



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

Медицински университет

„Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна

Факултет „Фармация“

Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“

Маг.-фарм. Станила Серьожева Стоева

**Нови аспекти в течнохроматографския анализ
на Сареситабине в проби от биологичен и
небиологичен произход**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и
научна степен „ДОКТОР“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.3. Фармация

Научна специалност: Токсикология

Научни ръководители:

Проф. д-р Петко Пенков Маринов, д. м.

Доц. Антоанета Здравкова Цветкова, д. и.

Варна, 2021

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на Катедрата по фармакология, токсикология и фармакотерапия към Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“, гр. Варна, състояло се на 05.02.2021 година и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:

- 1. Проф. д-р Петко Пенков Маринов, д.м. – председател (становище)*
- 2. Проф. д-р Камен Петров Канев, д. м. н. (рецензия)*
- 3. Проф. Васил Насков Атанасов, д. м. (рецензия)*
- 4. Доц. маг.-фарм. Калоян Добринов Георгиев, д. ф. н. (становище)*
- 5. Доц. д-р Евгения Иванова Бързашка-Христова, д. м. (становище)*

Дисертационният труд съдържа общо 166 страници, онагледен е с 36 фигури, 24 таблици и 2 схеми. Книгописът включва 313 заглавия, от които 10 на кирилица и 303 на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 20.04.2021 г. от часа в

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	1
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	5
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	7
1. Материали	7
1.1. Използвани реактиви	7
1.2. Използвани лабораторни и медицински консумативи	7
1.3. Използвана апаратура	7
1.4. Експериментални животни	8
2. Експериментални методи	11
2.1. Течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на CAP и 5-DFCR в проби от миша плазма.....	11
2.1.1. Преданалитичен етап.....	11
2.1.2. Аналитичен етап	14
2.2. Течнохроматографски метод за количествено определяне на професионалната експозиция с CAP	15
2.2.1. Преданалитичен етап.....	15
2.2.2. Аналитичен етап	20
2.3. Течнохроматографски метод за определяне на качествено и количественото съдържание на CAP в състава на таблетни лекарствени форми	20
2.3.1. Преданалитичен етап.....	20
2.3.2. Аналитичен етап	22
2.4. Валидационни методи, доказващи аналитичната надеждност на получените резултати	22
3. Статистическа обработка на резултатите.....	27
IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	28

1. Течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на САР и 5-DFCR в проби от миша плазма	28
1.1. Оптимизиране на пробоподготвителния етап	28
1.1.1. Процедура по протеинно преципитиране.....	28
1.1.2. Концентриране на целевите анализи	32
1.1.3. Матричен ефект	32
1.1.4. Определяне влиянието на вида антикуагулант в процеса на пробонабиране	34
1.2. Оптимизиране на течнохроматографския аналитичен етап....	35
1.2.1. Неподвижна фаза	36
1.2.2. Подвижна фаза.....	37
1.2.3. Температурен режим на работа.....	37
1.2.4. UV-детекция на САР и 5-DFCR	37
1.2.5. Качествено и количествено определяне на САР и 5-DFCR.....	38
1.3. Аналитична надеждност на течнохроматографския метод... 38	
1.3.1. Линейност.....	39
1.3.2. Граница на качествено и долната граница на количествено определяне.....	40
1.3.3. Специфичност	42
1.3.4. Точност и прецизност на метода	43
1.3.5. Валидационни параметри, характеризиращи пригодността на системата за анализ.....	46
1.4. Апробиране на течнохроматографския метод.....	47
1.5. Обсъждане на резултатите	49
2. Течнохроматографски метод за количествено определяне на професионалната експозиция с САР	56
2.1. Оптимизация на пробоподготвителния етап	56
2.1.1. Материал за пробонабиране	57

2.1.2. Определяне на влиянието на типа изследвана повърхност върху аналитичния добив на САР.....	59
2.2. Оптимизация на течнохроматографския аналитичен етап при определяне замърсяването с САР върху работни повърхности...	61
2.3. Аналитична надеждност на течнохроматографския метод...	61
2.3.1. Линеиност.....	61
2.3.2. Граница на качествено и количествено определяне.....	62
2.3.3. Специфичност.....	62
2.3.4. Точност и прецизност на метода.....	63
2.3.5. Валидационни параметри, характеризиращи пригодността на системата за анализ.....	65
2.4. Апробиране на течнохроматографския метод.....	66
2.5. Обсъждане на резултатите.....	69
3. Течнохроматографски метод за определяне на качествено и количественото съдържание на САР в състава на таблетни лекарствени форми.....	76
3.1. Оптимизация на преаналитичния етап.....	76
3.2. Оптимизация на аналитичния етап.....	77
3.3. Аналитична надеждност на течнохроматографския метод.....	78
3.3.1. Линеиност.....	78
3.3.2. Граница на качествено и количествено определяне.....	79
3.3.3. Специфичност.....	79
3.3.4. Точност и прецизност.....	80
3.3.5. Валидационни параметри, характеризиращи пригодността на системата за анализ.....	81
3.4. Апробация на течнохроматографския метод.....	82
3.5. Обсъждане на резултатите.....	83
V. ИЗВОДИ	86

1. Течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на определяне на САР и 5-DFCR в проби от миша плазма	86
2. Течнохроматографски метод за количествено определяне на професионалната експозиция с САР	87
3. Течнохроматографски метод за определяне на качествено и количественото съдържание на САР в състава на таблетни лекарствени форми	88
VI. ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН НАУЧЕН, НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН И ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР	89
VII. ПРИЛОЖЕНИЯ	90
VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	92
IX. УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	94
X. БЛАГОДАРНОСТИ	95

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

BC	Вътрешен стандарт
ГИ	Гастроинтестинален
ЕМА	Европейска агенция по лекарствата
КК	Контрол на качеството
МПД	Максимално поносима доза
ПП	Протеинно преципитиране
ППЕ	Палмо-планарната еритродистезия
РМЛД	Ретрометаболичен лекарствен дизайн
СЗО	Световна здравна организация
СРК	Синдром „ръка-крак“
СЧТ	Стомашно-чревен тракт
ТИ	Терапевтичен индекс
т. м.	Телесна маса
ТТЕ	Течно-течна екстракция
ТФЕ	Твърдофазна екстракция
ЧЕД	Човешка еквивалентна доза
б	Отклонение
б [%]	Относително отклонение в проценти
CAP	Capecitabine
CDA	Cytidine deaminase
CES	Carboxylesterase
CES1	Чернодробна карбоксилестераза
CES2	Интестинална карбоксилестераза
DAD	Детектор на диодна матрица
5-DFCR	5'-deoxy-5-fluorocytidine
5-DFUR	5'-deoxy-5-fluorouridine
DPD	Dihydropyrimidine dehydrogenase
FBAL	Fluoro- β -alanine
FDA	Американска агенция по храни и лекарства
5-FU	5-Fluorouracil

FUH₂	Dihydrofluorouracil
FUTP	Fluorouridine triphosphate
GC	Газова хроматография
GLP	Добра лабораторна практика
S/N	Съотношение сигнал/шум
HPLC	Високоэффективна течна хроматография
IARC	Международната агенция за изследване на рака
ICH	Международната конференция за хармонизация
LLOQ	Долна граница на количествено определяне
LOD	Граница на качествено определяне
LOQ	Граница на количествено определяне
LV	Leucovorin
MS	Мас-спектроскопия
RP	Обратно-фазова конфигурация
RSD	Относително стандартно отклонение
SD	Стандартно отклонение
TLC	Тънкослойна хроматография
TP	Thymidine phosphorylase
UHPLC	Високоэффективна течна хроматография при ултра високо налягане
UTA	Uridine triacetate
UTP	Uridine triphosphate
UV	Ултравioletова област на светлината
VIS	Видима област на светлината

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Лечението на злокачествени заболявания се явява сериозно предизвикателство за съвременната система на здравеопазване. Доказателство за това е драстичният ръст на заболяемостта и смъртността вследствие на рак в глобален мащаб (съответно с 44% и с 26 %). В допълнение, според Международната агенция за изследване на рака (International Agency for Research on Cancer, IARC), в следващите 20 години броят на болелите ще нарастне с около 60 %, поради устойчивото увеличаване и застаряване на световното население. Във връзка с това се предвижда, че до 2040 година делът на пациентите, изискващи прием на антинеопластици ще се повиши със средно 53%, въпреки разработените към днешна дата по-селективни терапии. От друга страна, през последното десетилетие преживяемостта на онкологично болните пациенти, приемащи цитостатично лечение, е повишена с едва 14 %. Причина за недостатъчно удовлетворителните резултати е липсата на селективно цитотоксично действие, както и тясната терапевтична ширина на антинеопластиките. Налице е висока честота на лекарство-индуцирана токсичност, която може да бъде животозастрашаваща, да налага преустановяване на лечението, а също и прием на допълнителни лекарства. Ето защо, в наши дни проучванията, насочени към оптимизиране цитостатичното лечение изпълняват важна функция в борбата срещу неоплазиите.

Повече от половин век флуоропиримидиновият клас цитостатици е крайъгълен камък в лечението на злокачествени заболявания, като колоректален карцином, рак на гърдата, рак на стомаха, рак на панкреаса, рак на яйчниците, карцином на главата и шията. Техен представител е антинеопластикът Capecitabine (CAP), рационално проектиран като орална пролекарствена форма на венозно вливания 5-Fluorouracil (5-FU). Със създаването му се цели постигане на насочено противотуморно действие, повишаване цитостатичната активност и редуциране на токсичността на активното вещество спрямо здравите клетки на организма. Въпреки това, по аналогия с останалите антинеопластици, пролекарството крие известни рискове за здравето на пациентите. Установено е, че при около 94 % от всички индивиди, приемащи CAP е регистрирана появата на поне една нежелана лекарствена реакция. В голяма част от случаите се касае за увреждане на стомашно-чревния тракт (СЧТ),

миелосупресия, синдром „ръка-крак“, невро- и кардиотоксичност. Най-често възникващи са гастроинтестиналните (ГИ) нежелани реакции, които нерядко се оказват, ако не животозастрашаващи, то дозо-лимитиращи за пациента. Счита се, че отговорен за това е наличният в СЧТ пълен набор от ензими, необходими за активирането на CAP до цитотоксичния агент 5-FU.

Съществува хипотеза, според която селективното инхибиране на ензима *carboxylesterase* (отговорен за пусковия стадий на активиране) в ГИ тракт следва да редуцира извънтуморното получаване на 5-FU. В резултат се очаква подобряване профила на безопасност и увеличаване ефективността на CAP. Същевременно, прегледът на литературните данни сочи, че към днешна дата липсват *in vivo* предклинични и клинични проучвания, изследващи здравните ползи от съвместния прием на CAP и *carboxylesterase*-инхибитори. Практическият опит показва, че количественият анализ на субстрата и продукта на даден ензим може да послужи за извеждане на съответните доза-ефект зависимости. За целта е необходимо разработването на чувствителен и надежден аналитичен метод, позволяващ детектирането на минимални количества от целевите аналити в биологични проби. Що се отнася до биомониторирането на CAP и/или неговите метаболити, метод на първи избор се явява високоефективната течна хроматография, предшествана от подходяща процедура за пробоподготовка. Предпоставка за това са медико-правните последици, както и изискванията за висока аналитична надеждност на фармако-токсикологичните изпитвания.

В качеството си на антинеопластик CAP следва да бъде анализиран и от друга токсикологична гледна точка. В края на XX век става известно, че риск от възникване на лекарство-индуцирани нежелани събития съществува не само при раково болните пациенти, но и при здравите индивиди, изложени на хронична цитостатична експозиция. Най-често това става в професионална среда, при ежедневен съприкосновение с антинеопластици (от момента на тяхното производство до изхвърлянето им като отпадъци). Данните сочат, че числеността на работниците в риск от цитотоксично въздействие надвишава 5.5 милиона, а предвид прогнозната употреба на цитостатици, се очаква броят им да нарастне.

С повишаване на осведомеността относно токсичните ефекти на антинеопластите, през последните години, специалисти от областта на онкологията, фармацията и професионалното здраве публикуват множество ръководства, касаещи безопасността на хората в професионални условия. Всички тези документи препоръчват комбинации от мерки, свеждащи до минимум контактът на лекарството с организма. Въпреки полагането на ежедневни усилия в тази насока, все още експозицията на здрави индивиди с цитотоксични лекарства е често наблюдавано явление. В резултат са докладвани остри и хронични усложнения, припокриващи се с токсичния профил на съответния антинеопластик. Поради тази причина в официалните ръководства се препоръчва провеждането на системен мониторинг на повърхностното натоварване с цитостатици в работната среда. От друга страна, към днешна дата няма докладвани проучвания, касаещи хроничната експозицията на САР в професионални условия. Предвид това, е важно да бъдат разработени надеждни аналитични методи, на база които да се определят нивата на пролекарствено замърсяване в работната среда. Изготвянето на подобни протоколи за работа е от критично значение за последващата оптимизация на мерките за безопасност в работните звена. В този смисъл, течната хроматография може успешно да послужи за определянето на професионалната експозиция на цитостатици, в това число и на САР.

Още един важен аспект на течнохроматографския анализ е възможността за установяване на качествения и количествения състав на активните вещества в готови лекарствени форми. Той се прилага в рутинните контролнокачествени изпитвания, които днес са от особено значение, предвид докладваното увеличаване на лекарствените продукти с установен фалшив произход. Според европейските здравни власти, най-често се касае за изделия, съдържащи съставки, с по-ниско от стандартното качество, с грешно дозирани вещества или такива, при които активното вещество категорично липсва. Ето защо разработването на течнохроматографска методика за качествено и количествено определяне на САР в лекарствени форми е повече от необходимо средство за гарантиране безопасността на пациентите, в духа на водената към днешна дата в цял свят борба с фалшивите лекарства.

Дисертационният труд има научно-приложен характер. Включва изследвания относно проблеми, касаещи както приема,

така и работата с фуоропиримидиновия карбамат CAP. Актуалността ѝ се определя от значителния ръст в употребата на пролекарството и непрестанно увеличаващата се ракова заболяемост. Анализирани в детайли са съобщените в научната литература течнoхроматографски методи за качествено и количествено определяне на CAP. Предложени са нови подходи за анализ на CAP, съобразени със съвременните световни здравни норми и потребности. Представените тук течнoхроматографски методи следва да намерят приложение при:

- ❖ проучването на нови терапевтични подходи в антинеопластичната терапия с CAP;
- ❖ мониторинга на професионалната експозицията с цитостатика;
- ❖ определяне съдържанието на CAP в таблетни лекарствени форми.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Изводите от направения литературен обзор разкриват необходимостта от въвеждане на специализирани методи за анализ на САР, които да послужат при последващи фармако-токсикологични и/или качественоконтролни проучвания, касаещи по-безопасния прием и работа с цитостатика. Това ни дава основание да дефинираме целта и основните задачи в настоящата работа.

1. Цел на изследването

Цел на предствения дисертационен труд е да се разработят течнохроматографски методи за:

- ❖ Анализ на САР и неговия първи метаболит (5-DFCR) в плазмени проби от експериментални животни;
- ❖ Проследяване повърхностното замърсяване с цитотоксичния агент САР в професионални условия;
- ❖ Качествено и количествено определяне на САР в таблетни лекарствени форми.

2. Задачи

Във връзка с постигането на поставената цел, се предвижда да бъдат изпълнени следните задачи:

1. Разработване на селективен течнохроматографски метод за определяне на САР и неговия метаболит 5-DFCR в състава на плазмени проби от експериментални животни:
 - ❖ Разработване на екологосъобразен протокол за обработване на биологични проби, във вид пригоден за осъществяването на течнохроматографски анализ;
 - ❖ Разработване и оптимизиране на обратнофазов HPLC метод за качествено и количествено определяне на САР и 5-DFCR в състава на плазмени проби от експериментални животни;
 - ❖ Определяне на аналитичната надеждност на течнохроматографския метод – линеен обхват, минимална граница на качествено и количествено определяне на целевите аналити, специфичност, точност и възпроизводимост, други валидационни параметри определящи надеждността на системата за анализ;

- ❖ Апробиране на течнохроматографския метод – анализ на плазмени проби при експериментални животни, третирани с САР.
2. Разработване на селективен течнохроматографски метод за определяне професионалната експозиция с САР:
- ❖ Дефиниране на най-вероятния начин за излагане на организма на антинеопластично въздействие в работната среда;
 - ❖ Маркиране на потенциално рисковите зони в работната среда;
 - ❖ Разработване на екологосъобразен протокол за пробонабиране на смивни проби от работни повърхности;
 - ❖ Адаптиране и оптимизиране на обратнофазов HPLC метод за качествено и количествено определяне на САР в състава на смивни проби от работната среда;
 - ❖ Определяне на аналитичната надеждност на течнохроматографския метод – линеен обхват, минимална граница на качествено и количествено определяне на целевия аналит, специфичност, точност и възпроизводимост, други валидационни параметри определящи надеждността на системата за анализ;
 - ❖ Апробиране на течнохроматографския метод – анализ на смивни проби от потенциално рисковите зони в работната среда;
 - ❖ Картографиране на рисковите зони на база резултатите от разработения течнохроматографски метод.
3. Разработване на селективен течнохроматографски метод за определяне на качествено и количествено съдържание на САР в състава на таблетни лекарствени форми:
- ❖ Разработване на ефективен протокол за извличане на САР от таблетни лекарствени форми;
 - ❖ Определяне на аналитичната надеждност на течнохроматографския метод — линеен обхват, минимална граница на качествено и количествено определяне на целевия аналит, специфичност, точност и възпроизводимост, други валидационни параметри определящи надеждността на системата за анализ;
 - ❖ Апробиране на течнохроматографския метод – анализ на съдържанието на течни екстракти от таблетни лекарствени форми, съдържащи САР.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Използвани реактиви

Сареситабин (99.5 %, Certified Reference Material, Sigma-Aldrich, USA); Сареситабин Accord® (филмирани таблетки от 500 mg, Accord Healthcare Limited, UK); 5'-деоху-5'-флуороцитидин (95.0 %, Fluorochem Ltd., UK); Мравчена киселина (99.0 – 100.0 %, HPLC grade, Chem-Lab, Belgium); Метанол (≥ 99.8 %, HPLC grade, Fisher Chemicals, UK); Етанол, абсолютен (99.99 %, HPLC grade, Fisher Chemicals, UK); Пропан-1-ол (≥ 99.5 %, HPLC grade, Fisher Chemicals, UK); Пропан-2-ол (≥ 99.8 %, HPLC grade, Fisher Chemicals, UK); Цинков сулфат монохидрат (99.0 %, Acros organics, Belgium); Би-дестилирана вода (получена в лабораторни условия);

Физиологичен разтвор (0.9 % 500 mL, B. Braun Melsungen AG, Germany); Сух лед (NOKOV&SON, Bulgaria); Лактоза монохидрат (extra pure, Fisher Scientific, UK); Микрокристална целулоза (Valerus, Bulgaria); Талк, фармакопееен (Chimtex, Bulgaria); Магнезиев стеарат, фармакопееен (Fisher Scientific, UK).

