

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA TRATNIK

**DOLOČANJE VEZAVE MOKSIFLOKSACINA NA PLAZEMSKÉ PROTEINE**

**DETERMINATION OF MOXIFLOXACIN BINDING TO PLASMA PROTEINS**

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos.

### **Zahvala**

Ob zaključku študija bi se rada zahvalila mentorici doc. dr. Mojci Kerec Kos, ki me je usmerjala pri nastajanju magistrske naloge. Hvala za vse nasvete, potrpežljivost in strokovno pomoč, ki ste jih delili z mano.

Hvala tudi ostalim s Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi kakor koli pomagali pri delu, še posebej Greti Cof za nesebično pomoč, ki mi jo je nudila pri uporabi in optimizaciji HPLC metode ter zbiranju podatkov. In hvala Juriju Trontlju za nasvet, ki je pripomogel k temu, da je šlo raziskovalno delo v pravo smer.

Zahvaliti se želim tudi družini, ki me je med celotnim študijem spodbujala in mi stala ob strani. Posebna zahvala pa gre tudi Bojanu, ki mi je tekom magistrskega dela dajal moč in oporo tam, kjer sem jo potrebovala.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos.

Vesna Tratnik

### **Komisija za zagovor**

Predsednik: prof. dr. Darko Černe

Mentorica: doc. dr. Mojca Kerec Kos

Član: doc. dr. Janez Ilaš

## Kazalo vsebine

<b>POVZETEK</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>	<b>VII</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 VEZAVA ZDRAVILNIH UČINKOVIN NA PLAZEMSKÉ PROTEINE	1
1.1.1 Plazemski prenašalni proteini	2
1.1.2 Pomen vezave ZU na plazemske proteine	3
1.1.3 Metode za določanje vezave ZU na plazemske proteine	4
1.1.3.1 Ravnotežna dializa	5
1.1.3.2 Ultracentrifugiranje	6
1.2 MOKSIFLOKSACIN	7
1.3 DOLOČANJE MOX V VZORCIH	9
<b>2 NAČRT ZA DELO</b>	<b>11</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>12</b>
3.1 MATERIALI	12
3.1.1 Biološki material	12
3.1.2 Standard	12
3.1.3 Reagenti in topila	12
3.1.4 Naprave in pribor	12
3.2 METODE	14
3.2.1 Priprava pufrov ter osnovnih in standardnih raztopin	14
3.2.2 Določanje vezave moksifloksacina na albumine z ultracentrifugiranjem	16
3.2.3 Določanje vezave moksifloksacina na plazemske proteine z ravnotežno dializo	16
3.2.4 Ekstrakcija plazemskih oz. albuminskih vzorcev	19
3.2.4.1 Razvijanje ekstrakcijskega postopka	19
3.2.5 Razvoj analiznih metod	20
3.2.5.1 Priprava umeritvene premice	21
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>24</b>
4.1 RAZVOJ HPLC ANALIZNE METODE	24
4.1.1 Priprava umeritvenih premic	25
4.1.1.1 Umeritvena premica v FP <sub>20</sub>	25
4.1.1.2 Umeritvena premica v ALB <sub>40</sub>	26
4.1.1.3 Umeritvena premica v PBS	27
4.1.1.4 Umeritvena premica v »mediju«	28
4.2 OPTIMIZACIJA POGOJEV EKSTRAKCIJE	30

4.3	DOLOČANJE VEZAVE MOX Z UC	35
4.4	DOLOČANJE VEZAVE MOX Z RD	39
4.4.1	Stabilnost MOX in vezava na dializni sistem	39
4.4.2	Odstotek vezave MOX po 2, 4, 6 in 22 urah	41
4.4.3	Odstotek vezave MOX po 22 urah pri 22 in 37 °C	44
4.4.4	Odstotek vezave MOX pri različnih koncentracijah albuminov	46
4.4.5	Odstotek vezave MOX na plazemske proteine	49
5	<b>SKLEP</b>	<b>53</b>
6	<b>LITERATURA</b>	<b>54</b>

## Kazalo slik

Slika 1:	Struktura moksifloksacina.	7
Slika 2:	Kromatogram standarda MOX s koncentracijo 5 mg/L, pridobljen s HPLC metodo 1. Retencijski čas MOX je 8,100 min.	24
Slika 3:	Kromatogram standarda MOX s koncentracijo 2,5 mg/L, pridobljen s HPLC metodo 2. Retencijski čas MOX je 3,813 min.	24
Slika 4:	Primer umeritvene premice v $FP_{20}$ .	25
Slika 5:	Primer umeritvene premice v $ALB_{40}$ .	26
Slika 6:	Umeritvena premica v PBS.	27
Slika 7:	Primer umeritvene premice v »mediju«.	28
Slika 8:	Odzivi MOX v odvisnosti od volumnov plazemskega vzorca (PV) in fosfatnega pufra (FP).	30
Slika 9:	Umeritvene premice MOX v odvisnosti od količine NaOH, uporabljene pri ekstrakciji.	32
Slika 10:	Odstotek vezave MOX na $ALB_{40}$ v odvisnosti od časa RD.	44
Slika 11:	Odstotek vezave MOX na $ALB_{40}$ pri RD pri 22 in 37 °C.	46
Slika 12:	Odstotek vezave MOX na $ALB_{25}$ , $ALB_{40}$ in $ALB_{50}$ po 22 urah RD pri 37 °C.	49
Slika 13:	Primerjava odstotka vezave MOX med plazemskimi in albuminskimi vzorci po 22-urni RD, določena pri 37 °C in 22 °C.	52

## Povzetek

V magistrski nalogi smo določevali odstotek vezave moksifloksacina na plazemske proteine. Moksifloksacin je protimikrobna zdravilna učinkovina, ki spada v skupino fluorokinolonskih kemoterapevtikov. Ima širok spekter delovanja. Peroralno se uporablja predvsem za okužbe dihalnega trakta, v obliki kapljic za oči pa za gnojni konjunktivitis.

Za določanje vezave učinkovin na plazemske proteine obstajajo različne metode. Mi smo jo določali z ultracentrifugiranjem in ravnotežno dializo. Vezavo smo določali pri različnih koncentracijah moksifloksacina v plazmi oz. albuminih različne koncentracije, pri tem pa spreminjali parametre metode. Pri ultracentrifugiranju smo spreminjali čas centrifugiranja, pri ravnotežni dializi pa poleg časa še temperaturo dializiranja. Zanimalo nas je, ali so odstotki vezave moksifloksacina na plazemske proteine pri različnih pogojih določanja primerljivi. Plazemske oz. albuminske vzorce moksifloksacina smo po končanem ultracentrifugiranju oz. ravnotežni dializi ekstrahirali z diklorometanom, koncentracijo prostega moksifloksacina pa določali s HPLC-UV analizo metodo.

Pri ultracentrifugiranju smo ugotovili, da je ravnotežje vezave doseženo po 4 urah centrifugiranja pri 30.000 obratih/min in 22 °C. S to metodo nismo uspeli določiti pravega odstotka vezave moksifloksacina na albumine oz. plazemske proteine. Najverjetneje je bila težava v umeritveni premici, ki bi jo morali pripraviti v mediju z enakim pH kot so ga imeli vzorci moksifloksacina, kar pa z ultracentrifugiranjem nismo uspeli. Pri ravnotežni dializi je nespecifična vezava učinkovine na dializni sistem znašala 10 %. Pri 37 °C se je ravnotežje pri dializi vzpostavilo v 22 urah. Obseg vezave moksifloksacina na albumine in celokupne plazemske proteine je bil pri teh pogojih primerljiv in je znašal 40 – 42 %. Z naraščanjem koncentracije moksifloksacina je odstotek vezave na plazemske proteine v splošnem padal. Pri višji koncentraciji albuminov je bil odstotek vezave učinkovine nanje večji. Pri 22 °C se v 22 urah ravnotežje še ni vzpostavilo.

## Ključne besede

Vezava na plazemske proteine, moksifloksacin, ultracentrifugiranje, ravnotežna dializa.

## **Abstract**

The aim of our work was to determine the extent of plasma protein binding of moxifloxacin. Moxifloxacin is a fluoroquinolone with wide antimicrobial activity. Orally it is usually used for infections of respiratory tract. Eye drops are used for conjunctivitis.

There are a lot of methods for determination of drug binding to plasma proteins. We used ultracentrifugation and equilibrium dialysis. After altering method parameters we determined the plasma protein binding for different concentrations of moxifloxacin in plasma and different concentrations of albumin solutions. By ultracentrifugation we changed time of centrifugation and by equilibrium dialysis we changed time and temperature of dialysis. We aimed to determine if the extent of plasma protein binding of moxifloxacin at different experimental conditions is comparable. After ultracentrifugation or equilibrium dialysis we used dichloromethane for extraction of plasma or albumin samples of moxifloxacin. The free drug concentration was determined by HPLC-UV analytical method.

By ultracentrifugation the equilibrium was reached in 4 hours (30000 rpm, 22 °C). We could not determine the real extent of plasma protein binding of moxifloxacin by this method. Probably the standards for calibration curve were not prepared correctly. They should be prepared in medium with the same pH as samples with moxifloxacin, which we could not achieve by ultracentrifugation. By equilibrium dialysis there was 10 % of nonspecific drug binding to dialysis system. The equilibrium of dialyzing reestablished in 22 hours at 37 °C. At these conditions the extent of moxifloxacin binding to albumin or total plasma proteins was comparable, being 40 – 42 %. At higher drug concentrations the extent of plasma protein binding generally decreased, while higher concentrations of albumin increased moxifloxacin binding to albumin. At 22 °C the equilibrium of dialyzing was not reached in 22 hours.

## **Key words**

Plasma protein binding, moxifloxacin, ultracentrifugation, equilibrium dialysis.

## Seznam okrajšav

ALB<sub>25</sub> – Raztopina albuminov s koncentracijo 25 g/L

ALB<sub>40</sub> – Raztopina albuminov s koncentracijo 40 g/L

ALB<sub>50</sub> – Raztopina albuminov s koncentracijo 50 g/L

C<sub>b</sub> – Koncentracija vezane učinkovine

C<sub>f</sub> – Koncentracija proste učinkovine

C<sub>tot</sub> – Celokupna koncentracija učinkovine

FKK – Fluorokinolonski kemoterapevtiki

FP<sub>20</sub> – 0,02 M fosfatni pufer s pH = 3

FP<sub>50</sub> – 0,05 M fosfatni pufer s pH = 3

HPLC – Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

KV – Koeficient variacije

MF – Mobilna faza

MOX – Moksifloksacin

PBS – Izotonični fosfatni pufer s pH = 7,4

RD – Ravnotežna dializa

R<sup>2</sup> – Determinacijski koeficient

SD – Standardna deviacija

UC – Ultracentrifugiranje

ZU – Zdravilna učinkovina

# 1 Uvod

## 1.1 Vezava zdravilnih učinkovin na plazemske proteine

Zdravilno učinkovino (ZU) lahko v organizem vnesemo na različne načine. Najpogosteje gre za peroralno aplikacijo, kjer zdravilo zaužijemo skozi usta in se ZU absorbira iz prebavnega trakta v kri. Večina ZU je v plazmi slabo topnih, zato po krvi krožijo vezane na prenašalne makromolekule, kot so albumini,  $\alpha$ 1-kisli glikoprotein in lipoproteini (1). Na prenašalne proteine je vezan le del ZU, preostali del pa je raztopljen v plazmi in predstavlja prosto ZU. Le v prosti obliki lahko ZU pasivno prehaja čez kapilare in celične stene v tkiva in do tarčnega mesta. Ko pride do tarčnega mesta, povzroči terapevtski učinek. Lahko pa se veže tudi drugam, kar povzroči neželene učinke (2). ZU, ki je v plazmi vezana na makromolekulo, predstavlja veliko strukturo, ki ne more prehajati membran in je zaradi tega farmakološko neaktivna. Vezava na proteine je lahko ireverzibilna, kjer se med ZU in proteinom ustvarijo močne kovalentne vezi in ob visokih odmerkih ZU lahko to privede do toksičnih učinkov. Vendar gre ponavadi za bolj varno, reverzibilno vezavo, ko se ZU veže na proteine s šibkimi vodikovimi, hidrofobnimi ali van der Waalsovimi vezmi (1).

Na obseg vezave vpliva več dejavnikov. Odvisen je od fizikalno-kemijskih lastnosti ZU in njene koncentracije v plazmi, če ima ZU nizko afinitetno konstanto. Pri ZU z nizko afinitetno konstanto je obseg vezave večji, če je plazemska koncentracija ZU nižja, to pa je takrat, ko se (lipofilna) ZU kopiči v maščobnem tkivu, se ZU močno veže na tkivne proteine ali je koncentracija plazemskih proteinov nizka. Na obseg vezave vpliva tudi afiniteta med plazemskim proteinom in ZU, ki jo določa afinitetna konstanta. Večja kot je slednja, večji je odstotek vezave ZU na protein (1).

Večina plazemskih proteinov se sintetizira v jetrih. Pri bolnikih, ki imajo bolezen jeter, npr. jetrno fibrozo ali hepatitis B ali C, je zaradi okvarjenih hepatocitov spremenjena sinteza proteinov. Posledično se zaradi spremenjene strukture proteina spremeni tudi afinitetna konstanta (3). Vezava se zmanjša, če so hkrati prisotne druge učinkovine, ki zasedajo ista vezavna mesta na proteinu in se med seboj izpodrivajo. Vezava se zmanjša tudi pri ledvičnih bolnikih zaradi povečane izgube proteinov in jetrnih bolnikih zaradi zmanjšane sinteze proteinov (1).



Na splošno ne moremo samo iz obsega vezave določiti farmakokinetičnih parametrov, kot so volumen porazdelitve, razpolovni čas itd. Med seboj lahko primerjamo npr. razpolovni čas ZU iz iste terapevtske skupine, ker so si po strukturi podobne med seboj. Velja, da če je obseg vezave majhen, lahko več proste ZU difundira v tkiva in se veže na tkivne proteine ali v maščevje. Če pride do tega, se volumen porazdelitve poveča. Kadar je volumen porazdelitve velik, je plazemska koncentracija ZU nizka in se zaradi tega ZU počasneje izloča iz telesa. Po drugi strani vpliva na izločanje tudi vezava ZU na plazemske proteine, saj je v primeru obsežne vezave malo proste ZU, ki bi bila izpostavljena razgradnji v hepatocitih ali glomerulni filtraciji v ledvicah. Torej velik volumen porazdelitve in obsežna vezava ZU na plazemske proteine podaljšata razpolovni čas učinkovine (1).

Pri nekaterih ZU je obseg vezave odvisen od odmerka zdravila. Kadar je kapaciteta prenašalnih proteinov majhna, se lahko zgodi, da pri visokem odmerku aplicirane ZU ta zasede vsa vezavna mesta proteinov in pride do njihovega nasičenja. Ob večanju odmerka se na proteine ne more vezati več učinkovine, zato je koncentracija proste oblike večja, odstotek vezave pa se zniža (1). Posledično se spremeni volumen porazdelitve, očistek in čas izločanja ZU. Farmakodinamični učinek se poveča in lahko pride do neželenih učinkov (2).

### **1.1.1 Plazemski prenašalni proteini**

V plazmi je prisotnih več kot petsto različnih proteinov z različnimi funkcijami. Ustvarjajo osmotski tlak, uravnavajo pH krvi, sodelujejo pri koagulaciji krvi in pri imunskem odzivu kot protitelesa (4). Normalno je v plazmi koncentracija proteinov med 60 in 80 g/L (5).

Od tega je približno 60 % albuminov, ki so pri odraslih v koncentraciji 35 – 55 g/L (1, 4). Albumini se sintetizirajo v jetrih. Njihov razpolovni čas je 17 – 18 dni (1). To so velike molekule s povprečno molsko maso 66300 g/mol (4). Albumini imajo v plazmi dve glavni funkciji. To sta regulacija osmotskega tlaka, ki zagotavlja ustrezne volumne tekočine v tkivih in vezava ter prenos netopnih snovi po krvi. Albumini prenašajo tako endogene kot eksogene spojine. Endogene snovi, ki jih prenašajo, so na primer hormoni, žolčne in maščobne kisline ter minerali. Eksogene snovi so ZU, ki se nanje vežejo reverzibilno in po krvi potujejo do tarčnih organov. Albumini jih ščitijo pred razgradnjo in poleg tega vplivajo na njihovo porazdelitev (2).

Nekatera fiziološka in patološka stanja lahko spremenijo koncentracijo albuminov v plazmi. Kadar njihova koncentracija pade pod 35 g/L, govorimo o hipoalbuminemiji (1). Razlogov zanjo je več, in sicer premajhen vnos aminokislin zaradi stradanja, nezadostna endogena sinteza albuminov v jetrih zaradi kroničnih jetrnih bolezni (ciroza) (5) oz. manjša dejavnost jeter pri starejših ljudeh (6), prevelika izguba albuminov pri nefrotskem sindromu in opeklinah ter prevelika razgradnja proteinov, če pride do travme s septo ali pri povečani aktivnosti ščitnice (1, 5). Hipoalbuminemija je lahko prisotna tudi pri nosečnicah zaradi povečanega volumna krvi (1).

Stanje, ko je plazemska koncentracija albuminov večja od 55 g/L, imenujemo hiperalbuminemija. Prisotna je pri nekaterih psihiatričnih motnjah (psihoza, shizofrenija) in zmanjšani aktivnosti ščitnice. Do nje pride tudi po naporni telesni obremenitvi (1) in pri dehidraciji, vendar pri slednji govorimo o relativni hiperalbuminemiji, saj je posledica zmanjšane serumskega volumna (4).

Če je prisotna hipoalbuminemija, se lahko obseg vezave ZU na albumine zmanjša (pri hiperalbuminemiji poveča). To pomeni, da bo v plazmi več proste ZU in bo njen farmakodinamični učinek večji, vendar se bo zaradi povišane koncentracije proste oblike ZU tudi hitreje izločala (1).

Pomemben prenašalni plazemski protein je tudi  $\alpha$ 1-kisli glikoprotein. V plazmi je v koncentraciji 0,4 – 1,0 g/L. Ker ima negativen naboj, prenaša le bazične ZU. Peroralni kontraceptivi in nefrotski sindrom zmanjšajo njegovo koncentracijo, medtem ko je povišana pri starejših ljudeh ter bolnikih s srčnim infarktom ali z revmatoidnim artritisom (1, 7).

