

Τεχνικό Φυλλάδιο

Irinotecan – Φωτομετρική Μέθοδος

Το irinotecan είναι ένα αντινεοπλασματικό φάρμακο, παράγωγο της camptothecin, που δρα ως παρεμποδιστής της τοποϊσομεράσης Ι. Οι φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές παράμετροί του εμφανίζουν σημαντική ενδοατομική διακύμανση, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων του φαρμάκου.

Αρχή Μεθόδου

Σε ισχυρά όξινο pH παρατηρείται βαθυχρωμική μετατόπιση του μέγιστου απορρόφησης του irinotecan προς τα 400 nm. Στο ίδιο pH επιτυγχάνεται απομάκρυνση πρωτεϊνών και λιπιδίων, λόγω μετουσίωσης και υδρόλυσης αυτών, αντίστοιχα. Η αύξηση της απορρόφησης στα 400 nm είναι ανάλογη της [irinotecan] στο βιολογικό δείγμα.



Αντιδραστήρια

R₁ (HCl 37%, ως μέσο οξίνισης),

R₂ (NaCl στερεό, ως αποσταθεροποιητής γαλακτωμάτων)

R₃ (πρότυπο διάλυμα irinotecan 2 mg/mL)

Τελικές Συγκεντρώσεις

HCl 1,32M

NaCl 2,6 %w/v

Χρόνος Ζωής Αντιδραστηρίων

Αναγράφεται στο set. Τα R₁, R₂ και R₃ διατηρούνται σε RT.

Χρησιμοποιούμενο Δείγμα

Πλάσμα

Σταθερότητα Irinotecan σε πλάσμα για 30 μέρες σε θερμοκρασία κατάψυξης^[2]

Μέθοδος

Θερμοκρασία: 25 °C

Κυψελίδα: 1 cm

Σε κάθε φιαλίδιο R₂ προσθέστε σύμφωνα με τον πίνακα:

	Τυφλό	Δείγμα	Πρότυπα
Πλάσμα ασθενούς (μετά από χορήγηση irinotecan)	-	1000	
Πλάσμα ελεύθερο από irinotecan	-	-	1000
H ₂ O (μL)	1000	-	-
R ₁ (μL)	125	125	125
R ₃ (μL)	-	-	0, 2, 4, 7, 10, 13, 16
Ανάδευση, παραμονή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, Φυγοκέντρηση σε 13.399 g σε RT επί 10 min και λήψη του υπερκείμενου.			

Φωτομέτρηση έναντι τυφλού σε μήκος κύματος 400 και 450 nm (διχρωματική ανάλυση).

Υπολογισμοί

Υπολογισμός ($A_{400} - \text{corrected } A_{450}$), όπου $\text{corrected } A_{450} = \text{correction factor} * A_{450}$
 $\text{correction factor} = (A_{400}/A_{450})_{\text{Π0}} * A_{450}$

Υπολογισμός [Irinotecan] (μg/mL) με βάση καμπύλης αναφοράς ($A_{400} - \text{corrected } A_{450}$) =
 $f([\text{Irinotecan}] (\mu\text{g/mL}))$

Γραμμικότητα

Μέχρι τουλάχιστον τα 28 μg/mL, (LOL ≤ 28 μg/mL).

Τεχνικά Χαρακτηριστικά

Γραμμικότητα (Linearity): Γραμμική συσχέτιση μεταξύ απορρόφησης και [irinotecan] παρατηρήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ 0 και τουλάχιστον 28 μg/mL irinotecan.

Αναλυτική ευαισθησία - όριο ανίχνευσης (Sensitivity): Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε σε 0,32 μg/mL ενώ το όριο ποσοτικοποίησης σε 0,96 μg/mL

Πιστότητα (Precision)

Επαναληψιμότητα (Repeatability)

α/α	[Irinotecan] μg/mL	Μέση τιμή (μg/mL), N=15	Τυπική απόκλιση (μg/mL), N=15	RSD % Intra- Day
1	2,11	2,79	0,10	3,58
2	4,22	3,73	0,08	2,23
3	6,82	5,06	0,03	0,72
4	9,76	7,50	0,08	1,04

Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)

α/α	C Irinotecan µg/mL	ΜΟ επαναλή- ψεων (µg/dL) N=20	SD επαναλήψε- ων (µg/dL) N=20	RSD % Inter-Day
1	2,11	2,24	0,31	13,91
2	> δείγματος 1	3,81	0,46	12,04
3	> δείγματος 2	4,86	0,53	10,91
4	9,76	7,48	0,90	12,08

Παρεμποδίσσεις - αλληλεπιδράσεις (Interferences)

Οι προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις του irinotecan δεν παρουσιάζουν σημαντική απόκλιση από τη γνωστή ή θεωρούμενη αληθή τιμή μέχρι, τουλάχιστον, τα, ως παρακάτω, αναφερόμενα όρια. Στην περίπτωση των λιπαιμικών δειγμάτων, η μέθοδος προκατεργασίας οδηγεί σε όξινη υδρόλυση των λιπιδίων, συνεπώς θεωρείται ότι η θολερότητα δεν παρεμποδίζει τον προσδιορισμό

Παρεμποδιστής	Έκφραση σε	Όρια (mg/dl)
Αιμόλυση	Αιμοσφαιρίνη	183
Ίκτερος	Χολερυθρίνη	3,84
Θολερότητα	Τριγλυκερίδια	-----

Βιβλιογραφία

- 1) Marangon E, Posocco B et al. Development and validation of a high performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of irinotecan and its main metabolites in human plasma and its application in a clinical pharmacokinetic study. Plos one. 2015; 10(2):1-18.
- 2) Tariq M, Negi L M, Talegaonkar S et al. Liquid Chromatographic Method for Irinotecan Estimation: Screening of P-gp Modulators. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015; 77(1):14-23.