1.2. Използвани лабораторни и медицински консумативи

- ❖ Сириндж филтри Minisart® NY25 (0.2 μm , d = 25.0 mm, Sartorius™, Germany);
- ❖ Филтри Nylone white membranes (0.45 μm , d = 47.0 mm, filtraTECH, France);
- ❖ Филтърна хартия Blue Ribbon (d = 55.0 mm, Chimtex Ltd., Bulgaria);
- ❖ Вакутейнери с EDTA.K₃ (Cat.№ 630903, Boen Healthcare Co., Ltd.) и хепаринизирани вакутейнери (Lithium Heparin, BD 367883, Thermo Scientific™, USA);
- ❖ Виалки (кафяво стъкло, 2 mL, ND 8 mm, Thermo Scientific™, USA);
- ❖ Инсърти (200 μL , 02-NV, Thermo Scientific™, USA);
- ❖ Перорална канюла (20G, 1.9 mm x 38 mm, Socorex Isba SA®, Switzerland).

1.3. Използвана апаратура

- ❖ Аналитична везна Ohaus Explorer Analytical – със софтуер SmarText™ 2.0 (USA);

- ❖ Дестилатор Gesellschaft für labortechnik mbH (Germany);
- ❖ Ултразвукова вана Advantage-Lab Model: AL 04-06 (Belgium);
- ❖ Вортекс-миксер ZX3 Advanced (Italy);
- ❖ Настолна мултифункциона центрофуга Ohaus Frontier FC5706 (USA);
- ❖ Концентрационна системата Stuart SBHCONC/1, снабдена с нагряващ блок Stuart SBH130D/3 (UK);
- ❖ За разработването на HPLC метод са използвани високоефективна течностно-хроматографска система Thermo Scientific UltiMate 3000 Analytical LC System (USA), снабдена с кватернерна помпа (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 LPG-3400SD Quaternary Pump, USA), автоматичен инжектор (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Autosampler, USA), вариабилен UV/VIS детектор (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 VWD-3100 Variable Wavelength Detector/VWD, USA) и детектор на диодна матрица (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 DAD-3000 Diode Array Detectors, USA);
- ❖ Системният контрол, събирането и анализа на данните са извършени с помощта на Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System software.

1.4. Експериментални животни

Проведени са опити с 48 броя мъжки Icr Albino мишки (на възраст 7-9 седмици, с тегло 25-30 g), предоставени от Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей при Българска академия на науките. Животните са отглеждани в пластмасови клетки, по шест мишки във всяка. Извършено е климатизиране в продължение на една седмица, при условия на контролирана температура (20 ± 2 ° C), влажност (55 ± 10 %) и осветление (от 7:00 до 19:00). В процеса на експериментална работа мишките са настанени при специфични и свободни от патогени условия на живот, при неограничен достъп до храна и вода.

Процедурите по третиране на животните и провеждането на експериментите са извършени в съответствие с националните закони (Наредба № 20 от 01.11.2012 г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им, в сила от 01.01.2013 г., издадена от Министерство на Земеделието и храните, Обн. ДВ бр. 87 от 09.11.2012г.) и международните

изисквания (ЕЕС Directive 86/609 от 1986 г.), съобразно Институционално ръководство № РД-09-27/21.05.2019 г. за експерименти с животни на Институтът по експериментална морфология, патология и антропология с музей при Българска академия на науките и разрешение на Българската агенция по безопасност на храните № 96. Животните са разделени на групи (по шест във всяка), както следва:

❖ *Изпитвания, касаещи избора на подходящ преципитиращ агент:*

I група – контролна група (сондирана с 0.25 mL физиологичен разтвор), чиято плазма е отделена с помощта на вакутейнери, съдържащи EDTA.K₃;

- събраният плазмен материал е разделен на 18 броя проби, всяка с обем 100 µL;
- полученият набор от проби е разделен на 3 подгрупи и е използван за приготвяне на празни проби;
- всяка подгрупа образци подлежи на последваща протеинна преципитация съответно с етанол, пропан-1-ол или пропан-2-ол;

II група – група (сондирана с 0.25 mL физиологичен разтвор), чиято плазма е отделена с помощта на вакутейнери, съдържащи EDTA.K₃;

- събраният плазмен материал е разделен на 18 броя проби, всяка с обем 100 µL;
- полученият набор от проби е разделен на 3 подгрупи;
- към всяка подгрупа е прибавено такова количество от работните стандартни разтвори на CAP и 5-DFCR, че да се получат плазмени образци с крайна концентрация съответно 1.0, 3.0 или 5.0 µg/mL (за двата анализа);
- получените проби се подлагат на протеинна преципитация с абсолютен етанол;

III група – група (сондирана с 0.25 mL физиологичен разтвор), чиято плазма е отделена с помощта на вакутейнери, съдържащи EDTA.K₃;

- събраният плазмен материал е разделен на 18 броя проби, всяка с обем 100 µL;
- полученият набор от проби е разделен на 3 подгрупи;

- към всяка подгрупа е прибавено такова количество от работните стандартни разтвори на CAP и 5-DFCR, че да се получат плазмени образци с крайна концентрация съответно 1.0, 3.0 или 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (за двата анализа)
- получените проби се подлагат на протеинна преципитация с пропан-1-ол;

IV група – група (сондирана с 0.25 mL физиологичен разтвор), чиято плазма е отделена с помощта на вакутейнери, съдържащи EDTA.K₃;

- събраният плазмен материал е разделен на 18 броя проби, всяка с обем 100 μL ;
- полученият набор от проби е разделен на 3 подгрупи;
- към всяка подгрупа е прибавено такова количество от работните стандартни разтвори на CAP и 5-DFCR, че да се получат плазмени образци с крайна концентрация съответно 1.0, 3.0 или 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (за двата анализа)
- получените проби се подлагат на протеинна преципитация с пропан-2-ол.

❖ *Изпитвания, определящи влиянието на антикоагуланта върху аналитичния добив на CAP и 5-DFCR:*

I група – контролна група, сондирана с 0.25 mL физиологичен разтвор;

- групата е разделена на две подгрупи – плазмата на първата подгрупа е отделена с помощта на вакутейнер, съдържащ EDTA.K₃, а на втората - с хепаринизиран вакутейнер;
- получените проби се подлагат на протеинна преципитация с етанол;

II група – тестова група, сондирана с 0.25 mL от разтвор на CAP с концентрация 370.0 mg/kg;

- групата е разделена на две подгрупи – плазмата на първата подгрупа е отделена с помощта на вакутейнер, съдържащ EDTA.K₃, а на втората - с хепаринизиран вакутейнер;
- получените проби се подлагат на протеинна преципитация с етанол.

❖ *Апробацията на течнoхроматографския метод за качествено и количествено определяне на CAP и 5-DFCR в състава на плазмени проби от експериментални животни, третирани с пролекарството (370 mg/kg, т. м.):*

I група – контролна група, сондирана с 0.25 mL физиологичен разтвор;

- плазменият материал е отделен с помощта на вакутейнер, съдържащ EDTA.K₃;
- получените проби се подлагат на протеинна преципитация с етанол;

II група – тестова група, сондирана с 0.25 mL от разтвор на CAP с концентрация 370.0 mg/kg;

- плазменият материал е отделен с помощта на вакутейнер, съдържащ EDTA.K₃;
- получените проби се подлагат на протеинна преципитация с етанол.

2. Експериментални методи

2.1. Течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на CAP и 5-DFCR в проби от миша плазма

2.1.1. Преданалитичен етап

2.1.1.1. Приготвяне на изходни стандартни разтвори и работни стандартни разтвори на CAP и 5-DFCR

- ❖ Изходните стандартни разтвори на CAP (1000.0 µg/mL) и 5-DFCR (1000.0 µg/mL) се приготвят чрез разтваряне на 20.0 mg от съответната стандартна субстанция (в насипно състояние) в 20.0 mL филтрувана би-дестилирана вода;
- ❖ Работните разтвори на целевите анализи са приготвени чрез последователно разреждане на съответните изходни стандартни разтвори с би-дестилирана вода до получаване на следните концентрационни нива: 0.05, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 и 50.0 µg/mL. Данните от техния качествен и количествен анализ служат за валидиране на течнохроматографския метод, както и при определяне стабилността на пробите за анализ;
- ❖ Отделно са приготвени сборни работни стандартни разтвори, включващи CAP и 5-DFCR с концентрация 10.0, 6.0 и 2.0 µg/mL, използвани за привнасяне („спайкване“) на анализите към плазмени проби от нетретирани с антинеопластика експериментални животни.

2.1.1.2. Приготвяне на суспензия, съдържаща САР (стандартна субстанция), за третиране на експериментални животни

В процедурите по третиране на експерименталните животни е използвана прясно приготвена работна суспензия на САР. Приложената доза (370.0 mg/kg, телесна маса (т. м.) е определена чрез формулата за изчисляване на човешка еквивалентна доза спрямо телесната повърхност при съответния експериментален биологичен вид:

$$\text{ЧЕД (mg/kg)} = \text{ДПЕЖ (mg/kg)} \frac{K_{m(\text{Ж})}}{K_{m(\text{Ч})}}$$

където:

ЧЕД – човешка еквивалентна доза

ДПЕЖ – доза, приложена на експерименталното животно

$K_{m(\text{М})}$ – 3 (фактор за преобразуване на доза от mg/kg в mg/m² при мишки)

$K_{m(\text{Ч})}$ – 37 (фактор за преобразуване на доза от mg/kg в mg/m² при човек)

Суспензията е приготвена чрез диспергиране на 74.0 mg САР (стандартна субстанция) в 2.0 mL прясно приготвена и филтрувана бидестилирана вода за 5 минути. Непосредствено преди всяко третиране е осъществява процедура по ресуспендиране на вортекс миксер (при 5000 rpm в продължение на 20.0 секунди).

2.1.1.3. Третиране на експерименталните животни

При третиране на лабораторните животни (със суспензията, съдържаща САР) е избран орален път на въвеждане, чрез еднократно сондиране. Целта е да се реализира експериментален модел, който да се доближава максимално до начина на прием на антинеопластика при онкологично болни пациенти. Паралелно с това е дефиниран допустимият обем (0.25 mL) за прилагане на суспензията на САР и физиологичния разтвор, изхождайки от предварително установената средна телесна маса на лабораторните животни.

2.1.1.4. Събиране и пробоподготовка на плазмени проби от експериментални животни

- ❖ Кръвните проби от всяко опитно животно се взимат 30.0 минути след осъществяване на орално сондиране със суспензия на САР или физиологичен разтвор. Те се събират поотделно във

вакутейнери с антикоагулант EDTA.K₃, предназначени за отделяне на плазма. Единствено в изпитванията, касаещи избора на подходящ антикоагулант е предвидена допълнителна употреба на хепаринизирани вакутейнери.

- ❖ Пробите се центрофугират (при 6000 грм, за 5 минути при стайна температура), като плазмената фракция се отделя и се замразява незабавно (при приблизително - 80 °C). Веднага след това всички образци се транспортират до течнoхроматографската лаборатория, в предвиден за целта криосъд със сух лед;
- ❖ Преди провеждане на HPLC анализа, получените плазмени проби се оставят да се размразят напълно при стайна температура. След това те се хомогенизират с помощта на вортекс-миксер (5000 грм за 2.0 минути);
- ❖ Аликвотни части от 100.0 µL плазма се поставят в стерилни стъклени епруветки (с обем 10.0 mL) с полипропиленова винтова капачка. Единствено към тестовите проби, предвидени за изпитване на подходящ преципитиращ агент се осъществява привнасяне на стандартен разтвор на CAP и 5-DFCR (с цел получаване на образци с крайна концентрация 1.0, 3.0 или 5.0 µg/mL);
- ❖ Към всяка епруветка се добавят по 30.0 µL 1% мравчена киселина и 100.0 µL 3% воден разтвор на цинков сулфат монохидрат. Пробите се хомогенизират с помощта на вортекс-миксер при 5000 грм за 2.0 минути;
- ❖ Към получените хомогенати се добавят по 800.0 µL протеинно-преципитиращ разтворител (етанол) и отново се хомогенизират на вортекс-миксер (при същите условия). Единствено в изпитванията, касаещи избора на подходящ преципитиращ агент е предвидена алтернативна употреба на пропан-1-ол или пропан-2-ол, вместо етилов алкохол;
- ❖ Получената суспензия се подлага на центрофугиране (при 6000 грм за 5 минути), за да се получи отделяне на чистия супернатант от образувалите се белтъчни коагулати. Течните фракции се отбират старателно с помощта на автоматична пипета, като се прехвърлят в нови стъклени епруветки с идентичен капацитет;
- ❖ Твърдият остатък се суспендира отново с 300.0 µL преципитирация агент, с последващо хомогенизиране и

центрифугиране при същите условия. Полученият супернатант се комбинира с първия, като след това се изпарява до сухо с помощта на апарат за концентриране на проби, при лек поток от азот (при 40 °C) (Схема 1);

- ❖ Всички сухи остатъци се възстановяват в 200.0 µL би-дестилирана вода и се хомогенизират на вортекс-миксер (при 5000 rpm за 2.0 минути). След това пробите се центрофугират при 6000 rpm в продължение на 5.0 минути. Получените бистри водни фракции се прехвърлят в инсърти (200 µL, 02-NV, Thermo Scientific™), като аутосемплерът на системата за анализ се програмира да инжектира по 20.0 µL от всяка една от тях в хроматографската колона.

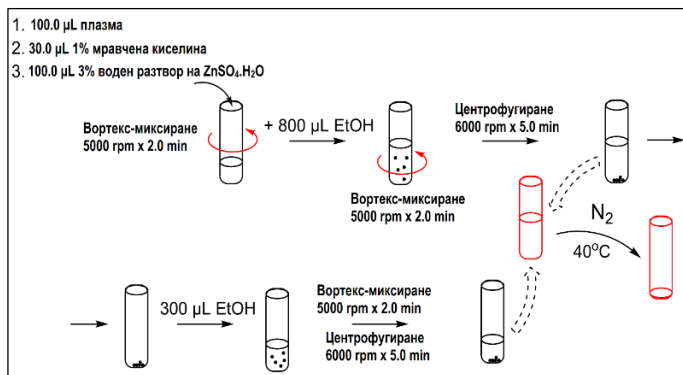


Схема 1. Подготовка на биологичните проби за HPLC анализ

2.1.2. Аналитичен етап

2.1.2.1. Хроматографски условия

Хроматографският анализ е проведен с помощта на мобилна фаза със състав: би-дестилирана вода, метанол и 1.0% мравчена киселина. Разделянето на целевите анализи е извършено с помощта на хроматографска колона Hypersil GOLD aQ C₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 µm, Thermo Scientific™, USA), защитена с предколона Hypersil GOLD aQ C₁₈ (10 mm x 4.0 mm, 5 µm, Thermo Scientific™, USA). Анализът е осъществен в градиентен режим и е с общо времетраене от 30.0 минути (Таблица 1).

Таблица 1. Градиентен режим на течнохроматографския анализ

Време (min)	Скорост на потока (mL/min)	А % (Метанол)	В % (1 % Мравчена киселина)	С % (би-дестилирана вода)
0.00	0.8	0	10	90
20.0	0.8	70	10	20
30.0	0.8	0	10	90

Хроматографските колона и предколона се термостатират при 30 °С, а аутосемплерът при 10 °С. Обемът на инжектиране е 20.0 µL. Елуентите се наблюдават с помощта на UV/VIS-детектор и фотодиоден детектор с дължина на вълната от 280 nm за 5-DFCR и 306 nm за CAP.

2.1.2.2. Качествено и количествено определяне на CAP и 5-DFCR

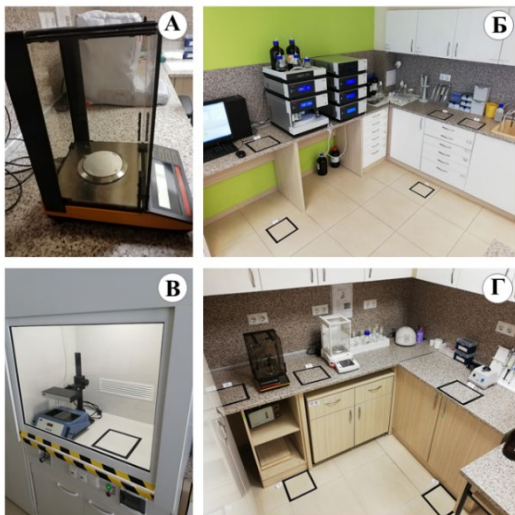
Идентификацията на CAP и 5-DFCR се провежда по UV-спектъра и времето на задържане на веществата от хроматограмите на стандартните разтвори. Количественият анализ се извършва по метода на абсолютната калибровка. Калибровъчните криви се построяват на базата съотношението площ/височина на пика от хроматограмата на стандартните серии.

2.2. Течнохроматографски метод за количествено определяне на професионалната експозиция с CAP

2.2.1. Преданалитичен етап

2.2.1.1. Определяне на зони и материал за пробонабиране

Определени са работните участъци, при които рискът от настъпване на евентуален дермален контакт с CAP е най-висок. Избраните зони за изследване са локализиращи в течнохроматографска лаборатория, както и свързаната с нея пробоподготвителна стая (Фигура 1).



Фигура 1. Изследвани повърхности: А) Блюдо на аналитична везна; Б) Работни плотове и подова настилка в течнохроматографска лаборатория; В) Работна повърхност на химическа камина; Г) Работни плотове и подова настилка в пробоподготвителна стая

Маркирани са 12 броя участъци, всеки с площ $20 \times 20 \text{ cm}^2$. Изключение прави, намиращото се в аналитичната везна блюдо, чиято площ се изчислява по формулата:

$$S = \pi r^2$$

където:

S – площ на кръга

π – Лудолфово число

r – радиуса на изследваната повърхност

Сумата от всички изследвани повърхности възлиза на около 5% от общата работна площ на двете помещения. Таблица 2 представя в синтезиран вид характеристиките на изследваните участъци.

Таблица 2. Характеристика на обектите за анализ

Обект за изследване	Материал	Обща площ	Тип повърхност
Плот на химическа камина	Керамика	400 cm ²	Гладка
Блюдо на аналитична везна	Неръждаема стомана	63.6 cm ²	Гладка
Работни плотове в течнохроматографска лаборатория и в пробоподготвителна стая (6 участъка)	Формалдехидни смоли	2400 cm ²	Неравна
Под в течнохроматографска лаборатория и в пробоподготвителна стая (4 участъка)	Керамика	1600 cm ²	Неравна

Подобно на други литературни източници, при набиране на пробите се използва целулозна филтърна хартия. За да се гарантира хомогенност по отношение на абсорбцията и десорбцията на целевия аналит са определени средното тегло на избрания консуматив, както и влиянието му върху аналитичния добив.

2.2.1.2. Приготвяне на изходен стандартен разтвор, работни стандартни разтвори и проби за качествен контрол

- ❖ На аналитична везна, в мерителна колба с обем 20.0 mL се претеглят 20.0 mg стандартна субстанция CAP. Последва разтваряне в прясно приготвена и предварително филтрувана би-дестилирана вода до получаването на изходен стандартен разтвор с концентрация 1.0 mg/mL;
- ❖ Работните стандартни разтвори се приготвят чрез серийно разреждане на изходния стандартен разтвор в би-дестилирана вода, за да се получат проби с крайна концентрация съответно 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 и 20.0 µg/mL. Приготвените разтвори се подлагат на шест-кратен течнохроматографски анализ, като получените резултати служат за определяне на аналитичния добив на контролните проби;
- ❖ Отделни работни разтвори (с концентрация 10.0, 100.0, 500.0, 1000.0, 1500.0 и 2000.0 µg/mL) са изготвени за последващо

приготвяне на проби със строго дефинирани привнесени количества от САР (стандартна субстанция);

- ❖ За да се оцени стабилността на пробите при нормални условия, в процеса на съхранение и при престояване в аутосемплера, са изготвени качествено- контролни проби при най-ниското и най-високото концентрационно ниво (0.1 и 20.0 µg/mL) на анализа.

