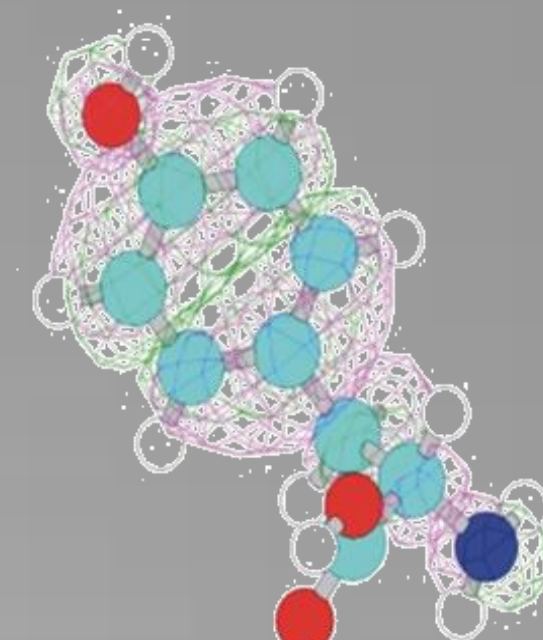




OPRACOWANIE NOWYCH PROCEDUR LC-FL DO OZNACZANIA WYBRANYCH LEKÓW CYTOSTATYCZNYCH W PŁYNACH USTROJOWYCH I ICH ZASTOSOWANIE W PRAKTYCE KLINICZNEJ



Olga Maliszewska¹, Natalia Treder¹, Ilona Olędzka¹, Piotr Kowalski¹, Natalia Miękus¹, Tomasz Bączek¹, Ewa Bień², Małgorzata Krawczyk², Alina Plenis¹

¹ Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

² Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny

Wstęp

Antybiotyki antracyklinowe, do których należą dokсорubicyna, epirubicyna i idarubicyna, to powszechnie stosowane leki cytostaticzne w leczeniu nowotworów m.in. chłoniaka Hodgkinga i mięsaków. Do głównych skutków ubocznych działania antracyklin należą kardiotoxyczność, mielosupresja i wymioty. Aby zwiększyć efektywność leczenia onkologicznego a także zminimalizować ryzyko występowania działań niepożądanych, istotne jest kontrolowanie poziomu stężenia tych leków w próbkach płynów ustrojowych [1].

Cel

Celem badań było opracowanie nowych, dokładnych i precyzyjnych metod opartych na chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (LC-FL) do oznaczania dokсорubicyny, epirubicyny i idarubicyny w moczu i osoczu krwi ludzkiej jako konkurencyjnych narzędzi analitycznych do zastosowania w praktyce klinicznej.

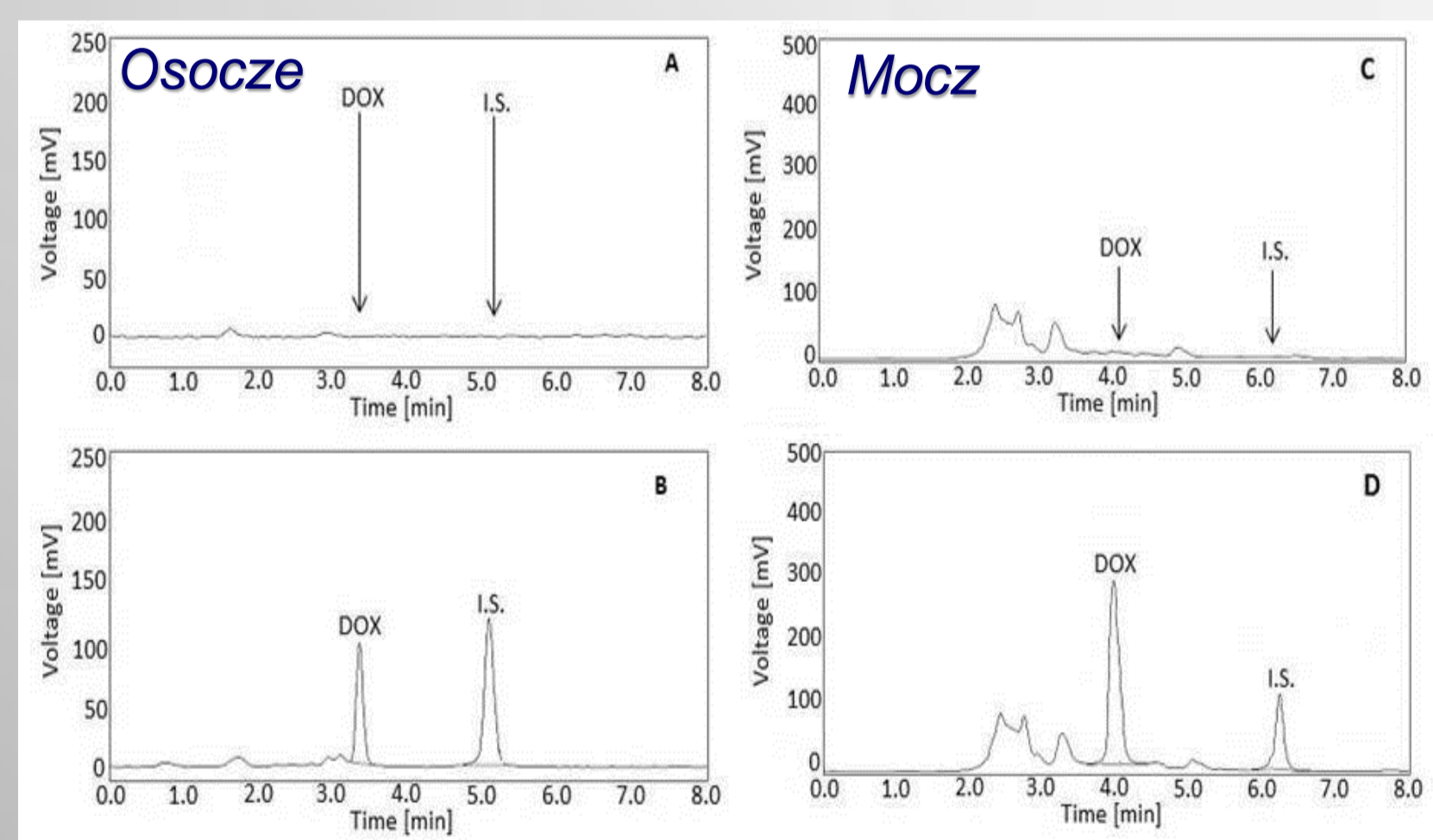
Materiały i metody:

