

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Lara Zorić

**Razvoj i validacija HPLC-FD metode za istovremeno
određivanje metabolita doksorubicina u urinu štakora**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u okviru istraživačkog projekta „Sinteza supramolekulskih samo-udruženih nanostruktura za izgradnju naprednih funkcionalnih materijala“ (SUPeRNANO, IP-2018-01-6910) i projekta „Siguran pristup za razvoj nano-sustava za ciljanu isporuku lijekova u mozak-SENDER“ (HRZZ-PZS-2019-02-4323) koje financira Hrvatska zaklada za znanost, u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji, Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Ruže Frkanec, znanstvene savjetnice uz komentorstvo doc. dr. sc. Davora Šakića, Zavod za Analitičku kemiju Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

POPIS KRATICA

ADME	apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje (engl. <i>absorption, distribution, metabolism, and excretion</i>)
DOX	doksorubicin
IDA	idarubicin
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DOXol	doksorubicinol
DOXon	doksorubicinon
DOXolon	doksorubicinolon
IS	interni standard
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PEG	polietilen glikol
PEG-DOX	pegilirani liposomalni doksorubicin
NPLD	nepegilirani liposomalni doksorubicin
FDA	Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. <i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
PLGA	kopolimer mliječne i glikolne kiseline (engl. <i>polylactic-co-glycolic acid</i>)
EPR	povećana propusnost i zadržavanje (engl. <i>enhanced permeability and retention</i>)
HPLC-FD	visoko učinkovita tekućinska kromatografija s fluorescentnom detekcijom (engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescent Detection</i>)
UV-Vis	zračenje u području ultraljubičastog i vidljivog djela spektra
Vis	zračenje u području vidljivog spektra

FD	fluorescentni detektor
MS	spektrometar masa
RI	indeks refrakcije
ICH	međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. <i>International Conference on Harmonization</i>)
RSD	relativna standardna devijacija
LOD	limit detekcije
LOQ	limit kvantifikacije
TCA	trikloroetena kiselina
DMSO	dimetilsulfoksid
QC	uzorci za kontrolu kvalitete (engl. <i>quality control samples</i>)
IRF	faktor korelacije (engl. <i>internal response factor</i>)

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Antraciklinski antitumorski lijekovi.....	3
1.2. Doksorubicin i mehanizam djelovanja.....	4
1.3. Metabolizam doksorubicina.....	5
1.3.1. Doksorubicinol.....	6
1.3.2. Doksorubicinon.....	7
1.4. Formulacije doksorubicina.....	8
1.4.1. Liposomska formulacija doksorubicina.....	8
1.4.2. Doksorubicin ugrađen u polimerne nanočestice.....	9
1.5. Visoko učinkovita tekućinska kromatografija (HPLC, <i>engl. High-Performance Liquid Chromatography</i>).....	10
1.5.1. Osnovna načela visoko učinkovite tekućinske kromatografije.....	10
1.5.2. Fluorescentni detektori.....	11
1.6. Validacija analitičke metode.....	11
1.6.1. Točnost metode.....	12
1.6.2. Preciznost metode.....	13
1.6.3. Specifičnost i selektivnost metode.....	13
1.6.4. Linearnost metode.....	13
1.6.5. Limit detekcije i limit kvantifikacije.....	14
1.6.6. Robusnost metode.....	15
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	16
3. MATERIJAL I METODE	18
3.1. Materijal.....	19
3.1.1. Instrumenti.....	19
3.1.2. Pribor.....	19
3.1.3. Kemikalije.....	19
3.2. Metode.....	20
3.2.1. HPLC-FD analiza.....	20
3.2.1.1. Priprema otopine mobilne faze.....	20

3.2.1.2. Priprema standardnih uzoraka metabolita	20
3.2.1.3. HPLC-FD metoda za istovremeno određivanje DOX, DOXola i DOXona.....	21
3.2.2. <i>In vivo</i> pokus.....	21
3.3. Statistička obrada rezultata.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Validacija metode.....	24
4.1.1. Specifičnost i selektivnost metode	24
4.1.2. Linearnost metode	28
4.1.3. Preciznost metode.....	30
4.1.4. Točnost metode.....	33
4.1.5. Limit detekcije i limit kvantifikacije	34
4.2. Primjena metode za istovremeno određivanje metabolita doksorubicina u urinu štakora.	35
5. ZAKLJUČAK	38
6. ZAHVALE.....	40
7. POPIS LITERATURE	42
8. SAŽETAK	48
9. SUMMARY	50

1. UVOD

Brza, osjetljiva i reproducibilna metoda za istovremeno određivanje metabolita lijeka u farmaceutskoj industriji je neophodna za kontrolu djelotvornosti i potencijalne toksičnosti lijeka, te istraživanje farmakokinetike lijeka, odnosno apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja (ADME, engl. *absorption, distribution, metabolism, and excretion*). Cijeli niz modernih analitičkih tehnika koristi se kroz cijeli postupak razvoja lijeka, uključujući predkliničke i kliničke studije (Pandey i sur., 2010). U predkliničkoj fazi se *in vivo* model na laboratorijskim životinjama koristi u svrhu razvoja lijekova, poboljšanja kvalitete i smanjenja mogućih rizika u daljnjim fazama studije (Park i Schaer, 2019).

Maligne bolesti zbog široke rasprostranjenosti i visoke smrtnosti predstavljaju izazov u liječenju (Hassanpour i Dehghani, 2017). Većina današnjih antitumorskih lijekova koji se koriste u kemoterapiji su citotoksični lijekovi koji imaju antiproliferativni učinak te uz antitumorsku aktivnost oštećuju i sva normalna i zdrava tkiva. Važan problem u terapiji malignih bolesti je također i nemogućnost selektivne dostave antitumorskih lijekova u tumorsko tkivo (Lammers i sur., 2012). Unaprjeđenje antitumorske terapije primjenom nanotehnologije temelji se na ugrađivanju lijekova u terapijske nanosustave, nanočestice ili nanovezikule, s ciljem poboljšanja topljivosti antitumorskih lijekova, njihove stabilnosti u biološkom okruženju te farmakokinetičkih svojstava npr. produljeno zadržavanje lijeka u cirkulaciji i poboljšana raspodjela u ciljno tkivo (Bertrand i sur., 2014; Wei i sur., 2012).

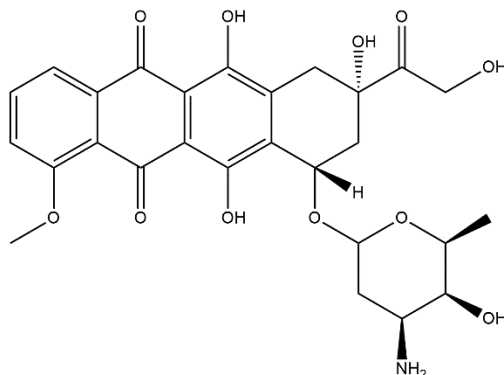
Regulatorne agencije za registraciju lijekova i nadzor farmaceutskih tvrtki imaju stroge zahtjeve za kontrolu kvalitete konačnih proizvoda, lijekova kao i njihovih nanoterapijskih formulacija koje se moraju testirati po strogim pravilima. Sve metode testiranja koje se koriste u procesu razvoja lijeka i dokazivanja njegove djelotvornosti i neškodljivosti moraju biti validirane, tj. mora se dokazati da su podesne i pouzdane za primjenu. Cilj ovoga rada bio je pomoću visoko učinkovite tekućinske kromatografije na reverznoj fazi i s fluorescentnom detekcijom razraditi metodu za istovremeno kvantitativno određivanje metabolita antitumorskog lijeka doksorubicina u urinu štakora tretiranih različitim formulacijama doksorubicina. Visoko učinkovita tekućinska kromatografija je instrumentalna analitička metoda koja se vrlo često primjenjuje u farmaceutskoj industriji zbog svoje preciznosti, specifičnosti i brze analize.

1.1. Antraciklinski antitumorski lijekovi

Tumori su drugi po redu uzročnici smrti u široj populaciji, a u Hrvatskoj u prosjeku svaka četvrta osoba oboli od neke zloćudne bolesti (Hassanpour i Dehghani, 2017; Incidencija raka u Hrvatskoj, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Bilten br. 40, 2018., ur. M. Šekerija, Zagreb, HR). Zbog toga svakodnevno raste potreba za razvojem novih načina i unaprjeđivanje već postojećih vrsta terapije ove globalne pandemije. Liječenje raka izrazito je kompleksno i podrazumijeva nekoliko različitih načina terapije od kojih je jedan korištenje kemoterapijskih lijekova, odnosno citostatika među koje spadaju antraciklinski antitumorski lijekovi (Nadas i Sun, 2006).

Izolirani iz roda bakterija *Streptomyces* u 1960-ima, antraciklini su skupina antitumorskih lijekova čiji su glavni predstavnici doksorubicin (DOX) i daunorubicin (Carvalho i sur., 2009). Koriste se u terapiji brojnih solidnih tumora i hematoloških maligniteta poput leukemija, limfoma, tumora dojke i jajnika (Farhat, 2013). Unatoč tome što su jedni od najčešće i najšire korištenih kemoterapeutika, učinkovitost antraciklina ograničava glavna nuspojava kardiotsičnosti, a moguć je i razvoj rezistencije tumora na ovu skupinu lijekova (Hortobagyi, 1997). Stoga su razvijeni brojni novi analozi postojećih antraciklina kao što su idarubicin (IDA) i epirubicin kako bi se umanjile neželjene posljedice (Carvalho i sur., 2009).

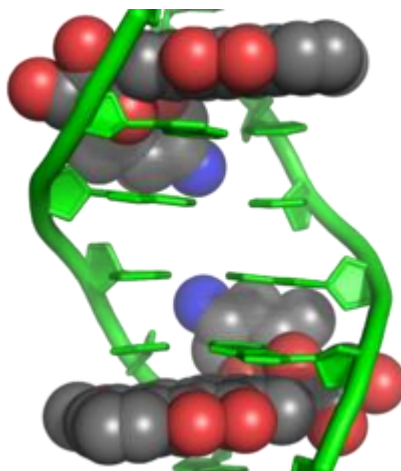
Antraciklini su crveno obojeni aromatski poliketidi čija se struktura sastoji od različitih aglikanskih i glikanskih djelova iz kojih proizlazi raznovrsnost članova. Glavni dio aglikanske strukture čini tetraciklinski prsten na koji je glikozidnom vezom vezan aminoglikozidni ostatak (slika 1) (Shaul i sur., 2013). Prirodna fluorescencija antraciklina olakšava njihovo istraživanje budući da se lako može pratiti njihova distribucija unutar stanica i tkiva i detektirati na fluorescentnim detektorima.



Slika 1. Kemijska struktura doksorubicina

1.2. Doksorubicin i mehanizam djelovanja

Doksorubicin, kao glavni predstavnik antraciklina, antitumorsko djelovanje postiže na nekoliko načina. Neki od njih su razjašnjeni, a jedan od mehanizama uključuje interkaliranje s DNA (deoksiribonukleinska kiselina, engl. *deoxyribonucleic acid*) heliksom kako je prikazano na slici 2 (Frederick i sur., 1990). Narušavajući strukturu dvostruke uzvojnice ugrađivanjem između baznih parova ili kovalentnim vezanjem za proteine koji su uključeni u transkripciju i replikaciju DNA molekule, doksorubicin u stanicama uzrokuje inhibiciju tih procesa. Također, inhibiciju transkripcije i replikacije DNA molekule uzrokuje i negativan učinak DOX-a na enzim topoisomerasu II. Usporeni ili oštećeni navedeni procesi u stanici izazivaju njenu smrt. (Carvalho i sur., 2009).

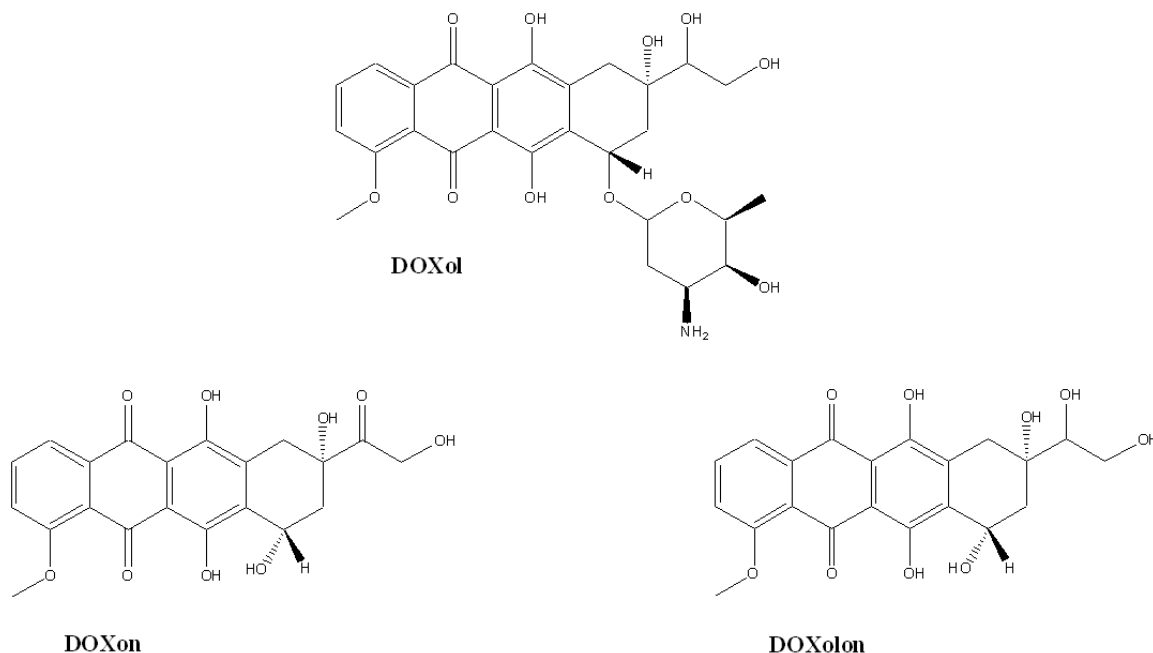


Slika 2. Interkaliranje doksorubicina s DNA heliksom (Frederick i sur., 1990)

Antraciklini, a samim time i DOX, u stanicama također potiču nastanak slobodnih radikala. Zbog visokog afiniteta prema kardiolipinu koji se nalazi na unutarnjoj membrani mitohondrija, DOX se nakon ulaska u stanicu u najvećoj mjeri lokalizira unutar mitohondrija (Reis-Mendes i sur., 2015). Reagirajući s kompleksom I, koji je jedan od mitohondrijskih proteina uključenih u oksidativnu fosforilaciju, nastaje semikinonski radikal koji oksidira molekularni kisik iz kojeg nastaju slobodni kisikovi radikali. Unutar mitohondrija i ostatka stanice slobodni radikali oksidiraju makromolekule pri čemu dolazi do njihovog oštećivanja što dovodi do stanične smrti (Carvalho i sur., 2009).