2.2.1.3. Избор на десорбционен разтворител

Като десорбционен разтворител е използвана предварително филтрувана прясно приготвена би-дестилирана вода. Освен евтин и екологосъобразен, разтворителят осигурява отлични стойности на аналитичния добив, независимо от вида изследвана повърхност, при това без да нарушава интегритета на целулозния филтър.

2.2.1.4. Приготвяне на празни проби

Шест броя празни (бланкови) проби се приготвят, за да се установи наличието на съпътстващи компоненти, произхождащи от използваната филтърна хартия. За целта в празна стъклена банка с вместимост 250.0 mL се поставя чист (неупотребяван) филтър. Доливат се 50.0 mL вода, след което съдът се подлага на вортекс-миксиране за 2.0 минути, при 5000 rpm. Сместа се филтрува с помощта на сиридж филтър, като 20.0 µL от нея се инжектират в хроматографската колона.

2.2.1.5. Контролни проби

- ❖ Възстановяването на САР след десорбция от филтърната хартия се оценява чрез количествен анализ на серия от контролни проби, покриващи работния диапазон. За да се получат проби с крайна концентрация 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 и 20.0 µg/mL върху отделни филтри се нанасят 0.5 mL от стандартен разтвор на пролекарството с концентрация съответно 10.0, 100.0, 500.0, 1000.0, 1500.0 и 2000.0 µg/mL;
- ❖ Независимо един от друг, листите се поставят в празни стъклени банки с вместимост 250.0 mL. В съдовете се доливат по 49.50 mL би-дестилирана вода, след което се подлагат на вортекс-миксиране за 2.0 минути, при 5000 rpm;
- ❖ Получените разтвори се филтруват с помощта на сиридж филтър, след което се подлагат на HPLC/UV анализ. На база получените резултати се построява калибровъчна крива и се

определя аналитичният добив при спайкнатите и тестовите проби.

2.2.1.6. Приготвяне на проби с привнасяне на строго дефинирани количества САР

- ❖ Подбират се повърхности, изработени от идентичен материал на изследваните участъци, при които следва да не се наблюдава замърсяване с САР. Върху всеки сектор (с площ $20 \times 20 \text{ cm}^2$) се нанася определено количество от стандартната субстанция, така че да се покрият всички концентрационни нива. Единствено при изследване замърсяването на аналитичната везна се изготвят спайквани проби от една и съща повърхност, при своевременно прецизно почистване на блюдото;
- ❖ Стандартните разтвори се нанасят върху изследваните повърхности, като се изчаква петната засъхнат напълно (за 4 часа, при $25 \text{ }^\circ\text{C}$);
- ❖ За осъществяване на пробонабирането, листите филтърната хартия се омокрят с 0.5 mL би-дестилирана вода, така че да се навлажни около 80% от повърхността. Селектираните участъци се забърсват внимателно, следвайки стъпките, изобразени на Фигура 2. След всяко забърсване филтърът се прегъва наполовина, така че използваната страна на листа да остане отвътре. Използваният филтър се поставя в празна стъклена банка с вместимост 250.0 mL . Действието се повтаря с втора филтърна хартия, която се прибавя в същия съд;



Фигура 2. Набиране на смивни образци с помощта на филтърна хартия

- ❖ Към двата филтъра се доливат 49.0 mL би-дестилирана вода. Пробите се подлагат на вортекс-миксиране за 2.0 минути, при 5000 rpm ;

- ❖ Получените разтвори се филтрират с помощта на сириндж филтър и се подлагат на HPLC/UV анализ. Чрез получените резултати се определя възстановяването на анализа в зависимост от типа повърхност (материал и гладкост).

2.2.1.7. Пробонабиране от целеви повърхности (процес на апробация)

Маркираните повърхности се забърсват внимателно с помощта на предварително омокрена филтърна хартия, следвайки стъпките, посочени в точка 2.2.1.6 и изобразени на Фигура 3. Резултатите от HPLC/UV анализа на тестовите проби служат за количествено определяне на CAP върху участъците, оценени като най-рискови за осъществяване на евентуален дермален контакт с пролекарството в процеса на ежедневна научноекспериментална работа.

2.2.2. Аналитичен етап

2.2.2.1. Хроматографски условия

За осъществяване на течнохроматографския анализ на CAP в смивни проби е адаптирана методиката, описана в точка 2.1.2.

2.2.2.2. Качествено и количествено определяне на CAP в състава на смивни проби

Идентификацията на CAP се провежда по UV-спектъра и времето на задържане на анализа от хроматограмите на стандартните разтвори. Количественият анализ се извършва по метода на абсолютната калибровка. Калибровъчната крива се построява на базата съотношението площ/височина на пика от хроматограмата на стандартните серии.

2.3. Течнохроматографски метод за определяне на качествено и количествено съдържание на CAP в състава на таблетни лекарствени форми

2.3.1 Преданалитичен етап

2.3.1.1. Приготвяне на стандартни разтвори на CAP

- ❖ На аналитична везна се претеглят 25.0 mg от сертифицирана стандартна субстанция на CAP. Прехвърлят се в мерителна колба с обем 25.0 mL, в която предварително са поставени 10.0 mL метанол. Обемът на колбата се допълва до марката със

същия разтворител. Полученият основен разтвор е с концентрация 1.0 mg/mL;

- ❖ Чрез серийно разреждане се приготвят работни стандартни разтвори с концентрация: 0.5, 1.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0, 350.0, 400.0, 450.0 и 500.0 µg/mL;
- ❖ За всеки работен разтвор са проведени по шест независими хроматографски анализа, като получените данни служат за валидиране на течнoхроматографския метод, както и при определяне стабилността на пробите.

2.3.1.2. Приготвяне на тестови проби от таблетна лекарствена форма

- ❖ Таблетен прах, еквивалентен на 50.0 mg CAP, се претегля в бехерова чаша, добавят се 15.0 mL метанол и се обработва с ултразвук в продължение на 10.0 минути;
- ❖ Образувалата се суспензия се филтрува през филтърна хартия в 50-милилитрова мерителна колба. Остатъкът се промива с 3 порции от 10.0 mL разтворител;
- ❖ Обемът на колбата се допълва до марката с метанол за получаването на разтвор с концентрация 1.0 mg/mL.
- ❖ От основния разтвор, чрез подходящи разреждания, се приготвят тестовите проби, съответстващи на следните концентрационни нива: 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0 и 150.0 µg/mL.

2.3.1.3. Приготвяне на празни („плацебо“) проби

- ❖ На аналитична везна се претеглят по 25.0 mg безводна лактоза, микрокристална целулоза, пречистен талк и магнезиев стеарат. Прехвърлят се в мерителна колба с обем 25.0 mL, в която предварително са поставени 10.0 mL метанол. Обемът на колбата се допълва до марката със същия разтворител;
- ❖ Получената суспензия съдържа четирите помощни вещества, всяко с концентрация от 1.0 mg/mL. От нея, след филтруване, се приготвят работни разтвори съответстващи на концентрационни нива от 1.0, 10.0 и 100.0 µg/mL;
- ❖ За всеки работен разтвор са проведени по шест независими хроматографски анализа. Получените хроматограми са

използвани при изготвяне оценка на валидационния параметър специфичност.

2.3.2. Аналитичен етап

2.3.2.1. Хроматографски условия

Хроматографският анализ количествено определяне на САР в състава на таблетни лекарствени форми представлява модификация на описаната в точка 2.1.2. методика. Използвана е аналитична колона Thermo scientific AQUASIL C₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 µm), защитена с пред-колона AQUASIL C₁₈ (10 mm x 4.6 mm, 5 µm). Температурата на колоната е 30 °С, а тази на автоматичния инжектор – 10 °С. Скоростта на подаване на подвижната фаза е 0.9 mL/min, а времето на задържане на САР при тези условия е 12.7 min. Обемът на инжектиране е 10.0 µL. UV-детекцията на САР е извършена при 306 nm. Анализът е осъществен в градиентен режим с общо времетраене 15.0 минути (Таблица 3).

Таблица 3. Градиентен режим на работа на метода

Време (min)	Скорост на потока (ml/min)	А % (вода)	В % (метанол)	С % (1% мравчена киселина)
00.00	0.9	80	10	10
10.00	0.9	20	70	10
15.00	0.9	80	10	10

2.3.2.2. Качествено и количествено определяне на САР в таблетни състави

Идентификацията на САР се провежда по UV-спектъра и времето на задържане на анализа от хроматограмите на стандартните разтвори. Количественият анализ се извършва по метода на абсолютната калибровка. Калибровъчната крива се построява на базата съотношение площ/височина на пика от хроматограмата на стандартните серии.

2.4. Валидационни методи, доказващи аналитичната надеждност на получените резултати

Надеждността на разработените течнохроматографски методи се осъществява съгласно критериите, предложени от ръководството на Международната конференция по хармонизация (International

conference on harmonization, ICH), както и в съответствие с принципите на Добра лабораторна практика (Good laboratory practice, GLP). В допълнение, надеждността на резултатите при анализа на биологични проби е доказана чрез определяне на валидационните параметри, посочени в Ръководството за валидиране на биоаналитични методи на Европейската агенция по лекарствата (ЕМА). Във връзка с това са определени следните параметри:

❖ **Линейност**

Предложените в настоящата работа течнохроматографски методи имат различно предназначение. Поради тази причина за оценка на линейността, респективно за построяване на калибрационните криви, е реализиран шесткратен анализ при следните концентрационни нива (Таблица 4):

Таблица 4. Концентрационен диапазон на линейния обхват в разработените HPLC методи

HPLC метод	Концентрационни нива на САР при определяне на показателя линейност	Концентрационни нива на 5-DFCR при определяне на показателя линейност
HPLC метод за определяне на САР и 5-DFCR в състава на биологични проби	0.05, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 и 50.0 $\mu\text{g/mL}$	0.05, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 и 50.0 $\mu\text{g/mL}$
HPLC метод за количествено определяне на професионалната експозиция с САР	0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 и 20.0 $\mu\text{g/mL}$	-
HPLC метод за определяне съдържанието на САР в състава на таблетни лекарствени форми	0.5, 1.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0, 350.0, 400.0, 450.0 и 500.0 $\mu\text{g/mL}$	-

Линейността е оценена чрез уравнението на стандартната права ($y = ax + b$) и корелационния коефициент (R^2).

❖ Граница на детектиране и граница на количествено определяне

Границите на детектиране и на количествено определяне са изчислени на база съотношението сигнал/шум (S/N) при анализа на серия образци, получени чрез последователно разреждане на стандартни проби в ниския концентрационен диапазон на анализа/ите.

Съобразно ръководството на ICH Topic Q2(R1), за граница на детектиране (LOD) е приета концентрацията на анализа/ите, при която съотношението $S/N \geq 3$, а границата на количествено определяне (LOQ) – при която съотношението $S/N \geq 10$. В случая на биоаналитичното определяне на CAP и 5-DFCR е определена стойността на долната граница на количествено определяне (LLOQ), при която $S/N \geq 5$.

❖ Специфичност

Изследвана е способността за недвусмислено определяне на анализа/ите в присъствието на матрични компоненти на пробата. Таблица 5 представя възможните източници на матричен ефект, както и приложените методи за определяне на специфичността при отделните течнохроматографски методи.

Таблица 5. Подходи за определяне показателя специфичност при разработените HPLC методи

HPLC метод	Изследвани източници на матричен ефект	Дизайн на изпитването
HPLC метод за определяне на CAP и 5-DFCR в състава на биологични проби	Плазмени компоненти	Извършен е сравнителен анализ между празни плазмени проби и такива, с привнесени строго дефинирани количества от стандартни субстанции на CAP и 5-DFCR.
HPLC метод за количествено определяне на	Компоненти на филтърния материал	Наличието на компоненти, произхождащи от материала за пробонабиране, е проучено

професионалната експозиция с CAP		чрез анализ на серия празни смивни проби. В допълнение е изследван профила на фоновия шум в зависимост от типа изследвана повърхност. Получените хроматограми са сравнени с тези при анализа на тестови образци с привнесени строго дефинирани количества от стандартна субстанция на CAP.
HPLC метод за определяне съдържанието на CAP в състава на таблетни лекарствени форми	Помощни вещества в състава на лекарствената форма	Извършен е течнхроматографски анализ на „плацебо“ проби, съдържащи безводна лактоза, микрокристална целулоза, пречистен талк и магнезиев стеарат. Резултатите са сравнени с хроматограмите, получени при анализ на тестовите таблетни проби, съдържащи CAP.

❖ Точност

Изследвано е влиянието на системните грешки върху точността на метода в процеса на аналитична работа. Във връзка с това са изчислени отклонението (b) и относителното отклонение в проценти (b [%]), при шесткратен анализ на контролни проби, съдържащи целевите аналити в концентрационния диапазон на съответната калибрационна крива.

❖ Прецизност

Определена е степента на близост на получените в хода на аналитична работа резултати. Оценени са повтаряемостта (последователно шесткратно анализиране на минимум три концентрационни нива, в рамките на деня, при едни и същи аналитични условия, от един оператор) и възпроизводимостта в рамките на лабораторията (последователно шесткратно анализиране на минимум три концентрационни нива, в различни дни). За целта са изчислени стандартното отклонение (SD), и относителното стандартно отклонение (RSD) на контролни проби, съдържащи

целевите аналити в концентрационния диапазон на съответната калибрационна крива.

❖ **Фактор на задържане (k')**

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

където:

k' – фактор на задържане

t_r – време на задържане на анализа

t_o – средното време, необходимо на една молекула от разтворителя да премине през колоната (мъртво време)

❖ **Резолюция (R_s)**

$$R_s = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{t_{w1} + t_{w2}}$$

където:

R_s – резолюция

t_{r2} – време на задържане на анализа

t_{r1} – време на задържане на съседен пик

t_{w2} – ширина на пика на анализа, измерена при базовата линия между допирателните към страните на пика

t_{w1} – ширина на съседен на анализа пик, измерена при базовата линия между допирателните към страните на пика

❖ **Фактор на симетрия (T)**

$$T = \frac{w_{0.05}}{2a_{0.05}}$$

където:

T – Фактор на симетрия

$w_{0.05}$ – ширина на пика, измерена при 5 % от височината

$a_{0.05}$ – полуширина на пика, измерена при 5 % от височината

❖ **Ефективност на колоната (N)**

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{t_w} \right)^2$$

където:

N – ефективност на колоната (брой теоритични тарелки)

t_r – време на задържане на анализа

t_w – ширина на пика, измерена при базовата линия между допирателните към страните на пика

❖ **Селективност (α)**

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

където:

α – селективност

k_2 – фактор на задържане на анализа

k_1 – фактор на задържане на съседен пик

❖ **Стабилност**

Стабилността на приготвените проби е оценена чрез вътрешно лабораторен качествен контрол. За целта се определя концентрацията на целевите анализи в състава на качествено контроли проби при нормални условия (25 °C), в процеса на съхранение (при 4 °C) и при престояване в аутосемплера (10 °C).

3. Статистическа обработка на резултатите

При статистическата обработка на резултатите (изчисляване на SD и регресионен анализ ANOVA) е използван софтуерен пакет Microsoft Excel® 2016

IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на САР и 5-DFCR в проби от миша плазма

Индивидуалните отклонения в експресията на ензима CES са от значение за изявата на антинеопластичен ефект на САР, както и на лекарство-индуцирана ГИ токсичност. В тази връзка, количественият анализ на цитостатика и неговия първи метаболит се явява важен способ за отчитане на вариации в пусковия стадий на пролекарствена активация. От друга страна, разработването на подобен биоаналитичен метод е обвързано с предизвикателства, породени от физикохимичните свойства на целевите аналити, както и от природата на биологичния образец. Ето защо, всеки аспект на аналитичния дизайн следва да бъде оптимизиран и изчерпателно оценен.

1.1. Оптимизиране на пробоподготвителния етап

Изборът на целесъобразен подход за пробоподготовка се счита за критичен етап в съвременния фармако-токсикологичен биомедицински анализ. Той има отношение не само към получаването на надеждни и значими резултати, но и към осъществяването на икономичен и безопасен режим на работа.

В контекста на количествения анализ на САР и/или неговите метаболити, методът на ПП недвусмислено се откроява като най-ефективен подход за приготвяне на биологичните образци. В подкрепа на изложеното твърдение са постигнатите в настоящото проучване резултати.

1.1.1. Процедура по протеинно преципитиране

1.1.1.1. Избор на преципитиращ агент

В рамките на проучването са изследвани три преципитиращи агента - етанол, пропан-1-ол и пропан-2-ол. Посочените алкохоли са добавени отделно към серия празни плазмени проби, с привнесени стандартни субстанции на САР и 5-DFCR. При всички опитни постановки е налице белтъчна преципитация, обусловена от понижаването на диелектричната константа на разтвора и възникващите от това електростатични взаимодействия. Същевременно, алкохолите предизвикват агрегиране и утаяване на неразтворимите компоненти, измествайки водните молекули

около хидрофобните области на протеиновата повърхност. Освен че са ефективни белтъчни утайтели, и трите разтворителя са общодостъпни и сравнително безопасни за употреба. Те са инертни по отношение САР и 5-DFCR, чиято водно-алкохолна разтворимост доказано надвишава протеинно-плазмения им афинитет.

Нарушаването на хидратиращия слой, обграждащ белтъчните молекули, е подпомогнато чрез добавяне на преситен разтвор на цинков сулфат монохидрат и 1% разтвор на мравчена киселина към всяка изследвана проба. Заедно с това, подкиселяването на пробите допълнително способства за освобождаването на целевите анализи от матрицата.

Макроскопският преглед на опитните постановки свидетелства за формирането на плътни протеинови утайки и получаването на бистри супернатанти (Фигура 3).

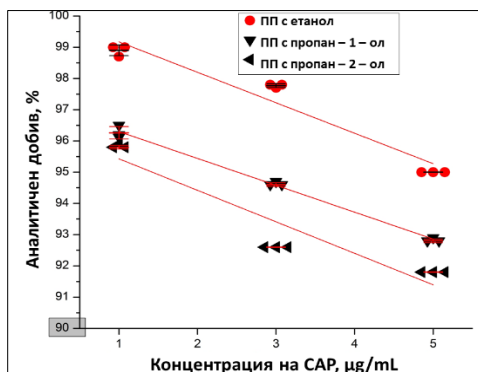


Фигура 3. Плазмени проби след добавяне на преципитиращ агент етанол, пропан-1-ол или пропан-2-ол

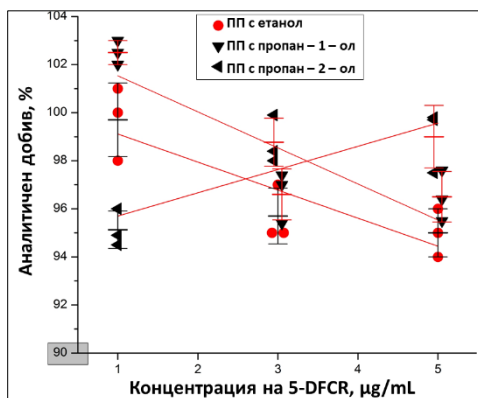
Това предполага постигането на висока чистота на пробите, а също и минимизиране на смущаващите матрични ефекти. По тази причина, като решаващ критерий за избора на преципитиращ агент е взет средният процентен аналитичен добив на САР и 5-DFCR. Във връзка с това е осъществен течнохроматографски анализ на серията образци. За получаването на статистически достоверни резултати са приготвени плазмени проби с концентрация на двата анализа от 1.0, 3.0 и 5.0 $\mu\text{g/mL}$. Посочените стойности са в ниския концентрационен диапазон на работния обхват, където аналитичната грешка следва да бъде най-ясно разграничима. Освен това, избраният интервал попада

в терапевтичния индекс на пролекарството при хора, изхождайки от възможността за провеждане на последващи клинични проучвания.