Próbki moczu i osocza zawierające dokсорubicynę (DOX) i idarubicynę (IDA) oraz danorubicynę stosowaną jako wzorzec wewnętrzny (IS), były rozdzielane chromatograficznie na kolumnie Discovery HS-C18. W przypadku epirubicyny (EPI), analizy przeprowadzono na kolumnie Synergi Hydro-RP 80 A. W każdym przypadku, temperatura kolumny wyniosła 30°C. Jako fazę ruchomą dla dokсорubicyny i idarubicyny zastosowano mieszaninę 0,1 % kwasu mrówkowego w wodzie i acetonitrylu, a dla epirubicyny mieszaninę 40 mM buforu fosforanowego pH 4,1 i acetonitrylu. Przepływ fazy ruchomej we wszystkich analizach wynosił 1 ml/min. Analizy były monitorowane za pomocą detekcji fluorescencyjnej (FL). W przypadku dokсорubicyny długości fali wzbudzenia wynosiła 487 nm a długość fali emisji 555 nm. Dla idarubicyny były to wartości odpowiednio: 487 and 547 nm, a dla epirubicyny 497 nm i 557 nm. Powyższe metody poddano walidacji, a uzyskane dane potwierdziły, że spełniają kryteria FDA i ICH dla metod analitycznych.

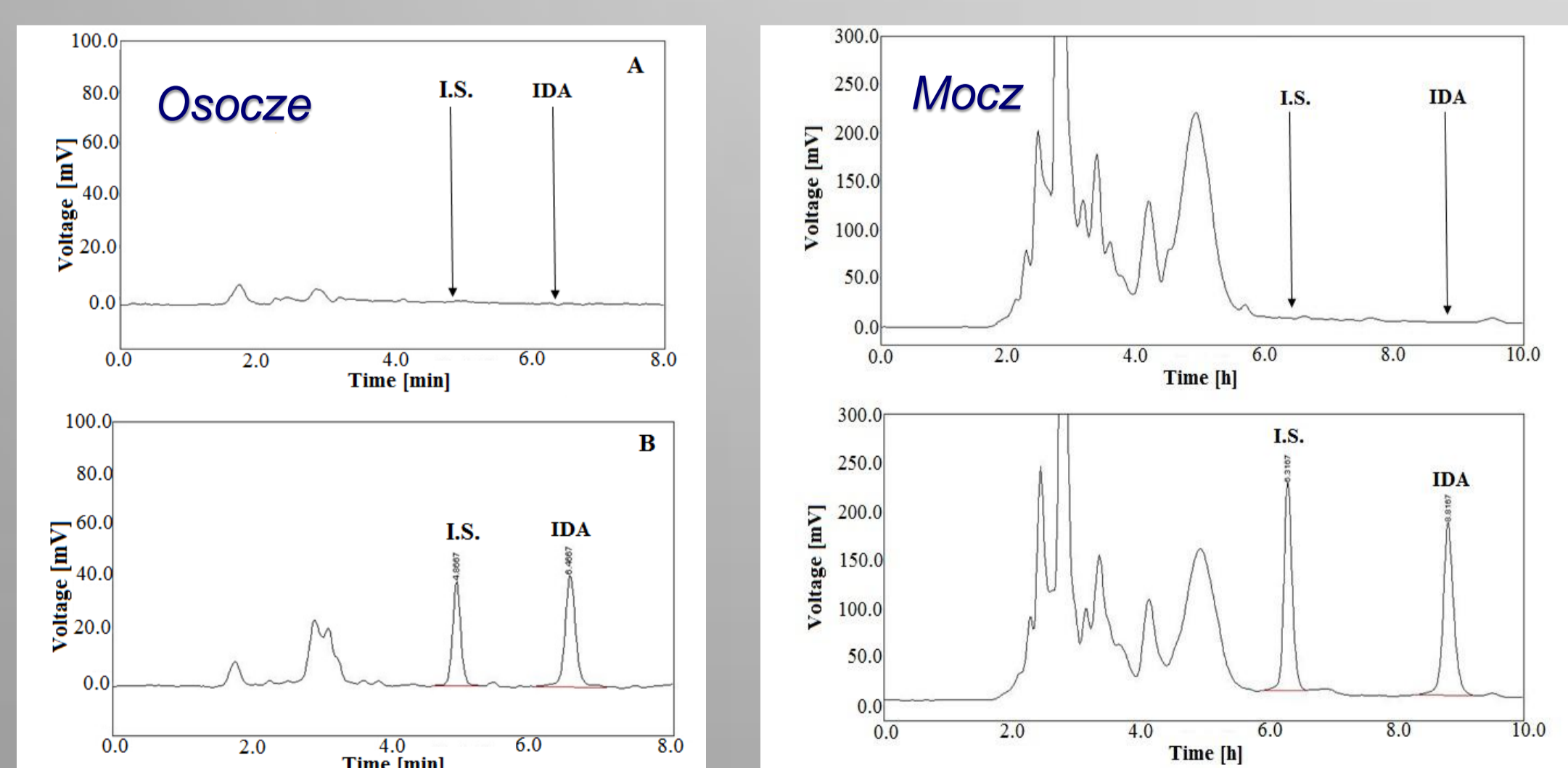
Wyniki i dyskusja:

W trakcie optymalizacji procedury przygotowania próbek do analizy testowano wiele metod opartych na deproteinizacji, ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE), ekstrakcji do fazy stałej (SPE) oraz mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). W badaniach tych, zastosowano szereg różnorodnych rozpuszczalników do ekstrakcji, oczyszczania prób i desorpcji analitów oraz kolumnki o różnych złożach fazy stacjonarnej (C18, HLB). Ostatecznie, dla wszystkich badanych antracyklin, jako najbardziej efektywną procedurę przygotowania prób wybrano SPE z użyciem kolumnki HLB.

Uzyskane ekstrakty analizowano metodą LC-FL, dla której zoptymalizowano parametry chromatograficzne. Powyższe procedury poddano walidacji, a uzyskane dane walidacyjne potwierdziły, że spełniają kryteria FDA i ICH dla metod analitycznych. Wydajność absolutna dla wszystkich badanych leków wynosiła ponad 95,9 %. Chromatogramy przedstawione na Rys. 1-3 dowodzą, że nie zaobserwowano interferencji pików pochodzących od matrycy w miejscu występowania pików badanych analitów i IS. To potwierdza że opracowane metody LC są selektywne. Liniowość dla dokсорubicyny, epirubicyny oraz idarubicyny potwierdzono w zakresach podanych w Tabeli 1.