1.3. Metabolizam doksorubicina

DOX u stanice ulazi slobodnom difuzijom, a svoje djelovanje postiže u jezgri i mitohondriju stanice nekim od navedenih mehanizama. Tri glavna metabolita koja nastaju degradacijom DOX-a u stanici su doksorubicinol (DOXol), doksorubicinon (DOXon) i doksorubicinolon (DOXolon) čije su kemijske strukture prikazane na slici 3 (Sakai-Kato i sur., 2010).

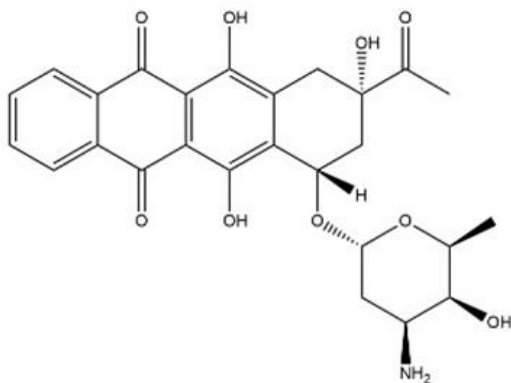


Slika 3. Kemijske strukture metabolita doksorubicina (DOX)

Antraciklini generalno podliježu hepatičkom metabolizmu, a metaboliti i nemetabolizirani lijek se izlučuju urinom. Istraživanja su pokazala da se urinom izlučuje oko 50% nepromijenjenog DOX-a, 30% DOXola i 9,3% aglikona doksorubicina među koje spada DOXon (Reis-Mendes i sur., 2015). Studije provedene na laboratorijskim životinjama pokazale su da svaki od navedenih metabolita nastaje u uvjetima ovisnim o NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) što sugerira postojanje specifičnih enzima koji sudjeluju u metabolizmu doksorubicina (Licata i sur., 2000; Schaupp i sur., 2015).

Prema istraživanju koje su proveli Alhareth i suradnici (2012), u urinu, plazmi te tkivima jetre, slezene i srca klinički je značajno određivati DOX, DOXol i DOXon uz neki od internih

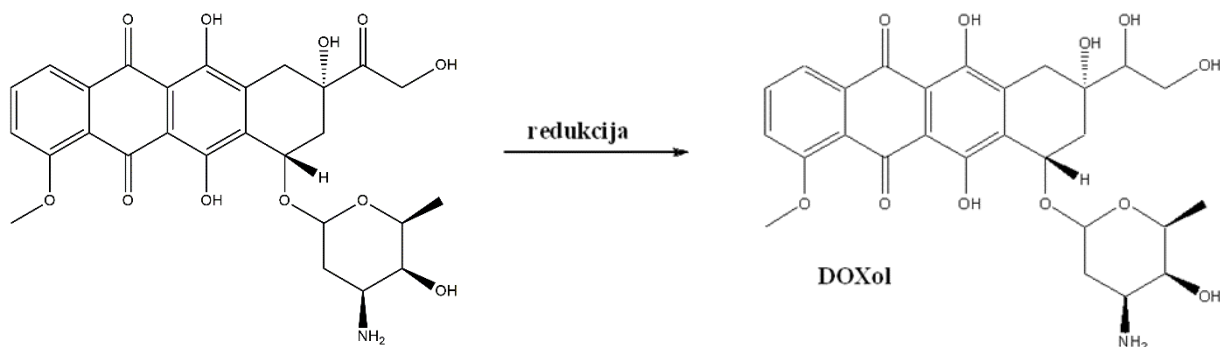
standarda (IS). Kao IS najčešće se koriste daunorubicin i idarubicin (IDA) čija je kemijska struktura prikazana na slici 4 (Alhareth i sur., 2012).



Slika 4. Kemijska struktura idarubicina

1.3.1. Doksorubicinol

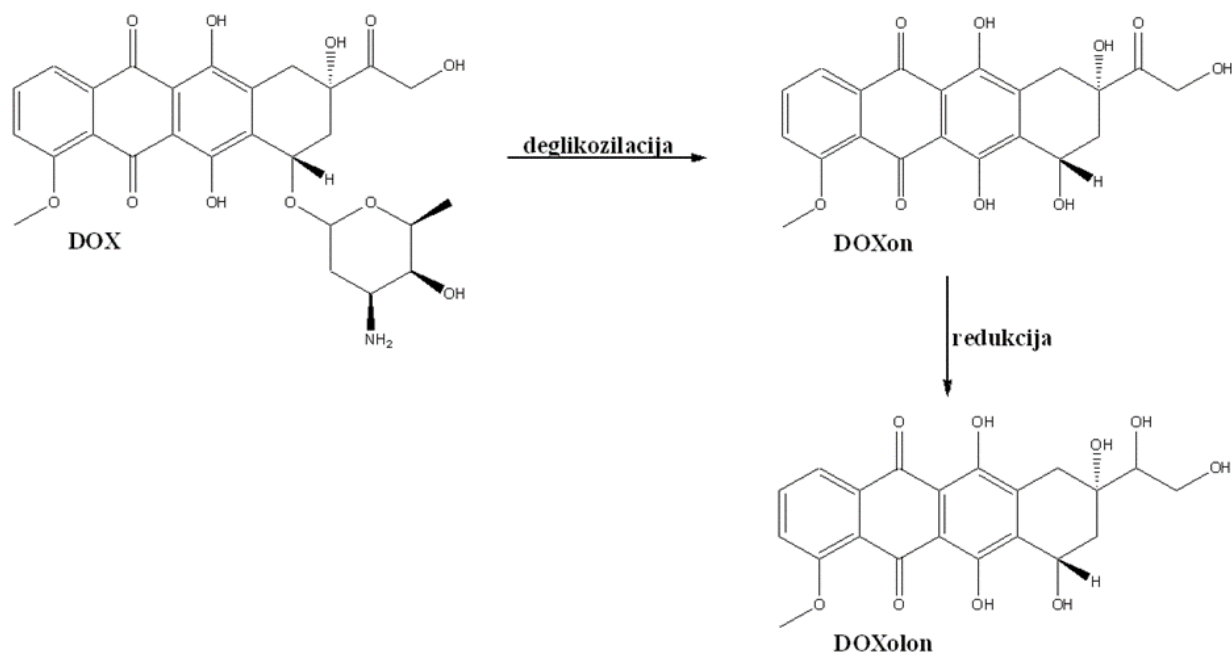
Doksorubicinol je metabolit koji nastaje parcijalnom redukcijom karbonilne skupine doksorubicina djelovanjem enzima NADPH-ovisne karbonilne reduktaze (slika 5). Dosadašnja istraživanja su pokazala da DOXol uz DOX ima najznačajniju ulogu u razvoju kardiotoksičnosti, ali točan mehanizam toksičnog djelovanja nije u potpunosti razjašnjen. DOXol je hidrofilniji od DOX-a tako da u većoj mjeri ulazi u kardiomiocite gdje uzrokuje oštećenja. Pretpostavlja se da DOXol poput DOX-a inducira oksidativni stres koji je u srčanom tkivu oko 10 puta veći nego u drugim tkivima poput tkiva jetre, bubrega ili slezene. Istraživanja su pokazala da DOXol u ljudskom miokardu utječe na aktivnost proteina koji reguliraju količinu željeza u stanici, a disbalans homeostaze željeza u stanici među ostalim doprinosi i nastanku oksidativnog stresa (Reis-Mendes i sur., 2017). Istraživanja na srčanom tkivu laboratorijskih životinja pokazala su da DOXol također inhibira djelovanje Ca²⁺ pumpe koja se nalazi na sarkoplazmatskom retikulumu što nije slučaj s doksorubicinom (Reis-Mendes i sur., 2015).



Slika 5. Redukcija doksorubicina u doksorubicinol (Sakai-Kato i sur., 2010)

1.3.2. Doksorubicinon

Doksorubicinon ili doksorubicin hidroksiaglikon nastaje hidrolizom glikozidne veze u strukturi doksorubicina, a daljnom karbonilnom redukcijom DOXona nastaje doksorubicinolon (DOXolon). Studija provedena na određivanju metabolita DOX-a u srčanom tkivu dokazuje da je količina nastalog doksorubicinona u srcu zanemariva budući da se gotovo odmah prevodi u doksorubicinolon reakcijom prikazanom na slici 4 (Licata i sur., 2000). Unatoč tome što u usporedbi s DOXolom, metabolizmom nastaje znatno manje DOXona, urinom se ipak izlučuju mjerljive i klinički značajne količine.



Slika 6. Deglikozidacija DOX-a u DOXon te njegova redukcija u DOXolon (Sakai-Kato i sur., 2010)

1.4. Formulacije doksorubicina

Limitirajući faktor pri korištenju konvencionalnog doksorubicina u otopini kao antitumorskog lijeka je razvoj oštećenja srčanog tkiva stoga su provedeni brojni pokušaji poboljšanja doksorubicina u svrhu smanjenja njegove toksičnosti i poboljšanja djelotvornosti. Neki od načina su već spomenuti razvoj novih analoga postojećih antraciklina, upotreba manjih doza, istovremeno korištenje kardioprotektivnih agensa te razvoj novih nanoformulacija doksorubicina (Rivankar, 2014). Unaprjeđenje antitumorske terapije primjenom nanotehnologije temelji se na ugrađivanju lijekova u terapijske nanosustave, nanočestice ili nanovezikule, s ciljem poboljšanja topljivosti antitumorskih lijekova, njihove stabilnosti u biološkom okruženju te farmakokinetičkih svojstava npr. produljeno zadržavanje lijeka u cirkulaciji i poboljšana raspodjela u ciljno tkivo (Bertrand i sur., 2014; Wei i sur., 2012). Klinički najznačajnije nanoformulacije doksorubicina, koje se primjenjuju uz konvencionalni doksorubicin u otopini, su liposomska formulacija doksorubicina i doksorubicin uklopljen u različite nanočestice.

1.4.1. Liposomska formulacija doksorubicina

Ugrađivanje doksorubicina u liposome se postiže jednaka djelotvornost lijeka, a nuspojave se znatno smanjuju (Torchilin, 2005). Liposomi su vezikule građene od fosfolipidnog dvosloja koji spontano nastaju u vodenim otopinama, te pri nastajanju zatvaraju određenu količinu vodene otopine u kojoj je otopljen lijek. Liposomi mogu biti nosači hidrofilnih lijekova, koji se uklapaju u unutarnju vodenu fazu, hidrofobnih lijekova koji se ugrađuju u lipidni dvosloj te amfipatskih koji će biti smješteni između lipidne i vodene regije. Dakle, strukturna svojstva liposoma omogućuju uklapanje lijekova različitih fizičko-kemijskih svojstava (Bulbake, 2017). Zbog svoje sličnosti s biološkim membranama, netoksičnosti, neimunogenosti i biorazgradivosti, liposomi su u potpunosti fiziološki prihvatljivi što im osigurava primjenu u različitim terapijskim područjima. Budući da imaju kratko vrijeme zadržavanja u cirkulaciji zbog opsonizacije proteinima plazme što uzrokuje aktivaciju imunskog odgovora i uklanjanje iz cirkulacije, liposomima se dodaju molekule poput polietilen glikola (PEG), gangliozida i cerebrozid sulfata. Takvi liposomi nazivaju se pegilirani liposomi, a time se postiže inhibicija opsonizacije proteinima plazme i produljenje poluživota (Lucas i sur., 2016; Rivankar, 2014). Međutim, primijećeno je da pegilirana liposomska formulacija doksorubicina (PEG-DOX) uzrokuje kožne osipe na dlanovima i stopalima (Yokomichi i sur., 2013). Stoga je razvijena novija formulacija

doksorubicina: nepegilirani liposomski doksorubicin (NPLD). NPLD također produljuje vrijeme zadržavanja DOX-a u cirkulaciji i smanjuje kardiotsičnost, a nuspojava kožnih osipa koja se pojavljuje u terapiji s PEG-DOX je izbjegnuta (Rivankar, 2014). Ugrađivanje doksorubicina u liposome povećava njegovo poluvrijeme vrijeme eliminacije ($t_{1/2}$) i raspodjelu u tumorskim tkivima. Myocet® (Teva Company, Jeruzalem, Izrael) je liposomska formulacija doksorubicina koju je odobrila Američka Agencija za hranu i lijekove (FDA, engl. U.S. Food and Drug Administration) za terapiju metastatskog raka dojke i jajnika u Americi, ali je također lijek odobren i u Europi te Kanadi.

1.4.2. Doksorubicin ugrađen u polimerne nanočestice

U svrhu poboljšanja dopreme lijeka do stanica razvijena je formulacija doksorubicina uklopljenog u različite polimerne nanočestice. Brojna su istraživanja polimernih nanočestica za primjenu u biomedicini koje se temelje na prirodnim ili sintetskim polimerima koji su biokompatibilni (Chai i sur., 2017; Škrbina, 2016).