### 1.1.2 Pomen vezave ZU na plazemske proteine

Vezava ZU na plazemske proteine pomembno vpliva na farmakokinetiko in farmakodinamiko ZU. Če sta v plazmi prisotni dve ZU, ki tekmujeta za ista vezavna mesta, se poveča koncentracija proste ZU z manjšo afinitetno konstanto do plazemskih proteinov, s tem pa se poveča tudi terapevtski učinek izpodrinjene ZU in možnost pojava toksičnosti (1). Do te teorije so prišli že v 60. letih prejšnjega stoletja, ko so na prostovoljcih izvajali raziskavo z varfarinom in s fenilbutazonom. Pokazalo se je, da se je ob sočasnem uživanju teh dveh ZU povišala plazemska koncentracija varfarina in posledično se je povečal protrombinski čas (8). Nekaj let kasneje so naredili *in vitro* poskus s tema dvema ZU, kjer

so dokazali, da fenilbutazon izpodrine varfarin z vezavnih mest na albuminih in da sprememba obsega vezave ZU na plazemske proteine vpliva na izražen učinek zdravila (9).

Veliko kasneje, leta 2002, sta raziskovalki Benet in Hoener ugotovili, da ta teorija, ki v *in vitro* sistemih deluje, za veliko ZU v organizmu nima večjega kliničnega pomena (10). Organizem je namreč odprt sistem z možnostjo izločanja snovi iz telesa. V primeru, da se koncentracija proste ZU v plazmi poveča, ker jo izpodrine z vezavnih mest druga ZU ali ker je koncentracija plazemskih proteinov zaradi bolezni zmanjšana, se ZU tudi hitreje izloča. Po peroralni aplikaciji je ZU izpostavljena metabolizmu prvega prehoda v jetrih še preden pride v sistemski krvni obtok. Obseg slednjega je večji, če je več učinkovine v nevezani obliki. Zmanjšana vezava ZU v sistemskem obtoku poveča ledvični in jetrni očistek. Zaradi teh dveh mehanizmov se koncentracija proste ZU relativno hitro povrne na prvotni nivo in celokupna plazemska koncentracija ZU se zmanjša (11).

Kljub vsemu je dobro vedeti, kakšen je obseg vezave pri določeni ZU, da se lahko prilagaja odmerek. Zaradi tega se obseg vezave določa novo odkritim ZU. Pomemben je tudi pri ZU z ozkim terapevtskim oknom (10).

### 1.1.3 Metode za določanje vezave ZU na plazemske proteine

Za določanje vezave ZU na plazemske proteine je bilo razvitih več metod. Večina se uporablja za *in vitro* določevanje, nekatere pa tudi za *in vivo* (7). Primerjalne študije so pokazale, da stopnja vezave, ki jo z izbrano metodo določimo, ni vedno enaka, kot če bi jo določevali z drugo metodo (12). Glede na lastnosti ZU, ki jo analiziramo, trajanja analize, enostavnosti meritev in cene aparatur se odločimo, katero metodo bomo izbrali (1). Najpogosteje se uporabljajo ravnotežna dializa (RD), ultrafiltracija in ultracentrifugiranje (UC). Delujejo tako, da ločijo vezano in nevezano obliko ZU, ki jih potem izmerimo in določimo obseg vezave na plazemske proteine (13).

Ultrafiltracija je hitra in poceni metoda, ki je tudi enostavna za uporabo. Uporablja se za laboratorijsko spremljanje terapevtskih koncentracij pri bolniku in za okvirno določanje vezave pri novo odkritih ZU (13). Slabost te metode je, da ne moremo zagotoviti konstantne temperature pri določevanju in da se ZU lahko adsorbira na filter, kar vpliva na rezultate meritev (12).

Mikrodializa se uporablja za *in vivo* določanje vezane frakcije ZU v plazmi, drugih telesnih tekočinah ali organih, kar je njena glavna prednost pred ostalimi metodami. Zaradi

invazivnosti metode njena uporaba ni razširjena, saj se mikrodializna sonda kirurško vstavi v žilo ali tkivo, kjer želimo določevati koncentracijo vezane ZU (7).

### 1.1.3.1 Ravnotežna dializa

RD je bila pred dvajsetimi leti najbolj pogosto uporabljena metoda za določanje vezave ZU na plazemske proteine v *in vitro* študijah (7). Sedaj so prišle v ospredje novejšie metode z izboljšavami, vendar se RD še vedno uporablja (13). Dializna celica je sestavljena iz dveh komor z enakim volumnom, ki ju ločuje polprepustna membrana (7). V eno komoro damo plazmo ali raztopino plazemskih proteinov, ki vsebujejo ZU, v drugo komoro damo pufer. Pore membrane so tako majhne, da prosta ZU lahko prehaja preko nje, proteini in vezana ZU pa ne (13). Dializno celico inkubiramo pri temperaturi 37 °C, dokler se ne vzpostavi ravnotežje (7). Pri ZU z visoko molekularno maso in tistih, ki se močno vežejo na plazemske proteine, traja dlje časa, da se vzpostavi ravnotežje. Ta čas skrajšamo, če dializno celico rahlo tresemo (13).

V ravnotežju je koncentracija proste ZU na obeh straneh membrane enaka, medtem ko vezana ZU ostane v komori s proteini (13). Vzorce poberejo z obeh strani. V pufru določimo koncentracijo proste ZU ( $c_f$ ), v plazmi pa celokupno koncentracijo ZU ( $c_{tot}$ ). Koncentracijo vezane ZU ( $c_b$ ) izračunamo po enačbi:  $c_b = c_{tot} - c_f$ . Obseg vezave je enak kvocientu  $c_b / c_{tot}$  (7).

RD je enostavna za uporabo in daje bolj zanesljive rezultate od ultrafiltracije. Proces je temperaturno kontroliran. Dializne celice so cenovno dostopne. Kljub tem prednostim ima metoda kar nekaj slabosti. Mednje spadajo:

- čas do vzpostavitve ravnotežja;
- razpad termolabilnih ZU;
- nespecifična vezava ZU na dializne celice in polprepustno membrano – manjša je, če je dializni sistem iz teflona. Pri računanju jo moramo upoštevati, kar naredimo tako, da po vzpostavitvi ravnotežja vzorce jemljemo iz obeh komor;
- razredčitev plazemskih proteinov (12) – do tega pride, kadar koloidni osmotski tlak proteinov povzroči premik tekočine s puferne na proteinsko stran. Ta učinek se pojavi, kadar dializiranje traja več kot štiri ure. Preprečimo ga npr. tako, da pufru dodamo dekstran;
- Donnanov efekt – zgodi se zaradi zahteve po električni nevtralnosti na obeh straneh membrane ter zahteve po izenačitvi kemijskih potencialov za vse snovi,

ki lahko prehajajo membrano. Do tega pojava pride, ko vsaj ena vrsta nabitih delcev (ioni ali ionizirane molekule) ne more prehajati prek polprepustne membrane. Pojavlja se pri ioniziranih ZU, ki imajo majhno afiniteto do plazemskih proteinov. Zmanjšamo ga, če povečamo koncentracijo elektrolitov v dializnem pufru;

- uhajanje proteinov prek polprepustne membrane – do tega pride, če je membrana poškodovana. Posledica tega je, da v puferskem vzorcu izmerimo višjo koncentracijo (proste) ZU in sklepamo na manjšo vezavo ZU na proteine (13).

Slabosti, ki se lahko pojavijo med določanjem vezave ZU na plazemske proteine, moramo poznati in jih upoštevati pri računanju parametrov vezave ali jih čim bolj odpraviti že med dializo (13).

### 1.1.3.2 Ultracentrifugiranje

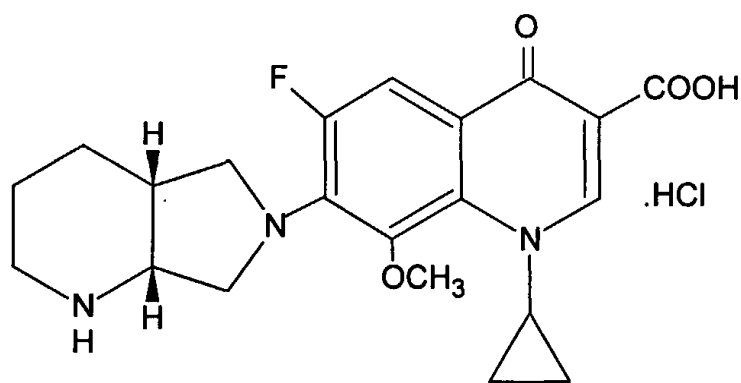
Metoda ultracentrifugiranja (UC) se je za določanje vezave ZU na plazemske proteine začela uporabljati kasneje kot RD. Medtem ko ultrafiltracija, RD in mikrodializa uporabljajo za ločevanje vezane in proste ZU polprepustno membrano, to pri UC dosežemo s pomočjo visokih gravitacijskih pospeškov (npr.  $600.000 \times g$ ). Pri večji hitrosti centrifugiranja se vezana in prosta ZU hitreje in bolje ločita. Pri UC se uporabljajo posebne centrifugirke, ki so odporne na tako visoke gravitacijske pospeške. Vanje damo plazemski ali albuminski vzorec z ZU in jih položimo v ultracentrifugo. Po centrifugiranju je na dnu centrifugirke viden sediment, ki ga sestavljajo plazemski proteini, HDL, LDL in vezana ZU. Supernatant je sestavljen iz dveh slojev. Na vrhu plava lipidni flotat, sestavljen iz hilomikronov in VLDL, ki s prostim očesom ni zaznaven. V spodnjem sloju pa se nahaja nevezana ZU (13).

Med centrifugiranjem je temperatura konstantna, npr.  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Volumen vzorca je odvisen od velikosti centrifugirk in je lahko relativno majhen (1 mL ali manj). Donnanov efekt je manj izražen kot pri RD. Čas, ki je potreben za ločitev vezane in proste ZU, je daljši kot pri ultrafiltraciji, a krajši kot pri RD, ker ni potrebna vzpostavitev ravnotežja. Nespecifična vezava je manj izrazita kot pri membranskih metodah. Vendar pa ima UC tudi svoje slabosti. Ultracentrifuga je zelo draga. Hkrati lahko analiziramo le majhno število vzorcev. Med centrifugiranjem se pH dvigne s 7,4 na 7,8 – 8,0. Spodnji sloj supernatanta, kjer se nahaja prosta ZU, je kontaminiran s proteini in lipoproteini, zato

vzorca ne moremo dati direktno na analizo. Poleg tega pri ZU, ki se močno vežejo na proteine, lahko zaradi prisotnosti proteinov v supernatantu pride do velikih napak pri določanju obsega vezave. V tem primeru se namreč lahko tudi vezana ZU nahaja v supernatantu in posledično izmerimo več proste ZU in določimo manjši obseg vezave na plazemske proteine. Še en problem se lahko pojavi pri odvzemu supernatanta. Če se ZU veže na lipoproteine in če lipidni sloj pri odvzemu pretrgamo tako, da se pomeša s supernatantom, je v odvzetem alikvotu tudi del ZU, vezane na lipoproteine. Tudi tukaj izmerimo višjo navidezno koncentracijo proste ZU in izračunamo manjši obseg vezave (13). Poleg difuzije proteinov v supernatant lahko pride še do sedimentacije proste ZU, predvsem pri daljšem času UC. Pri tem izračunamo večjo vezavo, kot je v resnici. Leta 1985 so naredili raziskavo, v kateri so med sabo primerjali RD, ultrafiltracijo in UC za določanje vezave valprojske kisline na plazemske proteine. Ugotovili so, da je UC dalo najnižje odstotke vezave med temi metodami. Razlog je verjetno v tem, da je bil supernatant kontaminiran s proteini (14).

## 1.2 Moksifloksacin

Vezavo na plazemske proteine smo določali zdravilni učinkovini moksifloksacin (MOX) (slika 1).



Slika 1: Struktura moksifloksacina (15).

MOX je v Sloveniji registriran kot Avelox 400 mg filmsko obložene tablete, Avelox 400 mg / 250 mL raztopina za infundiranje in Vigamox 5 mg / mL raztopina za kapljice za oko (16). Uvrščamo ga v skupino fluorokinolonskih kemoterapevtikov (FKK). FKK so analogi nalidiksne kisline. Ostali FKK, ki so registrirani pri nas, so še ciprofloksacin, levofloksacin, norfloksacin in pefloksacin. Zgodnejši FKK delujejo predvsem na Gram negativne aerobne bakterije in se uporabljajo za okužbe spodnjega dela

urinarnega trakta. MOX spada med novejšje antibiotike te skupine. Literatura ga glede na spekter delovanja uvršča v tretjo (17) oz. v četrto generacijo. Napram zgodnejšim FKK močnejše deluje na Gram pozitivne aerobne bakterije. Poleg tega deluje še na klamidijo, mikoplazmo in legionelo (11).

Nekateri ga imenujejo kar respiratorni FKK, saj se pri sistemskem zdravljenju uporablja predvsem za okužbe dihalnih poti (11) – za okužbo obnosnih votlin, akutno poslabšanje kroničnega bronhitisa in pljučnico, pridobljeno v domačem okolju. Avelox ni zdravilo prvega izbora za okužbe dihalnih poti. Predpiše se lahko le, če antibiotiki prvega izbora niso primerni ali učinkoviti. Poleg tega se ne predpisuje nosečnicam, doječim materam in otrokom, mlajšim od 18 let. Indiciran je tudi za medenično vnetno bolezen, ne uporablja pa se za infekcije urinarnega trakta, ker se prek ledvic izloči le 35 % učinkovine, medtem ko se z žolčem oz. blatom izloči 61 % (18).

FKK delujejo baktericidno, ker zavirajo sintezo bakterijske DNA. Inhibirajo topoizomerozo II (DNA girazo) in topoizomerozo IV. DNA giraza pomaga pri zvijanju bakterijske DNA v dvojno vijačnico, ki je potrebna za normalno prepisovanje in podvajanje DNA. Poleg tega z zaviranjem topoizomeroze IV preprečijo ločitev podvojene kromosomske DNA pri delitvi bakterijske celice v hčerinski celici (11, 18).

Na MOX so nekateri mikroorganizmi odporni. Odpornost je lahko posledica točkovnih mutacij na tarčnem mestu ZU ali v zmanjšani prepustnosti bakterijske celične stene za ZU (11). Pogosto pa je rezistenca posledica mutacij v *mar* (multiple antibiotic resistance) in *qnr* (quinolone resistance) genskih sistemih, ki jo bakterije med seboj prenašajo prek plazmidov. Če se pojavi odpornost na enega izmed FKK, se ponavadi vzpostavi navzkrižna odpornost na vse FKK, ne pa tudi na druge antibiotike zaradi različnega mehanizma delovanja (17, 18).

Biološka uporabnost MOX po peroralni aplikaciji je 91 %. Absorpcija se zmanjša ob sočasnem jemanju dvo- in trivalentnih kationov, zato se odsvetuje jemanje antacidov, sukralfata in železovih ter cinkovih pripravkov dve uri pred in šest ur po zaužitju MOX. Kljub temu pa hrana, vključno z mlečnimi izdelki, nima večjega vpliva na učinek zdravila in se lahko uživa neodvisno od zdravila. Razpolovni čas MOX je 12 ur. Slednji je dovolj dolg, da se tablete odmerjajo enkrat dnevno. Priporočen odmerek je 400 mg enkrat na dan. Po enkratnem odmerku se najvišja koncentracija v plazmi pojavi pol do štiri ure po zaužitju in znaša 3,1 mg/L. Po večdnevnem jemanju se vzpostavi stacionarno stanje, kjer

plazemske koncentracije nihajo med 0,6 in 3,2 mg/L. Farmakokinetika MOX v terapevtskih odmerkih je linearna. V krvi se MOX veže na plazemske proteine, večinoma na albumine. Literatura navaja, da se nanje veže približno 40 do 42 % MOX in da v terapevtskem območju vezava ni odvisna od koncentracije ZU (18). MOX se izloča pretežno prek jeter, zato je kontraindiciran pri jetrnem popuščanju, medtem ko pri ledvičnem popuščanju odmerka ni treba prilagajati (11).

Pri sistemskem zdravljenju z MOX lahko pride do neželenih učinkov. Pri več kot 3 % bolnikov pride do prebavnih motenj, kot sta driska in slabost. Pogosto se pojavljajo tudi bruhanje, ustna ali vaginalna kandidoza, glavobol ali omotica ter podaljšanje intervala QT (t.j. zakasnelo prevajanje električnih signalov) pri ljudeh, ki imajo hipokaliemijo ali sočasno jemljejo zdravila, ki prav tako lahko podaljšajo QT interval (npr. antiaritmiki, triciklični antidepresivi, antipsihotiki) (18).

Pri zdravljenju z MOX se lahko pojavijo tudi resni neželeni učinki, ki vodijo celo do smrtnih izidov, vendar se le-ti izrazijo redko (pri manj kot 1 bolniku od 1000) ali zelo redko (pri manj kot 1 bolniku od 10000). Ti neželeni učinki so: anafilaktični šok, fulminantni hepatitis, ki lahko povzroči odpoved jeter, pojav mehurjev na koži (Stevens-Johnsonov sindrom), epileptični napadi, depresija, ki jo lahko spremljajo samomorilne misli in poskus samomora, vnetje in raztrganje kit (predvsem Ahilove tetive), odpoved ledvic, če je bolnik dehidriran, prehodna izguba vida in fotosenzitivne reakcije. Pediatrični populaciji se MOX ne predpisuje (18).

### **1.3 Določanje MOX v vzorcih**

Članki navajajo različne metode za določanje MOX v plazemskih vzorcih (19, 20, 21, 22). Največkrat gre za separacijsko metodo, sklopljeno z detektorjem, ki proizvaja signal, premo sorazmeren koncentraciji komponent v vzorcu. Separacijska metoda za določanje MOX je pogosto tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), ki je hitra metoda in enostavna za uporabo. Aparatura vsebuje črpalko, ki potiska mobilno fazo (MF) pod visokim tlakom. Tako se komponente hitreje ločijo med sabo. Deluje pri stalni temperaturi. Injektor injicira določen volumen vzorca na kolono. Še preden pride do nje, gre skozi predkolono, kjer se očisti morebitnih nečistot (npr. proteinov), ki bi lahko zamašile kolono. Vzorec potuje skozi kolono, v kateri so delci stacionarne faze. Delci so inertni, majhni in porozni. Ponavadi je stacionarna faza silikagel. Od velikosti in polarnosti



sestavin vzorca je odvisno, kdaj se bodo sprale s kolone oz. kakšen bo njihov retencijski čas. Retencijski čas je pri določenih pogojih za komponento vedno enak, zato ga lahko uporabimo za identifikacijo. Vzorec spiramo z MF, ki ima konstanten pretok. Njena sestava je lahko med ločevanjem enaka (izokratsko spiranje), lahko pa se s časom moč MF povečuje (gradientno spiranje), predvsem kadar imamo učinkovine z zelo dolgim retencijskim časom in širokim kromatografskim vrhom (4).