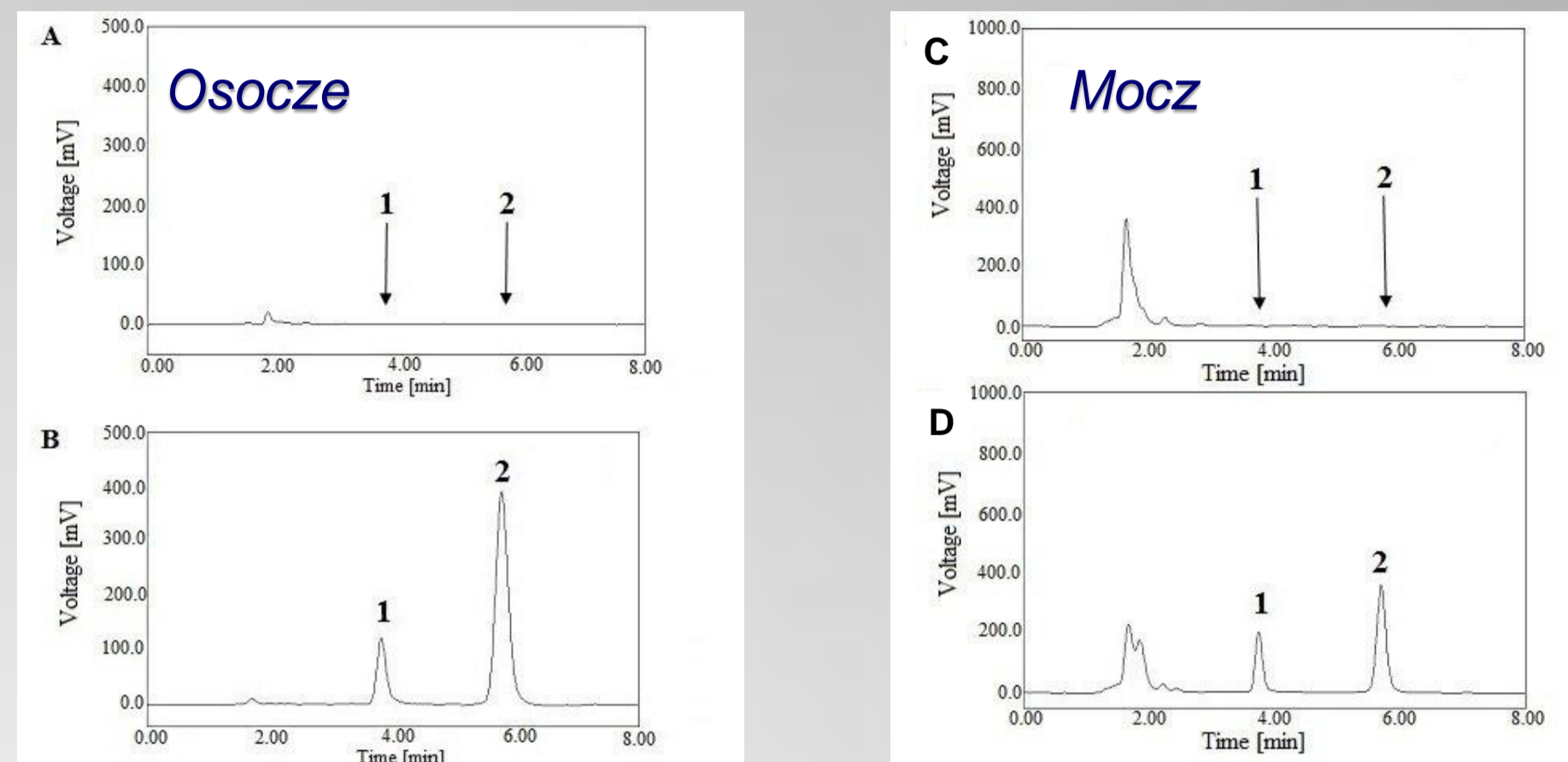
Rys. 1. Chromatogramy LC ekstraktów próbki czystego osocza (A) i moczu (C) oraz próbki osocza z dodatkiem dokсорubicyny o stężeniu 250 ng/mL i daunorubicyny (IS) o stężeniu 250 ng/ml (B), a także próbki moczu z dodatkiem dokсорubicyny o stężeniu 5 µg/ml i daunorubicyny (I.S.) o stężeniu 2,5 µg/ml (D), po ekstrakcji SPE HLB.



Rys. 2. Chromatogramy LC ekstraktów próbki czystego osocza (A) i moczu (C) oraz próbki osocza z dodatkiem idarubicyny o stężeniu 15 ng/ml i DAU (I.S.) o stężeniu 20 ng/ml (B), a także próbka moczu z dodatkiem idarubicyny o stężeniu 100 ng/ml i DAU (I.S.) o stężeniu 100 ng/ml (D), po ekstrakcji SPE HLB.

Bibliografia:

- [1] O. Maliszewska, A. Plenis, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, E. Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek, J. Pharm. Biomed. Anal., 2018, 158, 376 – 385
 [2] N. Treder, O. Maliszewska, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, E. Bień, M.A. Krawczyk, E. Adamkiewicz-Drożyńska, A. Plenis, J. Chromatogr. B, 2020, 1136, 121910
 [3] O. Maliszewska, N. Treder, I. Olędzka, P. Kowalski, N. Miękus, T. Bączek, W. Rodzaj, E. Bień, M.A. Krawczyk, A. Plenis, *Molecules*, 2020, 25(24), 5799; https://doi.org/10.3390/molecules25245799

