$\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 45/45/10$	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 1/1$	203,5	294,8	85,9

Odločitev najprimernejšega ekstrakcijskega topila je temeljila na velikosti odziva etopozida in koelucije pri tr 5,84 minute. Glede na odločitvena kriterija smo za najprimernejše ekstrakcijsko topilo izbrali $\text{MeOH}/\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 35/35/30$ (v/v/v).

5.1.3 Izbor IS

Sprva smo zaradi velike strukturne podobnosti kot IS uporabljali protirakavo učinkovino tenipozid. Kljub strukturni podobnosti se je izkazalo, da imata spojini zelo različni vrednosti logaritmov porazdelitvenega koeficiente (logP) in s tem povezana tudi retencijska časa. Zaradi zamudne analize (16 minut) in manjše stabilnosti raztopine tenipozida smo iskali primernejši interni standard. Utrnila se nam je zamisel, da bi kot interni standard poizkusili uporabiti fluorescirajoče aminokisline s pripetim danzilnim fragmentom (glej preglednico VII).

Sprva smo testirali šest različnih aminokislin s koncentracijo 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Njihovi retencijski časi (tr) in površine odzivov (A) so podani v preglednici XVI.

Preglednica XVI: Iskanje primernega internega standarda

spojina	tr (min)	A	logP
danzil-valin	/	/	1,48
danzil-triptofan	1,734	2151,7	2,45
	1,918	1322	
danzil-serin	6,24	1855,2	-0,63
	9,796	735,4	
danzil-alanin	10,977	1803,4	0,49
danzil-fenilalanin	/	/	2,28
danzil-lizin	2,969	499,2	-0,45
	4,005	1937,3	
	13,362	597,7	
	14,764	1084,2	
etopozid	cca 6	/	1,16

Spektre smo posneli pri ekscitacijski valovni dolžini 300 nm in emisijski valovni dolžini 500 nm. V primeru etopozida in tenipozida smo spektre snemali pri drugačni ekscitacijski in emisijski valovni dolžini, in sicer 230 in 330 nm. Za samo analitiko nam snemanje pri različnih valovnih dolžinah ne bi delalo težav, saj lahko s fluorescenčnim detektorjem (FLD) merimo odzive pri različnih valovnih dolžinah v različnih časih. Kot je razvidno iz preglednice XVI v primeru danzil-valina in danzil-fenilalanina nimamo podanih rezultatov, iz česar lahko sklepamo, da sta molekuli preveč lipofilni, zaradi česar sta se na stacionarni fazi zadržali dlje od same analize 16 minut.

Kot najboljša kandidata sta se izkazala danzil-alanin in danzil-lizin, ki imata nizko ter negativno vrednost logP. Zato smo se v naslednjem koraku odločili, da preverimo vse aminokisline s pripetim danzilnim fragmentom z negativnimi vrednostmi logP. Pripravili smo raztopine danzil-aminokislin s koncentracijami 10 µg/ml ter sprva posneli spektre pri Ex 300 nm in Em 500 nm in gradientom pretoka (glej točko 4.3.1). Glede na to, da smo pri preizkušenih aminokislinah s pripetim danzilnim fragmentom dobili tr nižji od 7 minut, smo se odločili da poizkus izvedemo pri pogojih detekcije najugodnejšem za etopozid Ex 230 nm in Em 330 nm ter brez uporabe gradijenta pretoka.

Preglednica XVII: Izbor internega standarda

spojina	logP	tr (min)	A	pogoji snemanja FLD (nm)	tr (min)	A	pogoji snemanja FLD (nm)
danzil-asparginska kislina	-0,3	6,379	237,9	Ex 300, Em 500	2,26	197,5	Ex 230, Em 330
					6,416	266,7	
danzil-lizin	-0,45	2,854	86,1	Ex 300, Em 500	2,264	323,6	Ex 230, Em 330
		3,951	827,2		2,825	325,6	
					3,955	194,0	
danzil-serin	-0,63	6,2	308,9	Ex 300, Em 500	2,263	232,8	Ex 230, Em 330
					6,233	259,0	
danzil-glutaminska kislina	-0,25	6,543	299,1	Ex 300, Em 500	2,257	205,4	Ex 230, Em 330
					6,562	224,5	
danzil-treonin	-0,17	/	/	/	2,246	195,4	Ex 230, Em 330
					8,27	467,8	
danzil-hidroksiprolin	-0,4	/	/	/	2,262	188,8	Ex 230, Em 330
					7,415	77,4	
danzil-cisteinska kislina	-0,44	/	/	/	2,253	183,7	Ex 230, Em 330
					3,681	536,2	
danzil-glutamin	-0,65	/	/	/	2,263	179,6	Ex 230, Em 330
					2,843	137,7	
					4,912	532,8	
gradient pretoka					NI gradiента pretoka		

Zaradi odzivov pri tr značilnem za etopozid (približno 6,1 minute) smo iz nabora IS izločili danzil-asparginsko kislino, danzil-serin in danzil-glutaminsko kislino (preglednica XVII). Tudi danzil-hidroksiprolin z tr 7,4 minute se je izkazal kot neustrezni kandidat, saj imamo v kromatogramu značilen koelucijski vrh pri tr 7,5 minute. Zaradi močnega odziva topila pri tr med 2 in 3,5 minute smo izločili tudi aminokislini danzil-lizin in danzil-cisteinsko kislino. Na koncu sta kot najprimernejša kandidata za IS ostala danzil-glutamin in danzil-treonin. Odločili smo se za danzil-treonin, ker le-ta dovolj močno fluorescira pri Ex 230 nm in Em 330 nm ter ima dovolj kratek retencijski čas, da za samo analizo ne potrebujemo gradienta pretoka.

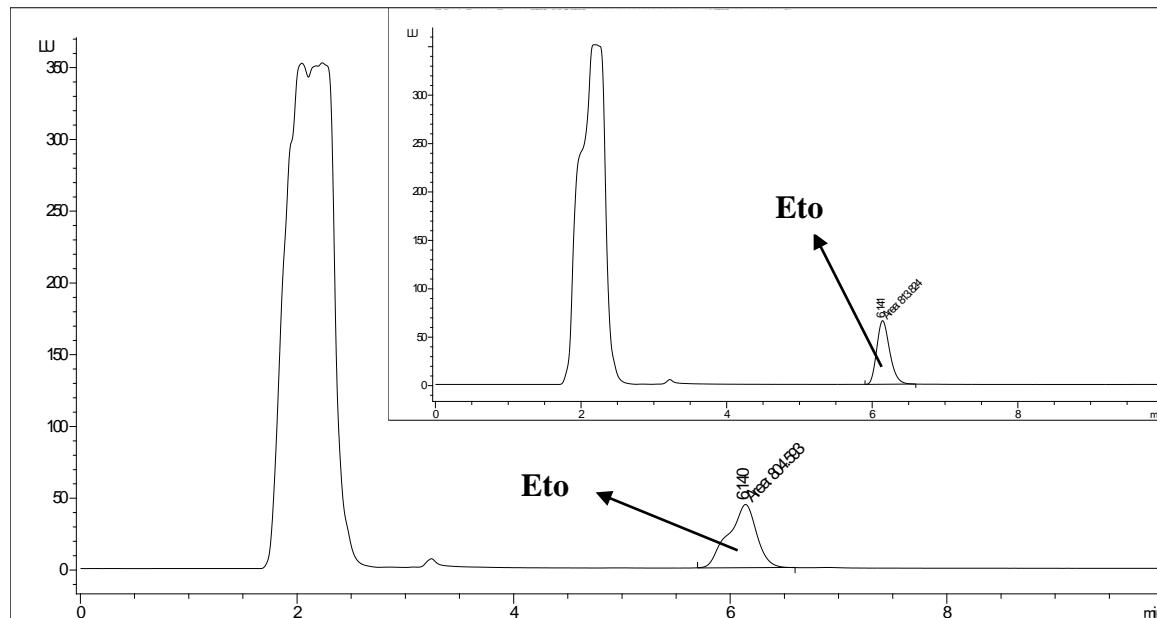
5.1.4 Izbor topila za rekonstitucijo suhega ostanka

Med samim eksperimentalnim delom smo prišli do spoznanja, da imamo v primeru previsokega deleža organske faze probleme s simetrijo vrhov. Kot je to vidno iz preglednice XVIII ter slik 8 in 9 je v primeru AcCN potreben večji minimalen delež vode, in sicer 50 %, v primeru MeOH pa 30 %.