Kadar določujemo nepolarno učinkovino, lahko uporabimo nepolarno stacionarno fazo, kjer so na silikagel kovalentno vezane alkilne skupine. Pri tem so topila za MF polarna. Uporabljajo se acetonitril, metanol, voda ali pufer z določeno vrednostjo pH, kadar analit ionizira. Polarne komponente se izločijo najprej, nepolarni analit pa se v koloni zadrži dlje. To metodo imenujemo reverznofazna HPLC in smo jo uporabili tudi mi (4).

Ko se komponente vzorca sperejo s kolone, pridejo do detektorja. Detektorjev je več vrst. Pri določanju MOX lahko uporabimo masni spektrometer (20) ter fluorescenčni (21) in UV detektor (19, 22). Masni spektrometer poleg informacije o koncentraciji poda tudi informacijo o strukturi in molski masi analita (4). Detektor fluorescenčne svetlobe se lahko uporablja, kadar analit absorbira svetlobo pri obsevanju pri določeni valovni dolžini in jo nato oddaja pri višji valovni dolžini. Pri MOX lahko uporabimo tak detektor, ker ima MOX kinolonsko jedro, ki močno fluorescira pri valovni dolžini 460 nm (23). Določevanje je možno tudi z detektorjem UV svetlobe, ki meri absorbanco analita, ki je sorazmerna z njegovo koncentracijo. Merimo pri valovni dolžini, pri kateri analit najbolj absorbira, pri MOX je to pri 296 nm. Slabost UV detekcije pa je, da lahko vzorec vsebuje več komponent, ki absorbirajo pri isti valovni dolžini, zato je potrebno pomeriti še absorbanco slepega vzorca (19).

## **2 Načrt za delo**

MOX je protimikrobna učinkovina, ki se po literarnih podatkih veže na plazemske proteine 40 – 42 %. V magistrski nalogi bomo določali vezavo MOX na albumine in celokupne plazemske proteine, pri čemer bomo uporabili dve metodi, in sicer UC in RD. Zanima nas, ali dajeta metodi primerljive rezultate glede obsega vezave MOX na plazemske proteine. Pri obeh metodah bomo spreminjali koncentracijo učinkovine in albuminov ter parametre metod. Pri UC bomo spreminjali čas centrifugiranja, pri RD pa čas in temperaturo dialize. Hkrati bomo razvili še HPLC analizo metodo, s katero bomo lahko določali koncentracijo prostega MOX po končanem UC oz. RD.

## 3 Materiali in metode

### 3.1 Materiali

#### 3.1.1 Biološki material

Pri delu smo uporabljali plazmo, ki smo jo pridobili z Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, Ljubljana. Delali smo tudi z raztopino humanega albumina za infundiranje Alburnorm (Octapharma) s koncentracijo 200 g/L.

#### 3.1.2 Standard

Moksifloksacinijev klorid, 437,9 g/mol (Bayer AG, Leverkusen, Nemčija)

#### 3.1.3 Reagenti in topila

- Diklorometan,  $\geq 99,9$  % (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril,  $\geq 99,9$  %, za HPLC (Sigma-Aldrich)
- Metanol,  $\geq 99,9$  %, za HPLC (Sigma-Aldrich)
- Trietilamin,  $> 99$  %, za sintezo (Merck)
- Kalijev dihidrogenkarbonat, za analizo (Merck)
- Dinatrijev hidrogenkarbonat dodekahidrat, za analizo (Merck)
- Natrijev klorid, za analizo (Merck)
- Ultra čista voda, pridobljena na Fakulteti za farmacijo, UL z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore)
- Fosforjeva(V) kislina, 85 %, za analizo (Emsure)
- Puferske raztopine s pH 2, 4 in 7 (Panreac, Merck)
- Pripravljena raztopina 1M NaOH in 1 M HCl
  - Titrisol NaOH – raztopina za pripravo 1000 mL 1 M NaOH (Merck)
  - Titrisol HCl – raztopina za pripravo 1000 mL 1 M HCl (Merck)

#### 3.1.4 Naprave in pribor

- Steklovina: bučke, čaše, merilni valj, epruvete, presesalna buča, tehtič, inserti za vialo, vialo.

- Polavtomatske pipete: 20 – 200  $\mu\text{L}$ , 100 – 1000  $\mu\text{L}$ , 1 – 10 mL (Eppendorf research)
- Precizna tehtnica XP105 (Mettler Toledo)
- pH meter MA 5750 (Iskra)
- Elektromagnetno mešalo Rotamix 550 MMH (Tehtnica)
- Vodna vakuumaska črpalka (Sartorius)
- Celulozni acetatni filtri (Sartorius Stedim Biotech GmbH)
- Mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica)
- Hladilnik  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Gorenje)
- Centrifuga Eppendorf 5415 R (Eppendorf research)
- Sušilnik TurboVap (Zymark)
- Ultrazvočna kadička Bandelin Sonorex Digital 10 P (Schalltec)
- HPLC sistem Agilent technologies 1100 in 1200 series z UV detektorjem (Agilent technologies)
  - Koloni: Kromasil C<sub>8</sub>, 250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Phenomenex)  
Eurospher 100 C<sub>8</sub>, 250 mm x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Knauer)
  - Predkolona: C<sub>18</sub>, 4 x 3,0 mm (Phenomenex)
- Ultracentrifuga Sorvall WX Ultra Series (Thermo Scientific)
- Mikrocentrifugirke za UC 100/pk (1,5 mL) (Thermo Fisher Scientific)
- Dializne celice (Bel-Art Products)
- Polprepustna dializna membrana Spectra/Por, velikost membranskih por: 6000 – 8000 D (Spectrum Laboratories, Inc.)
- Inkubator WTC Binder (37  $^{\circ}\text{C}$ ) (Binder GmbH)
- UV-VIS spektrofotometer Agilent 8453 (Agilent technologies)
- Plastične epice oz. mikrocentrifugirke (1,5 in 2 mL) (Eppendorf)
- Ostali pribor: nastavki za pipete, kapalke, magnetno mešalo, spatula, stojalo za plastične epice, izvijač, vijaki, matice, pinceta.

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprava pufrov ter osnovnih in standardnih raztopin

*0,02 M fosfatni pufer, pH = 3 (FP<sub>20</sub>):* v čašo smo zatehtali 2,722 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Raztopili smo ga v ultra čisti vodi ter prenesli v 1000 mL bučko. Do oznake smo dopolnili z ultra čisto vodo. Pripravljeno raztopino smo prefiltrirali preko celuloznega acetatnega filtra s pomočjo vodne vakuumske črpalke. Nato smo pufro uravnali pH na 3 s 85 % fosforjevo(V) kislino.

*0,05 M fosfatni pufer, pH = 3 (FP<sub>50</sub>):* v čašo smo zatehtali 6,805 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ga raztopili v ultra čisti vodi ter prenesli v 1000 mL bučko. Do oznake smo dopolnili z ultra čisto vodo. Pripravljeno raztopino smo prefiltrirali z vodno vakuumsko črpalko. Pufro smo uravnali pH na 3 s 85 % fosforjevo(V) kislino.

*Izotonični fosfatni pufer PBS, pH = 7,4 (PBS):* zaporedoma smo zatehtali 2,38 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O, 0,19 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 8 g NaCl. Zatehte smo prenesli v čašo in raztopili v destilirani vodi. To raztopino smo prelili v 1000 mL bučko in z destilirano vodo dopolnili do oznake. Nato smo pufro z 1 M NaOH oz. 1 M HCl uravnali pH na 7,4.

*Osnovna raztopina MOX 1 (OR1):* na precizni tehtnici smo zatehtali 10 mg MOX in ga kvantitativno prenesli v 50 mL bučko. Do oznake smo dopolnili s fosfatnim pufrom, FP<sub>20</sub> oz. PBS. Koncentracija MOX v OR1 je bila 200 mg/L.

*Osnovna raztopina MOX 2 (OR2):* v 100 mL bučko smo odpipetirali 1 mL OR1 in do oznake dopolnili s fosfatnim pufrom, kot smo ga uporabili pri pripravi OR1, FP<sub>20</sub> oz. PBS. Koncentracija MOX v OR2 je bila 2 mg/L.

*Osnovna raztopina MOX 3 (OR3):* v epico smo odpipetirali 800 µL OR1, pripravljene v PBS in 800 µL PBS. Raztopino smo vorteksirali 20 sekund. Koncentracija MOX v OR3 je bila 100 mg/L.

*Standardne raztopine MOX:* v plastične epice smo z redčenjem osnovnih raztopin pripravili standardne raztopine MOX, kot je prikazano v preglednici I. Fosfatni pufer, ki

smo ga uporabili pri pripravi, je bil enak kot v osnovnih raztopinah MOX (FP<sub>20</sub> oz. PBS). Standardne raztopine smo uporabili za pripravo plazemskih oz. albuminskih vzorcev MOX ter umeritvenih premic za HPLC analizo.

**Preglednica I: Priprava standardnih raztopin MOX iz OR1 oz. OR2**

Koncentracija standardne raztopine (mg/L)	Volumen OR1 / OR2 ( $\mu$ L)	Volumen fosfatnega pufra ( $\mu$ L)
100	500 (OR1)	500
50	250 (OR1)	750
40	200 (OR1)	800
30	150 (OR1)	850
20	100 (OR1)	900
15	75 (OR1)	925
10	50 (OR1)	950
5	25 (OR1)	975
2	1000 (OR2)	0
1	500 (OR2)	500

OR1 – osnovna raztopina MOX 1 s koncentracijo MOX 200 mg/L

OR2 – osnovna raztopina MOX 2 s koncentracijo MOX 2 mg/L

*Raztopina albuminov, 25 g/L (ALB<sub>25</sub>):* v 50 mL bučko smo odpipetirali 6,25 mL raztopine Alburnorm s koncentracijo albuminov 200 g/L in do oznake dopolnili s PBS.

*Raztopina albuminov, 40 g/L (ALB<sub>40</sub>):* v 50 mL bučko smo odpipetirali 10 mL raztopine Alburnorm s koncentracijo albuminov 200 g/L in do oznake dopolnili s PBS.

*Raztopina albuminov, 50 g/L (ALB<sub>50</sub>):* v 50 mL bučko smo odpipetirali 12,5 mL raztopine Alburnorm s koncentracijo albuminov 200 g/L in do oznake dopolnili s PBS.

*Raztopina 0,5 M NaOH:* v 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 800  $\mu$ L 1 M NaOH in 800  $\mu$ L destilirane vode ter na mešalniku Vibromix mešali 20 sekund.

### 3.2.2 Določanje vezave moksifloksacina na albumine z ultracentrifugiranjem

Za metodo UC smo pripravili albuminske vzorce MOX s pomočjo standardnih raztopin MOX (20, 50 in 100 mg/L), pripravljenih v PBS in raztopine ALB<sub>40</sub>. V 10 mL bučke smo odpipetirali 500 µL standardne raztopine in do oznake dopolnili z ALB<sub>40</sub>. Pripravili smo tri albuminske vzorce MOX s koncentracijami MOX 1, 2,5 in 5 mg/L. Za vsako koncentracijo smo naredili štiri paralele.

1000 µL posameznega vzorca smo odpipetirali v epice za UC. Ultracentrifugirali smo pri 22 °C in uporabljali rotor 50.3Ti, pri tem pa spreminjali čas centrifugiranja (2, 4 in 6 ur). Po končanem UC smo iz sredine epice odvzeli 200 µL vzorca in ga ekstrahirali po postopku, opisanem v poglavju Ekstrakcija plazemskih oz. albuminskih vzorcev. Po sušenju na TurboVapu smo oborino raztopili v 150 µL FP<sub>20</sub> in vzorce analizirali s HPLC metodo 1.

Pri UC smo naredili naslednje serije poskusov:

- Najprej smo pripravili albuminske vzorce MOX (v ALB<sub>40</sub>) in jih centrifugirali pri 30.000 obratih/min in 22 °C ter pri tem spreminjali čas UC – 2, 4 in 6 ur.
- Naredili smo tudi plazemske vzorce MOX, ki smo jih ultracentrifugirali 2 uri (30.000 obratov/min, 22 °C).

% vezave MOX smo izračunali po enačbi 1.

$$\% \text{ vezave} = (\text{koncentracija MOX po končanem UC} / \text{koncentracija MOX pred UC}) \times 100 \% \quad (\text{Enačba 1})$$

Koncentracija MOX pred UC je bila 1, 2,5 oz. 5 mg/L, saj smo raztopine s temi koncentracijami MOX ultracentrifugirali. Koncentracijo MOX po UC smo izračunali s pomočjo enačbe za umeritveno premico, ki smo jo dobili s standardi MOX. Vsaka serija vzorcev je imela svojo umeritveno premico.

### 3.2.3 Določanje vezave moksifloksacina na plazemske proteine z ravnotežno dializo

Pri določevanju vezave MOX z RD smo uporabljali dializne celice. Celica je sestavljena iz dveh polovic. Vsaka od njiju ima pet komor, v katere smo z brizgo injicirali vzorce oz. pufer. Volumen posamezne komore je približno 1 mL. Med obe polovici smo

vstavili polprepustno membrano. Le-ta je bila najprej 24 ur namočena v destilirani vodi, pred uporabo pa smo jo še za eno uro namočili v PBS. Celico smo sestavili skupaj z vijaki in napolnili komore.

Vzorci, ki smo jih dializirali v celicah, smo pripravili na enak način kot vzorce za UC. Pri tem smo uporabili raztopino albuminov določene koncentracije (ALB<sub>25</sub>, ALB<sub>40</sub>, ALB<sub>50</sub>) ali plazmo. Končne koncentracije vzorcev MOX so bile 1, 2,5 in 5 mg/L. Pripravili smo tudi slepo raztopino, ki je namesto standardne raztopine MOX vsebovala 500 µL PBS, do oznake 10 mL pa je bila dopolnjena z enako raztopino albuminov ali plazme kot raztopine z MOX.

V dializne celice smo najprej na eno stran polnili PBS, na drugo pa albuminske oz. plazemske raztopine MOX ali slepo raztopino. Za vsako od teh raztopin smo naredili več paralel, od 4 do 8. V komore smo injicirali po 1 mL raztopin. Ko smo celice napolnili, smo komore z vijaki zaprli in dali inkubirati. Spreminjali smo različne parametre:

- Čas inkubacije: 2, 4, 6 in 22 ur – najprej smo namreč želeli določiti, koliko časa je potrebno dializirati vzorce pri 37 °C, da se vzpostavi ravnotežje.
- Temperaturo: 37 °C (vzorci smo dali v inkubator) in sobna temperatura (vzorci so stali na delovnem pultu v laboratoriju, kjer je bilo približno 22 °C). Pri preverjanju ustreznega časa dialize in vpliva temperature na potek RD smo pripravili vzorce MOX v ALB<sub>40</sub>.
- Koncentracijo in vrsto plazemskih proteinov: ALB<sub>25</sub>, ALB<sub>40</sub>, ALB<sub>50</sub> ali plazma. Vzorce smo dializirali 22 ur pri 22 °C ali 37 °C.

Po končani RD smo vzorce jemali iz tistih komor, kamor smo na začetku poskusa injicirali PBS. Odvzete vzorce smo ekstrahirali, da smo jim odstranili morebitne primesi proteinov in jih nato dali na HPLC analizo.

Za izračun vezave MOX na plazemske proteine smo morali določiti tudi njegovo stabilnost pri 22 in 37 °C ter vezavo na dializni sistem. Ti dve lastnosti smo določali za vsako temperaturo posebej. Pripravili smo po dve raztopini MOX s koncentracijo 1, 2,5 in 5 mg/L. To smo pripravili tako, da smo odpipetirali 500 µL standardne raztopine MOX (20, 50 in 100 mg/L) v 10 mL bučko in jo do oznake redčili s PBS.

**Stabilnost** učinkovine smo določili tako, da smo 1 mL vsake raztopine – 4 paralele za vsako koncentracijo – dali v vialo in v hladilnik. Preostanek raztopine smo v bučki



inkubirali 22 ur pri 37 oz. 22 °C. Stabilnost MOX smo izračunali tako, da smo delili povprečje odzivov po inkubaciji s povprečjem odzivov pred inkubacijo.

Iste raztopine MOX smo uporabili za določanje **vezave učinkovine na dializne celice in polprepustno membrano**. Za vsako koncentracijo MOX smo napolnili 5 komor dializne celice. Na eni strani smo injicirali PBS, na drugi strani raztopino MOX. Inkubirali smo pri 37 oz 22 °C. Po 22 urah smo pobrali vzorce z obeh strani dializne celice in jih analizirali s HPLC. Vzorce, ki smo jih jemali s tiste strani, kamor smo polnili raztopino MOX, smo poimenovali puferski vzorci 1, vzorce s strani, kamor smo polnili PBS, pa puferski vzorci 2.

Vezavo MOX na dializni sistem smo določili s pomočjo povprečnih odzivov MOX po inkubaciji pri določanju stabilnosti učinkovine ter povprečnih odzivov MOX puferskih vzorcev 1 in puferskih vzorcev 2 iz dializnih celic po 22-urni inkubaciji pri 22 °C oz. 37 °C. Odstotek vezave na dializni sistem smo izračunali po enačbi 2. Kako dobro se je pri obeh temperaturah v 22 urah vzpostavilo ravnotežje, smo izračunali z enačbo 3.

$$\% \text{ vezave na dializni sistem} = (1 - (A_{\text{povprečni, puferski vzorci 1}} + A_{\text{povprečni, puferski vzorci 2}}) / A_{\text{povprečni, po inkubaciji v bučki}}) \times 100 \% \quad (\text{Enačba 2})$$

$$\text{Vzpostavitev ravnotežja} = A_{\text{povprečni, puferski vzorci 2}} / A_{\text{povprečni, puferski vzorci 1}} \quad (\text{Enačba 3})$$

Koncentracijo proste ZU ( $c_f$ ) po končani RD smo izračunali iz odzivov analiziranih puferskih vzorcev. Koncentracijo celokupne ZU ( $c_{\text{tot}}$ ) smo dobili iz koncentracije raztopine MOX, ki smo jo pripravili na začetku poskusa in jo injicirali na eno stran dializne celice, pri čemer smo upoštevali stabilnost ZU in njeno vezavo na dializni sistem (enačba 4). Koncentracijo vezane ZU ( $c_b$ ) smo izračunali po enačbi 5. V stanju ravnotežja smo odstotek vezave MOX na plazemske proteine izračunali po enačbi 6.

$$c_{\text{tot}} = c_{\text{MOX}} [1, 2,5, 5 \text{ mg/L}] \times (1 - \text{vezava na dializni sistem}) \times \text{stabilnost MOX} \quad (\text{Enačba 4})$$

$$c_b = c_{\text{tot}} - 2c_f \quad (\text{Enačba 5})$$

$$\% \text{ vezave} = c_b / (c_b + c_f) \quad (\text{Enačba 6})$$

### 3.2.4 Ekstrakcija plazemskih oz. albuminskih vzorcev

#### 3.2.4.1 Razvijanje ekstrakcijskega postopka

Vzorcem, ki smo jih odvzeli iz supernatanta po UC oz. iz dializnih celic po RD in ki bi lahko vsebovali plazemske proteine, smo morali le-te odstraniti, da ne bi poškodovali HPLC kolone. Odločili smo se za ekstrakcijo tekoče – tekoče. Najprej smo poskusili z **ekstrakcijo z acetonitrilom**, ki smo jo priredili po članku B. Raju in sod. (20). Pripravili smo plazemske vzorce MOX, ki so bili sestavljeni iz 25  $\mu\text{L}$  standardne raztopine MOX (preglednica I) in 475  $\mu\text{L}$  plazme. Standardne raztopine MOX so bile narejene v FP<sub>20</sub>. 200  $\mu\text{L}$  plazemskega vzorca smo v epicah dodali 200  $\mu\text{L}$  ali 400  $\mu\text{L}$  acetonitrila. Epice smo eno minuto mešali na mešalniku vibromix, jih nato 15 minut centrifugirali pri 5000 obratih/min in 20 °C in na koncu odvzeli 100  $\mu\text{L}$  supernatanta ter ga analizirali po HPLC metodi 1. Rezultati analize so bili slabi, saj nismo zaznali odziva učinkovine, zato smo poskusili naslednjo metodo ekstrakcije.