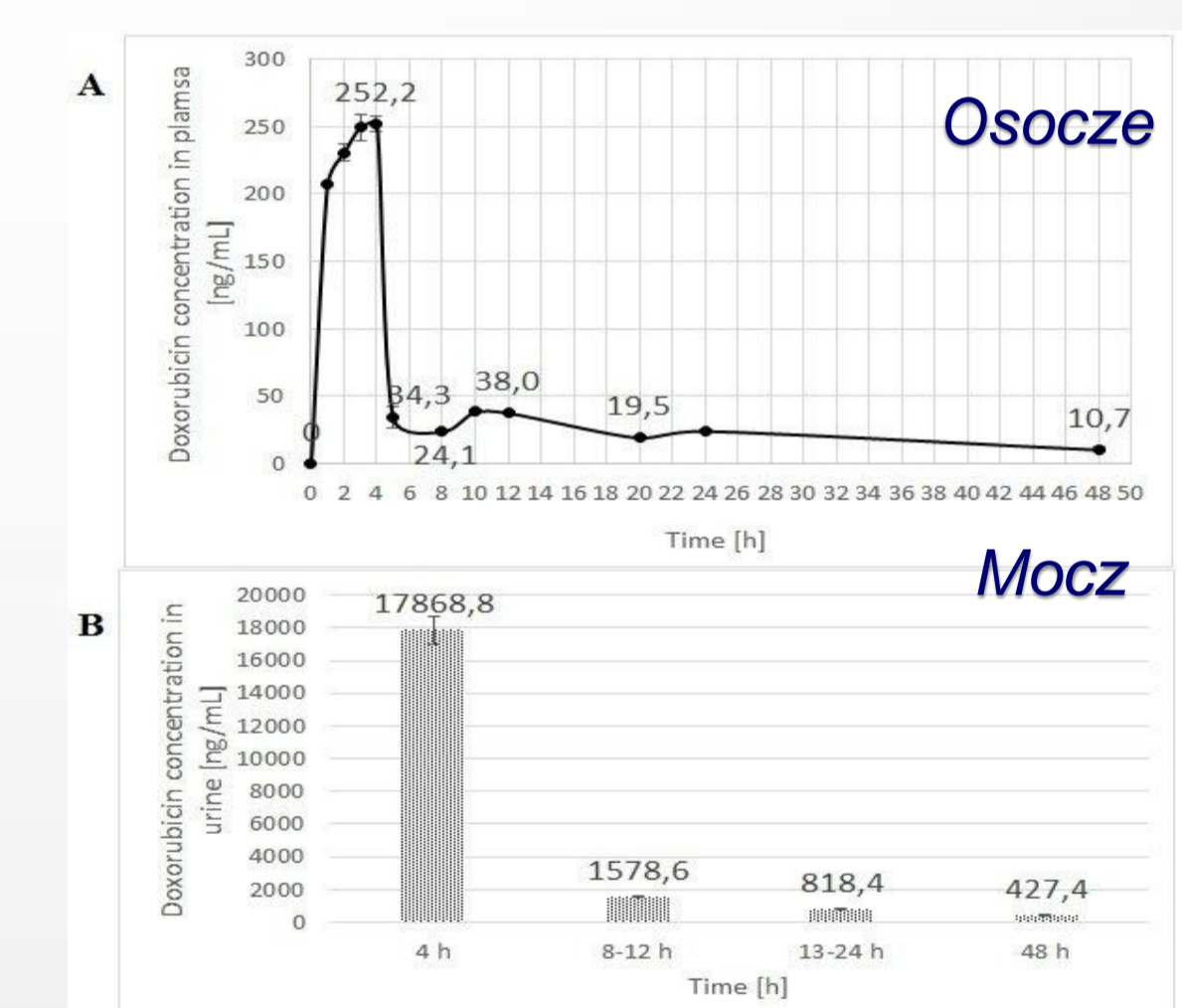


Rys. 3. Chromatogramy LC uzyskane po ekstrakcji próbki czystego osocza (A) i moczu (C) oraz próbki osocza z dodatkiem EPI o stężeniu 500 ng/ml i 1000 ng/ml i DAU (I.S.) (B), oraz próbka moczu z dodatkiem epirubicyny o stężeniu 1000 ng/ml i 1500 ng/ml i DAU (I.S.) (D), po ekstrakcji SPE HLB.

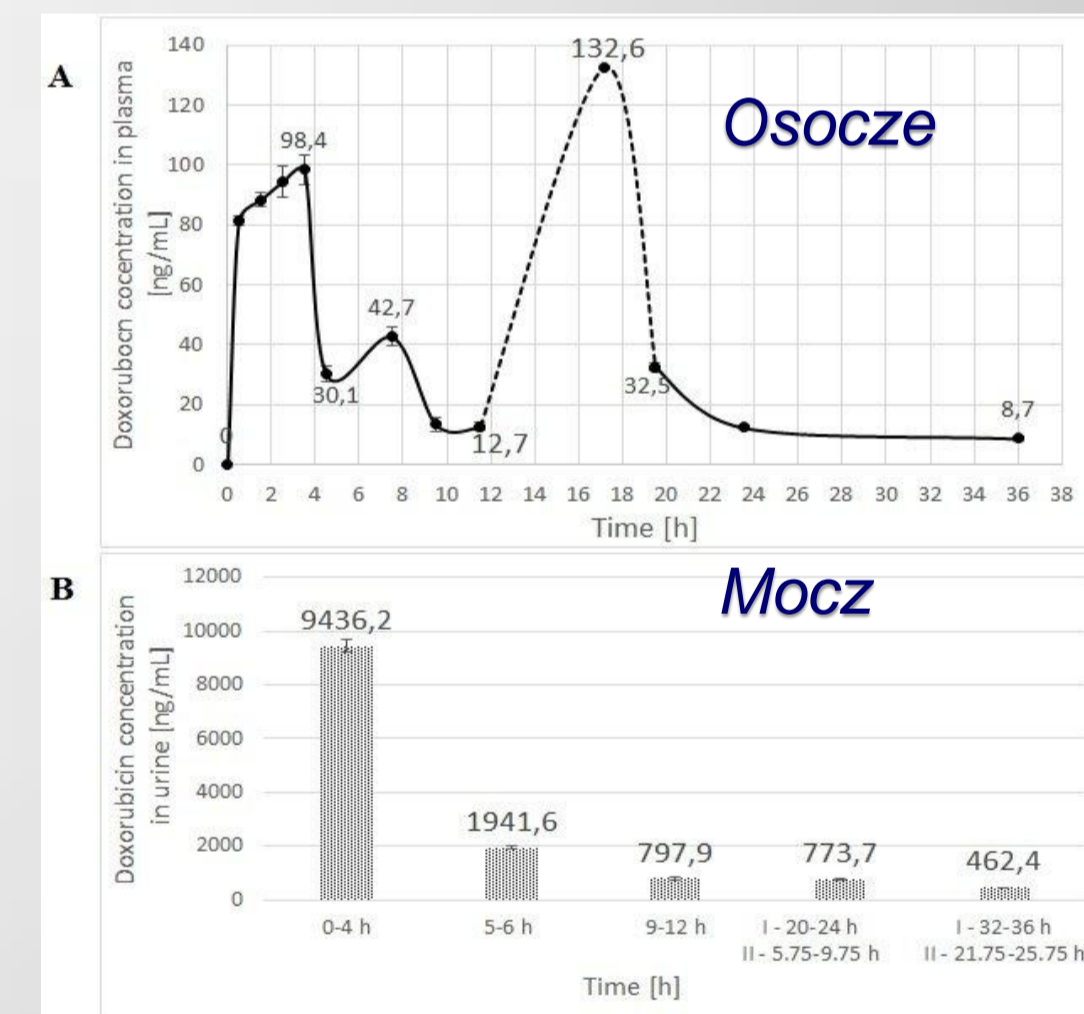
Tabela 1. Podsumowanie danych walidacyjnych opracowanych metod LC-FL oznaczania dokсорubicyny, epirubicyny oraz idarubicyny w ludzkim osoczu i moczu.