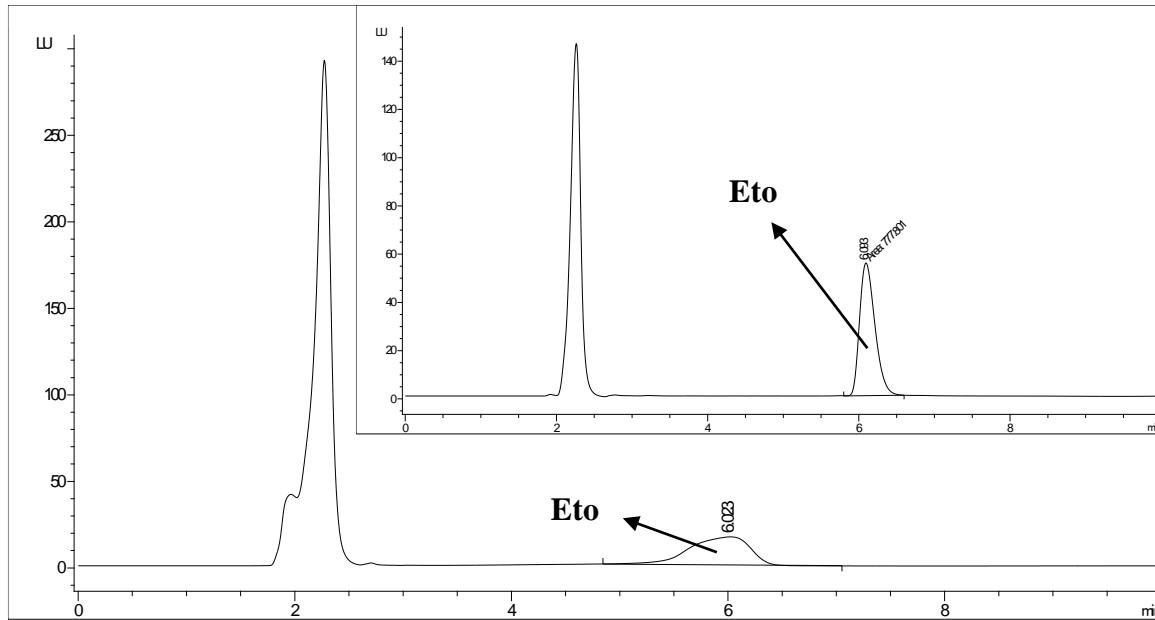
Preglednica XVIII: Vpliv deleža vode na simetrijo vrha

Topilo	Odziv Eto	simetrija
80 % MeOH	804,6	1,48
70 % MeOH	813,8	0,790
60 % MeOH	812,8	0,628
50 % MeOH	794,8	0,673
80 % AcCN	/	2,07
70 % AcCN	/	1,48
60 % AcCN	793,5	0,893
50 % AcCN	777,8	0,693

Odzivov etopozida kjer smo kot rekonstitucijsko topilo uporabili 70 oziroma 80 % AcCN nismo podali, saj sta bila vrhova preveč razširjena.

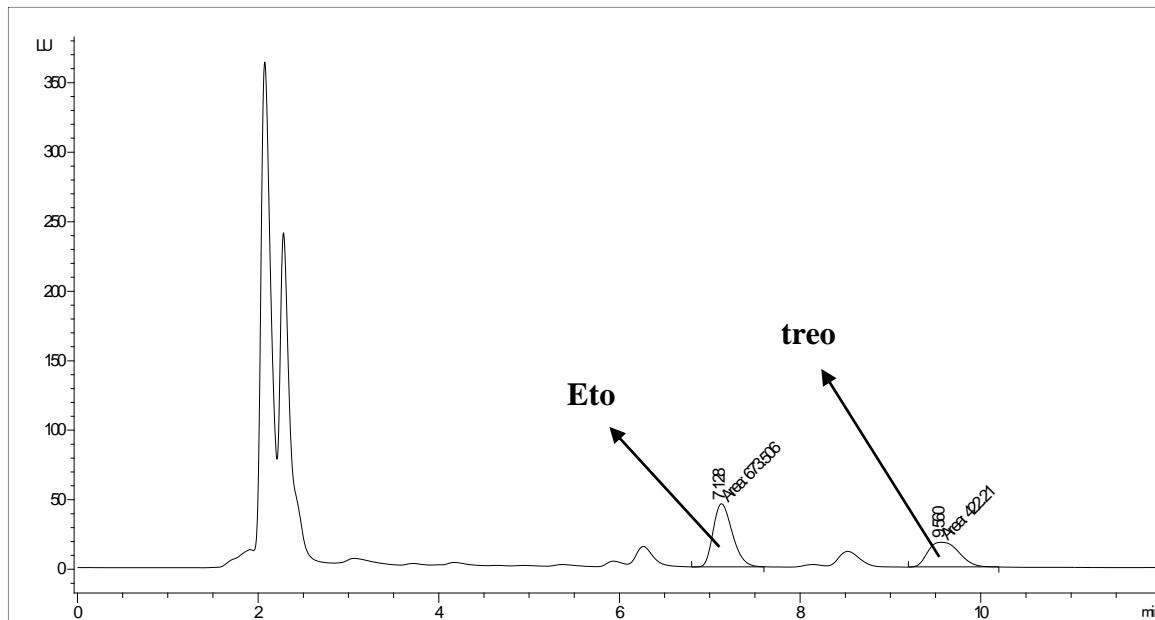


Slika 8: Oblika vrha etopozida pri 80 % in 70 % MeOH (zgoraj pomanjšano)

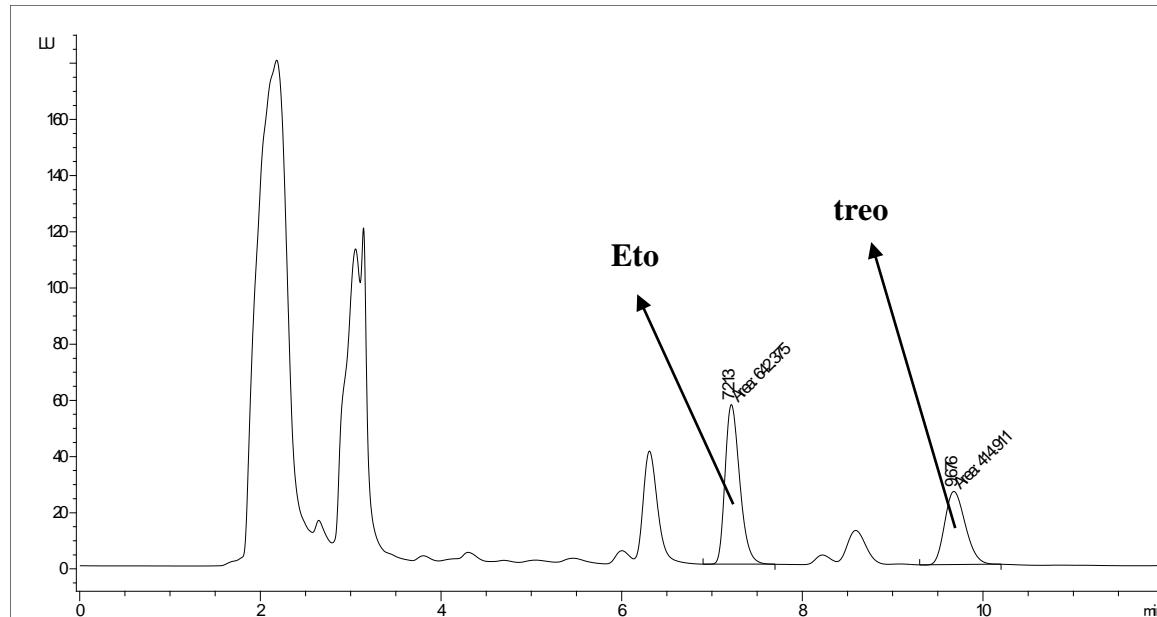


Slika 9: Oblika vrha etopozida pri 80 % in 50 % AcCN (zgoraj pomanjšano)

Zaradi omenjenih težav s simetrijo vrhov smo se odločili preizkusiti rekonstitucijski topili $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 2/3$ (slika 10) in $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 1/1$ (slika 11). Ekstrakcijo smo izvedli na enak način kot je opisana pod točko 4.2.7.1 z izjemo uporabe dveh različnih rekonstitucijskih topil.



Slika 10: Kromatogram vzorca DBS s koncentracijo $30 \mu\text{g}/\text{ml}$, kjer smo kot rekonstitucijsko topilo uporabili $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O} = 2/3$



Slika 11: Kromatogram vzorca DBS s koncentracijo 30 µg/ml, kjer smo kot rekonstitucijsko topilo uporabili MeOH/H₂O = 1/1

Zaradi lepše oblike vrhov etopozida in IS v primeru MeOH/H₂O = 1/1, smo se v primeru rekonstitucijskega topila odločili za MeOH/H₂O = 1/1.