Kopolimer mliječne i glikolne kiseline (PLGA, engl. *polylactic-co-glycolic acid*) je biorazgradivi polimer koji se u tijelu hidrolizira na mliječnu i glikolnu kiselinu (Škrbina, 2016). Odobren je od strane FDA kao nosač brojnih lijekova među koje se ubraja i DOX te nudi brojne prednosti u terapiji karcinoma budući da cirkulacijom ulazi u kapilare i pasivno se usmjerava u tumorsko tkivo zbog povećane propusnosti i zadržavanja u kapilarama tumorskog tkiva (EPR, engl. *enhanced permeability and retention*). U tumorskom tkivu se zbog EPR efekta u puno većoj mjeri akumuliraju lijekovi uklopljeni u nanočestice što povećava specifičnost terapije za tumore (Shukla i sur., 2019). Opisano je istraživanje ugrađivanja DOX-u u PLGA nanočestice, pripremljene različitim tehnikama, i praćeno je njegovo oslobađanje iz nanočestica (Pieper i sur., 2017; Babos i sur. 2018.). Provedena istraživanja pokazala su veliki postotak ugrađenog DOX kao i polagano otpuštanje iz nanočestica te potvrdila visoki potencijal koji takve formulacije imaju za kliničku primjenu (Rezvantab i sur. 2018.)

1.5. Visoko učinkovita tekućinska kromatografija (HPLC, *engl. High-Performance Liquid Chromatography*)

Kromatografija je metoda odjeljivanja komponenti homogene smjese koja se temelji na različitoj raspodjeli komponenti između stacionarne i mobilne faze. Smatra se jednom od najučinkovitijih separacijskih tehnika koja se osim za razdjeljivanje komponenti smjese koristi i za identifikaciju i kvantitativno određivanje (Skoog i Leary, 1992). Komponente uzorka nalaze se otopljene u mobilnoj fazi koja putuje duž stacionarne faze, a separacija komponenti događa se zbog neprestane apsorpcije i desorpcije na stacionarnoj fazi. Učinkovito razdvajanje komponenti kromatografijom postiže se ako komponente stvaraju međumolekularne interakcije s pokretnom i nepokretnom fazom različite jakosti. Odnosno, ako se njihove brzine putovanja kroz kromatografski materijal razlikuju (Snyder i sur., 2010) Na brzinu putovanja utječe topljivost u pokretnoj fazi i jakost stvorenih međumolekulskih veza s nepokretnom fazom.

Detektorski sustav ovisi o prirodi uzorka. Nakon prolaska kroz kolonu, pokretna faza s analitom protječe kroz ćeliju detektora. Detektor bi trebao davati stabilnu osnovnu liniju i odgovor na komponente uzorka u obliku električnog signala koji se prikazuje kao kromatogram. Električni odgovor detektora mora biti linearno proporcionalan koncentraciji komponente uzorka koja se analizira kako bi se kromatogram mogao koristiti za kvantitativnu analizu. Postoji nekoliko vrsta detektora koji se koriste u tekućinskoj kromatografiji. Detektori koji se najčešće upotrebljavaju temelje se na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja (UV-Vis), fluorescentni detektori (FD), spektrometar masa (MS) te detektori za mjerenje indeksa refrakcije (RI). Dobar detektor ima visoku osjetljivost, mali šum i širok raspon linearnosti.

1.5.1. Osnovna načela visoko učinkovite tekućinske kromatografije

Tekućinska kromatografija je vrsta kromatografije u kojoj je pokretna faza u tekućem obliku, a nepokretna može biti čvrsti adsorbens, razdjelna tekućina nanescena na inertni nosač ili umreženi polimer (Cerjan-Stefanović i sur., 1999.) Tekućinska kromatografija u koloni spada u elucijske kromatografije. Elucija je proces u kojem mobilna faza ispirane sastojke sa stacionarne faze, a eluens je otapalo koje nosi sastojke smjese kroz stacionarnu fazu (Cerjan-Stefanović i sur., 1999).

HPLC je visoko učinkovita tekućinska kromatografija kojoj različiti sorbensi mogu biti nepokretna faza. Ovisno o relativnoj polarnosti pokretne i nepokretne faze razlikujemo

kromatografiju normalnih faza i kromatografiju obrnutih faza. Kromatografiju obrnutih faza karakterizira polarna mobilna i nepolarna stacionarna faza koja je najčešće građena od lanaca ugljikovodika C8 (oktil), C₈H₁₇ ili C18 (oktadecil), C₁₈H₃₇ vezanih na silika gel. Otapala koja se koriste kao polarna mobilna faza su najčešće voda, metanol, acetonitril, tetrahidrofur, diklormetan i heksan. Promjenom polariteta mobilne faze vrlo jednostavno se može mijenjati zadržavanje komponente na koloni. Na navedenim stacionarnim fazama nepolarne molekule se dulje zadržavaju, dok se polarne brže eluiraju (Lindsay, 1992).

1.5.2. Fluorescentni detektori

Fluorescentni detektori (FD) se koriste za detekciju sastojka koji sami fluoresciraju ili se mogu prevesti u fluorescentne derivate. U slučaju potrebe za prevođenjem u fluorescentne derivate, to je moguće učiniti prije odvajanja na koloni ili nakon odvajanja na koloni kada se neposredno prije ulaska u detektor komponente derivatiziraju tj. kemijski se konjugiraju sa spojevima koji fluoresciraju. Fluorescentni detektor je jedan od najosjetljivijih detektora, a u usporedbi s UV detektorom, njegova osjetljivost je za jedan do tri reda veličine veća i zbog toga se koristi kada je god moguće i kada to karakteristike spoja omogućavaju (Preston i sur., 2016.).

1.6. Validacija analitičke metode

Analitičke metode se validiraju kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka, odnosno svaku analitičku metodu potrebno je opisati i provjeriti. Validacijom analitičke metode dokazuje se da ju je moguće primjenjivati u predviđene svrhe i da su dobiveni rezultati pouzdani. U farmaceutskoj industriji sve analitičke metode koje se koriste u kontroli djelotvornosti i neškodljivosti proizvoda, lijeka ili nekog drugog biotehnološkog proizvoda koji će se koristiti za ljudsku upotrebu moraju biti validirane.

Svako analitičkoj metodi pristupa se individualno kako bi se procijenila njena primjenjivost i granice validacijskih parametara. Pri tome se definiraju problemi, napravi plan rada, izvrše eksperimentalna mjerenja, obrade podatci, te izradi potrebna dokumentacija. Međunarodna konferencija o harmonizaciji (ICH, engl. *International Conference on Harmonization*) propisuje smjernice za postupak provođenja validacije analitičkih metoda (ICH Harmonized tripartite guideline, 2005).

Osnovni validacijski parametri su:

- *točnost*,
- *preciznost*,
- *specifičnost*,
- *limit detekcije*,
- *limit kvantifikacije i*
- *robustnost*.

Nužni kriteriji koji trebaju biti zadovoljeni da bi metoda bila prihvaćena su:

- *točnost*,
- *preciznost i*
- *specifičnost*.

1.6.1. Točnost metode

Točnost metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, referentne vrijednosti, i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom, metodom, određeni broj puta. Točnost metode moguće je procijeniti na tri načina: usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenih referentnom metodom, analizom uzorka poznate koncentracije (standarda) i cijepljenjem (engl. *spike*) uzorka poznatom koncentracijom referentnog materijala.

Određuje se minimalno u triplikatu pri najmanje tri različite koncentracije unutar radnog područja. Rezultati se iskazuju kao analitički prinos ili iskorištenje (engl. *recovery*) što označava srednju vrijednost omjera izmjerene i stvarne koncentracije analita izraženo u postotku.

$$\text{iskorištenje (\%)} = \frac{\text{izmjerena koncentracija analita}}{\text{stvarna koncentracija analita}} * 100$$

Ovisno o koncentraciji analita u mjernim otopinama, o namjeni analitičke metode i karakteristikama metode postavljaju se granice za analitički prinos (Causon, 1997).

1.6.2. Preciznost metode

Preciznost metode je slaganje vrijednosti dobivenih višestrukim određivanjem analita u istom uzorku pri istim uvjetima, a razlikujemo dnevnu i međudnevnu preciznost. Dnevna preciznost je ponavljanje analize unutar istog dana, a međudnevna je ponavljanje postupka unutar duljeg perioda. (ICH Harmonized tripartite guideline, 2005). Rezultati preciznosti metode se iskazuju kao srednja vrijednost ispitivanja (x_{sr}), relativna standardna devijacija (%RSD) i interval pouzdanosti (CI).

1.6.3. Specifičnost i selektivnost metode

Specifičnost i selektivnost su parametri kojima ocjenjujemo pouzdanost mjerenja u prisustvu ometajućih tvari (nečistoće, razgradni produkti matriksa i sl.). Neki autori imaju različite definicije za pojmove specifičnost/selektivnost, dok ih neki poistovjećuju. Metoda je specifična ako se s tom metodom određuje jedan analit, odnosno kada signal odgovara samo odzivu analita, dok se selektivnom metodom smatra ona kojom se istovremeno određuje više komponenti. Ukoliko je metoda selektivna, metoda je sposobna točno i specifično odrediti analit u prisustvu drugih interferencija u matriksu uzorka pod propisanim uvjetima ispitivanja (Taverniers i sur., 2004). Prema Eurachemu, metoda jedino može biti specifična ukoliko je 100 % selektivna. Prije samog postupka kvantifikacije, metoda mora pokazati visoku specifičnost (Fleming i sur., 1996). Obzirom da postoji vrlo malo metoda koje su specifične, pojam selektivnosti se smatra prikladnijim. Na selektivnosti se temelje brojna analitička određivanja i neophodan je validacijski parametar kod identifikacijskih ispitivanja te određivanja onečišćenja i sadržaja aktivne tvari lijekova (Lazarić i Gašljević, 2006).

Specifičnost HPLC-a se postiže odabirom optimalnih kolona i postavljanjem optimalnih kromatografskih uvjeta kao što su: stacionarna faza, sastav mobilne faze, temperatura kolone i detektor valne duljine. Osim kromatografske separacije, korak pripreme uzorka također treba biti optimiziran za bolju selektivnost (Huber, 2010). Kada se selektivnost ne može jednoznačno dokazati jednom metodom, preporučuje se kombinacija dvije ili više analitičkih metoda.

1.6.4. Linearost metode

Linearost metode podrazumijeva da je unutar ispitivanog koncentracijskog raspona, koncentracija analita izravno proporcionalna odgovoru detektora. Prilikom određivanja

linearnosti potrebno je napraviti baždarni pravac za analit u rasponu koncentracija pri najmanje pet različitim koncentracija (koncentracije se izaberu prema pretpostavljenim i očekivanim koncentracijama analita u stvarnom testu). Za svaku koncentraciju potrebno je napraviti najmanje tri do šest ponavljanja. Iz baždarnog dijagrama moguće je izračunati koeficijent korelacije. Metoda je linearna ukoliko je korelacijski koeficijent iznad 0,98.

1.6.5. Limit detekcije i limit kvantifikacije

Limit detekcije (LOD) je najmanja količina analita u analiziranom uzorku koji se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati pri određenim uvjetima. LOD je potrebno odrediti samo kod metoda za određivanje nečistoća u uzorku kvantitativnom metodom ili limit testom. Limit kvantifikacije (LOQ) je najmanja količina analita koja se može kvantificirati uz prihvatljivu razinu preciznosti i točnosti. Ovaj parametar validacije metode od velike je važnosti u slučajevima određivanja analita u tragovima (Huber, 2010).

LOD i LOQ se određuju razrjeđivanjem osnovne otopine, a rezultati se mogu procjenjivati na tri načina. Moguće je procijeniti vizualno, pomoću omjera signal/šum ili statističkom obradom podataka.

Omjer signal/šum primjenjuje se za analitičke postupke sa baznom linijom pri čemu se uspoređuju signali uzoraka poznatih niskih koncentracija analita sa signalom slijepog pokusa i tako se odredi najmanja koncentracija pri kojoj se analit može pouzdano detektirati. Prihvatljivi omjeri su 3:1 ili 2:1 za LOD, a 10:1 za LOQ.

Pri određivanju vrijednosti LOD i LOQ statističkom obradom podataka na osnovi odstupanja signala i nagiba, nagib se izračuna iz kalibracijske krivulje, a za standardno odstupanje se uzme ostatna standardna devijacija regresijskog pravca u koncentracijskom području granice detekcije. LOD i LOQ se u tom slučaju računaju prema formulama (ICH Harmonized tripartite guideline, 2005):

$$LOD = 3,3 \times \frac{\sigma}{a} \qquad LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{a}$$

$$\sigma = \frac{S_e}{S_d}$$

gdje je:

σ = ostatna standardna devijacija

a = nagib regresijskog pravca

S_e = standardna greška

S_d = standardna devijacija

1.6.6. Robusnost metode

Robusnost ili izdržljivost metode je svojstvo metode koje opisuje otpornost metode da pri malim, namjernim promjenama radnih uvjeta daje vjerodostojne rezultate. Uvjeti koji se mogu mijenjati su npr. pH mobilne faze, korištenje različitih kolona, promjena temperature, promjena volumena i injektiranja i sl. Ispitivanje robusnosti metode važan je dio razvoja metode budući da se pregledom rezultata može zaključiti koji su optimalni uvjeti njene provedbe. Važno je naglasiti da se radni uvjeti mijenjaju unutar realnih granica pri čemu se prati kvantitativna promjena rezultata. Radni uvjet je unutar robusnosti metode ako se njegovom promjenom rezultat ne mijenja značajno (Lazarić, 2012).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Doksorubicin se zbog djelotvornosti koristi u terapiji velikog broja karcinoma te se zbog široke kliničke upotrebe intenzivno istražuje kako bi mu se smanjile neželjene nuspojave, a zadržala djelotvornost. Oštećenja zdravih tkiva često otežava liječenje osnovne bolesti ograničavanjem terapijskih doza DOX-a i smanjenjem kvalitete života pacijenata tijekom i nakon liječenja DOX-om. Kako je već spomenuto, najčešći negativan učinak DOX-a je kardiotsičnost te u nešto manjoj mjeri toksičnost za druge organe (Julka i sur., 2008; Liu i sur., 2006; Maluf i Spriggs, 2002). Opisane su brojni analozi kao i nove nanoformulacije doksorubicina te brojne bioanalitičke metode za testiranje njegove djelotvornosti i studij farmakokinetičkog profila (Guha i sur. 2013; Xia i sur., 2018; Al-Abd i sur., 2009; Wei i sur., 2008; Jing i sur., 2008).