Резултатите сочат, че при всички концентрационни нива на CAP и 5-DFCR са установени отлични средни нива на процентния аналитичен добив. Независимо от вида на приложения преципитиращ агент, възстановяването на цялата серия плазмени проби надвишава 90 % (Фигура 4, Фигура 5).



Фигура 4. Среден процентен аналитичен добив след протеинно преципитиране с етанол, пропан-1-ол или пропан-2-ол, получен при анализа на CAP

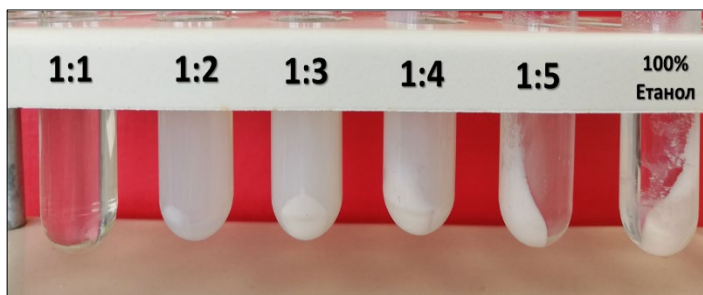


Фигура 5. Среден процентен аналитичен добив след протеинно преципитиране с етанол, пропан-1-ол или пропан-2-ол, получен при анализа на 5-DFCR

Анализът на получените данни показва, че абсолютният етилов алкохол се явява най-удачен преципитиращ агент в условията на настоящото проучване. Приложението му като утаител води до получаването на среден аналитичен добив на пролекарството и неговия метаболит, съответно от 95.4 % и от 96.98 %. Относителното стандартно отклонение при CAP достига до 0.17 %, а това при 5-DFCR - до 1.53 %. Изборът на етанол е подкрепен и от основните принципи на съвременната „зелена“ химия, която насърчава употребата на нетоксични, достъпни и евтини разтворители. Поради тази причина той е подложен на допълнителни изпитвания, касаещи пробоподготвянето на плазмени образци от експериментални животни.

1.1.1.2. Състав на преципитиращата алкохолна смес

След установяване на най-ефективния алкохолен плазмен утаител е изследвана възможността за прилагане на преципитиращ агент, представляващ комбинация от вода и етанол. За целта към серия плазмени проби (с привнесени стандартни субстанции от CAP и 5-DFCR) се добавят поотделно водно-алкохолни смеси в обемно съотношение 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 и 1:5. Фигура 6 представлява макроскопски преглед на получените резултати.



Фигура 6. Сравнителен макроскопски преглед на серия плазмени проби, след добавяне на преципитираща смес от алкохол и вода в различно обемно съотношение или абсолютен етанол

Безспорно, с увеличаване обемната част на алкохола се повишава ефективността на белтъчно-преципитационния процес. Същевременно, преобладаването на водната фракция води до получаване на опалесциращи или мътни супернатанти, сигнализиращи за наличието на прекомерно белтъчно съдържимо.

Рискът от компрометиране на хроматографския анализ, респективно от замърсяване на аналитичната апаратура, е причина за категоричното отхвърляне на прилагането на водно-алкохолни смеси. Допълнителен аргумент в подкрепа на употребата на абсолютен етанол са редица съображения, касаещи спецификата на работата с биологични проби. Използването на водно-алкохолни смеси е свързано с протичане на екзотермична реакция, поставяйки под съмнение резултатите от количествения анализ на склонния да хидролизира САР.

В допълнение е установено, че двукратното извличане на целевите аналити с етанол (първоначално с 800 μL и след това 300 μL) е напълно достатъчно за осигуряването на високи стойности на аналитичния добив, както на САР, така и на 5-DFCR. Поради всички изложени до тук резултати, утаяването с абсолютен етанол е окончателно обособено, като компонент на пробоподготвителния етап в настоящото проучване.

1.1.2. Концентриране на целевите аналити

Концентрирането на етанолните извлеци, съдържащи САР и 5-DFCR се извършва чрез изпаряване под лека струя азот. Основно предимство на процедурата е способността за получаване на серия сухи остатъци на целевите аналити за кратък период от време. Освен това, употребата на инертния газ способства за запазването на пролекарството и неговия метаболит в качествено и количествено отношение.

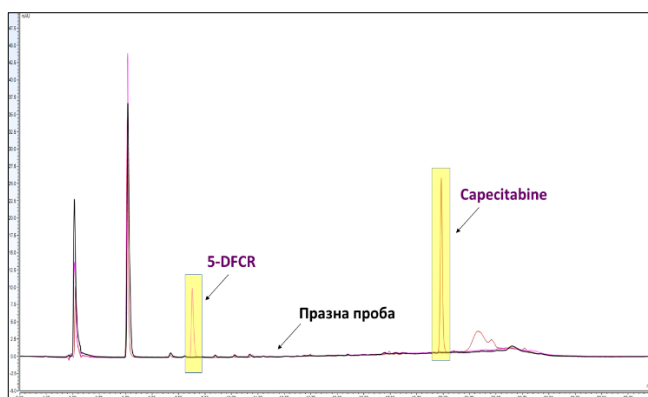
В последствие пробите се привеждат в обем, подходящ за провеждането на количествен анализ, чрез разтваряне в 200 μL бидестилирана вода за течна хроматография. След това 20 μL от всеки получен концентрат се инжектират в течнoхроматографската система за анализ.

1.1.3. Матричен ефект

Често в съвременната аналитична токсикология работата с проби от биологичен произход е съпътствана от проблеми, свързани с матричния ефект на образеца. Свеждането на неговото влияние спрямо точността и прецизността на метода до минимум представлява важна и същевременно трудна задача. Въпреки това тя не може да бъде пренебрегната, тъй като е нужно да бъдат

отхвърлени всички възможности за компрометиране на аналитичните резултати.

На практика методът на ПП не може да осигури тоталното съпътстващите компоненти в плазмената проба (протеини, фосфолипиди и други). Ето защо, от химикотоксикологична гледна точка може да бъде направен компромис единствено, ако се докаже, че наблюдаваните придружаващи вещества не пречат на качествено и количествено определяне на CAP и 5-DFCR. Фигура 7 представлява графичен израз на резултатите от сравнителния анализ на празна плазмена проба и на образци, съдържащи двата целеви анализа.



Фигура 7. Наставени хроматограми на празна проба и образци, съдържащи CAP и 5-DFCR след протеинна преципитация с етанол

В хода на оптимизация на преаналитичния етап са детектирани малко на брой съпътстващи ендогенни вещества. Анализът на пиковите показва, че те имат времена на задържане, различни от тези на пролекарството и неговия първи метаболит, като нито едно от тях не възпрепятства осъществяването на качествен и количествен анализ. Друго доказателство за липсата на смущаващи ефекти са удовлетворителните стойности на точността и прецизността на прилагания метод.

В заключение, постигнатият незначителен матричен ефект след ПП с абсолютен етанол свидетелства за рационалността на

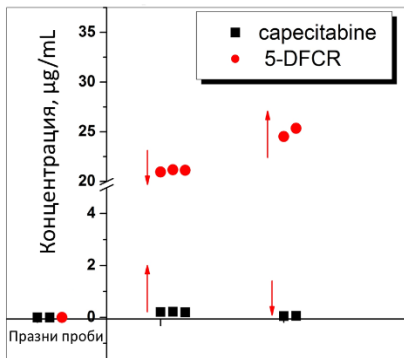
предложения метод за пробоподготовка. Това се потвърждава и чрез получените остри и симетрични хроматографски пикове.

1.1.4. Определяне влиянието на вида антикуагулант в процеса на пробонабиране

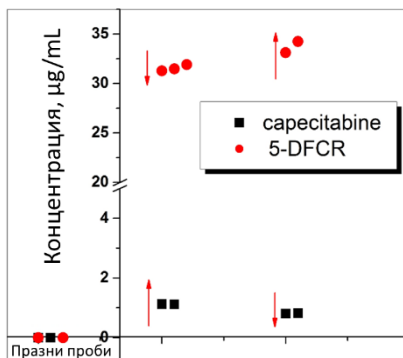
Установено е, че фабрично заложените характеристики, на иначе масово употребяваните вакуейнери, могат да повлияят върху стабилността и възстановяването на целевите аналити. Оказва се, че въпреки зависимостта на количествения анализ от наличния в съда антикуагулант, в практиката този факт често бива пренебрегван. Доказателство за това са преобладаващата част научни съобщения, касаещи CAP, при които липсва описание на типа на използвания консуматив. Вида вакуейнер е отбелязан единствено в проучванията на Yan Xu et al. (2003), Zufia et al. (2004), Hassanlou et al. (2016), Jayaseelan et al. (2010) и Wang et al. (2018), без да са налице изследвания относно пригодността на съда за пробонабиране. Във всички случаи антикуагулацията се осъществява с помощта на хепаринови соли, с изключение на последния доклад, където е използван EDTA. K₃.

Липсата на изпитвания, доказващи целесъобразността на процедурата по отделяне на плазма поражда съмнения относно коректното интерпретиране на съобщените в научната литература резултати. В същото време, това затруднява изготвянето на сравнителни анализи между отделните доклади. Поради тази причина, една от задачите на настоящото проучване е да се определи най-удачния подход за отделяне на кръвната плазма от експерименталните животни, третиран с CAP (370.0 mg/kg, т. м.). В тази връзка е сравнен средният процентен аналитичен добив на пролекарството и 5-DFCR след използване на вакуейнери с антикуагулант Lithium Heparin и EDTA.K₃. Кръвните проби са събрани 30.0 минути след оралното третиране на експерименталните животни с 370.0 mg (т. м.) от антинеопластика. Изпитванията са част от оптимизацията на пробоподготвителния етап, поради което са проведени при строго контролирани експериментални условия.

Получените резултати са сравнени със серия контролни (празни) проби, в които не присъстват пролекарството, както и неговия първи метаболит (Фигура 8 и Фигура 9).



Фигура 8. Аналитичен добив на CAP и 5-DFCR в състава на плазмени проби, отделени с помощта на хепаринизирани вакутейнери



Фигура 9. Аналитичен добив на CAP и 5-DFCR в състава на плазмени проби, отделени с помощта на вакутейнер, съдържащ EDTA.К₃

Резултатите разкриват, че степента на екстрахируемост на CAP и 5-DFCR е значително увеличена в случаите, в които се използват вакутейнери, съдържащи EDTA.К₃. Като по-значима полза в този случай се откроява възможността за извличане на малки количества CAP от реални биологични проби, предвид факта, че пролекарството се метаболизира за относително кратко време в организма, както при хора, така и при експерименталните животни.

❖ Заключение

Предложеният преданалитичен етап осигурява получаването на проби с детектируеми количества от целевите аналити, превъзхождащи границата на количествено определяне на CAP и 5-DFCR.

1.2. Оптимизиране на течнохроматографския аналитичен етап

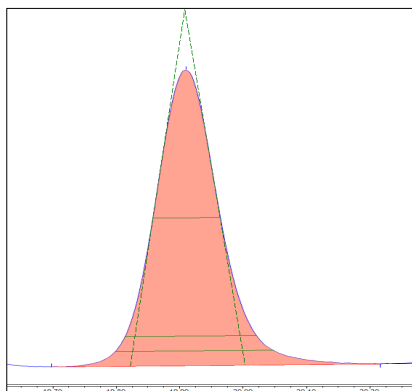
Предизвикателствата в избора на оптимални условия на течнохроматографския анализ са свързани на първо място със сложния характер на биологичната матрица. Необходимо е обособяването на съвкупност от параметри, при които извлечените съпътстващи компоненти не възпрепятстват качествения и количествения анализ на CAP и 5-DFCR. Едновременно с това е

нужно да се осигури достатъчно добро разделяне на целевите аналити един спрямо друг, предвид сходната химична структура на пролекарството и неговия първи метаболит. Изпълнението на тази задача изисква подходящ подбор на неподвижна и подвижна фаза, а също и на аналитични условия, включващи температура, режим и продължителност на работа и други. В допълнение, двете вещества показват абсорбционен максимум при различна дължина на вълната (съответно 306 nm и 280 nm), налагайки използването на специфична детекторна апаратура.

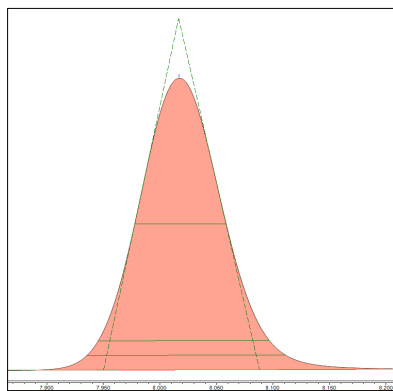
1.2.1. Неподвижна фаза

Разделителният метод е осъществен с обратнофазова хроматографска колона Hypersil GOLD aQ C₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 μm, Thermo Scientific™, USA), защитена с предколона Hypersil GOLD aQ C₁₈ (10 mm x 4.0 mm, 5 μm, Thermo Scientific™, USA). Производствените спецификации на предпочетените консумативи представляват условие за обратнофазови разделяния и употреба на подвижни фази с високо водно съдържание. Следователно, е налице възможност за работа с полярни и по-малко токсични разтворители, удовлетворявайки основните постулати на съвременната „зелена“ хроматография.

За целите на количествения биологичен мониторинг на CAP и 5-DFCR не са тествани други хроматографски колони, тъй като избраните консумативи осигуряват получаването на пикове със задоволителна симетричност (Фигура 10 и Фигура 11).



Фигура 10. Структура на хроматографския пик на CAP



Фигура 11. Структура на хроматографския пик на 5-DFCR

1.2.2. Подвижна фаза

В процеса на оптимизация на аналитичния етап са тествани осем различни състава на подвижна фаза, включващи етанол, метанол, калиевофосфатни и амониевоацетатни буфери. Резултатите показаха, че в условията на проведеното проучване най-удачна е предложената за пръв път от Zulfia et al. (2004) комбинация от вода, метанол и 1 % воден разтвор на мравчена киселина. С оглед на различния химичен характер на CAP и 5-DFCR, както и вероятността на детектиране на останалите метаболити на пролекарството, е избрана работа в градиентен режим при скорост на потока 0.8 mL/min. Целта е да се постигне достатъчно добро разделяне между аналитите, а също и между тях и съпътстващите матрични компоненти, при щядящо за колоната подаване на мобилната фаза.

За добрата разделителна способност на аналитичния метод допринася продължителността на анализа (30 минути), в която е включено време за рекондициониране на системата и подготовка за анализ на следващата проба. Допълнително предимство на настоящата методика е, че се проследяват нивата на първия метаболит на CAP – 5-DFCR, задача, която не е изпълнена в прототипния доклад на Zulfia et al. (2004).

1.2.3. Температурен режим на работа

Като основен критерий при избора на температурен режим на работа е определена чувствителността на метода спрямо CAP и 5-DFCR, както и стабилността на двете съединения. Във връзка с това е установено, че най-високи и възпроизводими резултати се наблюдават при подържане на хроматографските колона и предколона при 30 °C.

Отделно е въведен температурен режим от 10 °C на аутосемплера. Целта е да се осигури максимална стабилност на пробите, предвид техния престой в съответния апаратен модул до момента на анализ.

1.2.4. UV-детекция на CAP и 5-DFCR

Според литературните данни, CAP и 5-DFCR се характеризират с различни стойности на абсорбционния максимум. Това наблюдение е потвърдено и при осъществяване на настоящия дисертационен труд. Поради това посочените дължини на вълната

от 306 nm (CAP) и 280 nm (5-DFCR) са избрани за отчитане на пролекарството и неговия първи метаболит, заедно с избраните до тук аналитични условия.

С цел едновременно детектиране на двата анализа в състава на пробите, респективно съкращаване времетраенето на аналитичния процес, освен UV/VIS-детектор е използван детектор на диодна матрица. Конфигурацията е избрана поради възможността за едновременно качествено и количествено определяне на веществата при различни дължини на вълната. Посочената стратегия осигурява висока чувствителност на метода, позволяваща работа с минимални количества биологични проби, както и нисък разход на химични разтворители.

1.2.5. Качествено и количествено определяне на CAP и 5-DFCR

Качественото определяне на CAP и 5-DFCR в плазмените проби е извършено спрямо наблюдаваното време на задържане на двете вещества. В условията на описания аналитичен метод те имат стойности съответно 19.3 и 8.0 минути.

Количественият анализ на пролекарството и неговия метаболит е осъществен чрез използване на външни стандарти (на CAP и 5-DFCR). С цел опростяване на аналитичната процедура е отхвърлен вариантът за прилагане на ВС. Причина за това е едно от основните предимствата на UV/VIS-детекцията, а именно високата стабилност на сигнала. Следователно, при условие, че са подбрани аналитични условия, осигуряващи висока чувствителност и добра разделителна способност, използването на ВС не е наложително. Допълнителен аргумент за работата с външен стандарт са задоволителните резултати от проучванията, касаещи матричния ефект на плазмените проби.

Калибровъчните криви на CAP и 5-DFCR се построяват на база съотношението площ/височина на пика от хроматограмите на анализираната серия стандартни проби.

1.3. Аналитична надеждност на течнохроматографския метод

Целесъобразността на хроматографския метод е оценена спрямо критериите на ICH, както и Ръководството за валидиране на биоаналитични методи на ЕМА.

1.3.1. Линеиност

Определени са интервалите от концентрации на САР и 5-DFCR, при които се наблюдава линейна зависимост на сигнала от детектора. Във връзка с това е анализирана поредица от осем стандартни разтвора на пролекарството и неговия първи метаболит в диапазона от 0.05 $\mu\text{g/mL}$ до 50.0 $\mu\text{g/mL}$. Получаването на максимално достоверни данни е осигурено чрез шест-кратен анализ на всяка точка от калибровъчната крива.

На база получените резултати са построени отделни калибровъчни криви за двете вещества. Посоченият интервал е избран, така че да обхваща на плазмените концентрации на САР и 5-DFCR (при стандартен режим на дозиране), както при хора, така и при експериментални животни.