PARAMETRY	Dokсорubicyna		Idarubicyna		Epirubicyna		
	Osocze	Mocz	Osocze	Mocz	Osocze	Mocz	
Zakres liniowości [ng/ml]	1-1000	1-25 000	0,1-50	0,25-200	1-1500	1-10000	
Limit detekcji (LOD) [ng/mL]	0,5	0,5	0,05	0,25	0,25	0,25	
Limit oznaczalności (LOQ) [ng/mL]	1	1	0,25	0,5	0,5	0,5	
Dokładność [%]	Intra-day	≥ 96,1	≥ 94,6	≥ 96,4	≥ 99,3	≥ 92,1	≥ 98,4
	Inter-day	≥ 98,0	≥ 96,0	≥ 99,1	≥ 99,6	≥ 98,4	≥ 98,1
Precyzja [RSD%]	Intra-day	< 9,09	< 9,09	< 9,09	< 8,82	< 7,8	< 5,5
	Inter-day	< 11,22	< 10,91	< 9,09	< 9,78	< 8,7	< 9,6
Wydajność absolutna [%]	97,4 ± 6,6	99,4 ± 7,1	95,9 ± 4,9	92,1 ± 3,8	100,7	95,6	
Wydajność absolutna [%]	Daunorubicyna (IS)	98,9 ± 4,5	99,6 ± 6,0	97,3 ± 6,3	98,3 ± 7,2	98,9	98,9