Pregledom dostupne literature uočeno je da su opisane brojne metode za detekciju DOX-a i njegovih metabolita u biološkom materijalu, no isto tako vrlo je ograničen broj radova koji opisuju metode za istovremenu kvantitativnu analizu DOX-a i njegovih metabolita u malom volumenu uzorka urina tekućinskom kromatografijom s mobilnom fazom koja ne koristi pufere. Stoga je glavni cilj ovoga rada bio razviti i validirati jednostavnu i brzu bioanalitičku metodu, koja bi koristeći klasičnu tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti na reverznoj fazi i fluorescentnu detekciju, omogućila istovremeno kvantitativnu analizu doksorubicina i njegovih metabolita u malim volumenima urina uz visoku osjetljivost i selektivnost.

Specifični ciljevi rada bili su optimizirati uvjete analize kroz podešavanje uvjeta analize i sastava mobilne faze kako bi se postigla dobra rezolucija na RP18 koloni, a dobra rezolucija preduvjet je za validaciju metode. Svaki pojedini korak u validaciji metode proveden je prema ICH preporukama te su ciljevi validacije metode bili da svi parametri za svaki pojedini analizirani spoj budu u zadanim granicama.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Instrumenti

U izradi ovog rada korišteni su sljedeći instrumenti:

- HPLC sustav koji se sastoji od sljedećih komponenti:
 - 1) Waters In-line Degasser AF (vakuum degazer mobilne faze)
 - 2) Waters 600 Pump (visokotlačna pumpa)
 - 3) Waters 2479 Fluorescent Detector (fluorescentni detektor)
 - 4) Waters 717 puls Autosampler (autoinjektor)
 - 5) Računalo s Waters HPLC programom Empower
- Uređaj za pročišćavanje vode (Milipore Simplicity 185 Sistem, USA)
- Analitička vaga (Mettler Toledo, Njemačka)
- pH metar (Mettler Toledo, Njemačka)

3.1.2. Pribor

U izradi ovog rada korišten je sljedeći pribor:

- HPLC kolona (Atlantis dC18 3 μ m 4.6 x 150mm, Waters, USA)
- Filter, 0,45 μ m (Milipore, USA)
- Filter, 0,22 μ m (Milipore, USA)
- Varijabilne automatske pipete (Gilson, Francuska)
- Aparatura za filtraciju, (Milipore, USA)

3.1.3. Kemikalije

U izradi ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Metanol (CH₃OH), HPLC čistoće (Merck, Njemačka)
- Acetonitril, HPLC čistoće (Merck, Njemačka)
- Trikloroctena kiselina (CCl₃COOH), (Sigma-Aldrich, SAD)
- Dimetil sulfoksid (C₂H₆OS), (Merck, Njemačka)
- Standard doksorubicina (Toronto Research Chemicals, North York, Kanada)
- Standard doksorubicinola (Toronto Research Chemicals, North York, Kanada)

- Standard doksorubicinona (Toronto Research Chemicals, North York, Kanada)
- Standard idarubicina (Toronto Research Chemicals, North York, Kanada)
- DOX (Doxorubicin Pliva 2 mg/ml otopina za injekciju/infuziju, Zagreb, Hrvatska)
- DOX Myocet (Teva, Jeruzalem, Izrael)
- DOX u poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanočesticama (MJR PharmJet GmbH, Überherrn, Njemačka)

3.2. Metode

3.2.1. HPLC-FD analiza

3.2.1.1. Priprema otopine mobilne faze

Korištena je mobilna faza sastavljena od 0,05% trikloroctene kiseline (TCA) i acetonitrila u volumnom omjeru 65:35 (V:V). Za pripremu mobilne faze je korištena visoko pročišćena Milli-Q voda. Redestilirana voda pročišćena je na uređaju Milipore Simplicity 185 uređaj. Uređaj koristi SimFilter veličine čestica 0,05 μm , te UV lampu sa dvije valne duljine (185 nm i 254 nm) za pročišćavanje redestilirane vode. Ovako pročišćena voda je kvalitete tipa 1, otpornosti 18,2 $\text{M}\Omega/\text{cm}^2$ i sadrži manje od 5 ppb organskih onečišćenja i iznimno malo anorganskih onečišćenja, te je kao takva prikladna za korištenje u HPLC analizi. Pripremljenoj 0,05% otopini TCA dodan je acetonitril u navedenom volumnom omjeru, a dobivena smjesa se koristila kao mobilna faza u kromatografskoj analizi.

3.2.1.2. Priprema standardnih uzoraka metabolita

Otopine standarda DOX, DOXola, DOXona i IDA dobivene se otapanjem 1 mg standarda u 0,5 mL DMSO-a. Početne koncentracije standarda iznosile su 2 mg/mL i otopine su čuvane na 4 °C. Iz tako pripremljenih otopina svakog metabolita napravljena su razrjeđenja u metanolu HPLC čistoće te su dobivene koncentracije iznosile 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iz kojih su napravljena daljnja razrjeđenja te su dobivene otopine u rasponu koncentracija od 0,0005 – 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tako pripremljene otopine standarda čuvane su na -20 °C do provođenja analiza.

Uzorci urina korišteni za određivanje točnosti metode (QC, engl. *quality control samples*) priređeni su „cijepljenjem“ (engl. spike) uzoraka urina netretiranih štakora (kontrolni uzorci) sa standardima metabolita. Stock otopine svakog metabolita razrijeđene su određenim volumenima

urina kontrolne skupine eksperimentalnih životinja, pri čemu je dobiveno šest novih otopina koncentracija metabolita u rasponu od 0,05 – 1,6 µg/mL (0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 i 1,6 µg/mL). QC uzorci također su čuvani na -20°C kako bi se razina raspada DOX i njegovih metabolita smanjila (Wei, Xiao, Si, i Liu, 2008)

3.2.1.3. HPLC-FD metoda za istovremeno određivanje DOX, DOXola i DOXona

Princip istovremenog kvantitativnog određivanja DOX, DOXola i DOXona primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) na reverznoj fazi uz fluorescentnu detekciju - metodom internog standarda temelji se na izokratnoj eluciji, pri čemu se traženi spojevi eluiraju u nizu padajuće polarnosti prema literaturnim podacima (Alhareth i sur., 2012) uz određene modifikacije.

Prije kromatografske analize nije potrebna nikakva dodatna obrada, uzorci su profiltrirani kroz 0,45 µm filtar (Millipore, SAD), dodan je idarubicin, interni standard, u konačnoj koncentraciji od 1 µg/mL, te su analize provedene u slijedećim kromatografskim uvjetima:

Kromatografski uvjeti:

Kolona:	Waters, Atlantis dC18 3µm 4.6 x 150mm kolona
Mobilna faza:	0,05 % TCA : acetonitril u omjeru 65:35 (V:V)
Detektor:	FD
Eluiranje:	izokratsko
Temperatura:	29 °C
Vrijeme trajanja analize:	15 min
Injektirani volumen:	10 µL
Valna duljina ekscitacije:	480 nm
Valna duljina emisije:	558 nm

3.2.2. *In vivo* pokus

Razvijena i validirana metoda za istovremeno određivanje metabolita doksorubicina korištena je u analizi urina štakora koji su primili tri različite formulacije doksorubicina. Štakori su podijeljeni u 4 skupine po 8 jedinki u svakoj. Prvu eksperimentalnu skupinu su činile kontrolne životinje, druga eksperimentalna skupina je tretirana konvencionalnim DOX u otopini

(Pliva), treća skupina je primila komercijalnu liposomsku formulaciju DOX (Myocet, Teva Company) dok je posljednja četvrta skupina primila DOX uklopljen u PLGA-nanočestice (MJR PharmJet).

Štakorima je intraperitonealno injektirano 3 mg ekvivalenta DOX/kg tjelesne težine. Prije svake aplikacije životinje su se 24 sata nalazile u metaboličkom kavezu. Urin je prikupljan 12 sati nakon aplikacije. Prikupljeni urini su čuvani na -20 °C do provođenja analiza. Prije injektiranja uzorci su profiltrirani kroz 0,45 µm filtre. Budući da se za kvantitativnu analizu količine metabolita DOX-a koristio IS, u uzorke urina dodavao se idarubicin, na način da krajnja koncentracija IDA u svakom uzorku bude 1 µg/mL. Profiltrirani uzorci urina kojima je dodan IS su analizirani, a dobiveni rezultati su obrađeni statistički.

In vivo pokus je proveden na Institutu za medicinska istraživanja u Zagrebu u okviru istraživanja na projektu „Siguran pristup za razvoj nano-sustava za ciljanu isporuku lijekova u mozak-SENDER" (HRZZ-PZS-2019-02-4323). Korišteni su štakori soja Wistar, mužjaci, starosti 3 mjeseca iz vlastitog uzgoja. Testiranja su vršena u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN, 135/06) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusne i druge znanstvene svrhe (NN, 47/11).

3.3. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata provedena je računalnim programom Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, Redmond, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Validacija metode

Primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti na reverznoj fazi uz fluorescentnu detekciju (HPLC-FD) u ovom radu proveden je postupak razrade i validacije metode za istovremeno kvantitativno određivanje doksorubicina i njegovih metabolita u urinu štakora. Metoda je validirana te je pokazano da je metoda selektivna, linearna u području određivanja analita, precizna i točna te su određene granice detekcije i kvantifikacije.

Cilj i važnost validacije analitičke metode je dobiti točne i pouzdane rezultate, pri čemu se nailazi na niz točaka gdje može doći do pogrešaka koje mogu dovesti do netočnih i nepouzdatih rezultata. Validacijom metode za određenu vrstu analiza, mogućnost pogrešaka se svodi na najmanju moguću mjeru, a ako i dođe do pogrešaka one će se nalaziti unutar prihvatljivih granica. Svi parametri validacije razvijene metode su određeni prema preporukama regulatornih tijela (ICH smjernice), zadovoljavaju zahtjeve i pokazuju da je metoda visoko specifična, točna i precizna.

4.1.1. Specifičnost i selektivnost metode

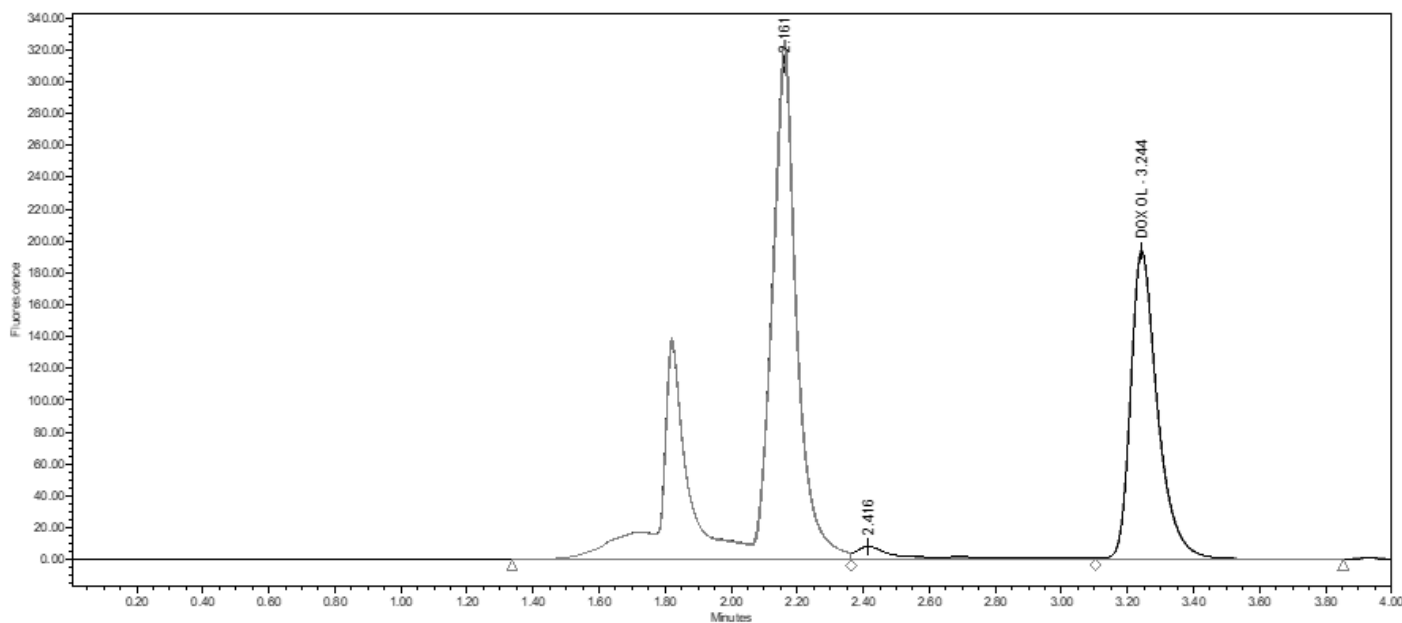
Brojna analitička određivanja temelje se na selektivnosti koja se smatra nepohodnim validacijskim parametrom kod identifikacijskih ispitivanja i primjenjuje se kod validacije svake metode. Ukoliko je metoda selektivna, znači da je sposobna točno i specifično odrediti analit u prisustvu drugih interferencija u matriksu uzorka pod propisanim uvjetima ispitivanja (Taverniers i sur., 2004).

Metoda se smatra selektivnom ako se usporedbom kromatograma mobilne faze, otopine standarda i otopine uzorka utvrdi da vremena zadržavanja i kromatografski maksimumi analita u standardnoj otopini odgovaraju vremenima zadržavanja i kromatografskim maksimumima analita u uzorku te ukoliko ne postoje interferirajući kromatografski maksimumi u kromatogramima u području u kojem se očekuje eluiranje analita.