1.3.1.1. Калибровъчна крива на САР

Графичната зависимост между концентрацията на САР и аналитичния сигнал се описва с регресионно уравнение имащо вида:

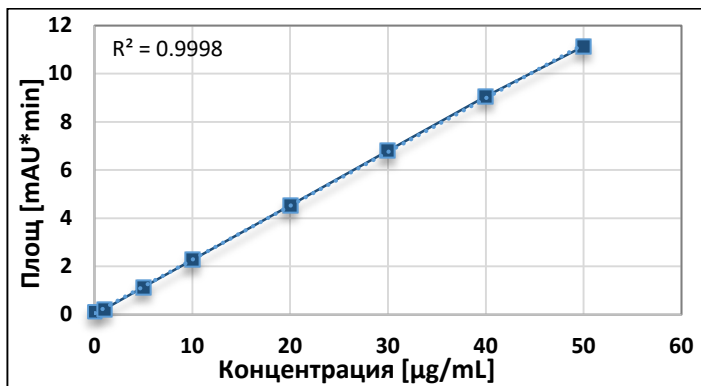
$$y = 0,2234x + 0,0512$$

където:

x – концентрация на САР

y – аналитичен сигнал на детектора

Графичен израз на изведеното уравнение е представен на Фигура 12:



Фигура 12. Калибрационна крива САР

1.3.1.2. Калибровъчна крива на 5-DFCR

Определена е графичната зависимост между концентрацията на 5-DFCR и аналитичния сигнал на детектора. Тя се описва с регресионно уравнение имащо вида:

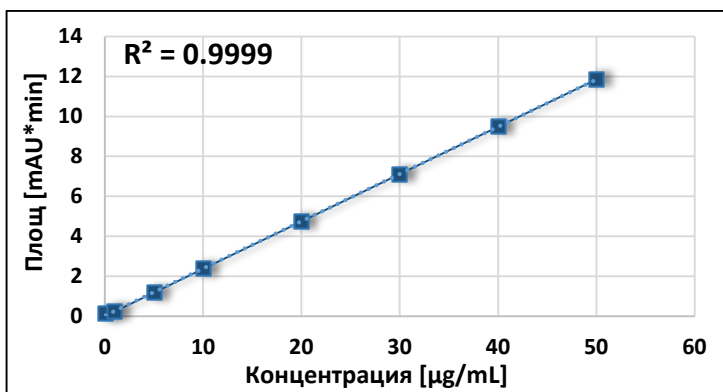
$$y = 0,2363x + 0,0287$$

където:

x – концентрация на 5-DFCR

y – аналитичен сигнал на детектора

Фигура 13 представлява графично изображение на функционалната зависимост между x и y.



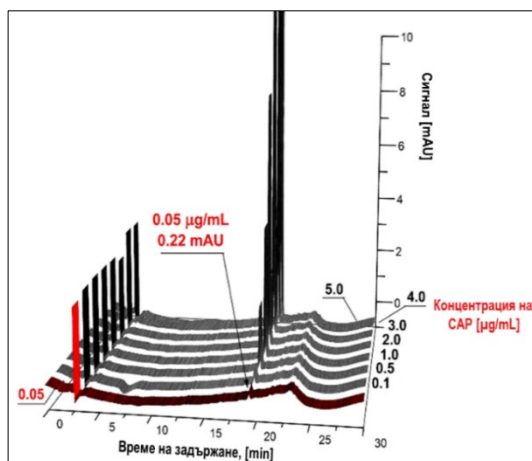
Фигура 13. Калибрационна крива на 5-DFCR

1.3.2. Граница на качествено и долната граница на количествено определяне

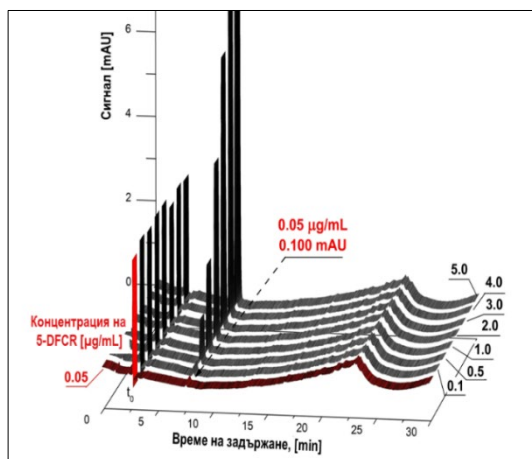
Установени са долната границата на количествено определяне и откриваемия минимум на CAP и 5-DFCR. Във връзка с това са проведени отделни течнохроматографски анализи на серии проби, съдържащи двете вещества. Посочените образци са получени чрез последователни разреждания на съответните стандартни разтвори в ниския концентрационен диапазон, използван за построяване на калибровъчните криви.

При изчисляване на LLOQ и LOD е взет сигнала от детектора на целевите аналити (S_{CAP} и S_{5-DFCR}), както и шума на базовата линия (N). За стойност на N при анализа на CAP и 5-DFCR е взет средния сигнал на фоновия шум (в едноминутен интервал от време), предхождащ съответния пик. Фигура 14 и Фигура 15 представят

наставени хроматограми при анализ на сериите стандартни разтвори на CAP и 5-DFCR.

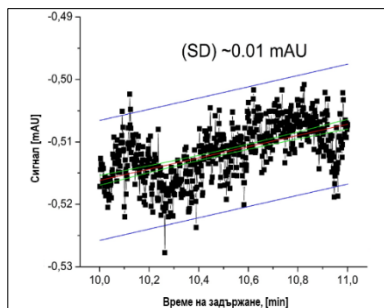


Фигура 14. Хроматограми на серия стандартни проби на 5-DFCR в ниския концентрационен диапазон, използван за построяването на калибровъчната крива

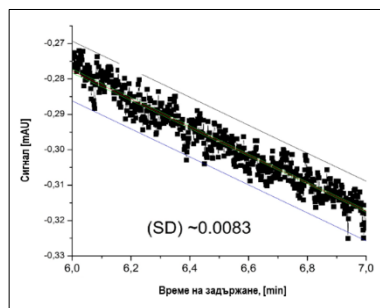


Фигура 15. Хроматограми на серия стандартни проби на 5-DFCR в ниския концентрационен диапазон, използван за построяването на калибровъчната крива

Фигура 16 и Фигура 17 представят графичен анализ на фоновия шум при изследване на серия стандартни разтвори на пролекарството и неговия първи метаболит.



Фигура 16. Средна стойност на сигнала на шума при анализ на CAP

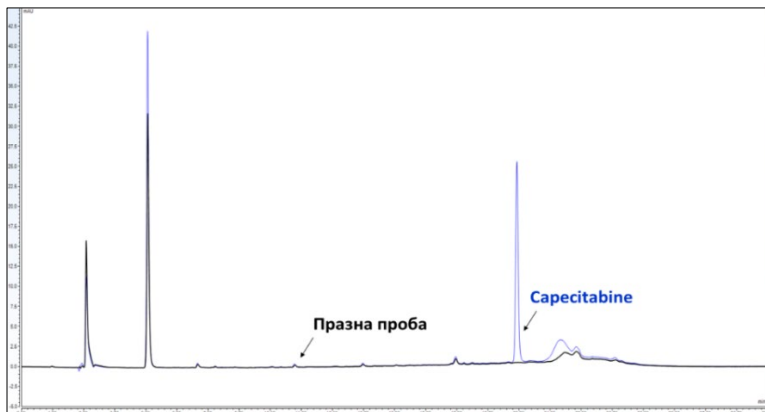


Фигура 17. Средна стойност на сигнала на шума при анализ на 5-DFCR

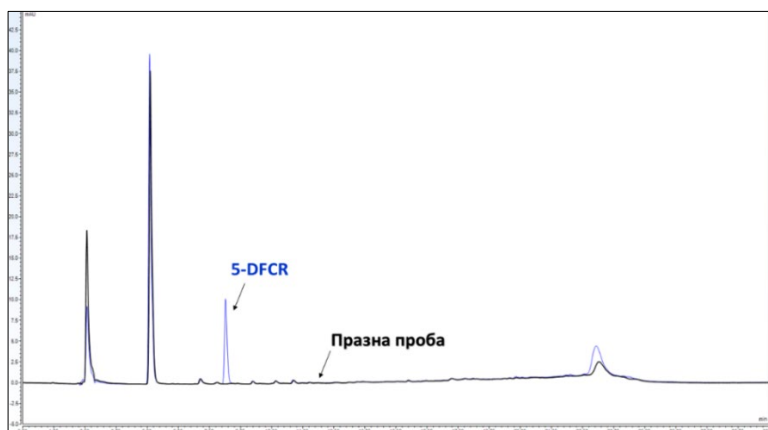
В условията на настоящата работа, са установени стойности на $LLOQ = 0.05 \mu\text{g/mL}$ и $LOD = 0.015 \mu\text{g/mL}$ за двата анализа. Предвид очакваните плазмени концентрации при стандартно дозиране на пролекарството е счтено, че представеният хроматографски метод притежава необходимите нива на чувствителност.

1.3.3. Специфичност

Доказана е възможността за пълно разделяне и последващо качествено и количествено определяне на CAP и 5-DFCR, в присъствието на придружаващи матрични компоненти. За целта е осъществен сравнителен анализ между празни плазмени проби и такива, съдържащи пролекарството и неговия първи метаболит. От представените хроматограми става ясно, че пиковите на двата анализа не се припокриват с тези на съпътстващите вещества (Фигура 18 и Фигура 19). Това прави разработения хроматографски метод специфичен за дадения анализ.



Фигура 18. Наставени хроматограми на празна плазмена проба и такава, съдържаща CAP



Фигура 19. Наставени хроматограми на празна плазмена проба и такава, съдържаща 5-DFCR

1.3.4. Точност и прецизност на метода

Параметрите точност и прецизност са определени чрез шесткратен анализ на цялата серия стандартни проби (от 0.05 до 50.0 $\mu\text{g/mL}$) на CAP и 5-DFCR.

1.3.4.1. Точност на метода

Изчислени са отклонението (b) и относителното отклонение в проценти ($b\%$), при съответните концентрационни нива на САР и 5-DFCR (Таблица 6 и Таблица 7).

Таблица 6. Точност на хроматографския метод, определена при анализ на серия стандартни разтвори, съдържащи САР

Субстанция	Концентрация [$\mu\text{g/mL}$]	Точност	
		b	b [%]
САР	0.05	0.00028	0.56
	0.10	0.00012	0.12
	0.50	0.00045	0.09
	1.00	0.00060	0.06
	2.00	0.00130	0.07
	3.00	0.00110	0.04
	4.00	0.00227	0.06
	5.00	0.00358	0.07
	10.00	0.00098	0.01
	20.00	0.00344	0.02
	30.00	0.00866	0.03
	40.00	0.01085	0.03
50.00	0.00911	0.02	

Таблица 7. Точност на хроматографския метод, определена при анализ на серия стандартни разтвори, съдържащи 5-DFCR

Субстанция	Концентрация [$\mu\text{g/mL}$]	Точност	
		b	b [%]
5-DFCR	0.05	0.000101	0.20
	0.10	0.000332	0.33
	0.50	0.000625	0.13
	1.00	0.000480	0.05
	2.00	0.000907	0.05
	3.00	0.002913	0.10
	4.00	0.001340	0.03

	5.00	0.004062	0.08
	10.00	0.009009	0.09
	20.00	0.000863	0.04
	30.00	0.007223	0.02
	40.00	0.016210	0.16
	50.00	0.020297	0.04

Оптимизацията на преаналитичния етап и хроматографския анализ способстват за постигането на удовлетворяващи стойности на показателя точност. При изследване на стандартните разтвори, съдържащи САР относителното отклонение в проценти достига максимална стойност от 0.56 %, докато при 5-DFCR, същият показател не надвишава 0.33 %.

1.3.4.2. Прецизност на метода

Чрез хроматографските данни от шесткратния анализ на серията стандартни разтвори на САР и 5-DFCR, е оценена степента на близост на получените резултати в рамките на деня (повторяемост). Същият набор от проби е изготвен и анализиран повторно през друг ден, за да се определи показателят възпроизводимост. Таблица 8 и Таблица 9 представят в обобщен вид повторяемостта и възпроизводимостта на метода при анализ съответно на САР и 5-DFCR.

Таблица 8. Оценка на повторяемостта и възпроизводимостта при шесткратен анализ на серия стандартни разтвори на САР

Субстанция	Концентрация [µg/mL]	Прецизност			
		Повторяемост		Възпроизводимост	
		SD	RSD [%]	SD	RSD [%]
САР	0.05	0.0006	1.200	0.0009	1.800
	0.10	0.0008	0.800	0.0019	1.900
	0.50	0.0039	0.780	0.0026	0.520
	1.00	0.0046	0.460	0.0048	0.480
	2.00	0.0019	0.095	0.0016	0.080
	3.00	0.0028	0.093	0.0083	0.277
	4.00	0.0044	0.110	0.0096	0.240

	5.00	0.0082	0.164	0.0060	0.120
	10.00	0.0067	0.067	0.0105	0.105
	20.00	0.0138	0.069	0.0127	0.064
	30.00	0.0091	0.030	0.0095	0.032
	40.00	0.0110	0.027	0.0049	0.012
	50.00	0.0203	0.041	0.0068	0.014

Таблица 9. Оценка на повторяемостта и възпроизводимостта при шесткратен анализ на серия стандартни разтвори на 5-DFCR

Субстанция	Концентрация [µg/mL]	Прецизност			
		Повторяемост		Възпроизводимост	
		SD	RSD [%]	SD	RSD [%]
5-DFCR	0.05	0.0004	0.800	0.00049	0.980
	0.10	0.0007	0.700	0.00083	0.830
	0.50	0.0061	1.220	0.0032	0.640
	1.00	0.0088	0.880	0.0028	0.280
	2.00	0.0048	0.240	0.0083	0.415
	3.00	0.0187	0.623	0.0091	0.303
	4.00	0.0095	0.238	0.0094	0.235
	5.00	0.0062	0.124	0.0067	0.134
	10.00	0.0106	0.106	0.0119	0.119
	20.00	0.0075	0.038	0.0074	0.370
	30.00	0.0039	0.013	0.0132	0.044
	40.00	0.0054	0.013	0.0104	0.026
50.00	0.0128	0.026	0.0094	0.019	

Изчислените RSD стойности при анализ на CAP и 5-DFCR са съответно $\leq 1.9\%$ и $\leq 1.2\%$. Резултатите потвърждават пригодността на метода за осъществяване на биоаналитичен мониторинг на анализите.

1.3.5. Валидационни параметри, характеризиращи пригодността на системата за анализ

Посредством анализ на плазмени проби с привнесени стандартни субстанции на CAP и 5-DFCR са проведени допълнителни тестове за оценка пригодността на хроматографската система. Отделно е определена стабилността на контролните проби,

съдържащи пролекарството и неговия метаболит. Таблица 10 обобщава количествено всички изследвани параметри.

Таблица 10. Валидационни параметри, характеризиращи течнохроматографската система за анализ

Параметър	Резултат
Фактор на задържане (САР)	7.60
Фактор на задържане (5-DFCR)	5.74
Ефективност (САР)	193600
Ефективност (5-DFCR)	53999
Резолуция (САР)	7.288
Резолуция (5-DFCR)	4.103
Фактор на симетрия (САР)	1.120
Фактор на симетрия (5-DFCR)	1.007
Селективност (САР)	1.20
Селективност (5-DFCR)	1.14
Стабилност на стандартните разтвори на САР при 25 °С	36 h
Стабилност на стандартните разтвори на 5-DFCR при 25 °С	48 h
Стабилност на стандартните разтвори на САР при 4 °С	72 h
Стабилност на стандартните разтвори на 5-DFCR при 4 °С	84 h
Стабилност на стандартните разтвори на САР при 10 °С	72 h
Стабилност на стандартните разтвори на 5-DFCR при 10 °С	84 h

❖ Заключение

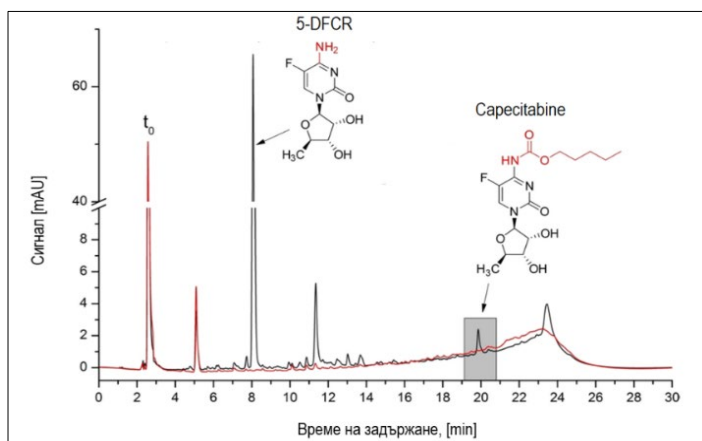
Резултатите от процедурата по валидиране сочат, че представеният течнохроматографски метод покрива всички необходими критерии, доказващи надеждността на системата за анализ.

1.4. Апробиране на течнохроматографския метод

Оптимизацията на преданалитичната и аналитичната процедура, заедно с представянето на обективни доказателства, отнасящи се до надеждността на метода, ни дават основание за осъществяване на неговата апробация. Реализирането на този етап от проучването е необходимо за окончателното удостоверяване

ефективността на предложената методология за целите на количествения анализ на CAP и 5-DFCR в динамична система, каквато несъмнено е живият организъм.

Въвеждането на описания протокол за работа в рутинната изследователска дейност е осъществено чрез анализ на плазмени проби от мишки (линия ICR Albino), третирани *p. o.* с 370.0 mg/kg (т. м.) CAP. От етични съображения броят на експерименталните животни е максимално редуциран на 12 броя, разделени в две групи (по шест мишки във всяка). Освен това, приложената доза е съобразена с телесната площ на изследвания биологичен вид и е отнесена към стандартния прием на пролекарството при хора. Кръвните проби са взети, съобразявайки се с фармакокинетичните характеристики на пролекарството и неговия първи метаболит. Фигура 20 представя сравнителен анализ на хроматограми на плазмени образци от третирано и нетретирано с CAP експериментално животно.



Фигура 20. Наставени хроматограми на плазмени проби от нетретирано (червен цвят) и от третирано с CAP животно (370.0 mg/kg т. м., черен цвят)

Поради постигнатата висока чувствителност на метода са детектирани стойности на двата анализа, надвишаващи тези на LLOQ и LOD. При групата животни, третирани с антинеопластика са установени средни нива на 5-DFCR = 33.45 $\mu\text{g/mL}$ (RSD = 1.55 %), докато тези на бързо метаболизиращия се CAP достигат 1.12 $\mu\text{g/mL}$ (RSD = 1.06 %).

❖ Заключение

Прецизното оптимизиране на всички преданалитични и аналитични етапи способстват за постигнатето на удовлетворяващи резултати в условията на проведения *in vivo* експеримент. Считаме, че представените данни са аргумент за възприемането на аprobационния етап като успешен.

На база наблюденията си можем да заключим, че предложеният поток за работа следва да бъде от полза при *in vivo* изследвания, свързани с проследяване първия стадий на пролекарствено активиране, както и такива, насочени към преодоляване CAP-обусловената GI токсичност с помощта на селективни CES2-инхибитори.

1.5. Обсъждане на резултатите

През последните години са установени множество фактори, повлияващи пусковия стадий от каскадата на активиране на CAP. Свидетелство за това са нарастващия брой съобщения за едноядрени нуклеотидни полиморфизми, сочени като важен индикатор за терапевтичния ефект и профила на безопасност на пролекарството. Характеристики на пациента, като възраст, пол, здравословно състояние и други, също могат да модулират CES-обусловената биотрансформация на CAP. В допълнение са публикувани доклади, разкриващи способността на редица вещества, да инхибират или индуцират селективно отделни карбоксилестеразни изоензимни форми. Проучванията включват молекули от синтетичен и природен произход, както и някои лекарства и помощни вещества. Несъмнено представените ендо- и екзогенни фактори, водещи до флуктуации в експресията и активността на CES са повод за безпокойство от страна на онкологичната общност. Причина за това са потенциалните затруднения в осигуряването на адекватна бионаличност на CAP, а също и рисковете от възникване на лекарство-индуцирана токсичност.