5.1.5 Vpliv zmrznjene in sveže krvi pri pripravi krvnih vzorcev

Primerjali smo odzive etopozida v primeru uporabe zmrznjene oziroma sveže krvi pri pripravi obogatenih krvnih vzorcev. Ugotovili smo, da pri obdelavi rezultatov ni prišlo do bistvenih razlik med odzivi etopozida pridobljenimi iz sveže in zmrznjene krvi.

5.1.6 Vpliv časa priprave obogatenih krvnih vzorcev na odziv etopozida

Pri izvajanju validacije se nam je čas priprave obogatenih krvnih vzorcev ter njihovo stanje pri sobni temperaturi zaradi večjega števila vzorcev podaljšalo. Za najzamudnejši del se je izkazal nanos 7 - 10 obogatenih kapljic posamezne koncentracije etopozida na papirček Whatman 903. Zato smo želeli preveriti, če čas priprave oziroma stanje obogatenih krvnih vzorcev pri sobni temperaturi vpliva na odziv etopozida.

Preglednica XIX: Vpliv časa priprave obogatenih krvnih vzorcev na odziv etopozida

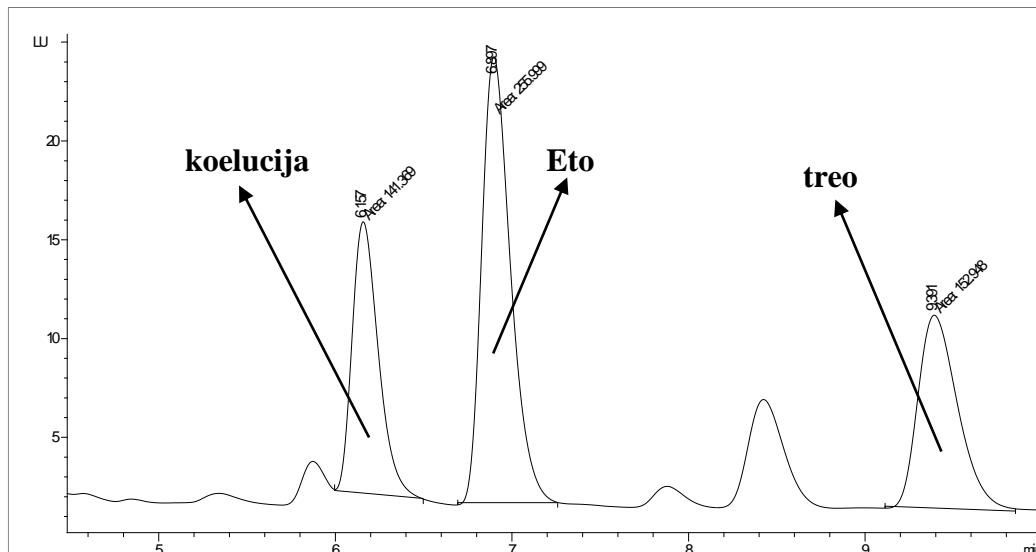
vzorec in čas	c µg/ml	A eto	A treo	A/A	povprečje A/A	AA _i /AA _{0h} (%)
DBS 3 0h	3,04	57,8	406,6	0,142	0,139	100
DBS 3 0h	3,04	56,0	409,9	0,137		
DBS 3 1h	3,04	57,6	416,8	0,138	0,140	100
DBS 3 1h	3,04	59,2	417,4	0,142		
DBS 3 3h	3,04	58,4	425,4	0,137	0,137	98,0
DBS 3 3h	3,04	59,6	438,1	0,136		
DBS 6 0h	6,01	119,7	403,6	0,297	0,293	100
DBS 6 0h	6,01	121,8	421,8	0,289		
DBS 6 1h	6,01	126,8	423,7	0,299	0,299	102
DBS 6 1h	6,01	128,8	432,1	0,298		
DBS 6 3h	6,01	126,0	430,8	0,292	0,289	98,8
DBS 6 3h	6,01	125,5	439,2	0,286		

Kot je vidno iz preglednice XIX čas priprave oziroma stanje obogatenih krvnih vzorcev do 3 ur ne vpliva na odziv etopozida.

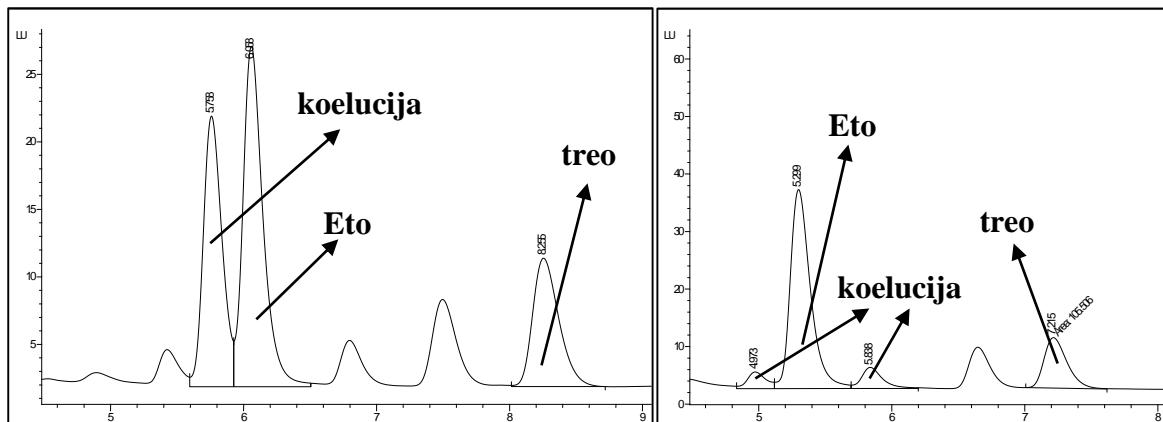
5.2 RAZVOJ KROMATOGRAFSKE METODE

5.2.1 Optimizacija sestave mobilne faze

Z spremenjanjem deleža acetonitrila smo želeli doseči optimalno ločbo vrha analita od ostalih motečih vrhov. S spremenjanjem deleža organske faze (33 %, 35 % in 37 %) smo pri 33 % deležu acetonitrila le-to dosegli, s čimer pa smo tudi podaljševali čas analizne metode.



Slika 12: Kromatogram pri 33 % AcCN (čas analize 10 minut)



Slika 13: Kromatogram levo pri 35 % AcCN (čas analize 9 minut) in desno pri 37 % AcCN (čas analize 8 minut)

5.2.1.1 Izbira optimalne pH vodne faze

Pri iskanju optimalne pH vodne faze smo posneli emisijske in ekscitacijske spektre pri pH-jih od 2 do 9. Oblika ekscitacijskih in emisijskih spektrov je bila v celotnem pH (2 - 9) območju identična. Preglednica XX prikazuje neodvisnost odziva etopozida od pH-ja vodne faze, zato smo se odločili da zadržimo prvotne pogoje (pH fosfatnega pufra 3,0).

Preglednica XX: Odziv etopozida v odvisnosti od pH-ja vodne faze

pH	2	3	4	5	6	7	8	9
Odziv	106	112	110	116	113	106	102	100

5.3 VALIDACIJA

Validacija bioanalitične metode vključuje vse postopke ki dokazujejo, da je metoda uporabljena za kvantitativno merjenje analitov v določenem biološkem vzorcu zanesljiva in ponovljiva za predvideno uporabo. Temeljni validacijski parametri so natančnost, točnost, selektivnost, občutljivost, ponovljivost in stabilnost. Validacija vključuje dokumentiranje zanesljivosti in primernosti metode za predvidene analitične aplikacije (31).

5.3.1 Območje linearnosti

Območje linearnosti smo določili s pomočjo linearne regresije (glej točko 4.4.2). Za zagotavljanje linearnosti mora 75 % vzorcev, vključno z odzivom pri najvišji koncentraciji, (v našem primeru 7 od 9 šteto brez ničtega vzorca) od pričakovane vrednosti odziva odstopati manj kot 15 %. Izjema je LLOQ, kjer bioanalitična dopustnost znaša $\pm 20\%$.