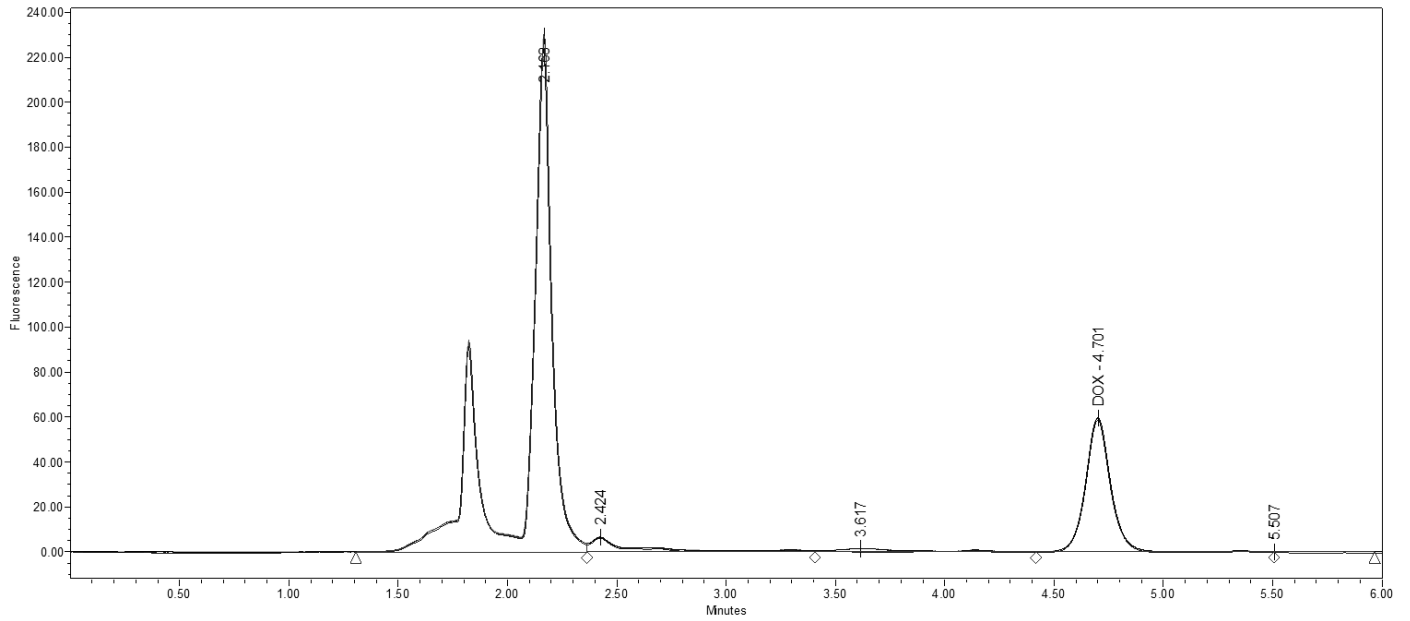
Selektivnost metode provjerena je injektiranjem uzoraka radnih standarda DOXola (slika 7), DOX-a (slika 8), DOXona (slika 9), i idarubicin (slika 10), (1 µg/mL, heksaplikat) u urinu štakora kontrolne skupine. Na slici 11 prikazan je kromatogram svih standarda metabolita u urinu štakora kontrolne skupine u koncentraciji od 1 µg/mL za svaki standard. Na prikazanim kromatogramima moguće je uočiti da sva tri standarda imaju različita retencijska vremena, odnosno kromatografski maksimumi se ne preklapaju čime su potvrđene specifičnost i

selektivnost metode. Retencijska vremena analita iznose 3,243 min za DOXol, 4,700 min za DOX, 6,639 min za DOXon te 13,909 min za IDA. Kod ponovljenih analiza u heksaplikatu, za sva tri analita, odstupanje u retencijskom vremenu je zanemarivo ($\pm 0,001$ min ili $\pm 0,002$ min).

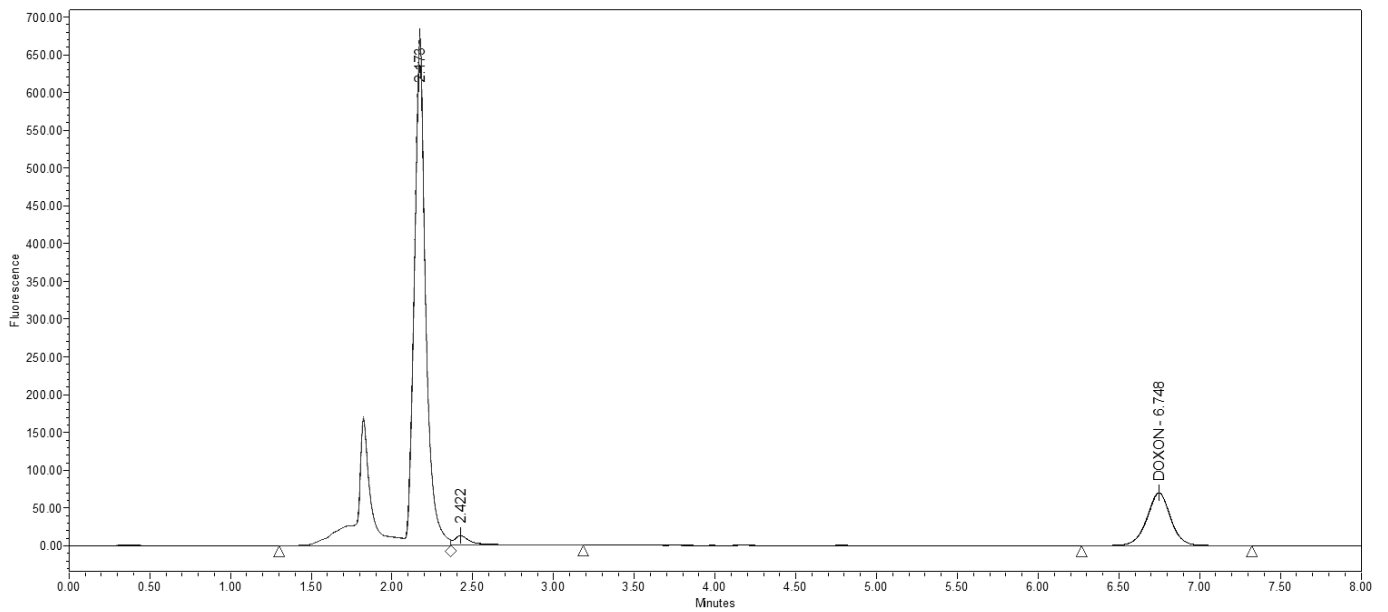
Također, uvjeti analize su optimalno podešeni te je razdvajanje sva četiri spoja, doksorubicina, doksorubicinola, doksorubicinona kao i internog standarda, idarubicina, potpuno i ne dolazi do interferencije sa spojevima iz urina, koji pokazuju kromatografske maksimume na samom početku analize (Rt 2,161 min). Izvrsna rezolucija (veća od 1 za sve analizirane spojeve) te potpuno razdvajanje analiziranih spojeva rezultat su karakteristika izabrane i primijenjene analitičke kolone, odnosno stacionarne faze koja je korištena u opisanoj metodi.



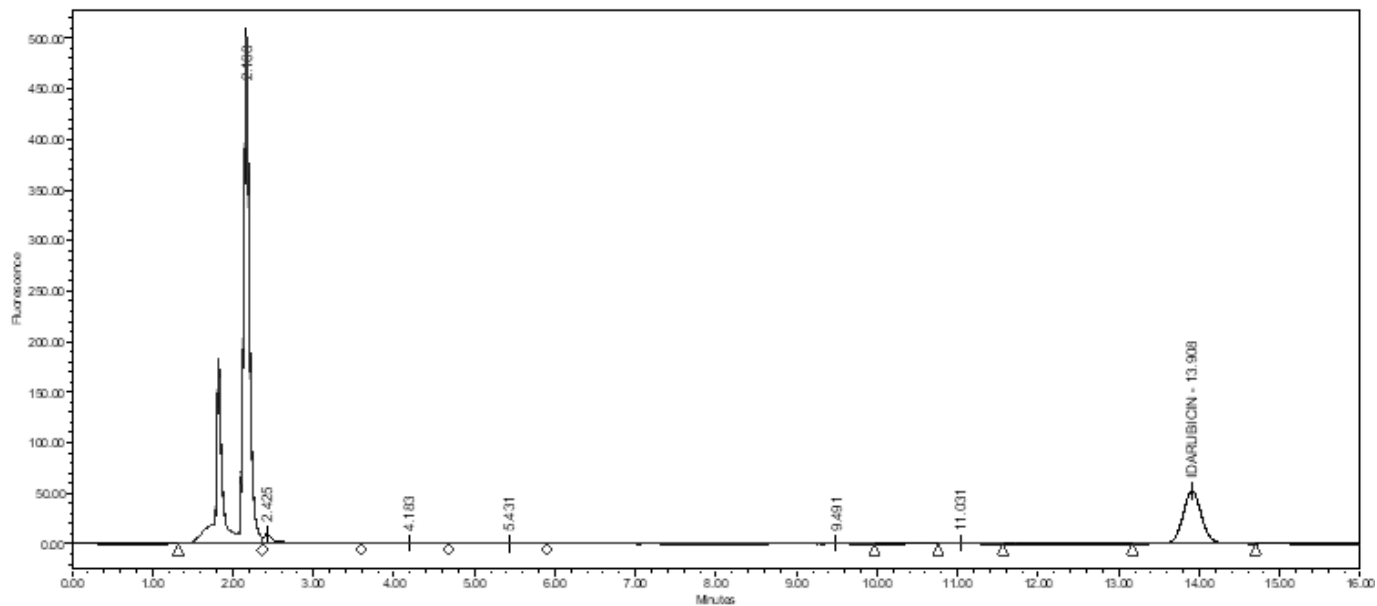
Slika 7. Standard DOXola u kontrolnom urinu (1 $\mu\text{g/mL}$, heksaplikat), retencijsko vrijeme $3,243 \pm 0,001$ min



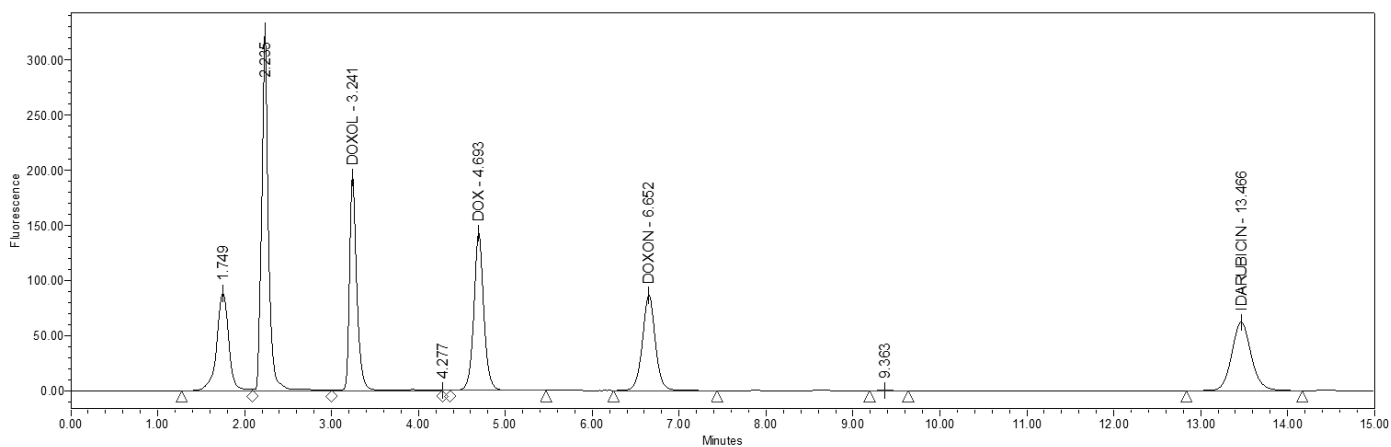
Slika 8. Standard DOX-a u kontrolnom urinu (1 $\mu\text{g/mL}$, heksaplikat), retencijsko vrijeme $4,700 \pm 0,001$ min



Slika 9. Standard DOXona u kontrolnom urinu (1 $\mu\text{g/mL}$, heksaplikat), retencijsko vrijeme $6,639 \pm 0,002$ min



Slika 10. Standard IDA u kontrolnom urinu (1 $\mu\text{g/mL}$, heksaplikat), retencijsko vrijeme $13,909 \pm 0,002$ min



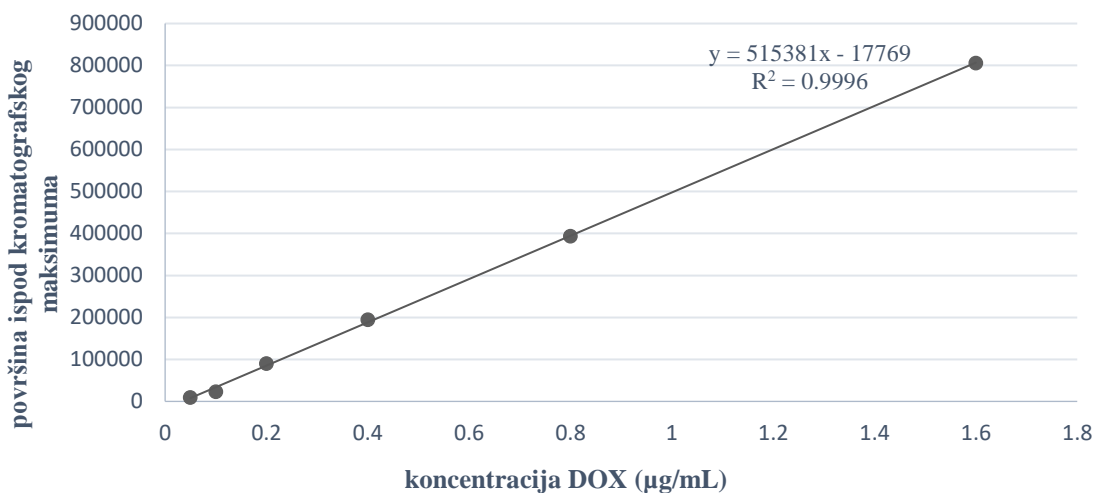
Slika 11. Kromatogram smjese standarda, DOX, DOXol, DOXon i IDA u kontrolnom urinu (koncentracija 1 $\mu\text{g/mL}$) s dodatkom IS (1 $\mu\text{g/mL}$)