Известно е, че интестиналната изоензимната форма CES2 участва в преждевременното разпадане на пролекарството до 5-FU в чревния тракт. Именно на тази биотрансформационна реакция се приписва характерната за CAP GI токсичност. Това довежда до възникване на нова научна хипотеза, според която селективното инхибиране на CES2 следва да потисне извънтуморното образуване на цитотоксичния агент 5-FU, респективно да редуцира най-често

наблюдаваните странични ефекти при прием на CAP. Също така се очаква да се увеличи фракцията пролекарство, достигаща системното кръвообръщение в непроменен вид, а от там и на противотуморна му активност. От друга страна, литературната справка сочи, че въпреки големия си потенциал, това научно твърдение все още е недостатъчно проучено.

За изследване влиянието на CES2-инхибитори върху терапията с CAP са необходими подходящи експериментални модели, както и обособени показатели за извеждане на съответните доза-ефект зависимости. Практическият опит показва, че количественият анализ на субстрата и продукта на даден ензим може да послужи за индивидуализиране терапията и/или подобряване профила на безопасност на даден антинеопластик. Нещо повече, в началото на 2020 година ЕМА, заедно с Изпълнителната агенция по лекарствата у нас, целят да наложат прилагането този подход при определяне фенотипната изява на друг ензим от метаболитния път на CAP – DPD. Това ни дава основание да считаме, че със задълбочаване знанията относно всеки стадий в каскадата на активиране, ще се увеличи и приложимостта на токсикохимичния анализ в полето на флуоропиримидиновото антинеопластично лечение.

В отговор на изложените данни и научни твърдения си поставихме за цел да разработим метод за надеждно количествено определяне на CAP и неговия първи метаболит в биологични проби от експериментални животни. Изготвянето на настоящата работа е продиктувано от необходимостта за проследяване отклоненията в пусковия стадий на пролекарствено активиране, както и от възможността за подобряване профила на безопасност на CAP в условията на CES2-инхибиция. Допълнителен мотив за това са обнадеждаващите резултати от единственото по рода си *in vitro* проучване на Quinney et al (2005), в което са съобщени селективноинхибиторните свойства на Loperamide, както и потенциала му да редуцира извънтуморното получаване на цитотоксичния агент 5-FU. Тук е моментът да подчертаем, че разработването на единен метод за качествено и количествено определяне на CAP и 5-DFCR в състава на плазмени проби е съпроводено от няколко практически затруднения. От една страна е необходимо да се обособи достатъчно селективна и специфична аналитична процедура, която да идентифицира близките по структура целеви аналити в състава на многокомпонентните

плазмени образци. От друга страна е нужно да бъдат подбрани оптимални условия, които да позволяват детектирането на малки концентрации от бързо метаболизиращия се САР. Същевременно в световната база данни липсва референтен протокол, специално насочен към биомониторинга на двете вещества. Това налага нуждата от прецизиране и доказване надеждността на всеки един компонент от нововъведения от нас метод, превръщайки разработването му в аналитично предизвикателство.

Във връзка с реализирането на количествения анализ на САР и 5-DFCR е оптимизирана лесна за изпълнение пробоподготовка. Процедурата включва протеинно преципитиране на плазмените белтъци (с абсолютен етанол), както и последващо отделяне и концентриране на алкохолните извлеци. В подкрепа на приложения утаител са ръководствата на редица фармацевтични компании и специализирани групи. Всички те единодушно затвърждават ролята на етиловия алкохол като екологосъобразен и безопасен за аналитичния персонал разтворител. В тази връзка считаме, че приложената „зелена“ пробоподготвителна стратегия има допълнително преимущество пред останалите методи, в които се прилагат опасни за човешкия организъм и околната среда разтворители, като ацетонитрил и етилацетат.

С оглед на поставената цел, считаме че ефективността е най-важното предимство на представената от нас преданалитична процедура. Въпреки разликата в химичната полярност на двете вещества е налице адекватно освобождаване от свързващите ги протеини, което предопределя отлични стойности на средния аналитичен добив, както при САР ($\geq 95.4\%$), така и при 5-DFCR ($\geq 96.98\%$). Високата степен на възстановяване е потенцирана от добавянето на синергично действащи утаители (мравчена киселина и преситен разтвор на цинков сулфат), както и от въведената стъпка на повторно извличане на веществата. Налице са резултати, съизмерими, а в голяма част от случаите и превъзхождащи, тези на публикуваните в литературата методи, включително и случаите, при които плазмените проби са с обем пет до десет пъти по-голям от използвания от нас. Отделно оптимизацията на пробоподготвителния етап позволява приготвянето на по-голям брой образци от един експериментален обект (животно), което допринася за получаването на статистически достоверни резултати и дава възможност за проследяване на фармако- или токсикокинетичните процеси в

динамика. Единственият пробоподготвителен метод, който превъзхожда предложеният от нас по отношение изискуемото количество проба е този на Singhal et al. (2015). При него са подложени на анализ 10.0 μL от образец под формата на засъхнало кръвно петно. За сметка на малкия обем проба, обаче авторите са принудени да реализират сложна, продължителна и неекологосъобразна пробоподготвителна процедура по извличане. Освен това методът им способства единствено за екстрахирането на САР, при което са постигнати незадоволителни стойности на аналитичния добив. На база наблюденията и резултатите си, можем да обобщим, че работата с биологични проби в обем от 100.0 μL се явява оптимален вариант за целите на количествения течнокроматографския анализ, не само на антинеопластика, но и на неговия първи метаболит. Допълнителен аргумент в подкрепа на преданалитичната ни процедура е възможността за едновременно извличане на двата целеви аналита – обстоятелство, което някои автори постигат чрез разработване на отделни стъпки по извличане на веществата.

Приложената от нас ПП е евтин и нетрудоемък подход, в сравнение с използваната от някои автори ТФЕ. От друга страна, проведеният хроматографски анализ показва определено наличие на съпътстващи компоненти, произхождащи от биологичната матрица. Въпреки това, възможността за компрометиране на качествено и количествено определяне е отхвърлена с помощта на серия тестове за специфичност. По отношение „чистотата“ на пробите, обаче ПП превъзхожда получените чрез ТТЕ извлеци на Zufia et al. (2004), Licea-Perez et al. (2009), Montange et al. (2010), Piorkowska et al. (2014), Singhal et al. (2015) и Wang et al. (2018). Поради всички представени предимства, методът е избран, като стратегия за обработването на образци, предвидени за количествения анализ на САР и 5-DFCR.

Настоящата работа внася нов поглед върху анализа на САР в биологични проби. За пръв път е проучено влиянието типа вакутейнер върху аналитичния добив на целевите аналити. Изследвани са свойствата на два типа консумативи, за отделяне на плазма, различаващи се единствено по вида фабрично заложен антикоагулант. Резултатите сочат, че антикоагулацията с EDTA.K₃ допринася за възпроизводимото получаване на високи стойности на аналитичния добив, както за пролекарството, така и за неговия

първи метаболит. Отхвърлена е вероятността за задържане на анализите от материала, от който е изработен хепаринизирания съд, предвид факта, че и двата консуматива са от стъкло. Добрите резултати от пробонабирането с EDTA.K₃-вакутейнери отдаваме на по-висок афинитет на плазмените белтъци към антикоагуланта спрямо този към анализите. Поради тази причина считаме, че посоченият консуматив следва да бъде на избор при обработване на плазмени проби от експериментални животни, третирани с CAP.

В дизайна на аналитичния етап взаимодействахме елементи от световния опит в биологичния анализ на CAP. Така например, подобно на преобладаващата част доклади, приложихме хроматографски анализ за количественото определяне на пролекарството и неговия първи метаболит в кръвна плазма. Използваният аналитичен инструментариум включва конвенционална HPLC техника с детекция в ултравиолетовата област. Друга отправна точка при изпълнението на поставената цел е спазване изискването за работа в съгласие с основните догми на съвременната екотоксикология, както и на „зелената“ хроматография. Във връзка с това, считаме, че предложената от Zulfia et al. (2004) комбинация от вода, 0.1 % разтвор на мравчена киселина и метанол се отличава като подходяща и екологосъобразна мобилна фаза. При подаването на разтворителите в градиентен режим, успяхме да детектираме присъствието на 5-DFCR, с което метода ни превъзхожда доклада на посочения авторски колектив. Допускаме, че възможността за едновременно обратнофазово разделяне на субстрата и продукта на CES-ензимната реакция, е обусловено от производствените спецификации на избраните колона и предколона тип Hypersil GOLD aQ C₁₈, позволяващи работа с мобилни фази с високо водно съдържание и ниско рН. Допълнително предимство на избраните от нас хроматографски условия е възможността за директен анализ на целевите анализи. Това обстоятелство не се наблюдава в доклада на Licea-Perez et al. (2009), където е приложена предварителна дериватизация, изискваща допълнително време и консумация на химични реагенти. Също така установеният режим на работа позволи едновременното определяне на CAP и 5-DFCR в многокомпонентния състав на биологичните проби. Невъзможността за изпълнението на това условие принуждава някои авторски колективи да разработят отделни течнохроматографски методи за различните анализи,

удвоявайки обема от работа, както и разхода на неекологосъобразни разтворители.

Аналитичната надеждност на метода е доказана с помощта на референтни стандартни субстанции на CAP и 5-DFCR, използвани при приготвянето на биологични проби, с привнесени и точно дефинирани количества на анализите. По този начин е демонстрирана способността за еднозначно определяне присъствието на субстрата и продукта на CES, в състава на биологичните проби. В допълнение е спазено изискването на ЕМА сигнала на празната проба да не надвасивава 20 % от този на аналитните пикове. Като друго основно предимство на метода можем да изтъкнем неговата чувствителност спрямо двете вещества. Установените стойности на LOD и LLOQ за CAP и 5-DFCR са съответно 0.015 µg/mL и 0.05 µg/mL. Граничните стойности са съизмерими с тези на публикуваните HPLC/MS/MS и превъзхождат по-голямата част от докладите с UV-детекция. От втората група, единствено Zufia et al. (2004) постигат по-ниска граница на количествено определяне (0.025 µg/mL) при работа с пет пъти по-голям обем на биологичната проба, както и два и половина пъти по-голям обем на инжектиране. От друга страна, това е причина за увеличаване на матричния ефект, крие рискове за изправността на аналитичната система и е съпроводено с употребата на по-големи количества неекологосъобразни разтворители в процеса на пробоподготовка. Заедно с широкия обхват на линейност (от 0.05 µg/mL до 50.0 µg/mL), нашата процедура напълно удовлетворява нуждите на предвидените *in vivo* експерименти за фенотипно проследяване активността на CES. В подкрепа на това са установените корелационни коефициенти при построяване на калибровъчните криви на CAP и 5-DFCR ($R^2 \geq 0.9998$). Съдейки по докладваните стойности за терапевтичния диапазон на CAP при хора, считаме още, че при подходящо адаптиране на метода, той следва да бъде годен за провеждане на терапевтично лекарствено мониториране в реални клинични условия. Разбира се доказването на това твърдение трябва да бъде обект на допълнителни и задълбочени клинични проучвания.

Определен е параметърът точност, както по отношение на CAP, така и при 5-DFCR. На фона на изискуемия минимум за отклонение на тестовите проби до 20 % от номиналната стойност, в настоящия метод са постигнати резултати, които не надвасават 0.56 % за пролекарството и 0.33 % за първия му метаболит. Изискванията за

възпроизводимост в серия и от ден в ден за клинично значимия диапазон също отговарят на критериите за допустимост. Получените стойности в условията на настоящата работа до 1.9% за CAP и до 1.2 % за 5-DFCR. Чрез серия изпитвания с празни плазмени проби, към които отделно са привнесени стандартни субстанции на двата анализа е отхвърлена вероятността за разлагане на CAP, както и превръщане на 5-DFCR в пролекарството, тъй като в съответните хроматограми не се наблюдават пикове на производните молекули. Отдаваме отличните резултати на задълбочената оптимизация на пробоподготвителната и аналитичната процедури, както и на работата в съответствие с изискванията GLP. Считаме, че приносът затова има валидационно доказаната надеждност на аналитичната система, което се потвърди и по време на апробационния етап от експерименталната ни дейност.

Въпреки предимствата на настоящия метод, срещу него може да се изложат аргументи по отношение на продължителността, финансовата стойност, както и необходимостта от квалифициран персонал. От друга страна, към днешна дата изискването за висока чувствителност и аналитична надеждност при анализа на биологични проби може да бъде задоволено единствено чрез прилагането на подобни високоспециализирани многостъпални процедури. Ето защо, не намираме за релевантен фактор изложените ограничения. Нещо повече, на база постигнатите резултати считаме, че представеният от нас метод може да послужи за последващи предклинични експерименти, целящи да установяват терапевтичния потенциал на идеята за лечение с пролекарството в условията на CES2-инхибиция.

Възможността за възникване на отклонения в експресията и активността на CES, както и тясната терапевтична ширина на CAP, затвърждават необходимостта разработване на аналитични методи за количествено определяне на антинеопластика и неговия първи метаболит в биологични проби. Ретроспекцията на публикуваните в научната литература доклади, както и постигнатите от нас резултати, категорично затвърждават способността на хроматографските методи да осигуряват резултати с висока точност и възпроизводимост. Същевременно, считаме, че последващото внедряване на подобни биоаналитични процедури в клиничната практика е разумна алтернатива на скъпите и по-малко достъпни генетични изследвания. Това следва да подпомогне и оценяването на

съотношението полза/риск при всеки пациент, в духа на съвременната персонализирана терапия. На база това можем да заключим, че прилагането на токсикохимичните методи за анализ в полето на онкологията може да доведе до редица здравни ползи, като: повишаване ефективността на противотуморната терапия; оптимизиране плътността на дозовия режим; предотвратяване застрашаващи здравето и живота на пациента токсични ефекти.

2. Течнохроматографски метод за количествено определяне на професионалната експозиция с САР

Разработването на процедура за проследяване професионалната експозиция с САР представлява сложно начинание. От една страна, в световен мащаб опитът в определянето на цитостатичния товар в работни условия е тревожно окъден. От друга страна, САР е сред множеството антинеопластични представители, които към днешна дата все още не попадат във фокуса на подобни изследвания. Същевременно, липсата на унифицирани международни стандартни, свързани с разработването на протоколи за мониторинг, създава затруднения в изграждането на единна система за оценка и контрол на професионалната цитостатична експозиция.

2.1. Оптимизация на пробоподготвителния етап

Отправна точка при изпълнението на поставената цел е конкретизиране на възможните пътища за контаминация с САР (в условията на настоящата работа). В тази връзка, дермалният път е определен като най-рисков за възникване на контакт с цитостатика. Допълнително са уточнени помещенията и работните повърхности, при които съществува възможност за кожно съприкосновение с пролекарството.

Предвид дефинираните основни параметри на проучването, са предприети съответните стратегии по пробонабиране и пробоподготовка, имащи отражение върху ефективността на последващия аналитичен етап.

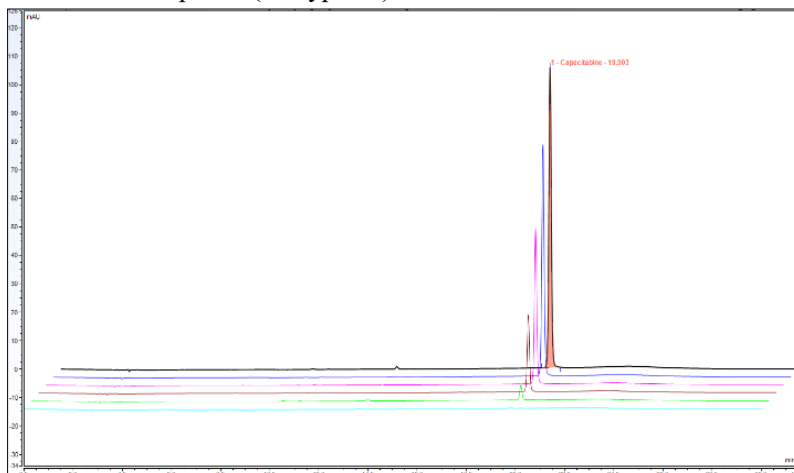
2.1.1. Материал за пробонабиране

2.1.1.1. Хомогенност на материала за пробонабиране

Дейността по пробонабиране е извършена с целулозна филтърна хартия (синя лента). За да се гарантира хомогенност на материала по отношение абсорбцията и десорбцията на целевия аналит, 20 броя филтри се претеглят последователно на аналитична везна. В резултат е определено средно тегло от 399.83 mg, с коефициентът на вариация (CV) 1.97 %. Употребата на избрания консуматив е целесъобразна и следва да осигури необходимата възпроизводимост на резултатите, предвид факта, че CV не надвишава обявената в научната литература допустима стойност от 5 %.

2.1.1.2. Аналитичен добив на целевия аналит

Реализирано е изпитване, свързано с доказване пригодността на предвидените филтри за количествения анализ на CAP в състава на смивни проби от работни повърхности. Като критерий е определен средният процентен аналитичен добив на серия контролни проби, покриващи целия концентрационен диапазон на аналита (от 0.1 $\mu\text{g/mL}$ до 20.0 $\mu\text{g/mL}$). Изложени са представителни хроматограми на изследваните образци (Фигура 21).



Фигура 21. Наставени (в перспектива) хроматограми на контролни проби, съдържащи CAP в концентрационния диапазон от 0.1 $\mu\text{g/mL}$ до 20.0 $\mu\text{g/mL}$

Възстановяването на САР е определено чрез отнасяне резултатите от анализа на контролните проби спрямо тези на идентичната серия стандартни разтвори, съдържащи пролекарството (Таблица 11).

Таблица 11. Среден процентен аналитичен добив при шесткратен анализ на серия контролни проби, съдържащи САР

Субстанция	Концентрация [µg/mL]	Средно количествено възстановяване на контролните проби [%]
САР	0.1	98.34
	1.0	98.43
	5.0	99.72
	10.0	100.01
	15.0	99.85
	20.0	99.56

Използваният консуматив осигурява аналитичен добив от 98.34 до 100.01 %, което несъмнено го прави подходящ за целите на проучването.

2.1.1.3. Определяне необходимия брой смивни проби при изследване на дадена рискова зона

Практически е установен необходимият брой смивни операции за постигане на максимално извличане на САР от изследваните повърхности. За целта е определен индивидуално средният аналитичен добив на контролни проби при три концентрационни нива (най-ниско, средно и най-високо), получен след всяко забърсване на съответния тип повърхност (Таблица 12).

Таблица 12. Аналитичен добив от отделните филтърни листи, получен при забърсването на повърхности с привнесена субстанция САР

Тип повърхност	Аналитичен добив от първи филтър	Аналитичен добив от втори филтър	Аналитичен добив от трети филтър	Общ аналитичен добив
Керамика - неравна повърхност (подова настилка)	93.99 %	3.2 %	п. а.	97.19 %
Формалдехидни смоли - неравна повърхност (работни плотове)	87.76 %	7.0 %	п. а.	94.76 %
Керамика - равна повърхност (плот на химическа камина)	97.6 %	1.0 %	п. а.	98.6 %
Неръждаема стомана – равна повърхност (блюдо на аналитична везна)	97.3 %	1.9 %	п. а.	99.2 %

Резултатите показват, че за целите на проучването е достатъчно двукратно забърсване на изследваните повърхности с конкретният тип филтърна хартия. Данните затвърждават очакванията ни, че това е особено критично при обекти с неравна и/или порьозна повърхност.