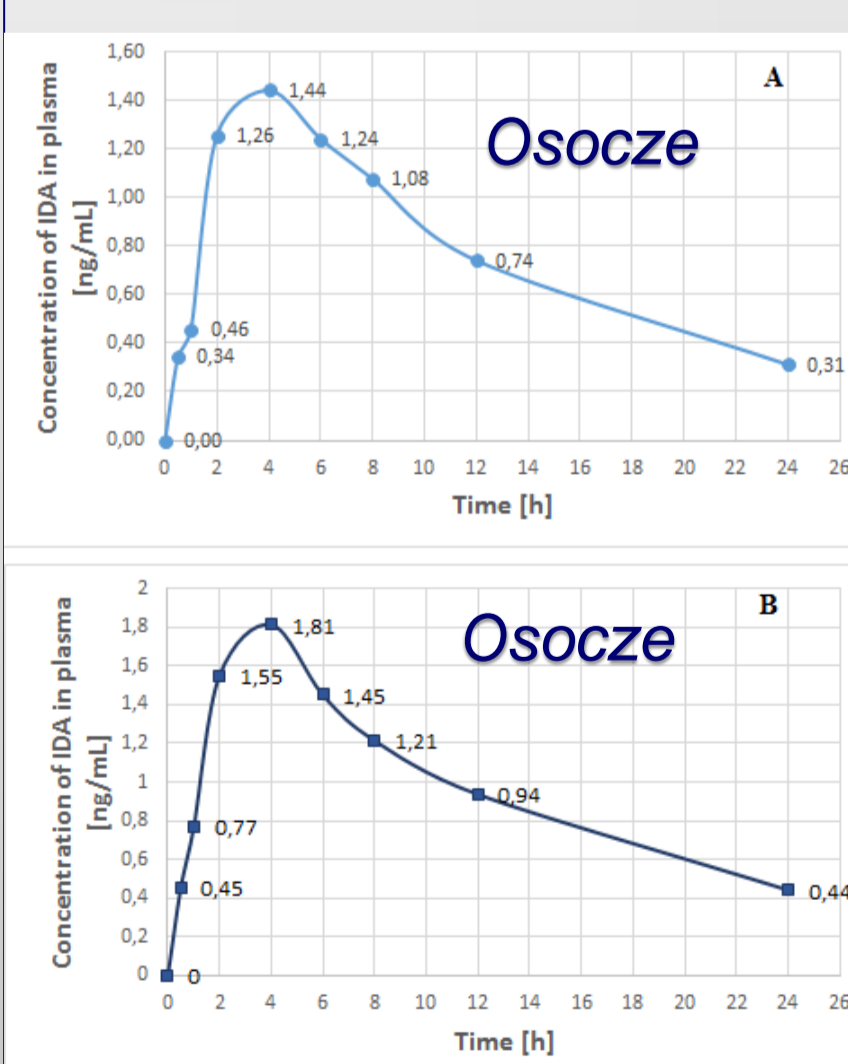
Następnie, opracowane procedury SPE-LC-FL zostały z powodzeniem zastosowane w praktyce klinicznej do monitorowania stężenia dokсорubicyny, idarubicyny oraz epirubicyny u pacjentów pediatrycznych z chorobą nowotworową [1-3]. Uzyskane profile stężeń zostały przedstawione na Rys. 4-7 dowodzą, że poziom stężenia leków cytostaticznych w moczu był znacznie wyższy niż poziom stężenia w osoczu w tym samym czasie.