Preglednica XXI: Točnost umeritvene premice razmerja etopozida in IS prvega validacijskega dne
 $y = 0,0714 \cdot x - 0,0163 (R^2 = 0,998)$

					A/A	
	c µg/ml	A eto	A treo	A/A	c premica µg/ml	točnost %
0	0	0	247,6	-	-	-
0,5	0,500	6,2	262,2	0,0236	0,560	112
1	1,04	14,8	259,3	0,0571	1,03	98,8
2	2,00	31,0	261,3	0,119	1,89	94,5
3	3,04	49,7	261,9	0,190	2,89	94,9
6	6,01	117,8	263,0	0,448	6,50	108
9	9,15	166,8	260,6	0,640	9,20	100
12	12,0	220,4	277,7	0,794	11,3	94,5
15	14,9	284,9	267,2	1,07	15,2	102
20	20,0	386,7	273,2	1,42	20,1	100

Kot je razvidno iz preglednice smo prvi dan validacije dobili malce nižje odzive etopozida, ki so posledica uporabe druge polavtomatske pipete 2 – 20 µl pri pripravi vzorcev obogatene krvi ter nanosa obogatenih krvnih vzorcev na papirček Whatman 903.

Preglednica XXII: Točnost umeritvene premice razmerja etopozida in IS drugega validacijskega dne
 $y = 0,0748 \cdot x + 0,00409 (R^2 = 0,996)$

					A/A	
	c µg/ml	A eto	A treo	A/A	c premica µg/ml	točnost %
0	0	0	294,8	-	-	-
0,5	0,500	10,5	292,9	0,0358	0,425	85,0
1	1,04	24,7	288,2	0,0857	1,09	105
2	2,00	48,3	290,7	0,166	/	/
3	3,04	67,0	278,2	0,241	3,16	104
6	6,01	123,9	288,7	0,429	5,68	94,6
9	9,15	205,9	284,1	0,725	/	/
12	12,0	258,1	291,9	0,884	11,8	97,9
15	14,9	346,7	291,6	1,19	15,8	106
20	20,0	412,7	281,7	1,47	19,5	97,5

Za zagotavljanje ustreznosti rezultatov 2. dan validacije smo zanemarili 2 rezultata, kar je še vedno znotraj dopustnih 75 %. Zanemarili smo rezultata vzorcev DBS s koncentracijo 2 µg/ml in 9 µg/ml.

Preglednica XXIII: Točnost umeritvene premice razmerja etopozida in IS tretjega validacijskega dne $y = 0,0644 \cdot x + 0,00509$ ($R^2 = 0,990$)

	c µg/ml	A eto	A treo	A/A	A/A	c premica µg/ml	točnost %
0	0	0	405,1	-	-	-	-
0,5	0,500	14,9	387,3	0,0385	0,519	104	
1	1,04	25,5	392,2	0,0650	0,931	89,4	
2	2,00	48,4	375,6	0,129	1,92	96,1	
3	3,04	76,8	397,5	0,193	2,92	96,1	
6	6,01	137,9	394,2	0,350	5,36	89,2	
9	9,15	232,9	382,6	0,609	9,38	102	
12	12,0	312,8	380,1	0,823	12,7	106	
15	14,9	381,7	367,0	1,04	16,1	108	
20	20,0	492,5	404,8	1,22	18,8	94,0	

Metoda je bila vse dni linearna v koncentracijskem območju 0,5 do 20 µg/ml in ustreza smernicam FDA.

5.3.2 Točnost

Pri izvajanju 3 dnevne validacije smo preverili enega od temeljnih validacijskih parametrov, točnost. Za zagotavljanje ustreznosti metode povprečje referenčnih vrednosti QC ne sme preseči 15 %. Glede na dobljene rezultate prikazane v preglednici XXIV lahko z gotovostjo trdimo, da naša metoda ustreza kriteriju točnosti, saj so vse vrednosti znotraj dopustnega.

Preglednica XXIV: Točnost razmerja odzivov etopozida in IS QC-jev tekom treh dni validacije

	Razmerje odzivov etopozida in IS								
	QCL (1,50 µg/ml)			QCM (5,00 µg/ml)			QCH (17,5 µg/ml)		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
1.	1,33	1,46	1,53	4,76	4,86	4,20	18,4	16,7	15,5
2.	1,25	1,50	1,48	4,97	4,78	4,39	18,8	17,3	14,7
3.	1,26	1,42	1,36	4,78	4,91	4,27	18,2	17,5	14,9
4.	1,20	1,43	1,42	5,19	4,76	4,30	18,6	17,0	14,4
5.	1,31	1,49	1,37	4,85	5,12	4,31	17,3	16,3	14,9
6.	1,36	1,39	1,35	4,94	4,63	4,41	18,5	16,2	15,3
povprečje	1,29	1,45	1,42	4,91	4,84	4,31	18,3	16,8	14,9
točnost %	85,9	96,8	94,9	98,3	96,9	86,3	105	96,1	85,3

5.3.3 Ponovljivost

Prva preglednica nam prikazuje podatke dnevne ponovljivosti, druga pa meddnevne ponovljivosti (ponovljivost treh dni).

Preglednica XXV: Dnevna ponovljivost standardov za zagotavljanje kakovosti (QC) tekom treh dni validacije

	Razmerje odzivov etopozida in IS								
	QCL (1,50 µg/ml)			QCM (5,00 µg/ml)			QCH (17,5 µg/ml)		
	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan	1. dan	2. dan	3. dan
povprečje	1,29	1,45	1,42	4,91	4,84	4,31	18,3	16,8	14,9
SD	0,0612	0,0445	0,0736	0,160	0,165	0,0768	0,541	0,526	0,386
RSD %	4,76	3,07	5,18	3,26	3,40	1,78	2,96	3,12	2,59

Preglednica XXVI: Meddnevna ponovljivost standardov za zagotavljanje kakovosti (QC) tekom treh dni validacije

	Razmerje odzivov etopozida in IS		
	QCL	QCM	QCH
Povprečje treh dni validacije	1,39	4,69	16,7
SD	0,0876	0,328	1,69
RSD %	6,32	7,00	10,1

Tako dnevna kakor tudi meddnevna ponovljivost ustreza smernicam Ameriške agencije za hrano in zdravila (točka 4.4.4).

5.3.4 Meja kvantifikacije (LLOQ)

0,5 µg/ml v posušenem krvnem madežu predstavlja spodnjo mejo kvantifikacije (LLOQ), saj ustreza vsem zahtevam FDA. Med izvajanjem 3-dnevne validacije je bil odziv analita več kot 5-krat višji od odziva slepega vzorca, izračunana točnost znotraj predpisanih meja 80 - 120 % ter ponovljivost z relativno standardno deviacijo manjša od 20 % (glej preglednico XXVII).

Preglednica XXVII: Ponovljivost razmerja etopozida in IS pri spodnji meji kvantifikacije

	C µg/ml	Aeto	Atreo	A/A
0,5	0,500	10,2	302,1	0,0338
0,5	0,500	10,3	293,5	0,0351
0,5	0,500	10,5	292,9	0,0358

Razmerje med etopozidom in IS		
povprečje LLOQ	SD	RSD %
0,0349	0,000862	2,47

5.3.5 Selektivnost

Pri pregledu kromatogramov šestih slepih vzorcev označenih z A do F (točka 4.4.6) smo posebno pozornost namenili odzivom pri retencijskih časih značilnih za naš analit ter IS. Zaradi odsotnosti motečih vrhov na omenjenih tr lahko z gotovostjo trdimo, da naša metoda ustreza kriterijem selektivnosti.

5.3.6 Delež ekstrakcije etopozida iz papirčka

Kot je prikazano v preglednici je izkoristek ekstrakcije etopozida iz papirčka zelo nizek, in sicer znaša med 43 in 48 % (preglednica XXVIII).

Preglednica XXVIII: Delež ekstrakcije etopozida iz papirčka Whatman 903

	c µg/ml	A eto	A treo	A/A	A/A*	izkoristek %	RSD %
QCL 1,5	1,49	74,9	389,3	0,192	0,194	49,9	2,47
QCL 1,5	1,49	78,2	392,2	0,199	0,201	48,1	
QCL 1,5	1,49	77,9	386,3	0,202	0,203	47,6	
povprečje				0,199	48,5		

QCM 5	4,98	237,9	402,2	0,591	0,594	47,6	1,58
QCM 5	4,98	241,2	399,9	0,603	0,605	46,7	
QCM 5	4,98	239,5	392,5	0,610	0,612	46,2	
povprečje				0,604	46,8		

QCH 17,5	17,6	859,6	380,0	2,26	2,26	42,8	1,62
QCH 17,5	17,6	835,0	379,4	2,20	2,19	44,0	
QCH 17,5	17,6	872,8	385,5	2,26	2,26	42,8	
povprečje				2,24	43,2		

A/A* preračunane vrednosti na koncentracije QC posušenih krvnih madežev

Nizek delež ekstrakcije le ni tako zaskrbljujoč, saj je le-ta konstanten in dobro ponovljiv ($RSD \leq 2,47\%$). Trudili smo se izboljšati delež ekstrakcije s podaljšanjem časa ultrazvočne kadičke ter s predhodno omogočitvijo posušenih krvnih madežev z vodo.