Plazemske vzorce smo pripravili na enak način kot za ekstrakcijo z acetonitrilom. Ekstrakcijo vzorcev smo povzeli po članku Yu Hong Xu in sodelavcev (19) in jo nekoliko modificirali. Odpipetirali smo 200  $\mu\text{L}$  plazemskega vzorca in mu dodali 20  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH ter vzorce vorteksirali 10 sekund in nato **ekstrahirali z diklorometanom**. Postopek je opisan v poglavju »Končni postopek ekstrakcije«. Pri optimizaciji ekstrakcije z diklorometanom smo dodatno spreminjali še volumen plazemskega vzorca (200 ali 150  $\mu\text{L}$ ), ki smo ga uporabili za ekstrakcijo in volumen fosfatnega pufra za rekonstrukcijo (200 ali 150  $\mu\text{L}$ ) suhega zaostanka. Odzive MOX pri HPLC metodi smo želeli povečati tudi s **spreminjanjem količine dodanega NaOH** med postopkom ekstrakcije. Pripravili smo albuminske vzorce (v ALB<sub>40</sub>) s koncentracijo MOX 0,50, 1,00, 2,00 in 5,00 mg/L. 200  $\mu\text{L}$  albuminskega vzorca smo dodajali različne količine NaOH:

1. serija: + 10  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH
2. serija: + 15  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH
3. serija: + 20  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH
4. serija: + 20  $\mu\text{L}$  1 M NaOH
5. serija: + 40  $\mu\text{L}$  1 M NaOH

Vzorce smo obdelali po »Končnem postopku ekstrakcije« in jih analizirali.

**Končni postopek ekstrakcije:**

Vzorci smo ekstrahirali po metodi iz članka Yu Hong Xu in sodelavcev (19), ki smo jo nekoliko modificirali. Pri UC smo ekstrahirali vse plazemske oz. albuminske vzorce po končanem UC, pri RD pa puferske vzorce. Po končanem UC ali RD smo odvzeli 200  $\mu\text{L}$  vzorca, ki smo mu dodali 20  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH. Raztopino smo 10 sekund vorteksirali in ji potem dodali 1750  $\mu\text{L}$  diklorometana ter ponovno vorteksirali 5 minut. Po centrifugiranju (5 minut, 10.000 obratov/min, 20 °C) smo v novo epico odpipetirali 1600  $\mu\text{L}$  organske faze in jo 10 minut sušili v sušilniku TurboVap pri 40 °C in tlaku 2,5 bar. V TurboVap-u s prepihanjem z inertnim plinom dušikom in segrevanjem v kadički s toplo vodo pospešimo odparevanje topila. Višji kot je tlak, večji je pritisk na šobi, skozi katero prihaja dušik in hitreje poteka sušenje. Suh vzorec smo rekonstruirali v 150  $\mu\text{L}$  FP<sub>20</sub> oz. FP<sub>50</sub> (odvisno od tega, kateri pufer je bil v MF uporabljene HPLC metode). Epico smo z obeh strani vorteksirali po eno minuto. 100  $\mu\text{L}$  pripravljene raztopine smo odpipetirali v inserte, te pa dali v vialo in analizirali s HPLC.

**3.2.5 Razvoj analiznih metod**

Za analizo vzorcev MOX smo uporabili HPLC metodo z UV detekcijo. Odzivi, ki smo jih merili, so bili površine kromatografskih vrhov. Razvili smo dve analizni metodi. HPLC metodo 1 smo uporabljali pri določevanju vezave MOX na plazemske proteine z UC, HPLC metodo 2 pa smo uporabljali pri določevanju vezave MOX z RD.

HPLC metodo 1 smo povzeli po članku Yu Hong Xu in sod. (19). Uporabili smo kolono Kromasil C<sub>8</sub> (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), predkolono C<sub>18</sub> (4 x 3,0 mm) in MF1, ki je bila sestavljena iz:

650 mL FP<sub>20</sub>,

6,5 mL trietilamina,

200 mL metanola in

150 mL acetonitrila.

Uporabili smo UV detekcijo pri 296 nm in temperaturo kolone 30 °C. Injicirali smo 50  $\mu\text{L}$  vzorca. Pretok je bil 0,8 ali 0,9 mL/min (odvisno od tlaka na koloni), zato je bil tudi retencijski čas MOX različen, med 7,4 in 8,6 min. Analiza s to metodo je bila dolgotrajna, zato smo skušali retencijski čas učinkovine skrajšati.

Pri HPLC metodi 2 smo uporabili kolono Eurospher 100 C<sub>8</sub> (250 mm x 4 mm, 5 μm), predkolono C<sub>18</sub> (4 x 3,0 mm) in MF2, ki je vsebovala:

700 mL FP<sub>50</sub> in

300 mL acetonitrila.

Injicirali smo 40 μL vzorca in pretok MF nastavili na 1,2 mL/min. Ostalih parametrov metode nismo spreminjali. Retencijski čas MOX se je skrajšal na 3,8 min.

MF smo pred analizo s HPLC vedno odstranili mehurčke zraka s sonifikacijo na ultrazvočni kadički.

### 3.2.5.1 Priprava umeritvene premice

Umeritveno premico smo pri določanju vezave MOX na albumine delali najprej v **ALB<sub>40</sub>**. Standarde za umeritveno premico smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirke odpipetirali 25 μL standardne raztopine MOX in 475 μL ALB<sub>40</sub>. Končne koncentracije MOX so bile 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5 in 5 mg/L. Slepa raztopina je bila ALB<sub>40</sub>. 200 μL raztopin smo ekstrahirali po »Končnem postopku ekstrakcije«. Albuminske vzorce in standarde za umeritveno premico smo dali hkrati na HPLC in s pomočjo umeritvene premice izračunali koncentracijo MOX v vzorcih.

Pri interpretaciji rezultatov se je pojavil problem, saj so bili izračunani odstotki vezave MOX na albumine prek 100 %. Zaradi tega smo se odločili, da bomo umeritveno premico namesto v ALB<sub>40</sub> pripravili v **PBS**. Pri uporabi PBS je bil omenjena težava še vedno prisotna. Vzrok bi lahko bil v občutljivosti učinkovine na **spremembe pH**. Naredili smo naslednje raztopine:

- ALB<sub>40</sub>,
- PBS,
- Raztopina *I*: 50 μL standardne raztopine MOX (20 mg/L v PBS) in 950 μL ALB<sub>40</sub>,
- Raztopina *II*: 50 μL standardne raztopine MOX (20 mg/L v PBS) in 950 μL PBS,
- 1 mL raztopine *I* + 20 μL 0,5 M NaOH,
- 1 mL raztopine *I* + 40 μL 0,5 M NaOH,
- 1 mL raztopine *II* + 20 μL 0,5 M NaOH,

- 1 mL raztopine II + 40  $\mu$ L 0,5 M NaOH,
- 200  $\mu$ L albuminskega vzorca (v ALB<sub>40</sub>) s koncentracijo MOX 1 mg/L, ki smo ga 2 uri ultracentrifugirali pri 30.000 obratih/min in 20 °C,
- Albuminski in plazemski vzorci po končani RD, ki smo jih jemali na puferski strani (pogoji RD: 2, 4, 6 ali 22 ur pri 22 oz. 37 °C; ALB<sub>25</sub>, ALB<sub>40</sub>, ALB<sub>50</sub> oz. plazma).

V vseh raztopinah je bila koncentracija MOX 1 mg/L. pH pripravljenih raztopin smo merili s pH lističi. Glede na rezultate, ki smo jih dobili, smo se odločili, da bomo umeritveno premico namesto v PBS pripravili v »mediju«. »Medij« smo dobili tako, da smo v dializne celice na eno stran membrane dali raztopino albuminov ali plazme (brez MOX), na drugo stran pa PBS. Dializno celico z »medijem« smo dializirali pri enakih pogojih kot albuminske oz. plazemske vzorce MOX, ki smo jim določali vezavo. Po inkubaciji smo s puferske strani dializnih celic vzorce zbrali v epruveti in jo 10 sekund vorteksirali. Zbrano raztopino v epruveti smo poimenovali »medij«.

Umeritveno premico smo izdelali za vsako analizo posebej. Ko smo delali standarde za umeritveno premico v »mediju«, smo pripravili standardne raztopine MOX s pol nižjo koncentracijo MOX kot pri prejšnjih umeritvenih premicah. Pri tem smo uporabili OR3. »Medija«, ki smo ga zbrali iz dializne celice, namreč ni bilo veliko, zato smo pripravili le 200  $\mu$ L standarda. Koncentracija in priprava standardnih raztopin MOX za RD sta prikazani v preglednici II.

**Preglednica II: Priprava standardnih raztopin MOX v »mediju«**

Koncentracija standardne raztopine (mg/L)	Volumen OR3 ( $\mu$ L)	Volumen PBS ( $\mu$ L)
50	500	500
25	250	750
20	200	800
15	150	850
10	100	900
7,5	75	925
5	50	950
2,5	25	975

OR3 – osnovna raztopina MOX 3 s koncentracijo MOX 100 mg/L

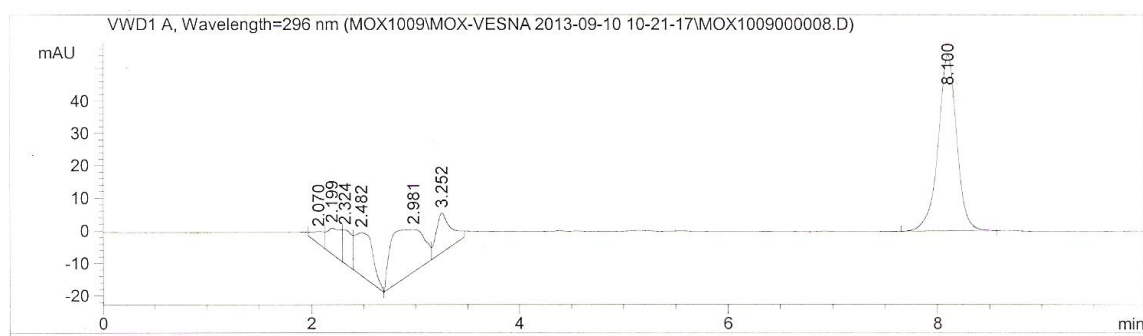
Standarde za umeritveno premico smo pripravili tako, da smo v 2 mL epice odpipetirali 180  $\mu$ L »medija« in 20  $\mu$ L standardne raztopine MOX. Dobili smo raztopine osmih različnih koncentracij MOX: 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5 in 5 mg/L. Naredili smo še slepo raztopino, ki je vsebovala 180  $\mu$ L »medija« in 20  $\mu$ L PBS. Za vsako analizo smo raztopine koncentracij 0,25 in 0,5 mg/L naredili v treh paralelah, koncentracije 0,75 – 2,5 mg/L v dveh in koncentracijo 5 mg/L ter slepo raztopino v eni paraleli. MOX smo iz standardov za umeritveno premico ekstrahirali po »Končnem postopku ekstrakcije«.

## 4 Rezultati in razprava

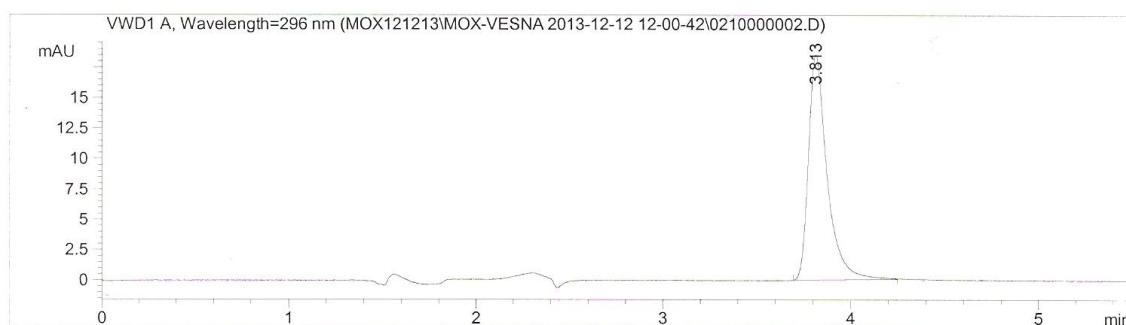
V magistrski nalogi smo v območju terapevtskih plazemskih koncentracij MOX določali vezavo MOX na albumine in celokupne plazemske proteine z UC in RD. Zanimalo nas je, ali dajeta metodi primerljive rezultate in kako na obseg vezave vpliva spreminjanje pogojev RD in UC. Pri svojem delu smo razvili tudi HPLC analizo metodo in optimizirali ekstrakcijski postopek za določanje MOX.

### 4.1 Razvoj HPLC analizne metode

Za analizo vzorcev smo izbrali metodo HPLC-UV. Najprej smo delali po HPLC metodi 1 iz članka Yu Hong Xu in sod. (19). Ker je imel MOX pri tej metodi zelo dolg retencijski čas in ker je MF1 vsebovala precej organskih topil, smo razvili HPLC metodo 2, pri kateri se je retencijski čas MOX močno skrajšal. Na slikah 2 in 3 sta prikazana kromatograma standarda MOX, ki smo ju dobili s HPLC metodo 1 in 2.



**Slika 2: Kromatogram standarda MOX s koncentracijo 5 mg/L, pridobljen s HPLC metodo 1. Retencijski čas MOX je 8,100 min.**

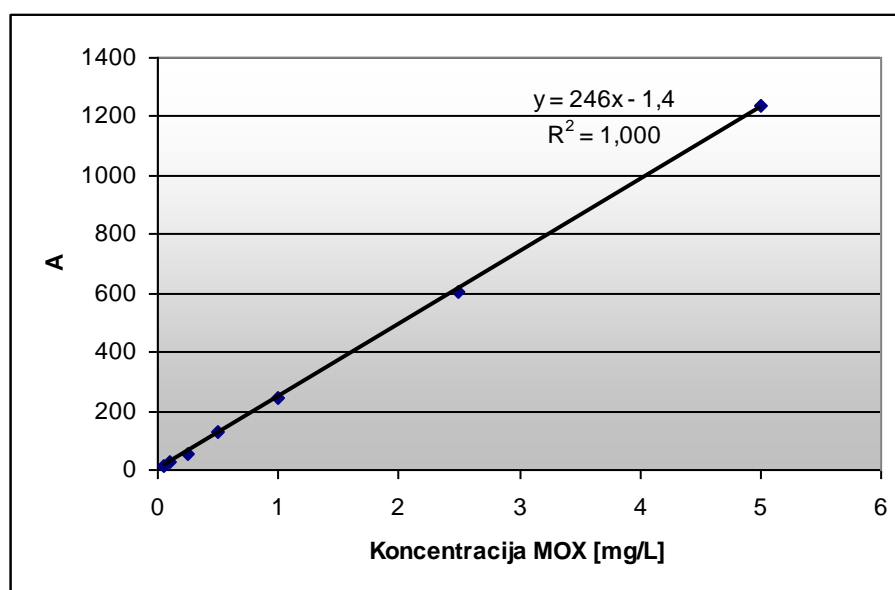


**Slika 3: Kromatogram standarda MOX s koncentracijo 2,5 mg/L, pridobljen s HPLC metodo 2. Retencijski čas MOX je 3,813 min.**

#### 4.1.1 Priprava umeritvenih premic

##### 4.1.1.1 Umeritvena premica v FP<sub>20</sub>

V povzetku glavnih značilnosti zdravila Avelox (17) je navedeno, da je pri priporočenem odmerku 400 mg enkrat dnevno razpon plazemskih koncentracij MOX v stacionarnem stanju med 0,6 in 3,2 mg/L. Na podlagi teh podatkov smo pripravili standardne raztopine MOX v FP<sub>20</sub> s koncentracijami MOX 0,01, 0,05, 0,10, 0,25, 0,50, 1,00, 2,50 in 5,00 mg/L in jih analizirali s HPLC metodo 1. Želeli smo določiti območje linearnosti in mejo zaznavnosti razvite analizne metode. Primer umeritvene premice je prikazan na sliki 4.



Slika 4: Primer umeritvene premice v FP<sub>20</sub>.

A – površina pod kromatografskim vrhom.

Točnost standardov pri posamezni koncentraciji MOX je prikazana v preglednici III. Točnost pri koncentraciji MOX 0,05 mg/L je bila 119 %, pri ostalih pa med 94 in 108 %. Linearno območje je bilo tako med 0,1 in 5,00 mg/L, meja zaznavnosti pa 0,05 mg/L. Pri najnižji pripravljene koncentraciji 0,01 mg/L namreč ni bilo odziva. Determinacijski koeficient ( $R^2$ ) je bil 1,000, kar pomeni zelo dobro ujemanje oz. linearnost.