2.1.2. Определяне на влиянието на типа изследвана повърхност върху аналитичния добив на САР

Заедно с материала за пробонабиране, типът изследвана повърхност има отношение към аналитичният добив на изследваното вещество. Обекти с неравна и/или порьозна повърхност, с неправилна форма, както и такива с адсорбиращи покрития могат да се окажат

източник на значима грешка за анализа, тъй като затрудняват максималното извличане на веществата. Според Администрацията по професионална безопасност и здраве, в такива случаи е приета компромисна стойност на аналитичния добив не по-малка от 75 %. От друга страна, при изследване замърсяването на равни повърхности е необходимо да се осигури възстановяване на целевия аналит над 90 % .

В рамките на проучването са изследвани работни области, с покрития от четири различни типа материал, някои от които с неравна повърхност. За тази цел беше определен средният процентен аналитичен добив на серия проби с привнесена стандартна субстанция САР, така че да се изследва целия концентрационен диапазон на пролекарството. Таблица 13 представя получените, резултати, изчислени на база възстановяването при контролните проби.

Таблица 13. Аналитичен добив на серия смивни проби с привнесени количества САР при отделните типове повърхност (изчислени спрямо контролните проби)

Субстанция	Концентрация [µg/mL]	Под (средно възстановяване, %)	Работен плот (средно възстановяване, %)	Работен плот на химическа камина (средно възстановяване, %)	Блюдо на аналитична везна (средно възстановяване, %)
САР	0.1	96.43	96.0	99.1	98.7
	1.0	96.26	94.92	98.4	97.6
	5.0	96.07	93.73	99.6	99.6
	10.0	99.10	94.45	99.8	99.7
	15.0	97.14	94.12	97.6	99.9
	20.0	98.18	95.35	96.9	100.1

2.2. Оптимизация на течнохроматографския аналитичен етап при определяне замърсяването с САР върху работни повърхности

Анализът на смивни образци изисква подбор на хроматографски метод с достатъчно висока чувствителност, селективност и специфичност спрямо САР. Получените отлични резултати в изследванията с миша плазма, дават пълно основание да приложим описаната и развита в точка IV.1.2 методология в проучвания, касаещи професионалната безопасност при работа с цитостатика.

2.3. Аналитична надеждност на течнохроматографския метод

Пригодността на метода за целите на количествения анализ на САР в състава на смивни проби е доказана в серия експерименти. Определени са валидационни параметри, заложили в ръководството на ICH (Topic Q2 (R1)).

2.3.1. Линеиност

Линеина зависимост на сигнала от детектора е установена при анализа на серия контролни проби, съдържащи САР в диапазона от 0.1 µg/mL до 20.0 µg/mL. Работният обхват е избран на база средното количество пролекарствена субстанция, с която се работи ежедневно на територията на изследваните помещения. Всяко концентрационно ниво е анализирано шест пъти с цел получаване на максимално достоверни резултати.

Графичната зависимост на детекторния сигнал от концентрацията на САР е изведена чрез определяне средно аритметичните стойности на съответните пикови площи. Тя се описва с регресионно уравнение, имащо вида:

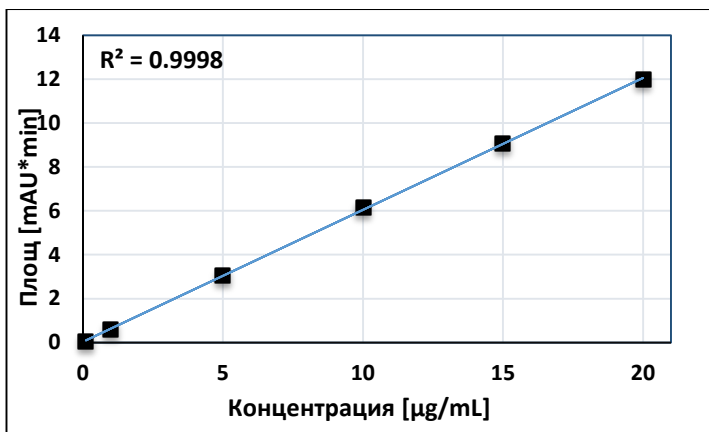
$$y = 0.6014x + 0.0294$$

където:

x – концентрация на САР

y – аналитичен сигнал на детектора

Фигура 22 изобразява калибровъчната крива при шесткратния анализ на контролни проби, съдържащи САР.



Фигура 22. Калибрационна крива, получена при трикратен анализ на серия контролни проби в диапазона 0.1 – 20.0 µg/mL

2.3.2. Граница на качествено и количествено определяне

Установени са откриваемия минимум и границата на количествено определяне на САР. За целта са анализирани образци, получени чрез последователно разреждане на контролни проби в ниския концентрационен диапазон на пролекарството. В условията на адаптация на метода са постигнати стойности на LOQ и LOD, съвпадащи с тези при анализа на САР в биологични проби (съответно 0.05 µg/mL и 0.015 µg/mL).

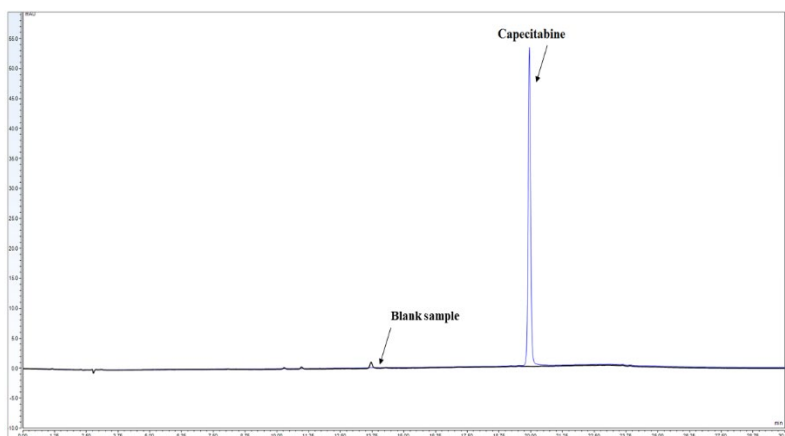
2.3.3. Специфичност

Наличието на компоненти, произхождащи от материала за пробонабиране, е проучено чрез анализ на серия празни смивни проби. В допълнение е изследван профила на фоновия шум в зависимост от типа изследвана повърхност. Проведените изпитвания са от значение за доказване способността на метода да детектира по недвусмислен начин пролекарството, в състава на многокомпонентни образци, каквито несъмнено са смивните проби.

Пикове на вещества, различни от целевия аналит, са установени въпреки добрите характеристики на материала за пробонабиране. От друга страна, детекторния сигнал на съпътстващите компоненти е с нисък интензитет, което свидетелства за значително минимизиране на матричния ефект. По всяка вероятност, задоволителните резултати се дължат на предварителното филтруване на всеки образец, както и

ниската разтворимост на потенциалните съпътстващи компоненти в десорбционния разтворител. Същевременно, не се наблюдават вариации в хроматограмите на празни смивни проби от областите с различно покритие. Вероятно, идентичният фонов шум е резултат от системното осъществяване на хигиенни дейности, съобразени с изискванията за добра лабораторна практика.

Специфичността на адаптирания метод е определена чрез съпоставяне на хроматограми на празни проби с такива, съдържащи стандартна субстанция на пролекарството. Както може да се види от Фигура 23, наличието на съпътстващи компоненти не представлява източник на аналитични проблеми, тъй като съответните пикове на достатъчно отстояние от целевия аналит.



Фигура 23. Припокриващи се хроматограми на стандартен разтвор на CAP (син цвят) и празна проба (черен цвят), която не съдържа целевия аналит

2.3.4. Точност и прецизност на метода

Валидационните параметри точност и прецизност са определени чрез шесткратен количествен анализ на серия контролни проби, съдържащи стандартна субстанция CAP в обхвата 0.1 – 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.3.4.1. Точност

Определено е влиянието на системните грешки в хода на аналитичната работа върху точността на метода. Като референтни

стойности при определяне на показателите b и b [%] са взети резултатите от анализа на стандартни разтвори, съдържащи САР в съответното концентрационно ниво (Таблица 14).

Таблица 14. Точност на хроматографския метод

Субстанция	Концентрация [$\mu\text{g/mL}$]	Точност	
		b	b [%]
САР	0.1	0.00017	0.17
	1.0	0.00130	0.13
	5.0	0.00550	0.11
	10.0	0.00400	0.04
	15.0	0.00135	0.09
	20.0	0.01200	0.06

Ефективността на пробоподготвителния етап, заедно с рационалния избор на хроматографски условия, способстват за постигането на добра точност. Към тях е причислен и стационарният температурен режим, осигуряващ стабилност на целевия аналит по време на аналитичната работа.

2.3.4.2. Прецизност

Определена е повторемостта на резултатите от шесткратния анализ на серията контролни проби. Същият експеримент е повторен след една седмица, с цел установяване на възпроизводимостта на метода. Показателите, отразяващи вътрелабораторната прецизност са отразени в таблица 15.

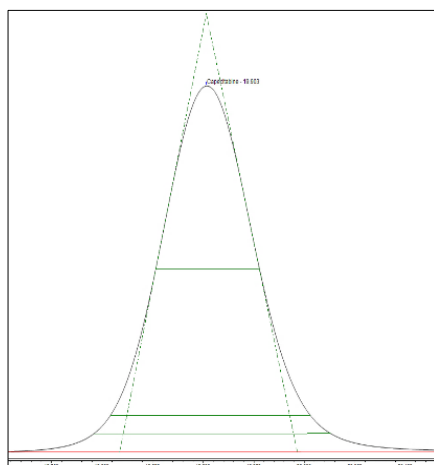
Таблица 15. Прецизност на метода

Субстанция	Концентрация [$\mu\text{g/mL}$]	Прецизност			
		Повторемост		Възпроизводимост	
		SD	RSD [%]	SD	RSD [%]
САР	0.1	0.0007	0.70	0.0009	0.90
	1.0	0.0014	0.14	0.0017	0.17
	5.0	0.0036	0.07	0.0154	0.31
	10.0	0.0117	0.12	0.0197	0.20
	15.0	0.0690	0.46	0.0540	0.36
	20.0	0.0108	0.05	0.0281	0.14

Благодарение на възпроизводимите условия на работа са установени стойности на SD и RSD [%], отразяващи ниски нива на случайната грешка.

2.3.5. Валидационни параметри, характеризиращи пригодността на системата за анализ

Проведените допълнителни тестове за пригодността на системата за анализ свидетелстват за постигането на висока селективност и добра разделителна способност на адаптирания метод. Пиковете на САР запазват своята симетричност (Фигура 24).



Фигура 24. Структура на пика на САР

Избраната хроматографска колона се характеризира с висока ефективност и води до задържане на анализа на 19.9 минута от анализа. Стабилността на разтворите, съдържащи анализа, също не показва отклонения в установените стойности. Таблица 16 обобщава количествено всички посочени параметри.

**Таблица 16. Валидационни параметри, характеризиращи
течнохроматографския анализ**

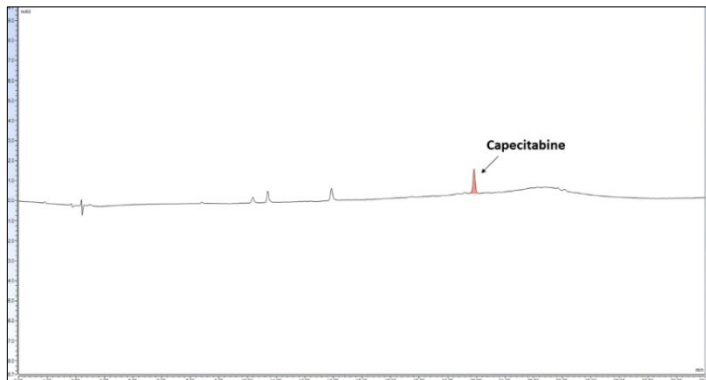
Параметър	Резултат
Фактор на задържане	6.16
Ефективност	204 612
Резолуция	36.34
Фактор на симетрия	1.05
Селективност	1.57
Стабилност на разтвора при 25°C	36 h
Стабилност на разтвора при 4 °C	72 h
Стабилност на разтвора при 10 °C	72 h

2.4. Апробиране на течнoхроматографския метод

Етап на апробация е реализиран след доказване аналитичната надеждност на адаптирания метод. Развитата методология е използвана за определяне наличието на цитостатика върху работни повърхности на територията на звеното, в което авторският колектив развива научноекспериментална дейност. В обхвата на мониторинга попадат течнoхроматографската лаборатория, както и свързаното към нея помещение за пробоподготовка.

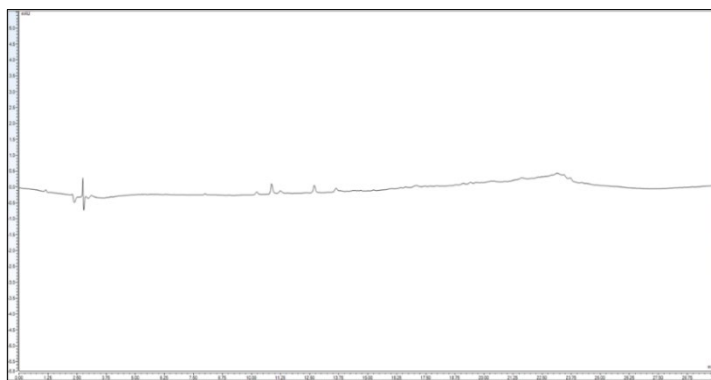
Пронабирането е осъществено след осем часова интензивна работа с цитостатика, включваща разопаковане на стандартната субстанция на CAP, нейното претегляне, разреждане, както и концентриране на проби с последващ течнoхроматографски анализ. Задължителен компонент при събирането на смивове, е употребата на лични предпазни средства.

При количествения анализ на смивни образци, от предварително фиксираните дванадесет рисковни точки, е детектирана една положителна проба, указваща наличието на цитотоксичния агент върху работната площ. Макар и в ниски концентрации, антинеопластикът е детектиран върху плота на намиращата се в хроматографската лаборатория химическа камина. Хроматограма на изследваната проба е представена на Фигура 25.



Фигура 25. Хроматограма на смивна проба от повърхността на химическа камина

В допълнение, с помощта на аналитичната процедура е оценена ефективността на рутинните хигиенни мерки в рамките на работното звено. За целта са извършени повторно пробонабиране и последващ анализ на образци от същите повърхности след почистване на работното място. В тази връзка, наличие на CAP не е установено при нито една от изследваните рискови зони, включително и при тази дала положителен резултат (Фигура 26).



Фигура 26. Хроматограма на смивна проба от повърхността на химическата камина след почистване на работното място

За да се изчисли количеството на замърсяване спрямо единица площ (cm^2) е осъществено преобразуване на концентрацията на

изследваните проби. Всички резултатите са умножени по 50 (обемът на разтворителя при екстракция) и след това са разделени на площта на съответната изследвана повърхност. Обобщените данни от апробирането на течнoхромa-тoгpафския метод са представени в Таблица 17.

Таблица 17. Резултати при количествения анализ на смивни проби от целевите изследвани работни повърхности

Локация на пробоземане	Количество след 8-часова интензивна работа [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Количество след почистване на работното място [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]
Работен плот в течнoхромaтoгpафскa лaбoрaтoрия - № 1	п. а.	п. а.
Работен плот в течнoхромaтoгpафскa лaбoрaтoрия - № 2	п. а.	п. а.
Работен плот в течнoхромaтoгpафскa лaбoрaтoрия - № 3	п. а.	п. а.
Под в течнoхромaтoгpафскa лaбoрaтoрия - № 1	п. а.	п. а.
Под в течнoхромaтoгpафскa лaбoрaтoрия - № 2	п. а.	п. а.
Работен плот в пробо-подготвителна стая - № 1	п. а.	п. а.
Работен плот в пробо-подготвителна стая - № 2	п. а.	п. а.
Работен плот в пробо-подготвителна стая - № 3	п. а.	п. а.
Под в пробоподготвителна стая - № 1	п. а.	п. а.
Под в пробоподготвителна стая - № 2	п. а.	п. а.
Повърхност на химична камина	0.014	п. а.
Блюдо на аналитична везна	п.а.	п. а.

Получените резултати служат за картографиране на рисковите зони в работното звено, съгласно препоръките на Европейската агенция за безопасност и здраве при работа. В тази връзка са изготвени Приложения I и II, имащи за цел да насочат вниманието на работния персонал към изследваните области, както и към необходимостта от използване на лични предпазни средства и защитно облекло.

❖ *Заключение*

Въз основа на представените до тук резултати, възприемаме аprobационния етап като успешен. Предложеният от нас метод е подходящ за количественото определяне на САР в състава на смивни проби.

2.5. Обсъждане на резултатите

Наблюдаваният през последните десетилетия бум на раковите заболявания води до увеличаване на цитостатичната употреба в световен мащаб. За съжаление, лекарственото обезпечаване на онкологично болните пациенти е причина милиони клинично здрави хора да бъдат изложени на цитотоксично въздействие при изпълнение на служебните си задължения. На този фон, множество здравни институции алармират за рисковете от настъпване на остри и/или хронични усложнения при ежедневен контакт с ниски концентрации от антинеопластичите. Според представените официални доклади, макар и в преобладаващата част от работните структури да има внедрени инженерни, административни и хигиенни мерки, проблемът с цитотоксичното въздействие е все още налице. Паралелно с това, в глобален план няма публикувани данни относно максимално допустимите експозиционни нива, при които да се гарантира безопасната работа на персонала.

Прегледът на научната литература насочи вниманието ни към още един съществен проблем. Оказва се, че броят на цитостатиците, за които съществуват разработени аналитични методи за определяне степента на експозиция в работни условия е обезпокоително оскъден. Също така, по наши данни, на територията на България никога не са провеждани подобни мониторингови мероприятия. Отдаваме състоянието на проблема, не само на трудоемкия характер на начинанието, но и на отсъствието на законови норми, свързани с неговата реализация. Въпреки това, заставаме зад твърдението на европейските здравни власти, относно необходимостта от

внедряване на практики за системно проследяване на цитостатичното натоварване във всяко едно звено, в което персоналът е в пряк контакт с цитотоксични лекарствени агенти. Нещо повече, считаме, че наблюдението на всеки един антинеопластик през призмата на токсикохимичния анализ следва да подпомогне изясняването на количествената зависимост между хроничното цитотоксично натоварване и неговия ефект върху здравия организъм. В този смисъл, системният мониторинг на повърхностното замърсяване в работна среда може да бъде разгледан, като липсващото звено в проучванията, целящи да дефинират посочените прагови стойности.

Разработването на аналитична процедура за определяне на САР в състава на смивни проби се обособи като цел на настоящото проучване. Причина за това са провежданите от нас фармакотоксикологични проучвания с антинеопластика - предпоставка за потенциален контакт на аналитичния персонал с веществото. Същевременно при направения литературен анализ установихме, че САР никога не е попадал в обсега на мониторингови проучвания в работна среда. В допълнение, широкото приложение на флуоропиримидина, както и нарастващият брой проучвания с негово участие, се явиха достатъчно основание за въвеждането на надежда аналитична процедура, която едновременно с това да допълва предприетите в звеното ни мерки за безопасност.