5.3.6.1 Podaljševanje časa ultrazvočne kadičke

S podaljšanjem časa ultrazvočne kadičke s 5 na 15 oziroma 30 minut smo želeli dvigniti odziv etopozida. Iz rezultatov podanih v preglednici XXIX je razvidno, da podaljševanje

časa ultrazvočne (UZ) kadičke ne vpliva na dvig temveč celo pripomore do minimalnega znižanja odziva etopozida. Je pa prav tako odgovoren za dvig odziva moteče koelucije.

Preglednica XXIX: Vpliv podaljševanja časa ultrazvočne kadičke na odziv etopozida

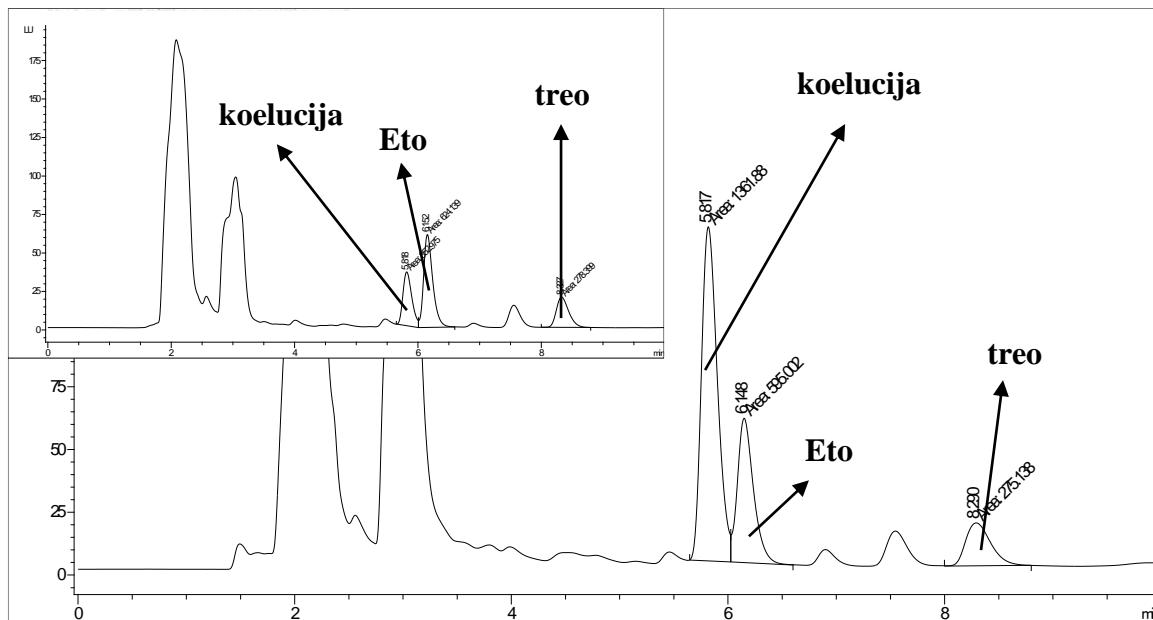
c µg/ml	čas UZ kadičke (min)	A eto	A treo	A koelucija
0	5	0	272,4	62,3
0	30	0	280,8	116,0
25	5	624,1	278,4	353,0
25	15	593,5	281,9	440,6
25	30	544,6	278,5	206,2

5.3.6.2 Omočitev obrezanih posušenih krvnih madežev z vodo

V primeru predhodnega omočenja posušenih krvnih madežev z vodo, je prišlo do večje obarvanosti raztopin ter do nastanka oborine v času ekstrakcije. Posedanje nastale oborine smo dosegli z 10 minutnim centrifugiranjem pri 5 °C. Kot je razvidno iz preglednice XXX z omočenjem nismo uspeli dvigniti odziva etopozida, smo pa močno dvignili odzive koelucije (slika 14) in ostalih motečih vrhov.

Preglednica XXX: Vpliv omočitve posušenih krvnih madežev na odziv etopozida

c µg/ml	čas UZ kadičke (min)	A eto	A treo	A koelucija
25	5 + omočitev	595,0	275,1	1361,9
25	30 + omočitev	631,3	303,1	794,0



Slika 14: Kromatograma vzorca DBS s koncentracijo 25 µg/ml (UZ = 5 minut) s predhodnim omočenjem in brez njega (pomanjšana slika)

Oba poizkusa s katerima smo želeli dvigniti delež ekstrakcije sta se izkazala za neuspešna, zato smo se odločili da zadržimo prvotne pogoje ekstrakcije zapisane pod točko 4.2.7.1.

5.3.7 Stabilnost etopozida

Pri testiranju stabilnosti smo posebno pozornost namenili postpreparativni stabilnosti vzorcev in dolgoročni stabilnosti posušenih krvnih madežev QCL in QCH.

5.3.7.1 Postpreparativna stabilnost

Preglednica XXXI prikazuje postpreparativno stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku pri temperaturi 5 °C in treh različnih časih (0h, 12h in 24h). Izračunali smo jo po *enačbi 7*, pri čemer nam razmerje odziva etopozida in IS v času 0 predstavlja 100 %.

$$\text{postpreparativna stabilnost (\%)} = \frac{A/A_{QC} (h)}{A/A_{QC} (0h)} \cdot 100 \quad \text{enačba 7}$$

Preglednica XXXI: Postpreparativna stabilnost vzorcev DBS - avtomatski vzorčevalnik na 5 °C

	c µg/ml	A eto	A treo	A/A	post preparativna stabilnost - avtomatski vzorčevalnik na 5 °C (%)
QCL 1,5 čas 0h	1,50	35,1	305,4	0,115	100
QCL 1,5 čas 12h	1,50	31,1	306,5	0,101	88,3
QCL 1,5 čas 24h	1,50	32,8	296,0	0,111	96,4
QCM 5 čas 0h	5,00	108,8	298,5	0,364	100
QCM 5 čas 12h	5,00	105,0	300,7	0,349	95,8
QCM 5 čas 24h	5,00	109,4	290,4	0,377	103
QCH 17,5 čas 0h	17,5	373,0	295,6	1,26	100
QCH 17,5 čas 12h	17,5	366,4	298,6	1,23	97,2
QCH 17,5 čas 24h	17,5	377,0	293,1	1,29	102

Sodeč po dobljenih rezultatih so vzorci DBS stabilni vsaj 24 ur pri shranjevanju na 5 °C, saj so vsi rezultati znotraj dopustnih ± 15 %.

5.3.7.2 Dolgoročna stabilnost

Posušene krvne madeže bolnikov smo pridobivali iz Univerzitetne Klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Zaradi časovne zakasnitve (tudi do 14 dni) pri možnosti izvedbe ekstrakcije posušenih krvnih madežev bolnikov smo želeli preveriti dolgoročno stabilnost etopozida na papirčku. Preglednica XXXIII nam prikazuje 4-tedensko stabilnost etopozida na papirčku pri treh različnih temperaturah shranjevanja (-20 °C, sobni temperaturi in 40

EVA KOKOT - Diplomska naloga

°C). Za izračun stabilnosti smo dobljene tedenske odzive etopozida delili s povprečno vrednostjo odzivov QC v času 0 (preglednica XXXII).