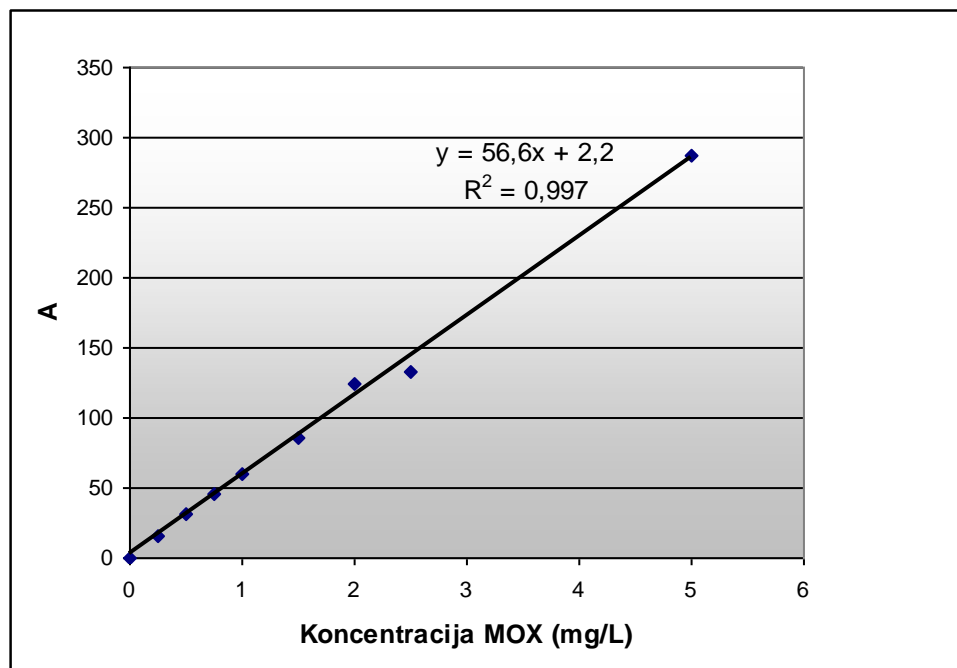


**Preglednica III: Točnost standardov MOX v FP<sub>20</sub>.**

Koncentracija MOX (mg/L)	Izračunana konc. MOX (mg/L)	Točnost (%)
0,05	0,060	<b>119</b>
0,10	0,108	<b>108</b>
0,25	0,235	<b>94</b>
0,50	0,526	<b>105</b>
1,00	0,995	<b>99</b>
2,50	2,456	<b>98</b>
5,00	5,021	<b>100</b>

#### 4.1.1.2 Umeritvena premica v ALB<sub>40</sub>

V nadaljevanju smo pripravljali umeritvene premice v ALB<sub>40</sub>. Koncentracije standardov MOX so bile 0,25, 0,50, 1,00, 2,50 in 5,00 mg/L. Analizirali smo jih s HPLC metodo 1. Te umeritvene premice so imele manjši naklon, kar pomeni, da je bil odziv MOX pri enaki koncentraciji nižji in posledično je bila tudi meja kvantifikacije višja, in sicer 0,25 mg/L. Na sliki 5 je prikazan primer umeritvene premice v ALB<sub>40</sub>. Pri vseh umeritvenih premicah, pripravljenih v ALB<sub>40</sub>, so bili R<sup>2</sup> med 0,997 in 1,000.

**Slika 5: Primer umeritvene premice v ALB<sub>40</sub>.**

Točnost standardov pri posamezni koncentraciji MOX je podana v preglednici IV. Točnost je bila med 92 in 108 %. Točnost ustreza kriterijem FDA smernic za validacijo bioanaliznih metod, ki dovolijo odstopanje za največ 15 % od nominalne vrednosti oz.

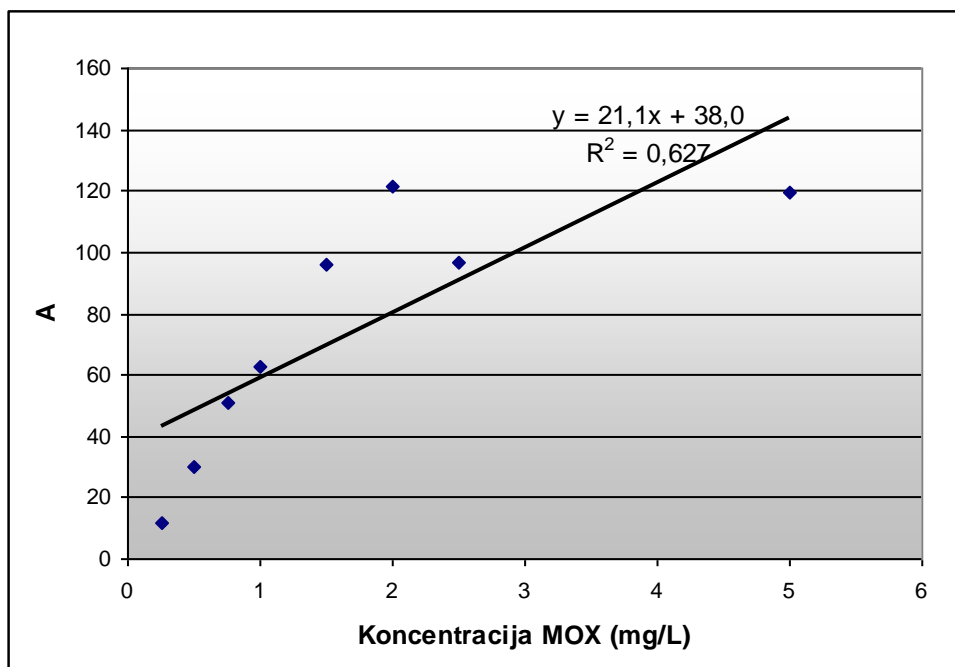
20 % pri meji zaznavnosti, pri čemer mora ta kriterij dosegati vsaj 75 % vzorcev (24). Linearno območje je bilo med 0,25 in 5,00 mg/L.

**Preglednica IV: Točnost standardov MOX v ALB<sub>40</sub>.**

Koncentracija MOX (mg/L)	Izračunana konc. MOX (mg/L)	Točnost (%)
0,25	0,251	101
0,50	0,506	101
0,75	0,780	104
1,00	1,034	103
1,50	1,473	98
2,00	2,157	108
2,50	2,309	92
5,00	5,029	101

#### 4.1.1.3 Umeritvena premica v PBS

Umeritveno premico smo pripravili tudi v PBS. Koncentracije standardov MOX so bile enake kot za umeritveno premico v ALB<sub>40</sub>. Analizirali smo jih s HPLC metodo 1. Na sliki 6 je prikazana umeritvena premica v PBS. V preglednici V je prikazana točnost standardov te umeritvene premice.



**Slika 6: Umeritvena premica v PBS.**

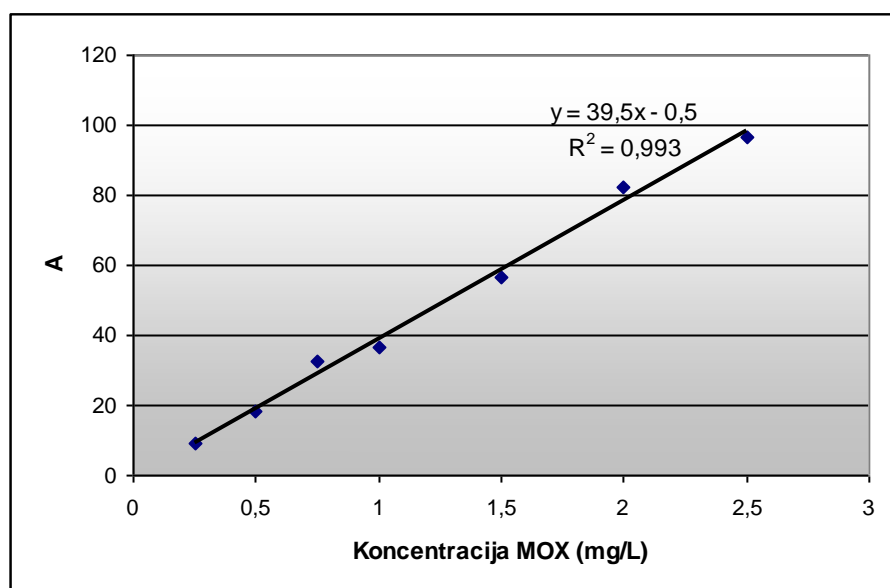
**Preglednica V: Točnost standardov MOX v PBS pri ekstrakciji z 10 µL 0,5 M NaOH.**

Koncentracija (mg/L)	Izračunana konc. (mg/L)	Točnost (%)
0,25	0,197	<b>79</b>
0,50	0,485	<b>97</b>
0,75	0,818	<b>109</b>
1,00	1,008	<b>101</b>
1,50	1,544	<b>103</b>
2,00	1,948	<b>97</b>
2,50	1,550	<b>62</b>
5,00	1,911	<b>38</b>

Pri umeritveni premici v PBS se je odziv pri višjih koncentracijah standardov MOX nelogično zmanjševal, zato je bila točnost povratno izračunanih koncentracij neustrezna. Za povraten izračun koncentracij MOX smo uporabili enačbo umeritvene premice med koncentracijama MOX 0,25 in 2,00 mg/L, ki je imela v tem območju  $R^2$  0,994.

#### 4.1.1.4 Umeritvena premica v »mediju«

V nadaljevanju smo pripravljali umeritvene premice v »mediju«. Koncentracije standardov MOX so bile 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50 in 5,00 mg/L. Standarde smo analizirali po HPLC metodi 2. Primer umeritvene premice je prikazan na sliki 7.

**Slika 7: Primer umeritvene premice v »mediju«.**

Točnost standardov MOX v »mediju« s slike 7 je prikazana v preglednici VI. Območje linearnosti je bilo med koncentracijama MOX 0,25 in 5,00 mg/L.

**Preglednica VI: Točnost standardov MOX v »mediju«.**

Koncentracija MOX (mg/L)	Izračunana konc. MOX (mg/L)	Točnost (%)
0,25	0,246	98
0,50	0,476	95
0,75	0,840	112
1,00	0,938	94
1,50	1,443	96
2,00	2,098	105
2,50	2,459	98
5,00	3,895	78

Umeritvene premice, pripravljene v »mediju«, so se med posameznimi analizami nekoliko razlikovale v  $R^2$  in naklonu. V preglednici VII so prikazani nakloni in  $R^2$  umeritvenih premic pri različnih pogojih priprave »medija«. Nakloni umeritvenih premic v »mediju« iz albuminskih vzorcev so si med seboj podobni, medtem ko so v »mediju« iz plazemskih vzorcev višji. Razlika je bila verjetno v nekoliko drugačni sestavi »medija«, pridobljenega iz plazemskih oz. albuminskih vzorcev.

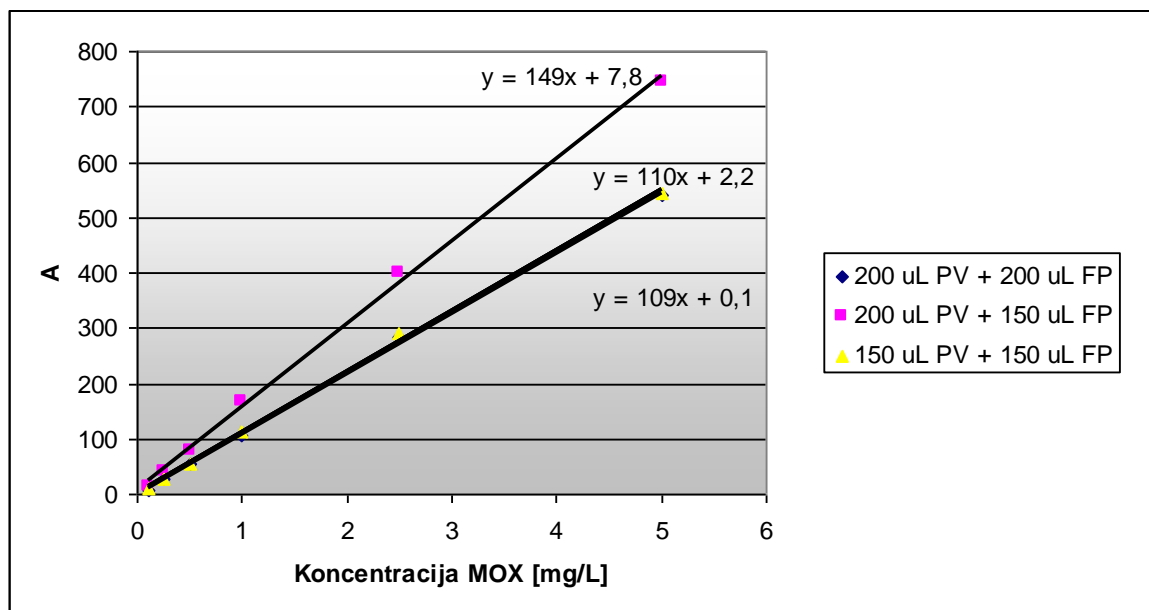
**Preglednica VII: Naklon in  $R^2$  umeritvene premice pri različnih pogojih priprave »medija«**

Pogoji RD			Naklon	$R^2$
Temperatura (°C)	Čas (h)	Koncentracija albuminov (g/L) / plazma		
37	2, 4, 6	40	39,7	0,999
37	22	40	39,3	0,999
37	22	25	40,0	0,996
37	22	50	40,1	0,999
22	22	40	39,5	0,993
37	22	Plazma	54,7	0,997
22	22	Plazma	48,9	1,000

## 4.2 Optimizacija pogojev ekstrakcije

Vzorci, ki so vsebovali plazemske proteine, smo morali očistiti z ekstrakcijo. V člankih (19, 20) za ekstrakcijo plazemskih proteinov uporabljajo acetonitril in diklorometan. Acetonitril je od teh dveh manj škodljiv za človeka in okolje. Čeprav oba dražita oči, dihala in kožo ter jih ne smemo zaužiti, diklorometan poleg tega lahko deluje tudi rakotvorno (25, 26). Ekstrakcija z acetonitrilom ni uspela, saj po analizi na HPLC učinkovina sploh ni dala signala, kljub temu da smo postopek dvakrat ponovili. MOX pri uporabljenih pogojih očitno ni prešel v organsko fazo.

V nadaljevanju smo prešli na ekstrakcijo z diklorometanom. Celokupne plazemske proteine smo najprej oborili z 0,5 M NaOH in jih nato ekstrahirali. Ekstrakcija z diklorometanom se je izkazala za uspešno. Dodatno smo spreminjali volumen plazemskega vzorca, ki smo ga ekstrahirali in volumen fosfatnega pufru za rekonstrukcijo suhega zaostanka, da bi ugotovili, kdaj so pri dani izhodni koncentraciji MOX odzivi največji. Odzivi so prikazani na sliki 8.



Slika 8: Odzivi MOX v odvisnosti od volumnov plazemskega vzorca (PV) in fosfatnega pufru (FP).

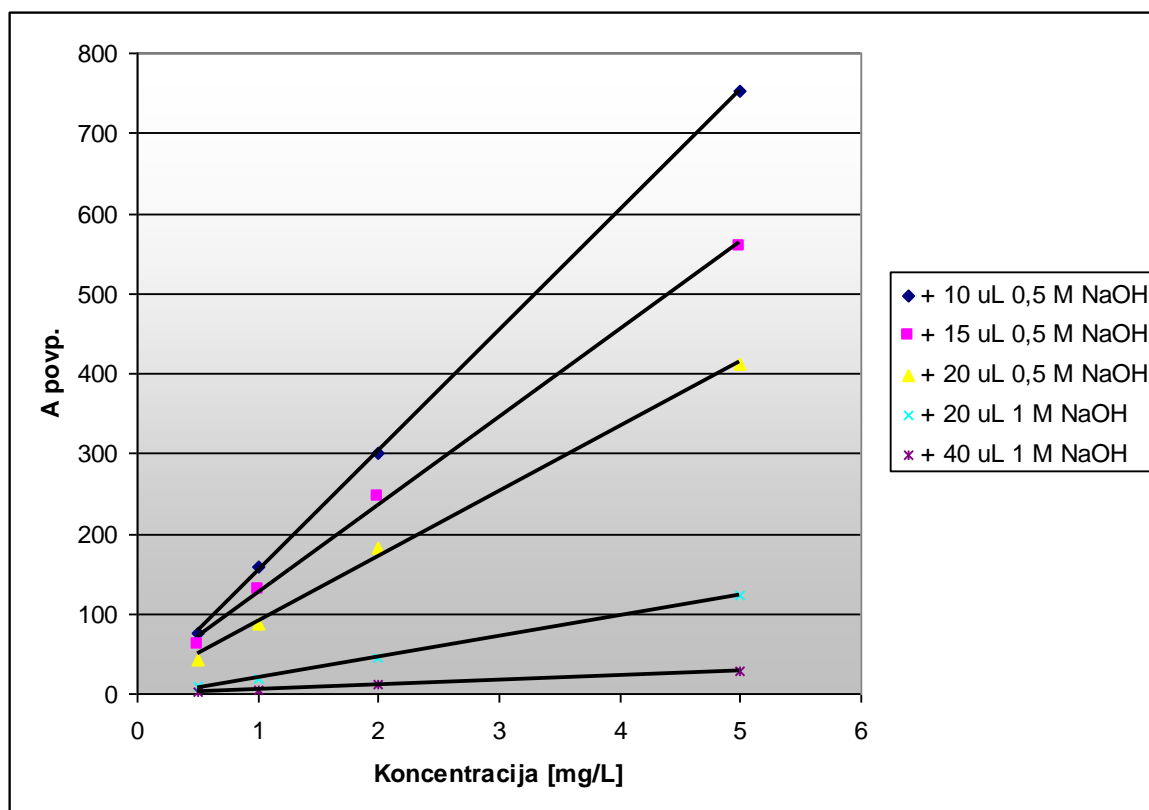
Vidimo, da je pri HPLC analizi največji odziv MOX, ko je volumen **plazemskega vzorca 200  $\mu$ L** in volumen **fosfatnega pufru 150  $\mu$ L** (enačba premice:  $y = 149x + 7,8$ ), medtem ko je med ostalima dvema serijama le minimalna razlika, saj se premici skoraj prekrivata. V nadaljevanju smo pri določevanju vezave MOX na plazemske proteine za

ekstrakcijo vedno vzeli 200  $\mu\text{L}$  albuminskega oz. plazemskega vzorca, ki smo ga na koncu rekonstruirali v 150  $\mu\text{L}$  fosfatnega pufru (FP<sub>20</sub> ali FP<sub>50</sub>).

Vezavo MOX na plazemske proteine smo z UC določali večkrat. Kljub temu, da smo spreminjali pogoje UC, smo vedno določili odstotke vezave na plazemske proteine preko 100 %. Razmišljali smo, da je težava v umeritveni premici. Standardov umeritvene premice (narejene v ALB<sub>40</sub>) namreč nismo ultracentrifugirali, ker smo z njimi določevali odziv celokupne koncentracije MOX. Zaradi velike količine plazemskih proteinov bi bilo lahko 20  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH (ta količina je povzeta iz članka Yu Hong Xu in sod. (19)) premalo za obarjanje vseh prisotnih proteinov in odcepitev vsega MOX z njih. Zato smo naredili umeritvene premice, kjer smo pri ekstrakciji standardov spreminjali količino NaOH v ekstrakcijskem postopku, in sicer:

1. serija: + 40  $\mu\text{L}$  1 M NaOH
2. serija: + 20  $\mu\text{L}$  1 M NaOH
3. serija: + 20  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH.
4. serija: + 15  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH
5. serija: + 10  $\mu\text{L}$  0,5 M NaOH.