4.1.2. Linearnost metode

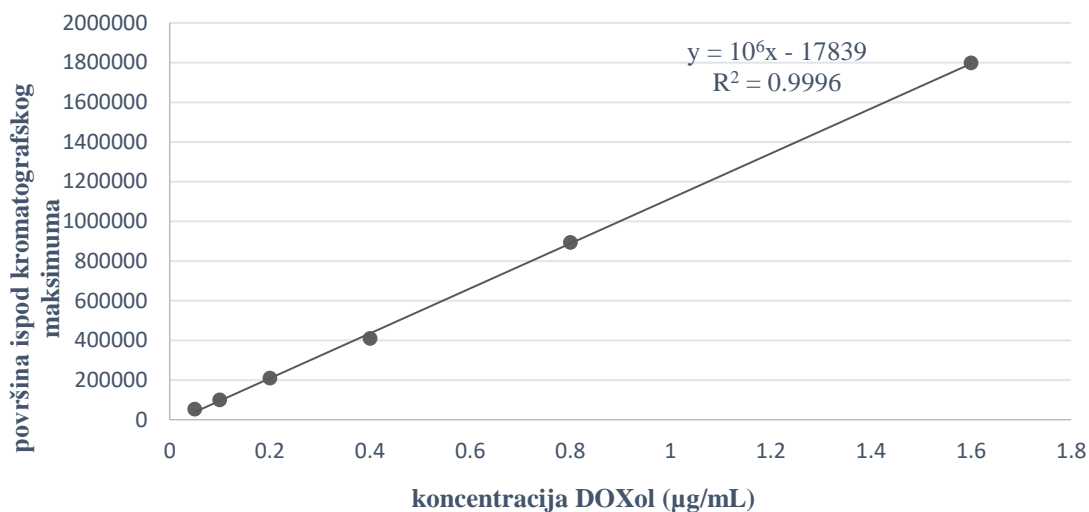
Ispitivanje linearnosti metode provodi se tako da se odrede baždarni pravci (kalibracijski ili standardni pravci) za analit u ispitivanom rasponu koncentracija koji prikazuju ovisnost signala detektora o koncentraciji analita. Odgovor detektora mora biti direktno proporcionalan koncentraciji analita u uzorku, a može se prikazati kvalitativno jednadžbom pravca u obliku $y = ax + b$, gdje je a nagib pravca, a b odsječak na osi y osi, te se kvantitativno izračuna metodom najmanjih kvadrata i izrazi kao koeficijent korelacije, R^2 koji mora biti iznad 0,98.

Ispitivanje je provedeno na šest koncentracijskih razina: 0,05, 0,10, 0,20, 0,40, 0,80 i 1,60 $\mu\text{g/mL}$ (priprema otopina standarda navedenih koncentracija opisana u poglavlju 3.2.2.3.)

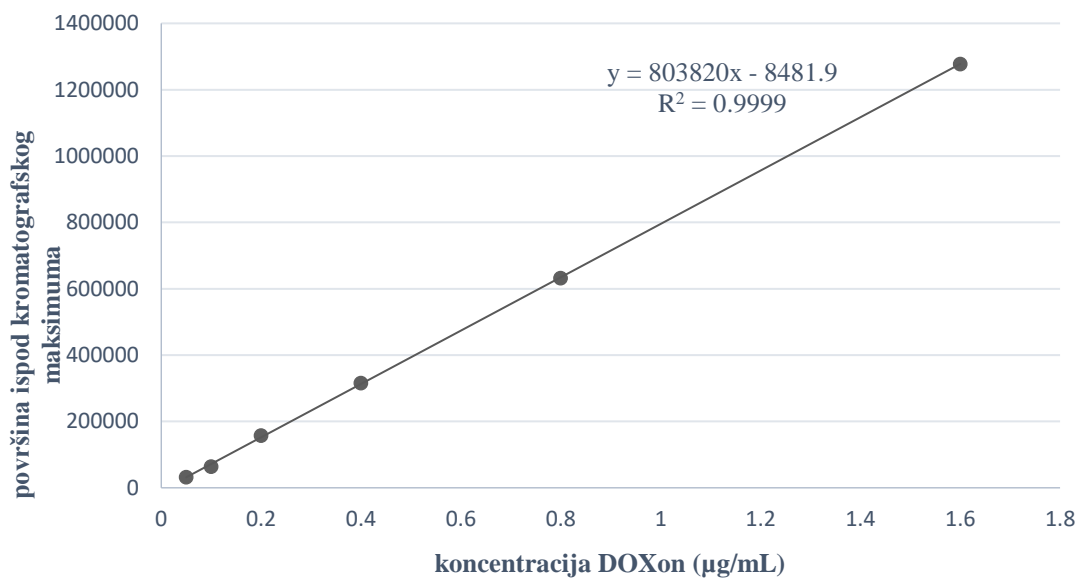
Otopine su injektirane tri puta, te je izračunata srednja vrijednost površine ispod kromatografskog maksimuma, jednadžba regresijskog pravca, te koeficijent korelacije. Rezultati su prikazani grafički za svaki metabolit (slike 12. – 14.) i tablično (tablica 1.) u kojoj su prikazane i izračunate jednadžbe pravca i koeficijent korelacije za svaki metabolit.



Slika 12. Grafički prikaz kalibracijskog pravca za DOX



Slika 13. Grafički prikaz kalibracijskog pravca za DOXol



Slika 14. Grafički prikaz kalibracijskog pravca za DOXon

Tablica 1. Parametri linearnosti

Metabolit	Područje linearnosti ($\mu\text{g/mL}$)	Jednadžba pravca	Koeficijent korelacije (R^2)
DOX	0,05 – 1,60	$y = 515381x - 17769$	0,9996
DOXol	0,05 – 1,60	$y = 10^6 x - 17839$	0,9996
DOXon	0,05 – 1,60	$y = 803820x - 848$	0,9999

Kao što se može vidjeti iz prikazanih rezultata, koeficijent korelacije zadovoljava postavljeni kriterij za svaki metabolit zasebno, budući da je veći od 0,9995. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja opisanim u literaturi (Alhareth i sur. 2012.).

4.1.3. Preciznost metode

Preciznost metode je stupanj slaganja rezultata kada se niz mjerenja provede na istom homogenom uzorku, ukazuje na slučajne pogreške i određena je preko ponovljivosti pripreme otopina i ponovljivosti mjerenja. Rezultat preciznosti metode se izražava preko standardnog odstupanja i relativnog standardnog odstupanja (RSD). Standardno odstupanje ukazuje na rasipanje rezultata oko vrijednosti aritmetičke sredine i za veliki broj ponovljenih mjerenja dobila bi se krivulja normalne raspodjele. RSD je statistička veličina kojom se znanstvenici koriste kao mjerom preciznosti, a računa se na sljedeći način:

$$RSD(\%) = \frac{S_d}{x_{sr}}$$

gdje je x_{sr} aritmetička sredina svih dobivenih rezultata, a S_d je eksperimentalno standardno odstupanje.

Postupkom validacije metode provjerene su unutarrestna i međutestna preciznost za sva tri metabolita i IS. Unutarrestna preciznost ili ponovljivost provjerena je tako da smo injektirali uzorke standarda koncentracije 1 $\mu\text{g/mL}$ u kontrolnom urinu u heksaplikatu. Međutestna preciznost ili podudaranje rezultata dobivenih mjerenjem istog uzorka kroz duže vremensko razdoblje utvrđena je iz tri odvojena testa rađena u heksaplikatu, kroz tri dana. Rezultati su izraženi u RSD (%).

Podaci se nalaze u tablicama 2. – 5. u kojima se srednja vrijednost odnosi na šest mjerenja. RSD se kreću od 0,03% za DOX, unutarrestna preciznost – 2 dan do 4,83% za DOXol – međutestna preciznost što je unutar postavljenih kriterija za preciznost HPLC metode od 5% (Lazarić, 2001). Odnosno, predložena analitička metoda udovoljava kriterijima unutarrestne i međutestne preciznosti što znači da je metoda precizna.

Tablica 2. Unutarrestna preciznost – 1. dan

Replikat	Površina ispod kromatografskog maksimuma			
	DOX (1 µg/mL)	DOXol (1 µg/mL)	DOXon (1 µg/mL)	IDA (1 µg/mL)
1.	459428,00	1022874,00	714418,00	834965,90
2.	455928,00	1021582,00	708549,00	837946,90
3.	457972,00	1025296,00	713234,00	839387,90
4.	458958,00	1026484,00	713071,00	835633,90
5.	456532,00	1022374,00	710889,00	835272,90
6.	457950,00	1024010,00	711516,00	834391,90
<i>x_{sr}</i> :	457794,60	1023770,00	711946,10	836266,60
<i>S_d</i> :	1353,18	1859,63	2091,75	1957,55
RSD (%) :	0,30	0,18	0,29	0,23

Tablica 3. Unutartestna preciznost – 2. dan

Površina ispod kromatografskog maksimuma				
Replikat	DOX (1 µg/mL)	DOXol (1 µg/mL)	DOXon (1 µg/mL)	IDA (1 µg/mL)
1.	462937,00	1088440,00	746877,90	803988,90
2.	464890,00	1083416,00	749581,90	804527,90
3.	464505,00	1088444,00	747487,90	805045,90
4.	464188,00	1092148,00	747061,90	813729,90
5.	466464,00	1087360,00	749015,90	809431,90
6.	467014,00	1091323,00	745430,90	811157,90
<i>x_{sr}</i> :	464999,60	1088522,00	747576,10	807980,40
<i>S_d</i> :	1508,11	3112,16	1513,79	4042,85
RSD (%):	0,03	0,29	0,20	0,50

Tablica 4. Unutartestna preciznost – 3. dan

Površina ispod kromatografskog maksimuma				
Replikat	DOX (1 µg/mL)	DOXol (1 µg/mL)	DOXon (1 µg/mL)	IDA (1 µg/mL)
1.	464379,00	1126877,00	753795,90	840217,90
2.	467205,00	1123778,00	756756,90	879941,90
3.	467342,00	1119696,00	749591,90	867107,90
4.	466345,00	1125330,00	752295,90	860409,90
5.	465454,00	1132866,00	749489,90	843533,90
6.	464978,00	1133078,00	750498,90	834438,90
<i>x_{sr}</i> :	465950,5	1126937,00	752071,60	854275,10
<i>S_d</i> :	1210,58	5250,95	2837,71	17706,24
RSD (%):	0,26	0,47	0,38	2,07

Tablica 5. Međutestna preciznost

Test:	Rezultat – prosječna površina ispod kromatografskog maksimuma			
	DOX (1 µg/mL)	DOXol (1 µg/mL)	DOXon (1 µg/mL)	IDA (1 µg/mL)
1. (n=6)	457794,60	1023770,00	711946,10	836266,60
2. (n=6)	464999,60	1088522,00	747576,10	807980,40
3. (n=6)	465950,50	1156937,00	752071,60	854275,10
x_{sr} :	462914,90	1079743	737197,90	832840,70
S_d :	4459,73	52140,97	21983,94	23336,72
RSD (%):	0,96	4,83	2,98	2,80

4.1.4. Točnost metode

Točnost je stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referentne vrijednosti i eksperimentalne vrijednosti, a određuje minimalno u triplicatu za najmanje tri koncentracije. Rezultati se prikazuju kao odnos teoretske i dobivene vrijednosti, što predstavlja iskorištenje.

Budući da je u ovom eksperimentu korišten interni standard (IS), u svrhu kvantifikacije svakog metabolita koji se određivao, potrebno je bilo odrediti faktor korelacije (IRF, engl. *internal response factor*). IRF je vrijednost koja dovodi u omjer, odnosno uspoređuje odnos površine ispod kromatografskog maksimuma IS i analita te njihove koncentracije, a računa se prema formuli:

$$IRF = \frac{\text{površina (IS)} * \text{masa (analit)}}{\text{površina (analit)} * \text{masa (IS)}}$$

Za određivanje IRF napravljene su redom otopine standarda DOX-a koncentracije 0,25 µg/mL, otopina standarda DOXola koncentracije 0,25 µg/mL i otopina DOXona koncentracije 0,25 µg/mL, a svakoj otopini dodan je IS (IDA) tako da krajnja koncentracija IDA bude 1 µg/mL u sve tri otopine. Prema gore navedenoj formuli izračunati su IRF vrijednosti za sva tri metabolita i rezultati su prikazani u tablici 6.

Točnost metode provjerena je na način da je kontrolni urin „cijepljen“ („spike“) kako bi se postigle tri različite koncentracije te je nakon analize iz dobivenih rezultata izračunat postotak

iskorištenja („recovery“). Dobivena analitička vrijednost iz analize smije odstupati $\pm 5\%$ od vrijednosti pripremljene, cijepljene koncentracije. Koncentracije pripremljene „cijepljenjem“ moraju se nalaziti u području linearnosti metode.

Nakon određenih IRF vrijednosti provjerena je točnost metode. Kao što je već navedeno, točnost je provjerena pri tri različite koncentracije svakog metabolita (0,50, 0,75, 1,00 $\mu\text{g/mL}$). Pripremljeni uzorci svih metabolita i u sve tri koncentracije testirani su u triplicatu, a rezultati su iskazani kao analitički prinos uz pripadajuće RSD vrijednosti (tablica 6.)