Preglednica XXXII: Odziv etopozida v času 0

	c µg/ml	A eto			povprečje
QCL 1,5	1,50	54,0	52,7	52,9	53,2
QCH 17,5	17,5	585,5	593,4	581,9	586,9

Preglednica XXXIII: Dolgoročna stabilnost etopozida na papirčku pri treh različnih temperaturah (40 °C, sobni temperaturi (RT) in -20 °C)

	c µg/ml	1. teden		2. teden		3. teden		4. teden	
		A eto	A/A* (%)						
-20 °C QCL 1,5	1,50	47,8	89,8	44,0	82,7	44,7	84,0	43,0	80,8
-20 °C QCL 1,5	1,50	45,9	86,3	42,9	80,6	45,9	86,3	44,1	82,9
-20 °C QCL 1,5	1,50	49,1	92,3	43,9	82,5	44,6	83,8	43,0	80,8
povprečje		47,6	89,5	43,6	82,0	45,1	84,7	43,4	81,5
-20 °C QCH 17,5	17,5	595,8	102	559,5	95,3	587,5	100	570,3	97,2
-20 °C QCH 17,5	17,5	630,2	107	574,7	97,9	574,0	97,8	551,9	94,0
-20 °C QCH 17,5	17,5	609,2	104	585,8	99,8	583,2	99,4	573,8	97,8
povprečje		611,7	104	573,3	97,7	581,6	99,1	565,3	96,3
RT QCL 1,5	1,50	49,1	92,3	47,9	90,0	49,7	93,4	48,5	91,2
RT QCL 1,5	1,50	51,7	97,2	47,6	89,5	49,8	93,6	48,0	90,2
RT QCL 1,5	1,50	49,6	93,2	48,4	91,0	46,4	87,2	50,5	94,9
povprečje		50,1	94,2	48,0	90,2	48,6	91,4	49,0	92,1
RT QCH 17,5	17,5	597,1	102	563,4	96,0	606,3	103	618,6	105
RT QCH 17,5	17,5	598,6	102	564,1	96,1	607,7	104	597,7	102
RT QCH 17,5	17,5	600,5	102	576,7	98,3	587,5	100	601,8	103
povprečje		598,7	102	568,1	96,8	600,5	102	606,0	103
40 °C QCL 1,5	1,50	53,0	99,6	52,5	98,7	59,0	111	51,4	96,6
40 °C QCL 1,5	1,50	51,9	97,6	52,8	99,2	53,0	99,6	53,6	101
40 °C QCL 1,5	1,50	55,0	103	59,0	111	49,8	93,6	53,9	101
povprečje		53,3	100	54,8	103	53,9	101	53,0	99,6
40 °C QCH 17,5	17,5	660,4	113	633,1	108	620,0	106	634,6	108
40 °C QCH 17,5	17,5	651,2	111	612,0	104	595,0	101	616,1	105
40 °C QCH 17,5	17,5	644,7	110	639,8	109	629,3	107	615,1	105
povprečje		652,1	111	628,3	107	614,8	105	621,9	106

A/A* (%) predstavlja razmerje med odzivom etopozida v času t in povprečno vrednostjo odzivov etopozida v času 0 v procentih

Iz literature (3) smo predvidevali, da bomo najvišje odzive Eto ter s tem povezan tudi najvišji delež ekstrakcije (recovery) dobili pri najnižji temperaturi -20 °C. Izkazalo se je, da to ne drži. Ugotovili smo, da je etopozid na papirčku najbolj stabilen pri najvišji temperaturi (40 °C), nato sobni temperaturi ter najmanj pri temperaturi -20 °C (preglednica XXXIII). Odzivi

QCL v primeru shranjevanja papirčka pri temperaturi -20 °C, z izjemo odzivov dobljenih 1. teden, padejo izven meja bioanalitične dopustnosti ± 15 %. Vsi ostali dobljeni rezultati so znotraj meja dopustnosti.

V preglednici lahko prav tako opazimo znatno višje odzive etopozida standardov za zagotavljanje kakovosti pri stabilnostni študiji kot jih imamo pri 3-dnevni validaciji. Razlog višjih odzivov je uporaba druge pipete (20 – 200 µl) pri pipetiranju ustrezne metanolne raztopine Eto v polno kri (točka 4.4.8.2).

5.4 UPORABA RAZVITE METODE ZA DOLOČANJE KONCENTRACIJ ETOPOZIDA NA BOLNIKIH

5.4.1 Vpliv hematokrita na koncentracije etopozida v krvnih vzorcih

Ker je v primeru različnih bolezni značilna zvišana ali znižana vrednost Ht v krvi, smo želeli preveriti ali spremenjen delež Ht vpliva na odziv etopozida v vzorcih DBS. Zanimali so nas odzivi etopozida pri vrednosti Ht 0,3; 0,6 in normalni vrednosti 0,4. Ujemanje razmerja smo izračunali s pomočjo *enacbe 8*, pri čemer nam je povprečna vrednost odzivov etopozida in IS pri vrednosti Ht 0,4 predstavljala 100 %.

$$ujemanje (\%) = \frac{A/A_{Ht}}{A/A_{Ht\ 0,4}} \cdot 100 \quad enacba\ 8$$

Preglednica XXXIV: Vpliv hematokrita na odziv etopozida

Ht	C $\mu\text{g}/\text{ml}$	Aeto	Atreo	A/A	povp. A/A	SD A/A	RSD	AA _i /AA ₄₀ (%)
0,3	QCL	26,8	366,1	0,0732	0,0740	0,00134	1,81	88,4
0,3	QCL	26,8	365,9	0,0732				
0,3	QCL	27,4	362,7	0,0755				
0,3	QCH	388,0	353,8	1,10	1,09	0,00839	0,772	93,5
0,3	QCH	397,8	367,3	1,08				
0,3	QCH	401,3	371,1	1,08				
0,4	QCL	32,2	380,6	0,0846	0,0837	0,00139	1,66	100
0,4	QCL	31,0	377,5	0,0821				
0,4	QCL	31,5	373,1	0,0844				
0,4	QCH	434,2	374,0	1,16	1,16	0,0265	2,27	100
0,4	QCH	436,3	383,6	1,14				
0,4	QCH	436,8	367,0	1,19				
0,6	QCL	32,8	377,5	0,0869	0,0897	0,00316	3,52	107
0,6	QCL	33,2	372,5	0,0891				
0,6	QCL	34,8	373,7	0,0931				
0,6	QCH	449,1	376,2	1,19	1,16	0,0365	3,13	100
0,6	QCH	466,0	414,8	1,12				
0,6	QCH	474,3	403,6	1,18				

Kot je razvidno iz preglednice XXXIV je odziv etopozida neodvisen od vrednosti hematokrita ($0,3 \leq \text{Ht} \leq 0,6$) v krvi. Vse izračunane vrednosti so znotraj meja dopustnosti ($\pm 15\%$).

5.4.2 Primerjava krvnih in plazemskih koncentracij etopozida pri bolnikih s pljučnim rakom

V preglednici so podani rezultati 2 bolnikov s pljučnim rakom v različnih krogih izvajanja kemoterapije. Razlaga označevanja realnih vzorcev je podana v preglednici II (točka 3.1).

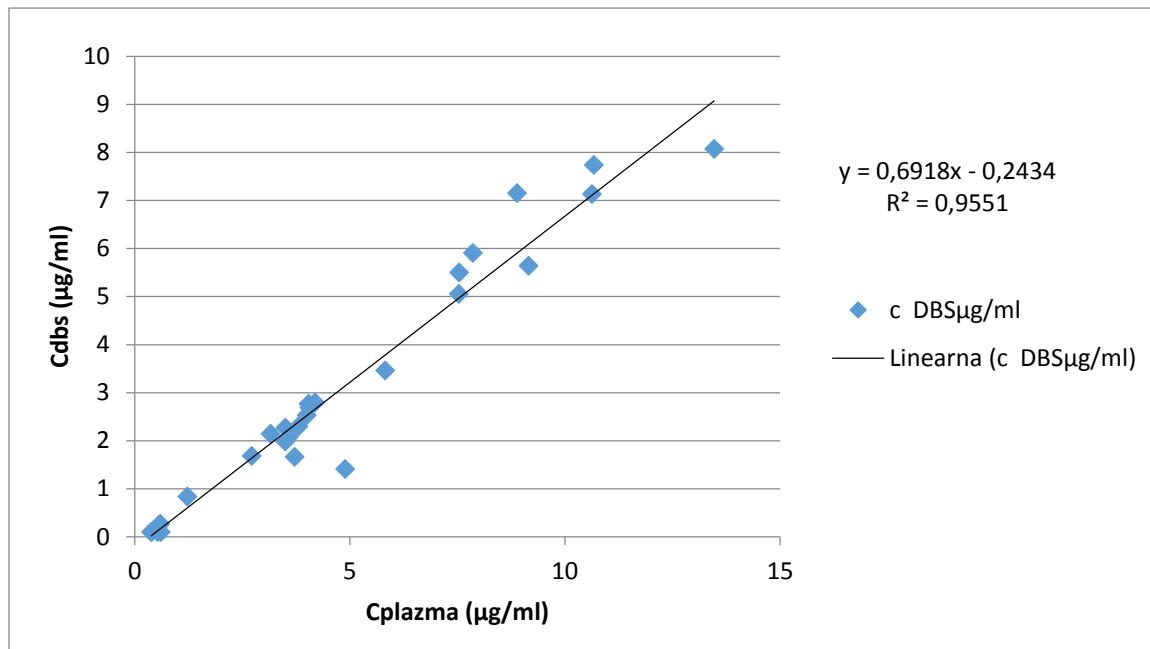
Preglednica XXXV: Koncentracija etopozida v polni krvi pri bolnikih s pljučnim rakom