Presenetilo nas je, ker so odzivi MOX pri HPLC analizi padali s povečevanjem količine dodanega NaOH. Vseh pet serij je prikazanih na sliki 9. Zavrgli smo našo teorijo, da smo dodajali premalo raztopine NaOH za oboritev proteinov.



**Slika 9: Umeritvene premice MOX v odvisnosti od količine NaOH, uporabljene pri ekstrakciji.**

A povp. – povprečna površina pod kromatografskim vrhom dveh standardov enake koncentracije

Ker se z dodajanjem NaOH odzivi MOX manjšajo, smo sklepali, da pri višjem pH vzorca preide pri ekstrakciji v organsko fazo manj MOX. MOX je namreč občutljiv na spremembe pH. Ima kisel in bazičen center, njegovi pKa točki sta 5,69 in 9,42 (27).

Dodatno smo izmerili pH različnih raztopin s koncentracijo MOX 1 mg/L, ki smo jih pripravili iz standardne raztopine MOX s koncentracijo 20 mg/L in PBS oz. ALB<sub>40</sub>. Zanimalo nas je, kakšna je razlika v pH, če uporabimo za redčenje raztopine MOX PBS ali ALB<sub>40</sub> ter za koliko se zviša pH po dodajanju NaOH, če je MOX pripravljen v teh dveh medijih, ki oba delujeta kot pufra. Zaradi majhnega volumna raztopin smo pH merili s pH lističi, ki lahko določajo pH v razponu od 1 do 14 in so natančni do pol enote. Izmerjeni pH zato ni najbolj točen, kljub temu pa se opazi razlika med posameznimi raztopinami. Rezultati izmerjenih pH so prikazani v preglednici VIII.

**Preglednica VIII: Izmerjeni pH različnih raztopin MOX s koncentracijo 1 mg/L v PBS ali ALB<sub>40</sub>**

Raztopina	pH
ALB <sub>40</sub>	6
PBS	7
Standardna raztopina MOX v PBS s koncentracijo 20 mg/L	7
Raztopina <i>I</i> (standardna razt. MOX s konc. 1 mg/L v ALB <sub>40</sub> )	6
Raztopina <i>II</i> (standardna razt. MOX s konc. 1 mg/L v PBS)	7
1 mL raztopine <i>I</i> + 20 µL 0,5 M NaOH	8
1 mL raztopine <i>I</i> + 40 µL 0,5 M NaOH	10
1 mL raztopine <i>II</i> + 20 µL 0,5 M NaOH	11
1 mL raztopine <i>II</i> + 40 µL 0,5 M NaOH	11,5
200 µL albuminskega vzorca MOX (v ALB <sub>40</sub> ) po 2 urah UC	6,5
Puferski vzorci iz dializnih celic po končani RD albuminskih vzorcev MOX	6,5
Puferski vzorci iz dializnih celic po končani RD plazemskih vzorcev MOX	6,5
»Medij« iz dializnih celic, pridobljen iz ALB <sub>40</sub>	6,5
»Medij« iz dializnih celic, pridobljen iz plazme	6,5

Z UV spektrofotometrom smo pri valovni dolžini 289 nm izmerili absorbanco raztopin *I* in *II*, ki smo jima dodali 40 µL 0,5 M NaOH. Obe sta imeli koncentracijo MOX 1 mg/L. 1 mL raztopine *I* + 40 µL 0,5 M NaOH je imel absorbanco 2,230, 1 mL raztopine *II* + 40 µL 0,5 M NaOH pa 0,625. Sklepamo lahko, da za odziv MOX ni ključna sama količina raztopine NaOH, uporabljena za ekstrakcijo, ampak končen pH raztopine. Poglavitno je, da bi morala biti pH v standardih za umeritveno premico in v vzorcih enaka.

Iz preglednice VI vidimo, da ima albuminski vzorec po UC višji pH kot raztopina *I*, ki smo jo uporabili za standard za umeritveno krivuljo pri UC. Prav tako imajo puferski vzorci (pri različnih pogojih RD imajo vsi enake pH) nižji pH kot raztopina *II*, ki je bila standard za umeritveno krivuljo pri RD. Kot edina možnost se nam je pokazala nadomestitev PBS oz. ALB<sub>40</sub> pri pripravi umeritvene premice z »medijem« iz slepih raztopin in se izkazala za učinkovito.



S slike 9, kjer so bile umeritvene premice sicer narejene v ALB<sub>40</sub> in ne v PBS, vidimo, da dajo najvišje odzive vzorci, ki smo jim dodali 10 µL 0,5 M NaOH. Kljub temu smo v nadaljevanju ekstrakcijo izvajali z 20 µL 0,5 M NaOH, saj se je pri umeritveni premici v PBS, ko smo dodajali 10 µL 0,5 M NaOH, odziv pri višjih koncentracijah standardov nelogično zmanjševal (preglednica V).

Kasneje smo naredili umeritveno premico še s 15 µL 0,5 M NaOH. Narejena je bila v »mediju« iz slepih raztopin ALB<sub>40</sub>. V preglednici IX so prikazane povratno izračunane koncentracije MOX in njihova točnost.

**Preglednica IX: Točnost umeritvene premice MOX v »mediju« pri ekstrakciji s 15 µL 0,5 M NaOH.**

Koncentracija (mg/L)	Izračunana konc. (mg/L)	Točnost (%)
0,25	- 0,017	- 7
0,50	0,343	69
0,75	1,026	137
1,0	1,473	147
1,5	1,554	104
2,0	1,561	78
2,5	2,515	101
5,0	5,045	101

Umeritvene premice nismo mogli uporabiti, ker je bila točnost povratno izračunanih koncentracij neustrezna. Težko je reči, zakaj je prišlo do tako velikih odstopanj od linearnosti, saj so bile pri umeritvenih premicah v ALB<sub>40</sub>, ko smo zmanjševali količino dodanega NaOH (slika 9), točke veliko bolj kolinearne –  $R^2$  je bil 0,999. Možno je, da »medij« ni bil dovolj homogen ali pa je prišlo do kakšne druge eksperimentalne napake, npr. delo z neumerjeno pipeto. Tako smo se odločili, da bomo v nadaljevanju pri ekstrakciji dodajali 20 µL 0,5 M NaOH. Primer takšne umeritvene premice je prikazan na sliki 7.

### 4.3 Določanje vezave MOX z UC

Pri UC smo najprej albuminske vzorce MOX centrifugirali pri različnem času (2, 4 in 6 ur), da bi ugotovili, kdaj se ločita vezana in prosta ZU. Nato smo spreminjali še vrsto plazemskih proteinov (ALB<sub>40</sub> ali plazma), v katerih smo pripravili raztopino MOX. Pri ekstrakciji vzorcev po končanem UC smo spreminjali tudi količino dodanega 0,5 M NaOH.

V serijah, ki so predstavljene v preglednicah X, XI in XII, smo spreminjali čas UC – 2, 4 in 6 ur. Umeritveno premico smo pripravili v ALB<sub>40</sub> in med ekstrakcijo dodajali 20 µL 0,5 M NaOH. Za vsako začetno koncentracijo MOX smo izračunali povprečen odstotek vezave, standardno deviacijo (SD) in koeficient variacije (KV).

**Preglednica X: Odstotki vezave MOX na albumine po UC pri pogojih 30.000 obratov/min, 22 °C, 2 uri**

<b>Pogoji UC: 30.000 obratov/min, 22 °C, 2 uri</b>					
Konc. pred UC (mg/L)	Izračunana konc. po UC (mg/L)	% vezave	<b>Povprečni % vezave</b>	SD	KV (%)
1,00	1,13	112,8	<b>125</b>	15,37	12,34
	1,10	110,2			
	1,41	141,1			
	1,34	134,0			
2,50	2,57	103,0	<b>111</b>	6,64	5,97
	2,94	117,7			
	2,89	115,4			
	2,73	109,2			
5,00	5,32	106,5	<b>119</b>	10,72	9,00
	5,86	117,3			
	6,63	132,5			
	6,02	120,5			

**Preglednica XI: Odstotki vezave MOX na albumine po UC pri pogojih 30.000 obratov/min, 22 °C, 4 ure**

<b>Pogoji UC: 30.000 obratov/min, 22 °C, 4 ure</b>					
Konc. pred UC (mg/L)	Izračunana konc. po UC (mg/L)	% vezave	Povprečni % vezave	SD	KV (%)
1,00	1,43	142,5	<b>140</b>	2,75	1,97
	1,42	142,0			
	1,37	136,7			
	1,39	138,8			
2,50	3,62	144,7	<b>147</b>	5,18	3,53
	3,81	152,4			
	3,52	140,8			
	3,74	149,8			
5,00	6,51	130,1	<b>139</b>	8,32	5,97
	6,74	134,7			
	7,33	146,6			
	7,32	146,3			

**Preglednica XII: Odstotki vezave MOX na albumine po UC pri pogojih 30.000 obratov/min, 22 °C, 6 ur**

<b>Pogoji UC: 30.000 obratov/min, 22 °C, 6 ur</b>					
Konc. pred UC (mg/L)	Izračunana konc. po UC (mg/L)	% vezave	Povprečni % vezave	SD	KV (%)
1,00	1,05	105,2	<b>114</b>	12,61	11,07
	1,30	129,6			
	1,19	118,6			
	1,02	102,4			
2,50	3,00	120,1	<b>143</b>	21,50	15,00
	3,27	130,9			
	3,89	155,4			
	4,17	166,7			
5,00	6,37	127,4	<b>141</b>	22,84	16,19
	7,78	155,6			
	5,82	116,4			
	8,24	164,7			

Težava se je pojavila že takoj po prvi HPLC analizi, saj je bil obseg vezave MOX na albumine večji od 100 %. Literatura sicer navaja, da se veže približno 40 – 42 % MOX na plazemske proteine, večinoma na albumine (18). Z daljšim centrifugiranjem % vezave celo narašča. Ta rezultat je logičen. Očitno po dveh urah UC še ne posede ves vezan MOX

in ga zajamemo skupaj s prostim MOX v supernatantu. Pri tem izmerimo več proste ZU in posledično določimo manjši odstotek vezave. Vidimo tudi, da je KV pri vseh treh časih UC precej velik, od približno 2 do 16 %.

Zaradi nepričakovanih rezultatov vezave MOX, ki so jih dali albuminski vzorci MOX, smo pri naslednji analizi poskusili s plazemskimi vzorci MOX. Tudi pri tej analizi smo vzorce ultracentrifugirali dve uri (30.000 obratov/min, 22 °C) in umeritveno premico pripravili v ALB<sub>40</sub> ter med ekstrakcijo dodajali 20 µL 0,5 M NaOH. Rezultati so prikazani v preglednici XIII.

**Preglednica XIII: Odstotki vezave MOX na celokupne plazemske proteine po UC pri pogojih 30.000 obratov/min, 22 °C, 2 uri**

<b>Pogoji UC: 30.000 obratov/min, 22 °C, 2 uri</b>					
Konc. pred UC (mg/L)	Izračunana konc. po UC (mg/L)	% vezave	<b>Povprečni % vezave</b>	SD	KV (%)
1,00	1,73	172,9	<b>170</b>	8,85	5,22
	1,58	157,6			
	1,69	168,8			
	1,79	178,5			
2,50	4,47	178,9	<b>171</b>	8,78	5,13
	4,12	165,0			
	4,47	178,6			
	4,06	162,4			
5,00	7,79	155,9	<b>141</b>	14,58	10,35
	6,91	138,1			
	7,37	147,4			
	6,09	121,8			

Iz zgornje preglednice vidimo, da so povprečni odstotki vezave pri plazemskih vzorcih še višji kot pri albuminskih. Sklepali smo, da je napaka nekje v postopku ekstrakcije, najverjetneje v količini dodanega NaOH.

Tako smo za naslednjo analizo pripravili albuminske vzorce MOX, ki smo jim po končanem UC med ekstrakcijo namesto 20 µL dodajali 10 µL 0,5 M NaOH. Umeritvena premica je bila pripravljena v ALB<sub>40</sub>. Rezultati so prikazani v preglednici XIV. Odstotek vezave se je zmanjšal, a je bil še vedno več kot stodonten. To je bilo dodatno potrjeno, da pH vpliva na izkoristek ekstrakcije.

**Preglednica XIV: Odstotki vezave MOX na albumine po UC pri pogojih 30.000 obratov/min, 22 °C, 2 uri. Med ekstrakcijo smo dodajali 10 µL 0,5 M NaOH**

<b>Pogoji UC: 30.000 obratov/min, 22 °C, 2 uri</b>					
Konc. pred UC (mg/L)	Izračunana konc. po UC (mg/L)	% vezave	<b>Povprečni % vezave</b>	SD	KV (%)
1,00	1,16	116,2	<b>110</b>	4,18	3,80
	1,09	108,8			
	1,08	108,1			
	1,07	107,0			
2,50	2,51	100,4	<b>106</b>	5,85	5,51
	2,79	111,6			
	2,76	110,5			
	2,54	101,6			
5,00	5,71	114,2	<b>112</b>	4,07	3,64
	5,65	112,9			
	5,29	105,9			
	5,73	114,5			

Pri naslednjem določanju vezave z UC smo uvedli novo spremembo. Tokrat smo umeritveno premico pripravili v PBS. Predvidevali smo, da če se v albuminskem vzorcu vsi proteini posedejo, je supernatant, ki ga odvezamemo po končanem UC, podoben PBS, v katerem smo pripravili raztopino albuminov. Pri ekstrakciji smo dodajali 10 µL 0,5 M NaOH (preglednica XV).

**Preglednica XV: Odstotki vezave MOX na albumine po UC pri pogojih 30.000 obratov/min, 22 °C, 2 uri. Umeritvena premica je bila pripravljena v PBS.**

<b>Pogoji UC: 30.000 obratov/min, 22 °C, 2 uri</b>					
Konc. pred UC (mg/L)	Izračunana konc. po UC (mg/L)	% vezave	Povprečni % vezave	SD	KV (%)
1,00	2,56	256,0	<b>222</b>	52,12	23,43
	1,45	145,0			
	2,39	238,6			
	2,50	250,1			
2,50	6,09	243,5	<b>211</b>	70,32	33,35
	6,42	256,9			
	2,65	106,1			
	5,92	236,8			
5,00	11,44	228,9	<b>241</b>	17,30	7,19
	11,19	223,8			
	13,02	260,4			
	12,49	249,9			

Pri teh pogojih ekstrakcije so odzivi umeritvene premice pri višjih koncentracijah začeli nelinearno padati (preglednica V). Poleg tega so bili pri tej analizi % vezave še višji kot doslej (210 – 240 % vezava). Zaradi navedenega umeritvene premice v PBS z dodatki 15 oz. 20 µL 0,5 M NaOH nismo delali.

Iz neuspešnih poskusov določanja vezave MOX na plazemske proteine smo prešli na RD, kjer smo za pripravo umeritvene premice uporabili »medij«. Pri UC bi to težko storili, ker so bile kapacitete ultracentrifuge premajhne za pripravo zadostnih količin »medija« za pripravo umeritvene premice.

#### **4.4 Določanje vezave MOX z RD**

Ker je ekstrakcija MOX očitno občutljiva na spremembe pH (preglednica VIII), smo pri vseh analizah, ki so predstavljene v tem poglavju, umeritvene premice naredili v »mediju«, pri ekstrakciji pa smo dodajali 20 µL 0,5 M NaOH. S tem smo skušali zagotoviti, da bi imeli vzorci in standardi za umeritveno premico čim bolj podoben pH.

##### **4.4.1 Stabilnost MOX in vezava na dializni sistem**

Stabilnost učinkovine smo izračunali iz povprečja odzivov MOX v posamezni raztopini pred in po 22-urni inkubaciji pri 22 °C in 37 °C. V preglednici XVI so prikazani rezultati testiranja stabilnosti MOX. Iz prikazanega vidimo, da je MOX stabilen pri obeh

temperaturah znotraj 22 ur, zato smo pri nadaljnjih izračunih upoštevali kar 100 % stabilnost.

**Preglednica XVI: Stabilnost MOX po 22-urni inkubaciji na 22 oz. 37 °C**

Konc. (mg/L)	22 °C (n = 2)			37 °C (n = 4)		
	Povp. A pred inkub.	Povp. A po inkub.	Stabilnost (%)	Povp. A pred inkub.	Povp. A po inkub.	Stabilnost (%)
1,00	174,6	172,9	<b>99,0</b>	245,2	244,6	<b>99,8</b>
2,50	453,7	447,3	<b>98,8</b>	596,0	600,0	<b>100,7</b>
5,00	935,4	920,5	<b>98,4</b>	1210,2	1217,7	<b>100,6</b>

A – površina kromatografskega vrha

n – število meritev

Določili smo še vezavo MOX na dializne celice in polprepustno membrano. V preglednici XVII so prikazani odstotki vezave MOX na dializni sistem po 22-urni inkubaciji pri 22 oz. 37 °C.

**Preglednica XVII: Odstotek vezave MOX na dializne celice in polprepustno membrano**

Konc. (mg/L)	22 °C (n = 3)				37 °C (n = 5)			
	Povp. A (puf.1)	Povp. A (puf.2)	% vezave	Ravno- težje	Povp. A (puf.1)	Povp. A (puf.2)	% vezave	Ravno- težje
1,00	81,7	69,2	<b>12,74</b>	<b>0,847</b>	109,86	109,0	<b>10,52</b>	<b>0,992</b>
2,50	217,7	184,2	<b>10,14</b>	<b>0,846</b>	275,62	270,3	<b>9,01</b>	<b>0,981</b>
5,00	443,8	394,7	<b>8,91</b>	<b>0,889</b>	562,32	551,38	<b>8,54</b>	<b>0,981</b>

A – povprečna površina kromatografskega vrha puferskih vzorcev 1 oz. 2 iz dializnih celic

Iz preglednice XVII vidimo, da je vezava MOX na dializni sistem pri obeh temperaturah primerljiva. Vezava se je z večanjem koncentracije MOX zniževala – očitno so se »vezavna mesta« za MOX na dializni celici in polprepustni membrani nasitila že pri nižji koncentraciji. V nadaljevanju smo pri izračunu vezave MOX na proteine plazme upoštevali ugotovljeno vezavo MOX na dializni sistem, in sicer se je zaradi tega zmanjšala celokupna koncentracija MOX (1, 2,5 ali 5 mg/L). Npr. pri vzorcih s koncentracijo MOX

1 mg/L, ki smo jih inkubirali pri 22 °C, smo celokupno koncentracijo MOX pomnožili z 0,8726.