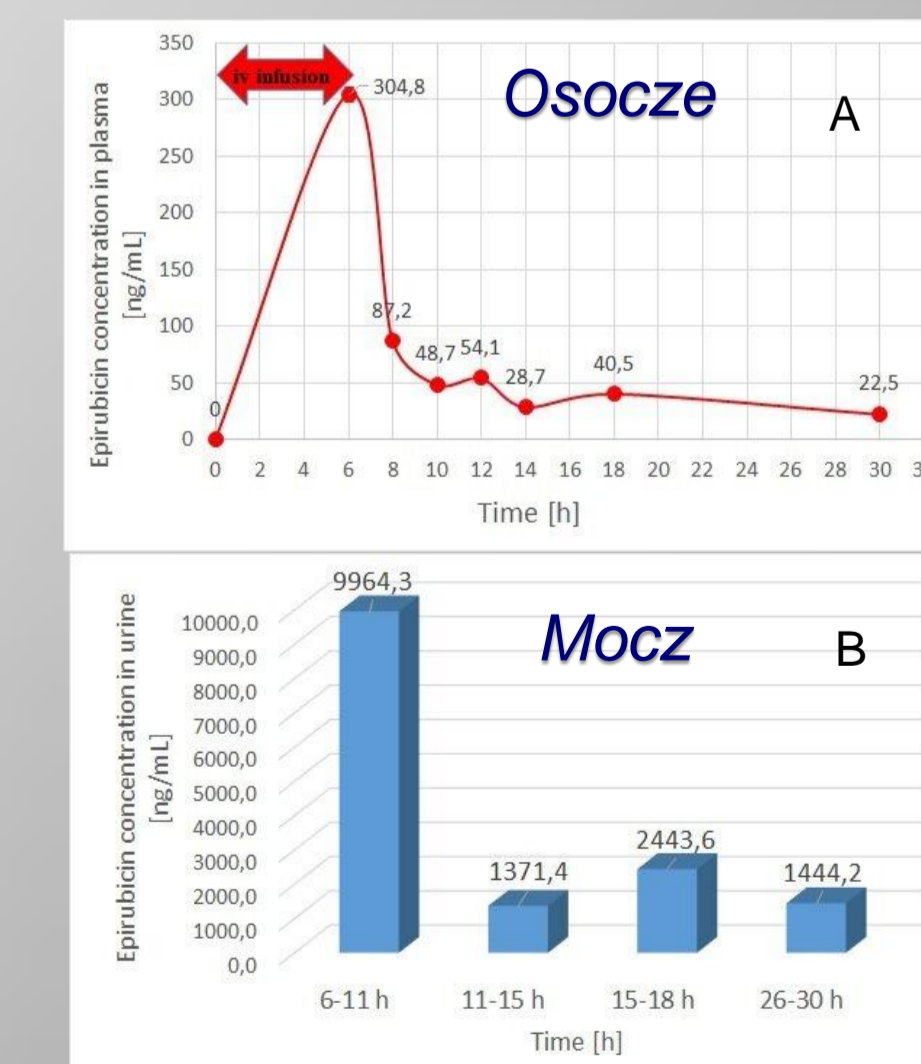
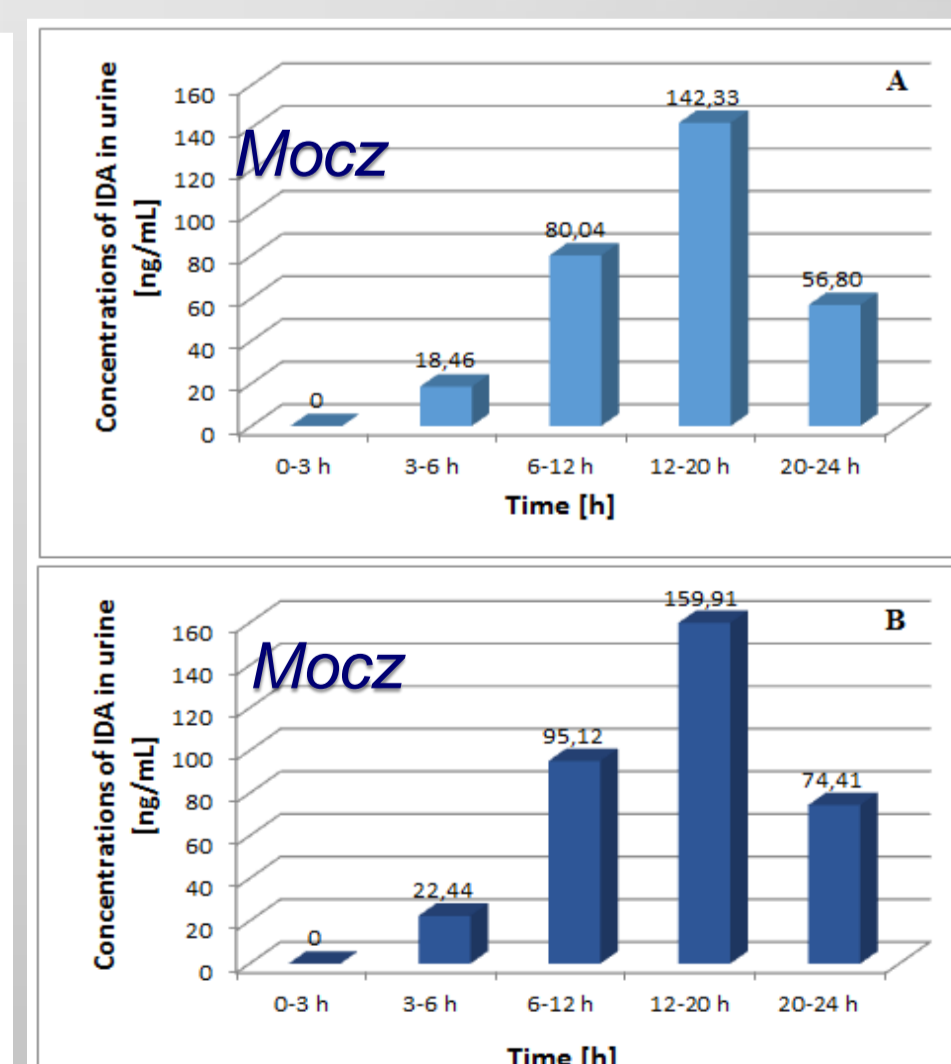
Rys. 4. Profile stężenia dokсорubicyny w próbkach osocza (A) oraz moczu (B) pobranych od 15 letniego pacjenta z chłoniakiem Hodgkinga po pojedynczym dożylnym wlewie (40 mg/m² - 4 h wlew).



Rys. 5. Profile stężenia dokсорubicyny w próbkach osocza (A) oraz moczu (B) pobranych od 17 letniego pacjenta z RMS po dwóch dożylnych wlewach, każdy w dawce 20 mg/m² powierzchni ciała, podawany przez dwa kolejne dni zgodnie z kursem IOA (czas pomiędzy dawkami - 14,25 h).



Rys. 6. Profile stężenia idarubicyny w próbkach osocza (A) oraz moczu (B) pobranych od 17-letniego pacjenta z RMA po doustnym podaniu idarubicyny w dawce 10 mg (podania w 1-szym i 10-tym dniu terapii onkologicznej zgodnie z protokołem CWS - 2006 (trofosamid - idarubicyna - etopozyd).



Rys. 7. Profil stężenia epirubicyny w próbkach osocza (A) i moczu (B) pobranych od 19-letniego pacjenta z RMA po 6 godzinnej dożylniej infuzji epirubicyny (150 mg/m²).

WNIOSKI

Opracowano nowe, selektywne, precyzyjne i dokładne metody LC-FL pozwalające na oznaczanie dokсорubicyny, idarubicyny i epirubicyny w próbkach osocza i moczu ludzkiego, które zostały z powodzeniem zastosowane do monitorowania leków cytostaticznych u dzieci leczonych onkologicznie. Opracowane metody LC-FL mogą być użytecznymi narzędziami analitycznymi w badaniach farmaceutycznych, biomedycznych i terapii monitorowania leku a także stanowią interesującą alternatywę dla wcześniej opublikowanych technik LC oznaczania wybranych antracyklin.