oznaka	A eto	A treo	A/A	A/A
				c v kapljici krvi µg/ml
P19 5/1/1 28.1.14	187,4	347,4	0,539	7,16
P19 5/1/2 28.1.14	144,8	348,2	0,416	5,50
P19 5/1/3 28.1.14	37,7	343,5	0,110	1,41
P19 5/2/1 29.1.14	194,7	333,8	0,583	7,74
P19 5/2/2 29.1.14	152,7	342,1	0,446	5,91
P19 5/2/3 29.1.14	44,6	346,5	0,129	1,67
P19 5/3/1 30.1.14	202,9	333,6	0,608	8,08
P20 4/1/1 28.1.14	69,3	325,0	0,213	2,80
P20 4/1/2 28.1.14	52,5	328,5	0,160	2,08
P20 4/1/3 28.1.14	3,3	336,1	0,00982	pod LLOQ
P20 4/2/1 29.1.14	58,3	331,2	0,176	2,30
P20 4/2/2 29.1.14	50,6	331,9	0,152	1,98
P20 4/2/3 29.1.14	1,3	336,3	0,00387	pod LLOQ
P20 4/3/1 30.1.14	173,2	322,0	0,538	7,14
P20 5/1/1 18.2.14	119,7	404,2	0,296	5,05
P20 5/1/2 18.2.14	59,8	393,7	0,152	2,53
P20 5/1/3 18.2.14	8,4	405,8	0,0207	pod LLOQ
P20 5/2/1 19.2.14	83,1	405,0	0,205	3,46
P20 5/2/2 19.2.14	68,1	411,8	0,165	2,77
P20 5/2/3 19.2.14	9,5	419,7	0,0226	pod LLOQ
P20 5/3/1 20.2.14	55,0	402,1	0,137	2,27
P20 6/1/1 19.3.14	80,2	364,3	0,220	2,69
P20 6/1/2 19.3.14	63,5	362,3	0,175	2,15
P20 6/1/3 19.3.14	10,7	360,7	0,0297	pod LLOQ
P20 6/2/1 20.3.14	49,2	358,5	0,137	1,69
P20 6/2/2 20.3.14	24,1	358,3	0,0673	0,838
P20 6/2/3 20.3.14	11,7	361,2	0,0324	pod LLOQ
P20 6/3/1 21.3.14	163,5	352,7	0,464	5,64

Kot je razvidno iz preglednice XXXV nimamo neposredne povezave koncentracij etopozida med bolnikoma. Pri bolniku 19 (P19) lahko vidimo veliko višje koncentracije etopozida v krvi, zaradi česar je bil po 5. krogu kemoterapije izvzet iz klinične študije. Pri odzivih

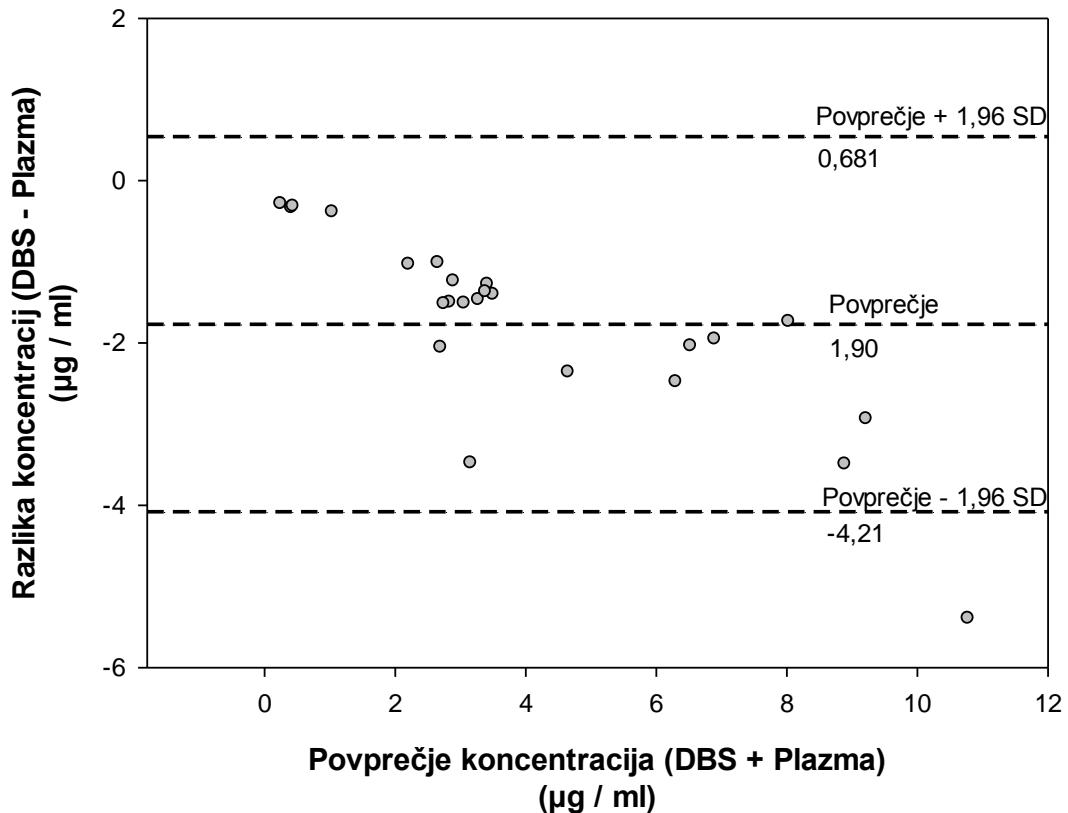
EVA KOKOT - Diplomska naloga

etopozida označenih z rumeno barvo koncentracije nimamo podane, saj je le-ta nižja od spodnje meje kvantifikacije ($0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ v kapljici krvi).



Slika 15: Primerjava plazemskih koncentracij etopozida ter koncentracij etopozida v polni krvi pri bolnikih s pljučnim rakom

Diagram na sliki 15 nam prikazuje dobro korelacijo med koncentracijo etopozida v plazmi in koncentracijo v polni krvi.



Slika 16: Bland-Altmanov diagram razlik metod določanja etopozida v plazemskih vzorcih in posušenih krvnih madežih bolnikov s pljučnim rakom

Z Bland Altman-ovim grafom smo želeli primerjati dobljene plazemske in krvne koncentracije etopozida pri bolnikih s pljučnim rakom. Kot je razvidno iz diagrama (slika 16) je le ena vrednost zunaj 95-odstotnih meja ujemanja. Iz česar lahko sklepamo, da obstaja dovolj veliko ujemanje med metodama določanja etopozida v plazmi in v posušenem krvnem madežu.

6 SKLEPI

V okviru diplomske naloge smo razvili in optimizirali analizno metodo za določanje krvnih koncentracij etopozida v posušenem krvnem madežu. Optimizirano metodo smo uporabili za določanje koncentracij etopozida v posušenih krvnih madežih bolnikov s pljučnim rakom.

Za uspešno separacijo etopozida in IS danzil-treonina iz vzorcev DBS smo uporabili na 50 °C segreto reverzno-fazno kolono Phenomedex Luna C18 (2) 100A 150 x 4,6 mm 3 µm s predkolono Phenomenex 4 x 3 mm C18. Za izvedbo analize smo injicirali 50 µl vzorca. Zaradi ne predolgo trajajoče analize (12 minut) smo se lahko poslužili konstantnega pretoka mobilne faze 0,7 ml/min. Kot mobilno fazo smo uporabili 33 % acetonitrila in 67 % fosfatnega pufra s pH 3. Odzive analitov smo detektirali pri Ex 230 nm in Em 330 nm.

Metodo smo validirali po smernicah Ameriške agencije za hrano in zdravila. Za zagotovitev ustreznosti metode smo preverili območje linearnosti, točnost, ponovljivost, mejo kvantifikacije, delež ekstrakcije etopozida iz papirčka, selektivnost ter stabilnost. Uspešno smo dokazali linearnost metode v območju 0,5 µg/ml in 20 µg/ml. Tudi ostali validacijski parametri so bili znotraj dovoljenih mej: točnost (vsi rezultati znotraj ± 15 %), znotrajdnevna ponovljivost ($RSD \leq 5,18\%$), meddnevna ponovljivost ($RSD \leq 10,1\%$), delež ekstrakcije etopozida iz papirčka med 43 in 48 % ($RSD \leq 2,47\%$), meja kvantifikacije pri 0,5 µg/ml ($RSD = 2,47\%$), ustrezna selektivnost in postpreparativna stabilnost vzorcev po 24 urah v avtomatskem vzorčevalniku pri temperaturi 5 °C (vsi rezultati znotraj ± 15 %). Pri izvajanju dolgoročne stabilnostne študije smo ugotovili, da je etopozid na papirčku stabilnejši pri višjih temperaturah. Zaradi česar smo najvišji delež ekstrakcije (recovery) dobili pri shranjevanju papirčka s posušenimi krvnimi madeži pri temperaturi 40 °C. Prav tako smo prišli do spoznanja da vrednost hematokrita v območju 0,3 in 0,6 ne vpliva na odziv etopozida, kar je izredno pomembno pri različnih boleznih, kjer je značilna povišana ali znižana vrednost Ht.