Iz preglednice XVII je prav tako razvidno, da se po 22 urah pri 37 °C vzpostavi zadovoljivo ravnotežje v dializnem sistemu, medtem ko se pri 22 °C ravnotežje še ne vzpostavi. Odziv puferskih vzorcev 2 (kamor je MOX difundiral) je namreč pri dani koncentraciji manjši kot odziv puferskih vzorcev 1 (raztopina, iz katere je MOX difundiral). To pomeni, da bo % vezave MOX na plazemske proteine, ki ga bomo določili pri sobni temperaturi, verjetno manj zanesljiv.

#### 4.4.2 Odstotek vezave MOX po 2, 4, 6 in 22 urah

Naredili smo štiri serije poskusov, pri katerih smo spreminjali čas inkubacije vzorcev – 2, 4, 6 ali 22 ur, medtem ko smo vse inkubirali pri 37 °C. Vzorce smo pripravili v ALB<sub>40</sub>. Rezultati so predstavljeni v preglednicah XVIII, XIX, XX in XXI.

**Preglednica XVIII: Odstotek vezave MOX na ALB<sub>40</sub> po 2-urni dializi pri 37 °C.**

Konc. (mg/L)	c <sub>tot</sub> (mg/L)	C <sub>f</sub> (mg/L)	C <sub>b</sub> (mg/L)	% vezave	Povp. % vezave
1,00	0,895	0,241	0,413	63,1	<b>67,6</b> (SD = 3,83) (KV = 5,66 %)
		0,196	0,503	72,0	
		0,226	0,443	66,2	
		0,211	0,473	69,2	
2,50	2,275	0,549	1,177	68,2	<b>71,5</b> (SD = 3,80) (KV = 5,31 %)
		0,531	1,213	69,5	
		0,428	1,419	76,8	
		0,503	1,268	71,6	
5,00	4,573	0,869	2,835	76,5	<b>77,6</b> (SD = 0,95) (KV = 1,23 %)
		0,854	2,865	77,0	
		0,811	2,951	78,4	
		0,814	2,946	78,4	

c<sub>tot</sub>, c<sub>f</sub> in c<sub>b</sub> – koncentracije celokupne, proste in vezane ZU



**Preglednica XIX: Odstotek vezave MOX na ALB<sub>40</sub> po 4-urni dializi pri 37 °C**

Konc. (mg/L)	c <sub>tot</sub> (mg/L)	c <sub>f</sub> (mg/L)	c <sub>b</sub> (mg/L)	% vezave	Povp. % vezave
1,00	0,895	0,202	0,492	70,9	<b>74,3</b> (SD = 2,69) (KV = 3,62 %)
		0,176	0,542	75,4	
		0,192	0,512	72,8	
		0,184	0,527	74,1	
		0,161	0,572	78,0	
2,50	2,275	0,469	1,337	74,0	<b>75,8</b> (SD = 1,82) (KV = 2,40 %)
		0,456	1,362	74,9	
		0,456	1,362	74,9	
		0,431	1,413	76,6	
		0,401	1,473	78,6	
5,00	4,573	0,686	3,201	82,4	<b>83,1</b> (SD = 1,08) (KV = 1,30 %)
		0,671	3,232	82,8	
		0,693	3,186	82,1	
		0,603	3,368	84,8	
		0,648	3,277	83,5	

**Preglednica XX: Odstotek vezave MOX na ALB<sub>40</sub> po 6-urni dializi pri 37 °C**

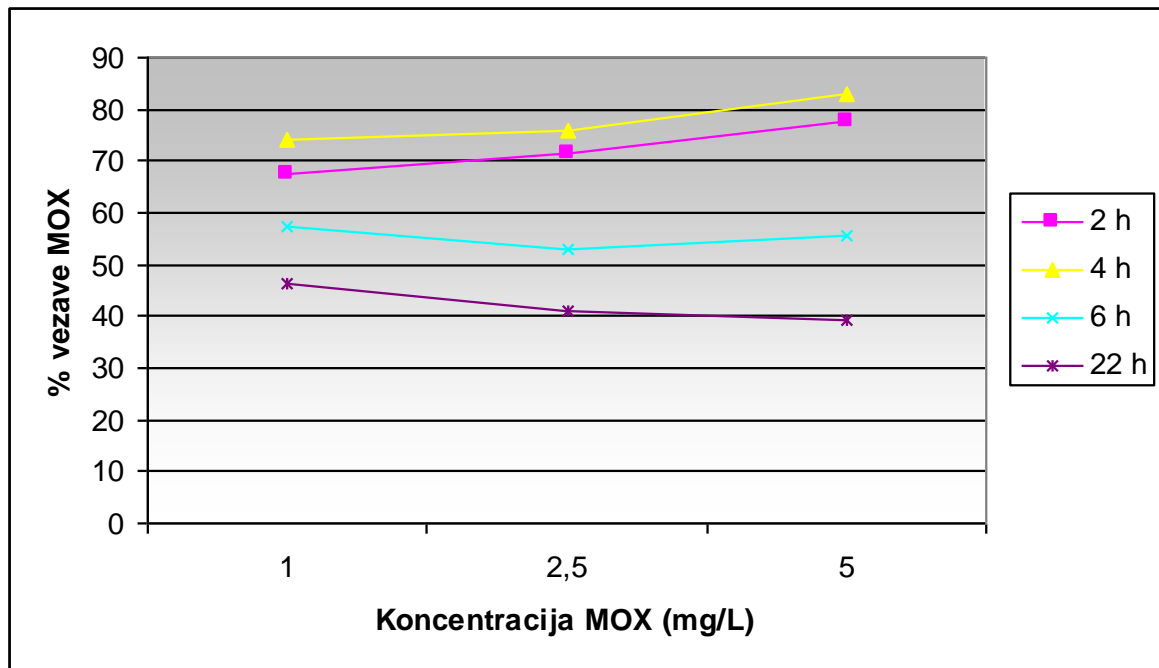
Konc. (mg/L)	c <sub>tot</sub> (mg/L)	c <sub>f</sub> (mg/L)	c <sub>b</sub> (mg/L)	% vezave	Povp. % vezave
1,00	0,895	0,256	0,384	60,0	<b>57,5</b> (SD = 3,55) (KV = 6,17 %)
		0,278	0,338	54,9	
		0,266	0,363	57,8	
		0,286	0,323	53,1	
		0,248	0,399	61,6	
2,50	2,275	0,735	0,805	52,3	<b>52,8</b> (SD = 3,73) (KV = 7,07 %)
		0,679	0,916	57,4	
		0,727	0,820	53,0	
		0,775	0,725	48,3	
		0,783	0,709	47,5	
5,00	4,573	1,368	1,838	57,3	<b>55,6</b> (SD = 3,96) (KV = 7,13 %)
		1,325	1,923	59,2	
		1,347	1,878	58,2	
		1,534	1,505	49,5	
		1,443	1,686	53,9	

**Preglednica XXI: Odstotek vezave MOX na ALB<sub>40</sub> po 22-urni dializi pri 37 °C**

Konc. (mg/L)	c <sub>tot</sub> (mg/L)	c <sub>f</sub> (mg/L)	c <sub>b</sub> (mg/L)	% vezave	Povp. % vezave
1,00	0,895	0,303	0,289	48,9	<b>46,4</b> (SD = 3,47) (KV = 7,48 %)
		0,298	0,299	50,2	
		0,305	0,284	48,2	
		0,356	0,182	33,9*	
		0,326	0,244	42,8	
		0,326	0,244	42,8	
		0,326	0,244	42,8	
		0,300	0,294	49,5	
2,50	2,275	0,906	0,463	33,8*	<b>40,9</b> (SD = 2,43) (KV = 5,94 %)
		0,809	0,657	44,8	
		0,837	0,601	41,8	
		0,832	0,611	42,3	
		0,850	0,575	40,4	
		0,852	0,570	40,1	
		0,880	0,514	36,9	
		0,850	0,575	40,4	
5,00	4,573	1,842	0,889	32,6	<b>39,4</b> (SD = 3,80) (KV = 9,63 %)
		1,743	1,088	38,4	
		1,669	1,235	42,5	
		1,677	1,220	42,1	
		1,687	1,199	41,6	
		1,791	0,991	35,6	
		1,651	1,271	43,5	
		1,733	1,108	39,0	

\* v vzorcu je bil mehurček ali pa so odzivi zelo odstopali v primerjavi z ostalimi pri enaki koncentraciji. Teh vzorcev pri izračunu povprečnega odstotka vezave na plazemske proteine nismo upoštevali.

Na sliki 10 so grafično prikazani odstotki vezave MOX na ALB<sub>40</sub> pri različnih časih inkubacije in 37 °C.



Slika 10: Odstotek vezave MOX na ALB<sub>40</sub> v odvisnosti od časa RD.

S slike 10 vidimo, da pri krajših časih RD odstotek vezave narašča s koncentracijo MOX, pri daljših časih pa pada. Bolj logično je slednje, saj so lahko pri višji koncentraciji ZU plazemski proteini nasičeni z njo.

Pri vseh testiranih koncentracijah MOX odstotek vezave MOX s povečevanjem časa RD pada. Rezultat je smiseln, saj se ravnotežje počasi vzpostavlja in v krajšem času preide prek polprepustne membrane manj MOX. Pri izračunu odstotka vezave MOX na albumine upoštevamo koncentracijo proste učinkovine, ki je prešla čez polprepustno membrano ( $c_f$ ). In če je ta koncentracija manjša, določimo večji odstotek vezave ZU. Pri 4-urni inkubaciji je prišlo do odstopanja, saj so odstotki vezave MOX na albumine višji kot po dvourni inkubaciji. Vzroka za to ne poznamo.

Glede na zgoraj navedene rezultate smo se odločili, da bomo v nadaljevanju vzorce dializirali 22 ur, saj se pri 37 °C (fiziološki pogoji) v tem času vzpostavi ravnotežje, poleg tega ZU v tem času še ne razpada. Ker se pri 22 °C v enakem času še ne vzpostavi ravnotežje, bomo rezultate, pridobljene pri sobni temperaturi, uporabili le za primerjavo.

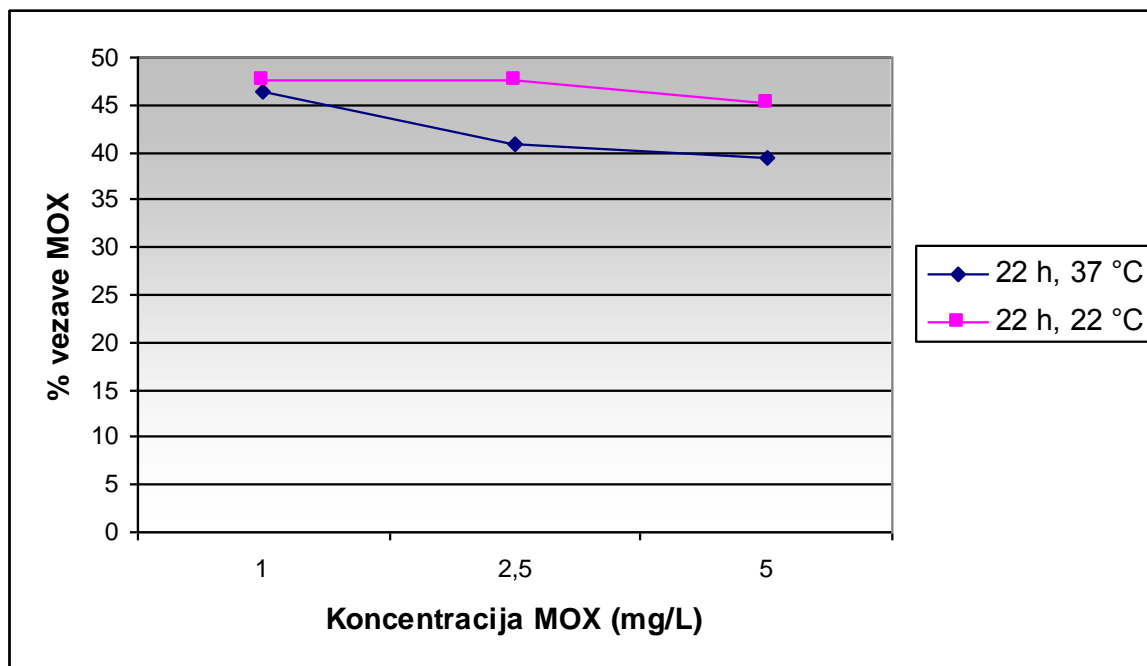
#### 4.4.3 Odstotek vezave MOX po 22 urah pri 22 in 37 °C

V naslednji stopnji smo albuminske vzorce MOX dializirali 22 ur pri 22 °C. Rezultati so prikazani v preglednici XXII.

**Preglednica XXII: Odstotek vezave MOX na ALB<sub>40</sub> po 22-urni dializi pri 22 °C**

Konc. (mg/L)	c <sub>tot</sub> (mg/L)	c <sub>f</sub> (mg/L)	c <sub>b</sub> (mg/L)	% vezave	Povp. % vezave
1,00	0,873	0,291	0,290	49,9	<b>47,5</b> (SD = 2,89) (KV = 6,09 %)
		0,309	0,255	45,2	
		0,299	0,275	47,9	
		1,748	-2,624	299,6*	
		0,317	0,240	43,1	
		0,286	0,300	51,2	
		0,306	0,260	45,9	
		0,294	0,285	49,2	
2,50	2,247	0,729	0,789	52,0	<b>47,6</b> (SD = 4,59) (KV = 9,63 %)
		0,797	0,652	45,0	
		0,858	0,531	38,2	
		0,787	0,672	46,1	
		0,774	0,698	47,4	
		0,742	0,763	50,7	
		0,742	0,763	50,7	
		0,739	0,769	51,0	
5,00	4,555	1,662	1,230	42,5	<b>45,1</b> (SD = 2,89) (KV = 6,40 %)
		1,584	1,387	46,7	
		1,516	1,523	50,1	
		2,353	-0,151	-6,9*	
		1,827	0,901	33,0*	
		1,622	1,311	44,7	
		1,657	1,240	42,8	
		1,640	1,275	43,8	

Na sliki 11 je prikazana primerjava odstotkov vezave MOX na albumine, ki so bili 22 ur dializirani pri 22 °C z albuminskimi vzorci, ki smo jih 22 ur inkubirali pri 37 °C (podatki so podani v preglednici XXI). Če rezultate primerjamo med seboj, vidimo, da so odstotki vezave MOX na albumine pri temperaturi 22 °C konstantni, medtem ko pri 37 °C z naraščanjem koncentracije padajo. Odstotki vezave MOX so pri 22 °C višji kot pri 37 °C, ker se pri sobni temperaturi v 22 urah še ni popolnoma vzpostavilo ravnotežje (preglednica XVII) in določimo previsoko c<sub>f</sub>. Bolj zanesljivi so odstotki vezave, ki smo jih pridobili pri 37 °C, saj temperatura ustreza fiziološkim pogojem. RD smo pri sobni temperaturi izvajali zaradi lažje izvedbe, vendar na podlagi primerjave rezultatov pri obeh temperaturah sklepamo, da je v primeru MOX potrebno RD izvajati pri 37 °C, da dobimo realne rezultate.



Slika 11: Odstotek vezave MOX na ALB<sub>40</sub> pri RD pri 22 in 37 °C.

#### 4.4.4 Odstotek vezave MOX pri različnih koncentracijah albuminov

Med sabo smo primerjali odstotke vezave MOX v albuminskih vzorcih MOX z različno koncentracijo albuminov – ALB<sub>25</sub>, ALB<sub>40</sub> in ALB<sub>50</sub>. Rastopini albuminov ALB<sub>40</sub> in ALB<sub>50</sub> smo izbrali zato, ker je v plazmi normalno koncentracija albuminov med 35 in 55 g/L, pri hipoalbuminemiji pa je nižja od 35 g/L, kar predstavlja ALB<sub>25</sub>. V preglednici XXIII so prikazani odstotki vezave MOX na ALB<sub>25</sub>, v preglednici XXIV pa odstotki vezave MOX na ALB<sub>50</sub>. V obeh primerih smo RD izvajali pri 22 urah in 37 °C.