Tablica 6. Parametri točnosti metode

	IRF	0,50 $\mu\text{g/mL}$		0,75 $\mu\text{g/mL}$		1,00 $\mu\text{g/mL}$	
		Analitički prinos (%)	RSD (%)	Analitički prinos (%)	RSD (%)	Analitički prinos (%)	RSD (%)
DOX	0,88	102,05	0,36	99,04	0,16	104,69	0,00
DOXol	0,86	102,73	1,28	104,61	0,69	97,73	2,48
DOXon	1,01	104,68	0,40	101,13	4,99	95,08	0,24

Dobiveni rezultati ukazuju da je primijenjena metoda u granicama prihvatljivosti te se može primijeniti za određivanje DOXola, DOX-a i DOXona u urinu miševa. Analitički prinos iznosio je od 95,08% za DOXon u urinu „cijepljenim“ s 1,00 $\mu\text{g/mL}$ DOXona do 104,69% za DOX u urinu „cijepljenim“ s istom koncentracijom.

4.1.5. Limit detekcije i limit kvantifikacije

Granica detekcije (LOD) predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se može detektirati tj. točka gdje je mjerna vrijednost veća od nesigurnosti kojom se mjeri. Uz nju je povezana i granica kvantifikacije (LOQ) koja predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost.

Granica detekcije i granica kvantifikacije dobivene su statističkom procjenom, na osnovu nagiba i ostatnog standardnog odstupanja regresijskog pravca. Pravac je dobiven linearnom regresijom podataka dobivenih ispitivanjem najnižih koncentracija standardnih otopina. Potrebni parametri za računanje te izračunati LOD i LOQ za svaki metabolit prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Izračunati parametri za LOD i LOQ za sva tri metabolita

Metabolit	S_e	S_d	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
DOX	3852,24	1572,67	0,010	0,031
DOXol	8594,37	21051,83	0,007	0,021
DOXon	2875,77	1174,03	0,005	0,015

Rezultati prikazani u tablici 7. pokazuju da su najniže granice detekcije i kvantifikacije za doksorubicinon, i iznose 0,005 $\mu\text{g/mL}$ (odnosno 5 ng/mL) za granicu detekcije, te 0,015 mg/mL (odnosno 15 ng/mL) za granicu kvantifikacije.

4.2. Primjena metode za istovremeno određivanje metabolita doksorubicina u urinu štakora

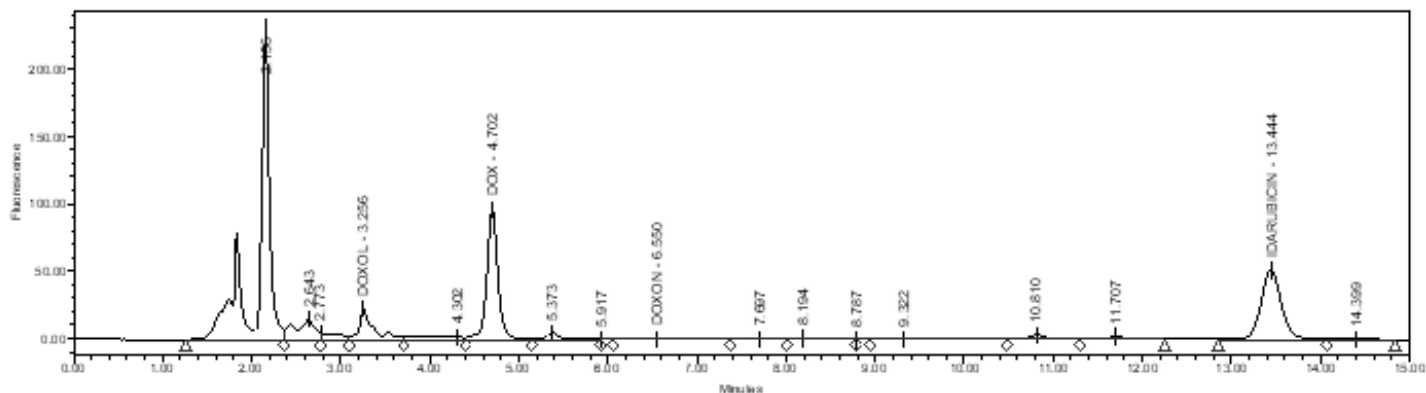
Optimizirana i validirana metoda primijenjena je za istovremenu identifikaciju i kvantifikaciju metabolita doksorubicina u urinu štakora tretiranih različitim formulacijama doksorubicina. Tri skupine štakora tretirane su: DOX u otopini (DOX-Pliva), liposomskom formulacijom DOX (Myocet) i DOX uklopljenim u PLGA- nanočestice (PLGA-DOX).

Tablica 8. Prosječna koncentracija izlučenih metabolita DOX-a u urinu štakora tretiranih s tri različite formulacija DOX-a

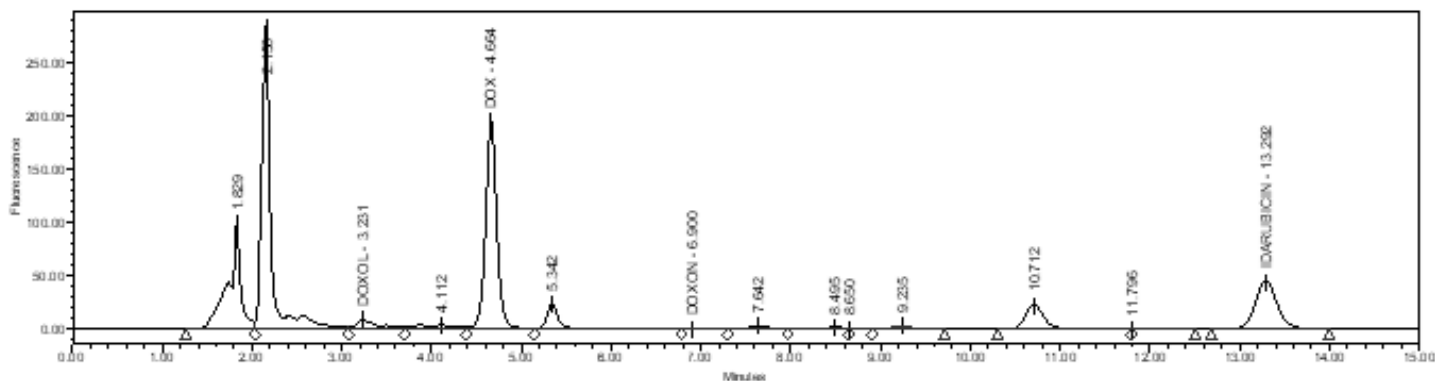
	DOX-Pliva			PLGA-DOX			Myocet		
	DOX ($\mu\text{g/mL}$)	DOXol ($\mu\text{g/mL}$)	DOXon ($\mu\text{g/mL}$)	DOX ($\mu\text{g/mL}$)	DOXol ($\mu\text{g/mL}$)	DOXon ($\mu\text{g/mL}$)	DOX ($\mu\text{g/mL}$)	DOXol ($\mu\text{g/mL}$)	DOXon ($\mu\text{g/mL}$)
x_{sr}:	0,775	1,196	0,034	0,826	1,436	0,034	0,111	0,699	0,003
S_d:	0,931	0,862	0,049	0,606	0,904	0,023	0,117	0,503	0,005

x_{sr} – srednja vrijednost koncentracije izlučenog metabolita u skupini od 8 štakora

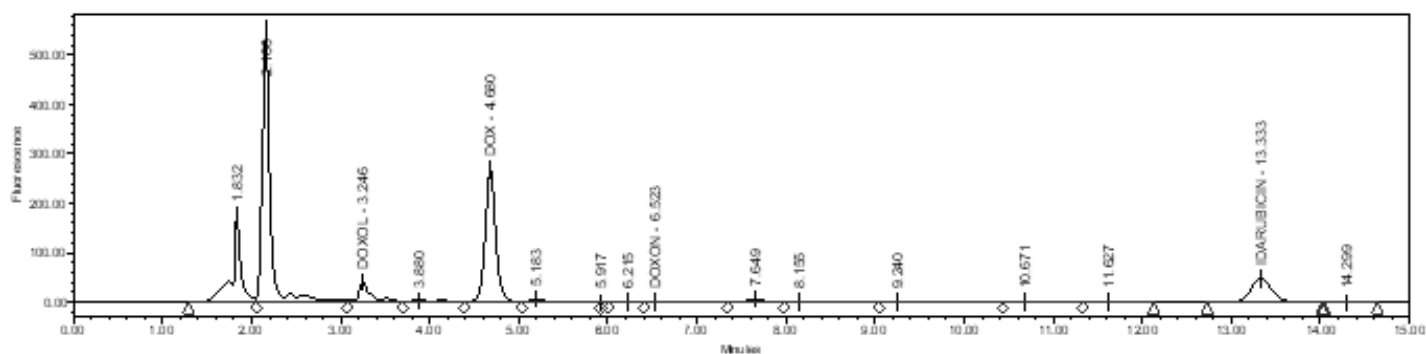
S_d – standardna devijacija koncentracije metabolita u skupini



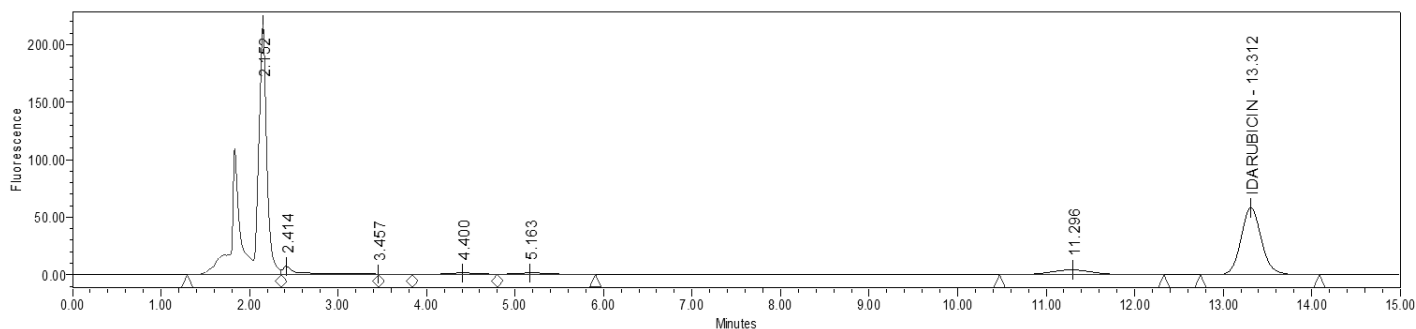
Slika 15a. Kromatogram urina štakora prikupljen 12 sati nakon injekcije konvencionalnog doksorubicina u otopini, DOX-Pliva, s dodatkom IS (1 $\mu\text{g/mL}$)



Slika 15b. Kromatogram urina štakora prikupljen 12 sati nakon aplikacije liposomske formulacije doksorubicina – Myocet, s dodatkom IS (1 $\mu\text{g/mL}$)



Slika 15c. Kromatogram urina štakora prikupljen 12 sati nakon aplikacije doksorubicina uklopljenog u nanočestice, PLGA-DOX, s dodatkom IS (1 $\mu\text{g/mL}$)



Slika 16a. Kromatogram urina štakora kontrolne skupine s dodatkom IS (1 µg/mL)

Razvijena metoda je uspješno primijenjena u kvantitativnom određivanju doksorubicina i njegovih metabolita u urinu štakora bez interferencije matriksa tj. ostalih spojeva prisutnih u urinu (primjeri analize dani su na slikama 15a., 15b., 15c. i 16.). Dobiveni podatci su pokazali razlike u koncentraciji izlučenih metabolita u grupama tretiranim različitim formulacijama. U svim skupinama urinom se u prosjeku izlučuje najviše DOXola, nešto manje nemetaboliziranog DOX-a te najmanje metabolita DOXona. Ovisno o primijenjenoj formulaciji DOX-a koncentracije izlučenih metabolita se razlikuju među skupinama što se pokazuju rezultati prikazani u tablici 8. Koncentracije metabolita u urinu skupina tretiranim sa doksorubicinom u otopini i doksorubicinom ugrađenim u PLGA-nanočestice su približno iste. Rezultati analize su pokazali da je u uzorcima urina eksperimentalnih životinja u skupini koja je tretirana doksorubicinom ugrađenim u liposome (Myocet) nađena značajno manja količina svih metabolita pa tako i nemetaboliziranog doksorubicina. Dobiveni rezultati ukazuju na utjecaj liposomske formulacije na metabolički put te time i različit farmakokinetički profil tako formuliranog doksorubicina. U literaturi je opisano kako doksorubicin ugrađen u liposome pokazuje poboljšana farmakokinetička svojstva i raspodjelu u tkivu te veću efikasnost nego slobodni doksorubicin. Liposomi omogućavaju dulje zadržavanje doksorubicina u organizmu i njegovo kontrolirano otpuštanje, štite ga od brze razgradnje i time smanjuju nastajanje doksorubicinola koji je uz doksorubicin odgovoran za kardiotoksičnost. U literaturi je pokazano da slobodan doksorubicin ima poluvrijeme eliminacije $t_{1/2}$ 0,2 sata, dok liposomska formulacija Myocet ima poluvrijeme eliminacije 2,5 sata (Gabizon, 1992).