Na koncu smo s pomočjo Bland Altmanovega diagrama primerjali novo razvito metodo določanja etopozida v posušenih krvnih madežih bolnikov z že razvito metodo določevanja etopozida v plazemskih vzorcih bolnikov. Ugotovili smo dobro ujemanje obeh metod.

7 LITERATURA

1. Jason Gonzalez, Monte S. Willis, MD, PhD; Robert Guthrie, MD, PhD; LabMedicine, 2009; 40: 748-749.
2. Sharon A. Cassol, Stanley Read, Bruce G. Weniger, Perry Gomez, Normand Lapointe, Chin-Yih Ou, P George Babu: Dried Blood Spots Collected on Filter Paper: An International Resource for the Diagnosis and Genetic Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type-1; Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro;1996 May-Jun; 91(3): 351-358
3. Wenkui Li, Francis L. S. Tse: Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules; Biomedical Chromatography, 2010; 24: 49–65
4. S. P. Parker, W. D. Cubitt: The use of the dried blood spots sample in epidemiological studies; Journal List, J Clin Pathol; 1999 September; 52(9): 633–639
5. la Marca G., Malvagia S., Filippi L., Fiorini P., Innocenti M., Luceri F., Pieraccini G., Moneti G., Francese S., Dani F. R., Guerrini R.: Rapid assay of topiramate in dried blood spots by a new liquid chromatography-tandem mass spectrometric method; J Pharm Biomed Anal. 2008 Dec 15; 48(5): 1392-1396.
6. la Marca G., Malvagia S., Filippi L., Innocenti M., Rosati A., Falchi M., Pellarani S., Moneti G., Guerrini R.: Rapid assay of rufinamide in dried blood spots by a new liquid chromatography–tandem mass spectrometric method; J Pharm Biomed Anal. 2011 Jan 5; 54(1): 192-197
7. Shah N. M., Hawwa A. F., Millership J. S., Collier P. S., McElnay J. C.: A Simple Dried Blood Spot Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Lamotrigine; J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2013 Apr 1; 923-924: 65-73
8. Hatami M., Karimnia E., Farhadi K.: Determination of salmeterol in dried blood spots using an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC; J Pharm Biomed Anal. 2013 Nov; 85: 283-287
9. Zheng J. H., Guida L. A., Rower C., Castillo-Mancilla J., Meditz A., Klein B., Kerr B. J., Langness J., Bushman L., Kiser J., Anderson P. L.: Quantitation of Tenofovir and Emtricitabine in Dried Blood Spots (DBS) with LC-MS/MS; J Pharm Biomed Anal. 2014 Jan; 88: 144-151

EVA KOKOT - Diplomska naloga

10. Barfield M., Spooner N., Lad R., Parry S., Fowles S.: Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies; *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008 Jul 1; 870(1): 32-37
11. Déglon J., Thomas A., Daali Y., Lauer E., Samer C., Desmeules J., Dayer P., Mangin P., Staub C.: Automated system for on-line desorption of dried blood spots applied to LC/MS/MS pharmacokinetic study of flurbiprofen and its metabolite; *J Pharm Biomed Anal.* 2011 Jan 25; 54(2): 359-367
12. Liang X., Li Y., Barfield M., Ji Q. C.: Study of dried blood spots technique for the determination of dextromethorphan and its metabolite dextrorphan in human whole blood by LC-MS/MS; *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009 Mar 15; 877(8-9): 799-806
13. Hoogtanders K., van der Heijden J., Christiaans M., Edelbroek P., van Hooff J. P., Stolk L. M.: Therapeutic drug monitoring of tacrolimus with the dried blood spot method; *J Pharm Biomed Anal.* 2007 Jul 27; 44(3): 658-664
14. van der Heijden J., de Beer Y., Hoogtanders K., Christiaans M., de Jong G. J., Neef C., Stolk L.: Therapeutic drug monitoring of everolimus using the dried blood spot method in combination with liquid chromatography-mass spectrometry; *J Pharm Biomed Anal.* 2009 Nov 1; 50(4): 664-670
15. Aburuz S., Millership J., McElnay J.: Dried blood spot liquid chromatography assay for therapeutic drug monitoring of metformin; *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 Mar 7; 832(2): 202-207. Epub 2006 Jan 30.
16. Timmerman P., White S., Cobb Z., de Vries R., Thomas E., van Baar B.: Update of the EBF recommendation for the use of DBS in regulated bioanalysis integrating the conclusions from the EBF DBS microsampling consortium; *Bioanalysis,* 2013 Sep; 5(17): 2129-2136
17. Timmerman P., White S., Globig S., Lüdtke S., Brunet L., Smeraglia J.: EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots; *Bioanalysis;* 2011 Jul; 3(14): 1567-1575.
18. Mara Bresjanac, Marjan Rupnik: Patofiziologija s temelji fiziologije; 3. popravljena in dopolnjena izd. – Ljubljana : Inštitut za patološko fiziologijo, 2002
<http://www.mf.uni-lj.si>

mb.si/mf/instituti/fizio/Fizioterapija/knjiga%20Fiziologija%20in%20patofiziologija.pdf dostopano 2.12.2013

19. De Vries R., Barfield M., van de Merbel N., Schmid B., Siethoff C., Ortiz J., Verheij E., van Baar B., Cobb Z., Timmerman P.: The effect of hematocrit on bioanalysis of DBS: results from EBF DBS-microsampling consortium; Bioanalysis; 2013 Sep; 5(17): 2147-2160.
20. Van Baar B. L., Verhaeghe T., Heudi O., Rohde M., Wood S., Wieling J., de Vries R., White S., Cobb Z., Timmerman P.: IS addition in bioanalysis of DBS: results from the EBF DBS-microsampling consortium; Bioanalysis; 2013 Sep; 5(17): 2137-2145
21. Emmons G., Rowland M.: Pharmacokinetics considerations as to when to use dried spot sampling; Bioanalysis, 2010 Nov; 2(11): 1791-1796
22. Rowland M., Emmons G.T.: Use of Dried Blood Spots in Drug Development: Pharmacokinetic; AAPS J.; 2010 Sep; 12(3): 290-293
23. Toffoli G., Corona G., Basso B., Boiocchi M.: Pharmacokinetic optimisation of treatment with oral etoposide; Clin Pharmacokinet. 2004; 43(7): 441-466
24. <http://en.wikipedia.org/wiki/Etoposide> dostopano 17.3.2014
25. Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J., Sarkadi B.: The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity; Curr Drug Deliv. 2004 Jan; 1(1): 27-42
26. Rychlik B., Pułaski L., Sokal A., Soszyński M., Bartosz G.: Transport of organic anions by multidrug resistance-associated protein in the erythrocyte; Acta Biochim Pol. 2000; 47(3): 763-772
27. Kralj E., Žakelj S., Trontelj J., Berginc K., Pajič T., Preložnik Zupan I., Černelč P., Ostank B., Podgornik H., Marc J., Kristl A.: Določanje privzema imatiniba v levkocite kot napovedni dejavnik uspešnosti zdravljenja KML; Zdrav. Vestn. Supl. november 2012, Letnik 81: 188-196
28. Clinton F. Stewart, Ronald A. Fleming, Susan G. Arbuck, and William E. Evans: Prospective Evaluation of a Model for Predicting Etoposide Plasma Protein Binding in Cancer Patients; Cancer Res. 1990 Nov 1; 50(21): 6854-6856
29. Vepesid 100 mg mehke kapsule, Odobren v Sloveniji 15.3.2011.
30. <http://www.sigmaldrich.com/catalog/product/sigma/39220?lang=en®ion=SI> dostopano 8.5.2014

EVA KOKOT - Diplomska naloga

31. Guideline for Industry Bioanalytical Method Validation U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administtration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veteronary Medicine (CVM), maj 2001
32. http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/sl/GELifeSciences/products/AlternativeProductStructure_21577/ dostopano 3.4.2014
33. http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/sl/GELifeSciences/products/AlternativeProductStructure_18076/ dostopano 3.4.2014