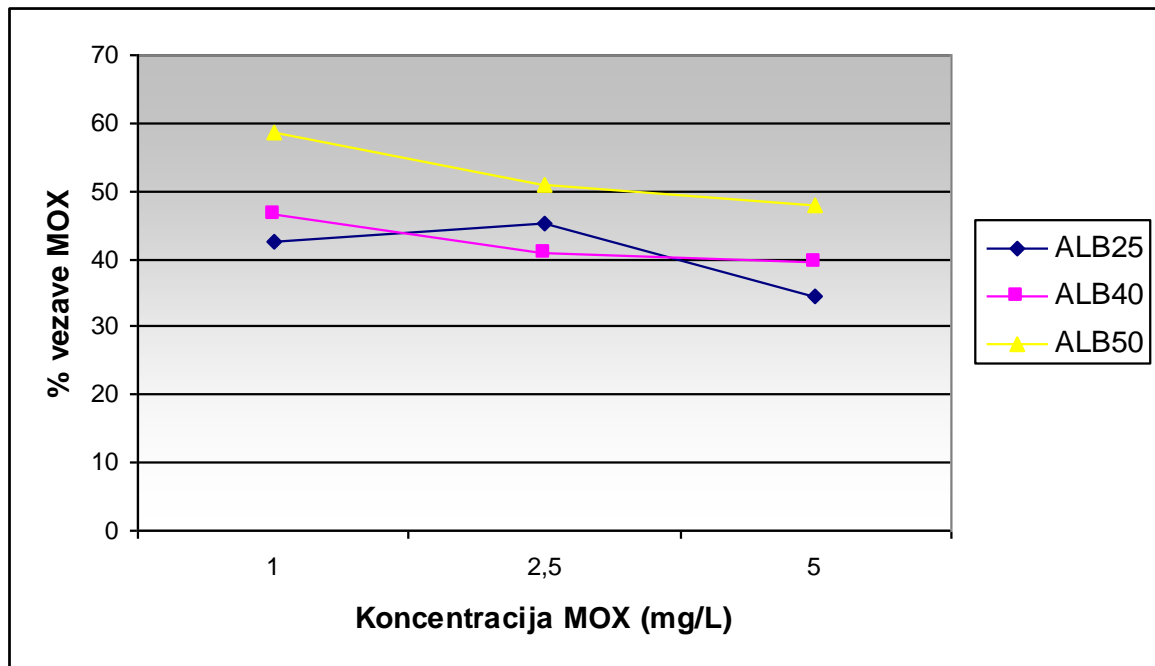
**Preglednica XXIII: Odstotek vezave MOX na ALB<sub>25</sub> po 22-urni dializi pri 37 °C**

Konc. (mg/L)	c <sub>tot</sub> (mg/L)	c <sub>f</sub> (mg/L)	c <sub>b</sub> (mg/L)	% vezave	Povp. % vezave
1,00	0,895	0,313	0,269	46,2	<b>42,7</b> (SD = 3,14) (KV = 7,36 %)
		0,322	0,250	43,7	
		0,318	0,259	45,0	
		0,315	0,264	45,6	
		0,451	-0,008	-1,8*	
		0,341	0,213	38,4	
		0,334	0,227	40,4	
		0,336	0,222	39,7	
2,50	2,275	0,799	0,677	45,9	<b>45,1</b> (SD = 2,96) (KV = 6,56 %)
		0,832	0,612	42,4	
		0,801	0,673	45,6	
		0,782	0,710	47,6	
		0,839	0,597	41,6	
		0,799	0,677	45,9	
		0,836	0,602	41,9	
		0,759	0,757	49,9	
5,00	4,573	1,632	1,309	44,5*	<b>34,6</b> (SD = 2,20) (KV = 6,34 %)
		1,749	1,075	38,1	
		1,824	0,924	33,6	
		1,848	0,878	32,2	
		1,815	0,943	34,2	
		1,766	1,042	37,1	
		1,841	0,892	32,6	
		1,808	0,957	34,6	

**Preglednica XXIV: Odstotek vezave MOX na ALB<sub>50</sub> po 22-urni dializi pri 37 °C**

Konc. (mg/L)	c <sub>tot</sub> (mg/L)	c <sub>f</sub> (mg/L)	c <sub>b</sub> (mg/L)	% vezave	Povp. % vezave
1,00	0,895	0,269	0,356	57,0	<b>58,5</b> (SD = 4,50) (KV = 7,70 %)
		0,292	0,312	51,7	
		0,244	0,406	62,4	
		0,312	0,272	46,6*	
		0,254	0,386	60,3	
		0,284	0,327	53,5	
		0,242	0,411	63,0	
		0,249	0,396	61,4	
2,50	2,275	0,673	0,929	58,0	<b>51,0</b> (SD = 4,72) (KV = 9,25 %)
		0,765	0,745	49,3	
		0,772	0,730	48,6	
		0,732	0,810	52,5	
		0,830	0,616	42,6	
		0,770	0,735	48,8	
		0,705	0,865	55,1	
		0,727	0,820	53,0	
5,00	4,573	1,669	1,235	42,5	<b>48,0</b> (SD = 3,65) (KV = 7,61 %)
		1,577	1,419	47,4	
		1,617	1,340	45,3	
		1,485	1,604	51,9	
		1,460	1,654	53,1	
		1,846	0,882	32,3*	
		1,579	1,415	47,2	
		1,552	1,469	48,6	

Na sliki 12 je primerjava % vezave MOX na albuminske raztopine z različno koncentracijo albuminov.



Slika 12: Odstotek vezave MOX na ALB<sub>25</sub>, ALB<sub>40</sub> in ALB<sub>50</sub> po 22 urah RD pri 37 °C.

Vidimo, da so se povprečni odstotki vezave pri posamezni koncentraciji albuminov z naraščanjem koncentracije MOX padali. To je smiselno, ker so očitno vezavna mesta za MOX na albuminih pri višjih koncentracijah MOX nasičena. S slike 12 je razvidno tudi, da se je pri posamezni koncentraciji MOX z naraščanjem koncentracije albuminov % vezave MOX povečeval. Izjema je povprečen odstotek vezave pri koncentraciji MOX 2,5 mg/L pri vzorcih, pripravljenih v ALB<sub>25</sub>, ki je višji, kot je bil pričakovan. Večji odstotek vezave pri višji koncentraciji albuminov se zdi logičen, ker je na razpolago več vezavnih mest za MOX.

#### 4.4.5 Odstotek vezave MOX na plazemske proteine

Pripravili smo plazemske vzorce MOX, ki so bili 22 ur izpostavljeni RD pri 37 °C oz. 22 °C. Rezultati so prikazani v preglednicah XXV in XXVI. Ko primerjamo plazemske vzorce MOX po 22-urni inkubaciji, opazimo, da so bili povprečni odstotki vezave MOX na celokupne plazemske proteine pri 22 °C nekoliko nižji kot pri 37 °C, kar je obratno kot pri albuminskih vzorcih MOX, ki smo jih 22 ur dializirali pri teh dveh temperaturah (slika 11).



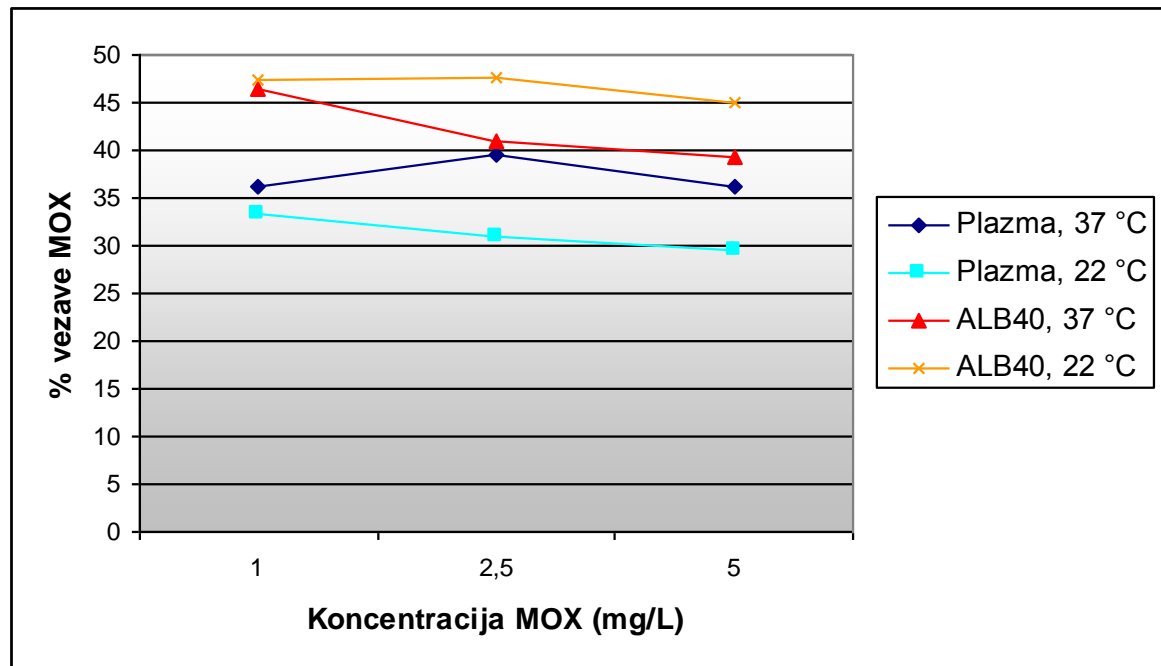
**Preglednica XXV: Odstotek vezave MOX na plazemske proteine po 22-urni dializi pri 37 °C**

Konc. (mg/L)	c <sub>tot</sub> (mg/L)	c <sub>f</sub> (mg/L)	c <sub>b</sub> (mg/L)	% vezave	Povp. % vezave
1,00	0,895	0,363	0,169	31,9	<b>36,1</b> (SD = 4,05) (KV = 11,23 %)
		0,350	0,195	35,8	
		0,355	0,184	34,1	
		0,355	0,184	34,1	
		0,364	0,166	31,3	
		0,332	0,232	41,1	
		0,343	0,210	38,0	
		0,328	0,239	42,2	
2,50	2,275	0,888	0,500	36,0	<b>39,6</b> (SD = 5,22) (KV = 13,17 %)
		0,928	0,419	31,1	
		0,770	0,734	48,8	
		0,849	0,576	40,4	
		0,858	0,558	39,4	
		0,851	0,573	40,2	
		0,875	0,525	37,5	
		0,820	0,635	43,6	
5,00	4,573	1,809	0,954	34,5	<b>36,2</b> (SD = 3,44) (KV = 9,51 %)
		1,771	1,031	36,8	
		1,806	0,962	34,8	
		1,806	0,962	34,8	
		1,862	0,848	31,3	
		1,656	1,262	43,2	
		1,771	1,031	36,8	
		1,760	1,053	37,4	

**Preglednica XXVI: Odstotek vezave MOX na plazemske proteine po 22-urni dializi pri 22 °C**

Konc. (mg/L)	c <sub>tot</sub> (mg/L)	c <sub>f</sub> (mg/L)	c <sub>b</sub> (mg/L)	% vezave	Povp. % vezave
1,00	0,873	0,347	0,179	34,1	<b>33,4</b> (SD = 1,83) (KV = 5,48 %)
		0,351	0,171	32,8	
		0,347	0,179	34,1	
		0,416	0,040	8,8*	
		0,338	0,196	36,6	
		0,349	0,175	33,4	
		0,353	0,167	32,1	
		0,357	0,159	30,8	
2,50	2,247	0,824	0,599	42,1*	<b>30,9</b> (SD = 1,36) (KV = 4,40 %)
		0,926	0,395	29,9	
		0,922	0,403	30,4	
		0,918	0,411	30,9	
		0,905	0,436	32,5	
		0,930	0,387	29,4	
		0,901	0,444	33,0	
		0,924	0,399	30,2	
5,00	4,555	1,912	0,730	27,6	<b>29,6</b> (SD = 1,14) (KV = 3,87 %)
		1,691	1,172	40,9*	
		1,863	0,828	30,8	
		1,622	1,311	44,7*	
		1,884	0,787	29,5	
		1,890	0,775	29,1	
		1,876	0,803	30,0	
		1,867	0,820	30,5	

Rezultate plazemskih vzorcev MOX smo primerjali z vzorci, ki smo jih pripravili v ALB<sub>40</sub> in jih dializirali 22 ur pri 37 °C (preglednica XXI) oz. 22 °C (preglednica XXII). Želeli smo ugotoviti, kakšna je dejanska vezava MOX v plazmi, kjer so poleg albuminov še drugi prenašalni proteini ter če ima temperatura RD vpliv na rezultate. Primerjava je prikazana na sliki 13.



Slika 13: Primerjava odstotka vezave MOX med plazemskimi in albuminskimi vzorci po 22-urni RD, določena pri 37 °C in 22 °C.

Primerjava plazemskih in albuminskih vzorcev MOX, inkubiranih pri 37 °C, pokaže, da so odstotki vezave MOX pri obeh serijah podobni. Največje odstopanje je pri koncentraciji MOX 1 mg/L, kjer je povprečni odstotek vezave v plazmi celo nižji kot v albuminskih vzorcih MOX. Pri 22 °C so odstotki vezave MOX na celokupne plazemske proteine še bolj očitno nižji v primerjavi z albumini. Pričakovali smo večjo vezavo MOX na celokupne plazemske proteine kot samo na ALB<sub>40</sub>, saj so albumini v podobni koncentraciji prisotni tudi v plazmi. Možno je, da se pri plazemskih vzorcih na dializni sistem v večji meri vežejo aminokislina in manjši proteini iz plazme in je zato vezava MOX na dializni sistem manjša ali pa so pri plazmi čez polprepustno membrano prehajali aminokislina in manjši proteini in se je MOX nanje vezal še na puferski strani. S tem bi določili večjo  $c_f$  in posledično manjši odstotek vezave. Odstopanje povprečnih odstotkov vezave od pričakovanega je mogoče tudi posledica večjega nihanja odstotkov vezave pri plazemskih vzorcih, saj je KV pri slednjih višji kot pri albuminskih vzorcih. Iz rezultatov lahko sklepamo, da se MOX v humani plazmi veže večinoma na albumine, kot je navedeno tudi v literaturi (18).

## 5 Sklep

V okviru magistrske naloge smo določali vezavo MOX na albumine in plazemske proteine z UC in RD. Pri tem smo spreminjali koncentracijo ZU in albuminov ter parametre obeh metod. Za določanje vezave MOX v bioloških vzorcih smo razvili dve HPLC-UV metodi.

Pri določanju vezave MOX z UC smo ugotovili, da odstotek vezave z daljšim časom centrifugiranja narašča. Ker je odstotek vezave po 4 in 6 urah enak, sklepamo, da je ravnotežje vezave doseženo že po 4 urah UC (30.000 obratov/min, 22 °C). Z UC nismo uspeli določiti pravega odstotka vezave MOX na albumine oz. plazemske proteine, saj smo vedno določili več kot 100 % vezavo. Razlog je bil v tem, da je učinkovina občutljiva na pH in bi morali standarde za umeritveno premico pripraviti v mediju z enakim pH kot so ga imeli vzorci MOX. Tega pa z UC nismo uspeli.

V nadaljevanju smo vezavo MOX na plazemske proteine določali z RD. Pri tem smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- MOX je v času 22 ur pri 22 oz. 37 °C 100 % stabilen in ne razpada.
- Pri 22 oz. 37 °C se MOX veže na dializni sistem v podobnem obsegu, in sicer približno 10 %. Pri tem je pri nižji koncentraciji MOX vezava večja.
- Pri daljšem času dialize se odstotki vezave MOX na plazemske proteine zmanjšujejo.
- Odstotki vezave MOX na albumine in celokupne plazemske proteine pri enakih pogojih RD (22 ur, 37 °C) so primerljivi.
- Z naraščanjem koncentracije MOX odstotki vezave MOX na albumine oz. celokupne plazemske proteine v splošnem padajo.
- Pri višji koncentraciji albuminov je odstotek vezave MOX nanje večji;
- Pri 22 °C v 22 urah še ni vzpostavljeno ravnotežje, zato poskusov pri teh pogojih ni smiselno delati.

Določanje vezave MOX na albumine in celokupne plazemske proteine z RD je torej zanesljivo v primeru, ko dializa poteka 22 ur pri 37 °C, saj so rezultati primerljivi z literaturnimi vrednostmi (18). Vezava MOX je približno 40 – 42 % in MOX se v plazmi veže predvsem na albumine.

## 6 Literatura

1. Shargel L, Wu-Pong S, Yu ABC. Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, 6. izdaja. Mc Graw-Hill Medical, New York, 2012: 205-52.
2. Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive Association of Drugs Binding to Human Serum Albumin. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(3): 3580-95.
3. Enomoto H, Aizawa N, Nakamura H, et al. An Increased Ratio of Glycated Albumin to HbA1c Is Associated with the Degree of Liver Fibrosis in Hepatitis B Virus-Positive Patients. *Gastroenterol Res Pract.* 2014 Feb; Vol 2014, 6 str.
4. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Clinical Chemistry: principles, procedures, correlations, 5. izdaja. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005: 110-1, 190-4.
5. Kumar, Clark. Clinical Medicine, 6. izdaja. Elsevier Saunders, Edinburgh, 2005: 348-9.
6. Nadai M, Katoh M. Changes in Pharmacokinetics in Elderly Patients. *Nihon Rinsho.* 2013; 71(6): 999-1003.
7. Wright JD, Boudinot FD, Ujhelyi MR. Measurement and Analysis of Unbound Drug Concentrations. *Clin Pharmacokinet.* 1996; 30(6): 445-62.
8. Saul L, Fox MD. Potentiation of Anticoagulants Caused by Pyrazole Compounds. *JAMA.* 1964; 188: 320-1.
9. Aggeler PM, O'Reilly RA, Leong L, et al. Potentiation of Anticoagulant Effect of Warfarin by Phenylbutazone. *N Engl J Med.* 1967; 276(9): 496-501.
10. Benet LZ, Hoener BA. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 71(3): 115-21.
11. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic and Clinical Pharmacology, 11. izdaja. McGraw-Hill Medical, New York, 2009: 49 in 819-21.
12. Pacifici GM, Viani A. Methods of Determining Plasma and Tissue Protein Binding of Drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1992; 23(6): 449-68.

13. Howard ML, Hill JJ, Galluppi GR, et al. Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2010; 13(2): 170-87.
14. Baree J, Chamouard JM, Houin G, et al. Equilibrium Dialysis, Ultrafiltration, and Ultracentrifugation Compared for Determining the Plasma-Protein-Binding Characteristics of Valproic Acid. *Clin Chem.* 1985; 31(1): 60-4.
15. Google patenti. An improved process for the preparation of moxifloxacin hydrochloride. <http://www.google.com/patents/EP1651630A1?cl=en>. Dostop: 03. 10. 2014.
16. Register zdravil RS. Seznam zdravil po sestavi. [http://www.ivz.si/register/RZ\\_SEST.HTM](http://www.ivz.si/register/RZ_SEST.HTM). Dostop: 27. 08. 2014.
17. Centralna baza zdravil. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Vigamox. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/BD9EE934CB25E08DC12579EC001FFAC3/\\$File/s-006733.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/BD9EE934CB25E08DC12579EC001FFAC3/$File/s-006733.pdf). Dostop: 27. 08. 2014.
18. Centralna baza zdravil. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Avelox 400 mg. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/AA2704D3868D99B0C12579C2003F4CE6/\\$File/s-011102.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/AA2704D3868D99B0C12579C2003F4CE6/$File/s-011102.pdf). Dostop: 27. 08. 2014.
19. Xu YH, Li D, Liu XY, et al. High performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for moxifloxacin: Validation and application to a pharmacokinetic study in Chinese volunteers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010; 878(32): 3437-41.
20. Raju B, Ramesh M, Borkar RM, et al. Development and validation of liquid chromatography-mass spectrometric method for simultaneous determination of moxifloxacin and ketorolac in rat plasma: application to pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr.* 2012; 26(11):1341-7.
21. Skalioti C, Tsaganos T, Stamatiadis D, et al. Pharmacokinetics of Moxifloxacin in Patients Undergoing Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *Perit Dial Int.* 2009; 29(5): 575-9.
22. Abdelaziz AA, Elbanna TE, Gamaleldeen NM. Validated Microbiological and HPLC Methods for the Determination of

- Moxifloxacin in Pharmaceutical Preparations and Human Plasma. *Braz J Microbiol.* 2012; 43(4): 1291-301.
23. Hemanth Kumar AK, Ramachandran G: Simple and rapid liquid chromatography method for determination of moxifloxacin in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009; 877(11-12): 1205-8.
24. Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. 2013.  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf>. Dostop: 27. 08. 2014.
25. PanReac AppliChem. Varnostni list za acetonitril.  
[http://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A0934\\_sl\\_SI.pdf](http://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A0934_sl_SI.pdf).  
Dostop: 27. 08. 2014.
26. PanReac AppliChem. Varnostni list za diklorometan.  
[http://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A3177\\_sl\\_SI.pdf](http://www.applichem.com/fileadmin/datenblaetter/A3177_sl_SI.pdf).  
Dostop: 27. 08. 2014.
27. DrugBank. Moxifloxacin. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00218>.  
Dostop: 27. 08. 2014.