5. ZAKLJUČAK

- Razvijena je jednostavna, brza i precizna metoda tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti na reverznoj fazi sa fluorescentnom detekcijom (HPLC-FD) za istovremeno kvantitativno određivanje doksorubicina i njegovih metabolita: doksorubicinola i doksorubicinona u urinu štakora.
- Metoda je validirana prema ICH smjernicama za sva tri analizirana spoja, doksorubicin, doksorubicinol, doksorubicinon te pokazuje veliku selektivnost, linearnost ($k \geq 0,999$), točnost ($95\% \leq \text{analitički prinos} \leq 105\%$) i preciznost ($\text{RSD} < 5\%$) u radnom području za svaki pojedini spoj.
- Također, prednosti metode su da zahtijeva vrlo male volumene urina ($10 \mu\text{L}$), u kojem se istovremeno određuje nemetabolizirani doksorubicin i njegovi metaboliti, priprema uzoraka je jednostavna, a vrijeme provođenja analize je kratko zbog čega je moguća analiza velikog broja uzoraka urina u kratkom periodu.
- Mobilna faza sastavljena od vode s trikloroocetnom kiselinom i acetonitrilom, iako nižeg pH, ne koristi puferne otopine čime se izbjeglo prekomjerno korištenje soli i njihovo taloženje na koloni.
- Prednosti korištenja idarubicina kao internog standarda u kvantitativnom određivanju vidljive su u visokoj točnosti i preciznosti određivanja spojeva te inter- i intra-testnoj preciznosti.
- Razvijena i validirana metoda visoke osjetljivosti, selektivnosti i točnosti, uspješno je primijenjena za određivanje DOX-a i njegovih metabolita u urinu štakora koji su tretirani različitim formulacijama doksorubicina.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem se dr. sc. Ruži Frkanec, znanstvenoj savjetnici, na mentorstvu, mnoštvu korisnih savjeta i susretljivosti.

Hvala i doc. dr.sc. Davoru Šakiću na pruženoj prilici i pomoći prilikom pisanja ovog rada.

7. POPIS LITERATURE

- Alhareth, K., Vauthier, C., Gueutin, C., Ponchel, G., & Moussa, F. (2012). HPLC quantification of doxorubicin in plasma and tissues of rats treated with doxorubicin loaded poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 887-888, 128-132. doi:10.1016/j.jchromb.2012.01.025
- Al-Abd, A.M., Kim, N.H., Song, S.C., Lee, S.J., & Kuh, H.J. (2009). A simple HPLC method for doxorubicin in plasma and tissues of nude mice. *Arch Pharm Res* 32(4): 605-611. doi: 10.1007/s12272-009-1417-5.
- Babos, G. (2018). Dual Drug Delivery of Sorafenib and Doxorubicin from PLGA and PEG-PLGA Polymeric Nanoparticles, *Polymers*, 10, 895; doi:10.3390/polym10080895.
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., & Farokhzad, O.C. (2014). Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev.* 66, 2-25.
- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*, 9(2), 12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I. (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*, 16(25), 3267-3285. doi:10.2174/092986709788803312
- Cerjan-Stefanović, Š., Drevenkar, V., Jurišić, B., Medić-Šarić, M., Petrović, M., Šegudović, N., . . . Turina, S. (1999). *Kromatografsko nazivlje*. Zagreb.
- Chai, F., Sun, L., He, X., Li, J., Liu, Y., Xiong, F., . . . Zheng, C. (2017). Doxorubicin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles coated with chitosan/alginate by layer by layer technology for antitumor applications. *Int J Nanomedicine*, 12, 1791-1802. doi:10.2147/IJN.S130404
- EURACHEM Guide (2011) The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics, www.eurachem.org/guides/pdf/valid.pdf, pristupljeno 16.8.2020.
- Frederick, C. A., Williams, L. D., Ughetto, G., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Rich, A., & Wang, A. H. (1990). Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry*, 29(10), 2538-2549.

- Gabizon A.A. (1992). Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. *Cancer Research*, 4: 891–896.
- Guha, R., Chowdhury, S., Palui, H., Mishra, A., Basak, S., Mandal, T., Hazra, S., & Konar, A. (2013). Doxorubicin-loaded MePEG-PCL nanoparticles for prevention of posterior capsular opacification. *Nanomedicine*, 8(9), 1415-28.
- Hassanpour, S.H. & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4 (4), 127-129.
- Hortobagyi, G. N. (1997). Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*, 54 Suppl 4, 1-7. doi:10.2165/00003495-199700544-00003
- ICH Harmonized tripartite guideline, Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1) (2005) International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, <http://www.ich.org>, pristupljeno 16.8.2020.
- Incidencija raka u Hrvatskoj, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske, Bilten br. 40, 2018., ur. Šekerija M, Izdao: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, HR
- Han, J., Zhang, J., Haiyan, Z., Li, Y., & Chen, Z. (2015). Simultaneous determination of doxorubicin and its dipeptide prodrug in mice plasma by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(3). 199-202.
- Julka, P. K., Chacko, R. T., Nag, S., Parshad, R., Nair, A., Oh, D. S., . . . Perou, C. M. (2008). A phase II study of sequential neoadjuvant gemcitabine plus doxorubicin followed by gemcitabine plus cisplatin in patients with operable breast cancer: prediction of response using molecular profiling. *Br J Cancer*, 98(8), 1327-1335. doi:10.1038/sj.bjc.6604322
- Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W.E. & Storm. G. (2012). Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J Control Release*. 161, 175-187
- Lazarić, K. (2012). Validacija analitičkih metoda-osnovna načela. *Svijet po mjeri*, 1, 61-64.
- Licata, S., Saponiero, A., Mordente, A., & Minotti, G. (2000). Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem Res Toxicol*, 13(5), 414-420. doi:10.1021/tx000013q
- Lindsay, S. (1992). *High performance liquid chromatography*. London: John Wiley & Sons.

- Liu, J., Tu, D., Dancey, J., Reyno, L., Pritchard, K. I., Pater, J., & Seymour, L. K. (2006). Quality of life analyses in a clinical trial of DPPE (tesmilifene) plus doxorubicin versus doxorubicin in patients with advanced or metastatic breast cancer: NCIC CTG Trial MA.19. *Breast Cancer Res Treat*, *100*(3), 263-271. doi:10.1007/s10549-006-9257-1
- Liposomal doxorubicin, <https://www.macmillan.org.uk>, pristupljeno 16.8.2020.
- Lucas, A. T., O'Neal, S. K., Santos, C. M., White, T. F., & Zamboni, W. C. (2016). A sensitive high performance liquid chromatography assay for the quantification of doxorubicin associated with DNA in tumor and tissues. *J Pharm Biomed Anal*, *119*, 122-129.
- Maluf, F. C., & Spriggs, D. (2002). Anthracyclines in the treatment of gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol*, *85*(1), 18-31. doi:10.1006/gyno.2001.6355
- Nadas J. & Sun D. (2006). Anthracyclines as effective anticancer drugs. *Expert opinion on drug discovery*, *1*, 549-568.
- Pandey, S., Pandey, P., Tiwari, G. & Tiwari, R. (2010). Bioanalysis in drug discovery and development. *Pharm Methods*, *1*(1), 14–24.
- Park, S.E., & Schaer, T.P. (2019). Preclinical Animal Models. *Academic Entrepreneurship for Medical and Health Scientists*. *1*(3), Article 20.
- Pieper, S. (2017). Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles - a systematic evaluation of preparation techniques and parameters, *Materials Today: Proceedings 4* S188–S192.
- Preston, G.W., Phillips, D.H. Quantification of a peptide standard using the intrinsic fluorescence of tyrosine. *Anal Bioanal Chem* **408**, 2187–2193 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9334-1>
- Reis-Mendes, A., Gomes, A. S., Carvalho, R. A., Carvalho, F., Remiao, F., Pinto, M., . . . Costa, V. M. (2017). Naphthoquinoxaline metabolite of mitoxantrone is less cardiotoxic than the parent compound and it can be a more cardiosafe drug in anticancer therapy. *Arch Toxicol*, *91*(4), 1871-1890.
- Reis-Mendes, A. F., Sousa, E., de Lourdes Bastos, M., & Costa, V. M. (2015). The Role of the Metabolism of Anticancer Drugs in Their Induced-Cardiotoxicity. *Curr Drug Metab*, *17*(1), 75-90.
- Rezvantalab, S. (2018). PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment, *Front. Pharmacol.*, doi.org/10.3389/fphar.2018.01260)

- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther*, 10(4), 853-858. doi:10.4103/0973-1482.139267
- Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., & Kawanishi, T. (2010). Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878(19), 1466-1470. doi:10.1016/j.jchromb.2010.03.040
- Schaupp, C. M., White, C. C., Merrill, G. F., & Kavanagh, T. J. (2015). Metabolism of doxorubicin to the cardiotoxic metabolite doxorubicinol is increased in a mouse model of chronic glutathione deficiency: A potential role for carbonyl reductase 3. *Chem Biol Interact*, 234: 154-161.
- Skoog, D. A., & Leary, J. J. (1992). *Principles of Instrumental Analysis*. New York: Saunders/Harcourt Brace Jovanovich.
- Snyder, R. L., Kirkland, J. J., Dolan, W. J. (2010) Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3. izd., J. Willey & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
- Škrbina, A. (2016). Nanotehnološki nosači biljnih tvari i pripravaka. In. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet
- Taverniers, I, De Loose, M. Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, *Trends in Analytical Chemistry*. 23 (8): 535-552.
- Torchilin, VP. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*.; 4:145–160.
- Shukla, T., Upmanyu, N., Pandey, S.P., Sudheesh, M.S (2019). Site-specific drug delivery, targeting, and gene therapy. In A. M. Grumezescu (Ed.), *Nanoarchitectonics in Biomedicine* (pp. 473-505). Norwich, New York, USA: William Andrew Publishing.
- Urva, S.R. Yang, V.C. Balthasar, J.P. (2009). Development and validation of an enzyme linked immunosorbent assay for the quantification of carcinoembryonic antigen in mouse plasma. *J Immunoassay Immunochem*. 30(4): 418-427
- Wei, G., Xiao, S., Si, D., & Liu, C. (2008). Improved HPLC method for doxorubicin quantification in rat plasma to study the pharmacokinetics of micelle-encapsulated and liposome-encapsulated doxorubicin formulations. *Biomed Chromatogr*, 22(11): 1252-1258.

- Wei, A., Mehtala, J.G., & Patri, A.K. (2012). Challenges and opportunities in the advancement of nanomedicines. *J Control Release*, 164: 236-46.
- Xia Y., Xu T., Zhao M., Hua L., Chen Y., Wang C., Tang Y., & Zhu B. (2018). Delivery of Doxorubicin for Human CervicalCarcinoma Targeting Therapy by FolicAcid-Modified Selenium Nanoparticles, *Int. J. Mol. SciI*, 19, 3582.
- Yokomichi, N., Nagasawa, T., Coler-Reilly, A., Suzuki, H., Kubota, Y., Yoshioka, R., . . . Yamaguchi, Y. (2013). Pathogenesis of Hand-Foot Syndrome induced by PEG-modified liposomal Doxorubicin. *Hum Cell*, 26(1), 8-18. doi:10.1007/s13577-012-0057-0.
- Yaqub, F. (2013). Mechanism of action of anthracycline drugs, *The Lancet, Oncology*, 14 (8): 296.

8. SAŽETAK

Lara Zorić

**Razvoj i validacija HPLC-FD metode za istovremeno određivanje metabolita
doksorubicina u urinu štakora**

Antraciklini su jedni od najčešće primjenjivanih antitumorskih lijekova, a zbog jakih i nerijetko fatalnih nuspojava, prvenstveno kardiotoksičnosti, farmakokinetika ove skupine kemoterapeutika čest je predmet istraživanja. Cilj ovog rada bio je razviti i validirati brzu, osjetljivu i preciznu HPLC-FD metodu za istovremeno kvantitativno određivanje doksorubicina i njegovih metabolita u urinu štakora. Metoda je validirana ispitivanjem nekoliko parametara: specifičnost i selektivnost, linearnost, točnost, preciznost te granice detekcije i granice kvantifikacije. Doksorubicin, metaboliti doksorubicinol i doksorubicinon, kao i idarubicin (kao interni standard, IS) razdvojeni su na C18 HPLC koloni reverzne faze i detektirani fluorescentnim detektorom, na valnoj duljini ekscitacije 480 nm i emisije 580 nm. Metoda je linearna u ispitanom rasponu 0,05-1,6 µg/mL, najniža granica detekcije bila je 5,0 ng/mL, dok je granica kvantifikacije bila 15,0 ng/mL za doksorubicinon. Za svaku razinu uzoraka kontrole kvalitete, inter i intra-testna preciznost je bila visoka i RSD je bila manja od 5% (relativno standardno odstupanje) za sve ispitivane spojeve. Točnost je određena izračunavanjem postotka pogreške opažene u analizi QC uzoraka i bila je u rasponu od 95,08% - 104,69%, što ukazuje na prihvatljivu točnost i preciznost razvijene metode. Metoda je uspješno primijenjena za istovremeno kvantitativno određivanje DOX i njegovih metabolita u urinu štakora tretiranih s različitim formulacijama doksorubicina.

Ključne riječi: metaboliti doksorubicina, HPLC-FD metoda, validacija, urin štakora

9. SUMMARY

Lara Zorić

Development and validation of HPLC-FD method for the simultaneous determination of doxorubicin metabolites in the urine of rats

Anthracyclines are one of the most commonly used antitumor agents, and due to its strong and often fatal side effects, especially cardiotoxicity, pharmacokinetics of this group of chemotherapeutics is a frequent subject of research. The aim of this study was to develop and validate the rapid, sensitive and accurate HPLC-FD method for the determination of doxorubicin and its metabolites in rat urine. The method was validated examining the following parameters: specificity and selectivity, linearity, accuracy, precision, and limit of detection and limit of quantification. Doxorubicin, metabolites, doxorubicinol and doxorubicinone as well as idarubicin (as internal standard, IS) were separated on a C18 reversed-phase HPLC column and quantified by a fluorescence detection with an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 580 nm. The linearity was obtained over the range of 0.05–1.6 µg/mL, the lowest limit of detection was 5.0 ng/mL while the limit of quantitation was 15.0 ng/mL. for doxorubicinone. For each level of quality control samples, inter- and intra-assay precision was less than 5 % (relative standard deviation) for all examine compounds. The accuracy was determined by calculating the percent error observed in the analysis of QC samples and expressed in percent error were in range from 95.08% - 104.69 %, indicating the acceptable accuracy and precision of the method developed. This method was successfully applied to the simultaneous quantitative determination of DOX and the metabolites in rat urine treated with different doxorubicin formulations.

Key words: metabolites of doxorubicin, HPLC-FD method, validation, rat urine