Τεχνικό Φυλλάδιο

Irinotecan – Χρωματογραφική μέθοδος HPLC

Το irinotecan είναι ένα αντινεοπλασματικό φάρμακο, παράγωγο της camptothecin, που δρα ως παρεμποδιστής της τοποϊσομεράσης Ι. Οι φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές παράμετροί του εμφανίζουν σημαντική ενδοατομική διακύμανση, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η παρακολούθηση των θεραπευτικών επιπέδων του φαρμάκου.

Αρχή Μεθόδου

Αναπτύχθηκε χρωματογραφική μέθοδος RP-HPLC UV/Vis ποσοτικού προσδιορισμού του φαρμάκου irinotecan. Η μέθοδος βασίζεται στην εκχύλιση του irinotecan από το πλάσμα, μετά από αποπρωτεΐνωση και στον διαχωρισμό του από τα υπόλοιπα συστατικά του πλάσματος, με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Το irinotecan εκλύεται ισοκρατικά και το εμβαδόν της κορυφής του είναι ανάλογο της συγκέντρωσής του στο βιολογικό δείγμα.

Φυσιολογικές Τιμές

Σε άντρες και γυναίκες: 10 ng/mL με 10 µg/mL σε πλάσμα, μετά από χορήγηση irinotecan σύμφωνα με όλα τα πρωτόκολλα της σύγχρονης ιατρικής πρακτικής^[1].

Αντιδραστήρια

R1 (HCl 37%),

R2 (MeCN)

R3 (πρότυπο διάλυμα irinotecan 2 mg/mL)

Τελικές Συγκεντρώσεις

HCl 2,0 M

MeCN (65 v/v)

Χρόνος Ζωής Αντιδραστηρίων

Αναγράφεται στο set. Τα R1, R2 και R3 διατηρούνται σε RT.

Χρησιμοποιούμενο Δείγμα

Πλάσμα

Σταθερότητα Irinotecan σε πλάσμα για 30 μέρες σε θερμοκρασία κατάψυξης^[2]

Μέθοδος (Όλοι οι όγκοι εκφράζονται σε µL)

Χρωματογραφική στήλη: Hypersil GOLD (175 Å, 3 µm, 150 x 4,6 mm)

Μήκος κύματος : 220 nm

Θερμοκρασία ανάλυσης : 29 °C

Ταχύτητα ροής : 1,3 mL/min.

Συνολικός Χρόνος ανάλυσης: 11,5 min

Ισοκρατική Έκλουση με Κινητή Φάση : NaPi Buffer(250mM, pH 3.0):MeCN 81-19%

	Δείγμα	Πρότυπα
Πλάσμα	500	500

R2	1000	1000
Vortex για 40'', φυγοκέντρωση σε 20.150 g, ποσοτική συλλογή υπερκείμενου, νέα φυγοκέντρωση σε 20.150 g, νέα ποσοτική συλλογή υπερκείμενου		
Υπερκείμενο	Ποσοτική λήψη	Ποσοτική λήψη
R1	25	25
R3	-	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30

Ακολουθεί ανάμιξη και ανάλυση σε HPLC, πρότυπου και δείγματος.

Υπολογισμοί

Υπολογισμός C- Irinotecan (μg/mL) με βάση καμπύλη αναφοράς εμβαδού κορυφής = $f(C\text{-Irinotecan } (\mu\text{g/mL}))$

Γραμμικότητα

Μέχρι τουλάχιστον τα 44 μg/mL.

Τεχνικά Χαρακτηριστικά

Γραμμικότητα (Linearity): Γραμμική συσχέτιση μεταξύ απορρόφησης και C-irinotecan παρατηρήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ 0 και τουλάχιστον 44 μg/mL irinotecan.

Αναλυτική ευαισθησία - όριο ανίχνευσης (Sensitivity): Το όριο ανίχνευσης βρέθηκε να αντιστοιχεί σε $9,61 \pm 3,79$ μg/mL ενώ το όριο ποσοτικοποίησης σε $31,71 \pm 12,53$ μg/mL.

Πιστότητα (Precision):

Επαναληψιμότητα (Repeatability):

C irinotecan (μg/mL)	ΜΟ εμβαδού (μg/mL), N=15	SD εμβαδού (μg/mL), N=15	RSD % Intra-Day
43,46	33,18	13,10	39,48

Αναπαραγωγικότητα (Reproducibility):

C αρχική irinotecan (μg/mL) σε πλάσμα	Θερμοκρασία αποπρωτεΐνωσης	Αραίωση	ΜΟ επαναλήψεων (μg/dL), N=7	SD επαναλήψεων (μg/dL), N=7	RSD % Inter-Day
45,26	RT	1:19	23,76	24,13	101,56
45,26	4°C	1:19	19,10	18,49	96,79
45,26	15°C	1:9	37,89	55,23	145,76
45,26	100% Control σε RT	1:9	32,98	42,22	128,03

Αναφορές

1) Marangon E, Posocco B et al. Development and validation of a high performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of irinotecan and its main metabolites in human plasma and its application in a clinical pharmacokinetic study. Plos one. 2015; 10(2):1-18.

2) Tariq M, Negi L M, Talegaonkar S et al. Liquid Chromatographic Method for Irinotecan Estimation: Screening of P-gp Modulators. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015; 77(1):14-23.