Липсата на референтен метод за определяне повърхностното натоварване с САР превърна оптимизацията на аналитичния етап в особено предизвикателство. Литературната справка показва, че за целите на цитостатичния мониторинг най-често прилагани на първи избор са хроматографските техники. По-рядко наблюдаван вариант е газ-хроматографският анализ, предвид условието за термостабилност и летливост на аналитите. Що се отнася до цитостатиците, съдържащи метален йон (например платина-съдържащи антинеопластици), е възможна употребата на индуктивно свързана плазмена мас спектрометрия или волтметрия. Съобразявайки се с молекулния състав, физикохимичните свойства и стабилността на обекта на нашия анализ – САР, считаме, че HPLC е най-удачен метод за точно и прецизно определяне на ниски концентрации от анализа в състава на смивни проби. Поради тази причина избрахме аналитичната техника в съчетание с детекция в ултравиолетовата област за целите на проучването си. В духа на

правилата за осигуряване на безопасни условия за труд, решихме да адаптираме съчетанието от подвижна и неподвижна фаза, използвани при анализа на биологични проби в точка III.2.2.1. Освен, че от гледна точка на екотоксикологията е спазено изискването за работа със "зелени" разтворители, работата с един и същ метод ни позволява да извършим мониторинга непосредствено след интензивна научноизследователска дейност с участието на САР. Именно по този начин е организирана и апробацията на адаптирания метод.

В процеса на валидиране е установена линейна зависимост на концентрацията на САР от сигнала на детектора ($R^2 = 0.9998$) в интервал от 0.1 до 20.0 $\mu\text{g/mL}$. Чувствителността на метода също задоволява нуждите на анализа, тъй като са налице стойности на LOD и LOQ от съответно 0.015 и 0.05 $\mu\text{g/mL}$. Сравнителния анализ на литературата показва, че комбинирането на течнoхроматографския анализ с мас-детекция има потенциала да осигури още по-ниски нива чувствителност. Въпреки това, изхождайки от количествата САР, с които се работи в изследваното от нас звено считаме, че установените гранични нива задоволяват напълно поставената цел. При необходимост от постигане на по-ниски LOD и LOQ е възможно обмислянето на корекции в пробоподготвителния етап, така че да се осигури получаването на по-концентрирани проби, както и да се повиши обема на инжектиране, предвид чистотата на изготвените образци. В подкрепа на тази възможност са проведените тестове за специфичност, разкриващи минимално влияние на съпътстващите компоненти – обстоятелство, което не компрометира по никакъв начин качествения и количествения анализ на САР. Проведените тестове за точност и прецизност също затвърждават надеждността на адаптирания метод. Заедно с покриването на критериите за пригодност на системата за анализ, постигнатите резултати са категорично доказателство за удачното комбиниране на процедури в преданалитичния и аналитичния етап.

Макар и обектът на изследването да е един и същ (с този в точка III.2.2.1), е необходимо предварително изясняване на подхода за набиране на проби, както и начинът на тълкуване на резултатите, така че да послужат при количествената оценка за степента на повърхностно натоварване. Подходът за оценка на експозицията е избран на база приетите препоръки за анализ на смивни проби от

повърхности, предвид факта, че дермалният път е най-вероятният начин на преминаване на цитотоксичните агенти в организма. Аргумент за изготвянето на конкретния вид проби са и физикохимичните свойства на антинеопластика, налагащи употребата на лични предпазни средства.

Понастоящем няма публикувани стандарти за набиране на смивни проби и анализ на антинеопластични лекарства в условия на професионална експозиция. Ето защо извършването на тази процедура е предшествано от предварителна и изчерпателна оценка на типа материал за пробовзимане, десорбционния разтворител, както и влиянието на типа изследвана повърхност върху стойността на аналитичния добив. В научната литература е докладвана употреба на различни видове консумативи за пробонабиране на смивове. Най-често се касае за материали, изработени от целулоза, чиято химическата обработка и структура често се оказват източник на проблем за анализа. Така например, в своето проучване Larson et al. (2002) оценяват пригодността на целулозни аналитични кърпи, установявайки че тяхната обработка води до наличието на неприемливо количество съпътстващи компоненти, които се елуират заедно с целевите аналити. Подобни ограничения са налице при реализираните процедури по пробонабиране с помощта на предварително напоени марли и лигнин, съответно от Viegas et al. (2014) и Siderov et al. (2010). Макар и липсата на единни стандарти да дава известна свобода в избора на преданалитичен подход, се оказва че целулозната филтърна хартия е най-целесъобразен материал за пробонабиране, осигуряващ висок и възпроизводим аналитичен добив на целевите аналити. Това наблюдение е потвърдено и чрез резултатите от нашето проучване. Доказахме, че използваната филтърна хартия (тип синя лента) отговаря на изискването за хомогенност, предпоставка за постигането на възпроизводими резултати след провеждането на стъпките по абсорбция и десорбция. Вследствие на това, при анализа на контролни проби, покриващи работния концентрационен интервал (0.1 – 20.0 µg/mL) е установен среден аналитичен добив от 98.34 % до 100.01 %.

Изборът на десорбционен разтворител също има пряко значение, както за ефективността на пробоподготовката, така и за течнхроматографския анализ. На този етап от дизайна на процедурата за мониторинг отново спазихме условието за работа с безопасен, както за аналитичния персонал, така и за околната среда

разтворител. В тази връзка, с цел извличане на САР от филтърната хартия е използвана прясно приготвена би-дестилирана вода. Успоредно на това, в прободаващата част от разгледаните научни съобщения са използвани органични разтворители (етилацетат и ацетонитрил) или разтвори с кисело рН, повишаващи риска от частично разтваряне на компоненти от целулозния материал. Налице е още риск по отношение изправността на аналитичната система, от увеличаване матричния ефект, както и намаляване специфичността на метода. Поради това, считаме, че употребата на вода като десорбционен разтворител в условията на нашия експеримент, способства за получаването на висок и възпроизводим аналитичен добив на САР.

За получаването на обективни данни относно степента на замърсяване са обособени 12 броя рискови зони. Като такива биват възприети всички области в работното звено, където съществува риск от замърсяване или пренос на цитотоксичния аналит. Отделно са определени анализируемите площи. Често при набирането на смивни проби се обособяват участъци с квадратура от 100 cm², отговаряща на средната повърхност на човешката длан. Такъв подход е приложен при Viegas et al. (2014), Sottani et al. (2017) и Verscheure et al. (2020). От друга страна, изследването на по-големи площи следва да дава по-точна информация относно състоянието на проблема с повърхностното цитостатично замърсяване. Поради тази причина, Larson et al. (2002), Touzin et al. (2009) и Merger et al. (2013) подготвят смивове, обхващащи 600 cm², като при Kopp et al. (2013) те достигат до 900 cm². Въпреки това, изследването на големи площи е свързано с разход на повече разтворители, а и поставя под въпрос сорбционния капацитет на материала за пробонабиране. Ето защо в настоящата работа е избран компромисния вариант на Schmaus et al. (2002) за изследване на предварително маркирани зони с площ 400 cm². Изключение прави по-малката повърхност на блюдото на аналитичната везна (63.6 cm²), което не представлява проблем, предвид факта че се покрива 100 % от изследвания обект.

Ефективността на процедурата по пробонабиране е оценена и от гледна точка на различните типове повърхност. В рамките на проучването са изследвани дванадесет участъка, вариращи по отношение на материала на изработка, релеф и порьозност. Въпреки това установихме, че двукратното пробонабиране с предварително напоен филтър и десорбирането на САР с вода се оказва достатъчно

ефективно за постигането на висок аналитичен добив, независимо от типа повърхност. Считаме, че това бива подпомогнато и от приложената техника на пробонабиране, взаимодействаща от ръководството за изследване на експозицията с тежки метали на Брукхайвънската национална лаборатория.

Подобно на други автори, оценихме ефективността на преаналитичния етап на база обявените от Администрацията по професионална безопасност и здраве допустими стойности на аналитичния добив. Независимо, че по-голямата част от изследваните в нашето проучване зони са неравни или са изработени от материал, който затруднява извличането на анализа, се оказва, че двукратното почистване с избраната от нас филтърна хартия е достатъчно да осигури високи стойности на възпроизводимост. Методичното пробонабиране способства за постигането на среден аналитичен добив при керамичните подови настилки (96.07 – 99.10 %), смолистите плотове (93.73 – 96.0 %), керамичния плот на химическата камина (96.9 – 99.8 %), както и стоманеното блюдо на аналитичната везна (97.6 – 100.1 %).

Получените резултати послужиха за картографиране на рисковите зони, респективно за насочване вниманието на аналитичния персонал към участъците с потенциален или доказан риск от замърсяване. Считаме, че представянето на данните по този начин следва да повиши комплаънса на работниците по отношение на мерките за безопасност и необходимостта от употреба на лични предпазни средства. На база интензитета на работа в изследваното звено е избран интервал за реализиране на мониторингови мероприятия (на около всеки 50 изследвани проби, съдържащи САР). Също така е въведено правило за извънредно изследване на експозицията в случаи на разлив, както и при съмнение за замърсяване на работните повърхности.

Основен недостатък на данните, получени от анализа на смивни проби е, че те не доказват наличието на цитостатици и/или техни метаболити в организма на работещия персонал. Реализирането на този тип методи по-скоро дава информация за замърсяването на работната среда, като потенциален източник на излагане. Въпреки това, според Connor et al. (2016) получените по този начин данни могат послужат за:

- ❖ оценка на ефикасността на инженерния и/или административния контрол за премахване или минимизиране на потенциалния контакт с цитотоксични агенти;
- ❖ превантивен скрининг за потенциална експозиция;
- ❖ подкрепа за цялостната програма за безопасно боравене с антинеопластици;
- ❖ определяне на базовите нива на замърсяване на повърхността;
- ❖ оценка на замърсяването на постъпилите в звеното материали;
- ❖ оценка на ефективността на хигиенните процедури;
- ❖ проверка на чистотата (например след разлив или извеждане от експлоатация на помощно оборудване).

От друга страна считаме, че изследването на смивни проби може да насочи ръководителя на дадено звено към необходимостта от провеждане на инвазивен биологичен скрининг на работния персонал. Нещо повече, при изясняването на количествените връзки между замърсяването на повърхностите и концентрациите открити в организма, може да се предотврати необходимостта от биологичен мониторинг. Разбира се извеждането на такава зависимост би било възможно единствено при изграждането на унифицирани стандарти за работа, на мерки за безопасност, както и на извършваните системни мониторингови програми.

Настоящата работа представя първото проучване на експозицията с антинеопластика САР в работни условия. Също така за пръв път цитостатичното натоварване е изследвано в научноизследователско звено. За разлика от него, всички докладвани в литературата аналитични процедури са апробирани в онкологични отделения или болнични аптеки, където медицинския персонал е в постоянен контакт с групата лекарства. Базирайки се на макар и ограничения световен опит, както и на получените от нас резултати, става ясно че течнокроматографския анализ, може да послужи успешно за надеждното количествено определяне на пролекарството в състава на смивни проби. Резултатите разкриват значима връзка между оценените от нас като рискови зони и установените стойности на замърсяване. Вследствие на това би могло да се заключи, че предложеният метод има потенциала да допълва мерките за безопасност на работното звено, предвид възможността за обективна оценка на установените хигиенни и предпазни мерки. Представената процедура следва да бъде от интерес за институции, при които се извършва рутинна

терапевтична, научноизследователска, производствена или друг тип дейност в контакт с антинеопластика. Във връзка с това, считаме за уместно да посочим, че въвеждането на предложената от нас методика в друго звено, следва да бъде предхождано от предварителна оценка на пригодността на процедурата, особено в случаите, в които се използва друг тип материал за пробонабиране; при които се изследват се друг тип повърхности; когато се използва друг десорбционен разтворител или ако се методиката се взаимства за определянето на друг цитотоксичен агент. Това следва да бъде съпроводено от дефиниране на целевите рискови зони, което да отразява обективно състоянието на проблема с цитостатичната експозиция.

3. Течнохроматографски метод за определяне на качествено и количественото съдържание на САР в състава на таблетни лекарствени форми

Една от целите на настоящия дисертационен труд е разработването на течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на САР в таблетни състави. Предложената аналитична процедура е съобразена с производствените спецификации и природата на лекарствената форма. По този повод са изпълнени оптимизационни задачи, касаещи преданалитичния и аналитичния етап на работа.

3.1. Оптимизация на преданалитичния етап

Пробоподготвителният етап включва извличане на САР от стрити на прах филмирани таблетки с помощта на абсолютен метанол. Изборът на разтворител е направен след обстойно проучване на физикохимичните характеристики на антинеопластика и помощните вещества. По този начин е постигнато пълно разтваряне на целевия аналит, при минимално извличане на съпътстващите компоненти на лекарствената форма.

В процеса на пробоподготовка е получена серия от тестови суспензии. Предвид изискванията за работа с хроматографския инструментариум, е реализирана процедура по филтруване, така че да се получат пречистени образци, подходящи за осъществяване на последващия химичен анализ. Във връзка с това е установено, че трикратното промиване на остатъчната утайка с равни порции от

10.0 mL метанол е достатъчно за осигуряването на сборни филтрати с висок аналитичен добив.

3.2. Оптимизация на аналитичния етап

Предизвикателствата в подбора на оптимални условия за анализ се пораждат от възможността за детектиране на съекстрахирани (в процеса на пробоподготовка) пречещи съединения. Това налага необходимост от разработване на достатъчно чувствителен и специфичен метод, който да осигурява добро разделяне на целевия аналит от евентуалните матрични компоненти в пробата.

В търсене на целесъобразен състав на мобилната фаза са проведени изпитвания, включващи вода, етанол и/или буферни разтвори. Въпреки това, пикове с най-добри характеристики са наблюдавани при използване на подвижна фаза със състав, идентичен на представения в точки IV.1. и IV.2. (метанол, дейонизирана вода и 1% воден разтвор на мравчена киселина). Във връзка с това, считаме, че предложеният хроматографски метод, освен ефективен, е подходящ за безопасното провеждане на рутинния анализ на САР във фармацевтични продукти.

В допълнение е направен сравнителен анализ на хроматограмите от всички методи, представени в настоящия дисертационен труд. Най-незначителен матричен ефект е установен именно при пробите от таблетни извлеци. Чистотата на образците ни предоставя възможност за съкращаване времето за анализ наполовина, спазвайки същите пропорции на разтворителите, при градиентен режим на работа.

Избраните условия за работа, както и физикохимичните свойства на изследвания антинеопластик, са причина за отхвърляне на първоначално тестваните хроматографски колони – LiChroCART® 125-3 HPLC-Cartridge, Purospher® STAR RP₁₈ (5 µm) и Thermo scientific Accuscore C₁₈ (100 mm x 4.6 mm, 2.6 µm). По тези причини методът е разработен с използване на специализирана колона Thermo scientific AQUASIL C₁₈ (150 mm x 4.6 mm, 5 µm), предпазена от предколона с идентичен пълнеж. Избраният хроматографски консуматив притежава производствени характеристики, осигуряващи стабилност при работа с мобилни фази с високо водно съдържание, както и при ниско рН.

Температурния режим, при който работят аутосемплерът и модулът, в който са поместени колоната и предколоната, е съответно

10 °C и 30 °C. Най-висока чувствителност на метода е наблюдавана при дължина на вълната на UV/VIS-детектора от 306 nm.

3.3. Аналитична надеждност на течнохроматографския метод

Данните, получени от анализа на серията стандартни и тестови разтвори на CAP са използвани за обща оценка на така предложения метод, както и за неговото валидиране.

3.3.1. Линеиност

С оглед на съдържанието на CAP в предлаганите на пазара таблетни лекарствени форми (от 150.0, 300.0 и 500.0 mg), линеиността на настоящия метод е оценена в концентрационния диапазон 0.1 – 500.0 µg/mL. Всяко концентрационно ниво е анализирано шесткратно, с цел получаване на максимално достоверни резултати.

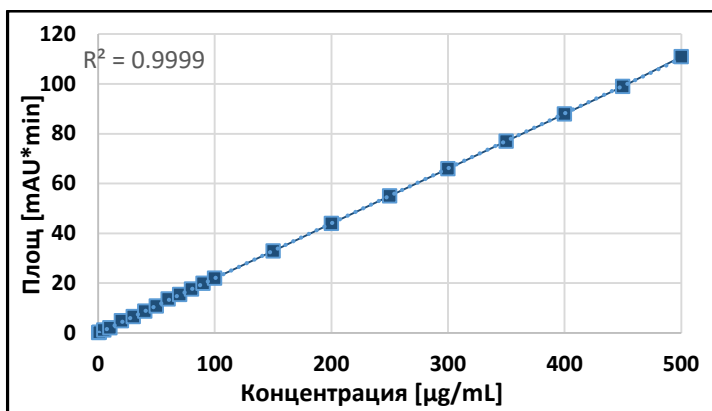
Графичната зависимост на детекторния сигнал от концентрацията на антинеопластика е изведена чрез определяне средно аритметичните стойности на съответните пикови площи (Фигура 27). Тя се описва с регресионно уравнение, имащо вида:

$$y = 0,2204x + 0,0141$$

където:

x – концентрация на CAP

y – аналитичен сигнал на детектора



Фигура 27. Калибрационна крива, получена при анализ на серия стандартни разтвори на CAP в концентрационен интервал 0.1 – 500 µg/mL

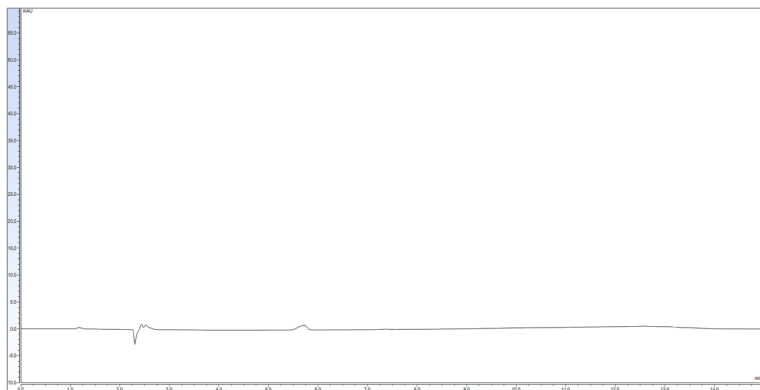
3.3.2. Граница на качествено и количествено определяне

Стойностите на сигнала от детектора на CAP, както и тези на базовата линия, са използвани за определяне границите на детектиране и на количествено определяне. В условията на нашия експеримент LOD и LOQ са съответно 0.03 µg/mL и 0.1 µg/mL.

3.3.3. Специфичност

Проучен е съставът на предлаганите на фармацевтичния пазар таблетни лекарствени форми, съдържащи CAP. При повечето продукти е докладвано използването на лактоза, микрокристална целулоза, талк и магнезиев стеарат. За да се определи валидационният параметър специфичност са приготвени „плацебо“ проби, съдържащи четирите помощни вещества. Пригответените образци са анализирани с помощта на предложения течнохроматографски метод. Резултатите са сравнени с хроматограмите, получени при анализ на тестовите таблетни проби, съдържащи CAP.

Фигура 28 представя хроматограма получена, при анализ на пригответената “плацебо” смес:



Фигура 28. Хроматограма на „плацебо“ проба

Очевидно, в процеса на пробоподготовка е възможно да се наблюдава извличане на съпътстващи вещества. Въпреки това, те са на достатъчно отстояние от пика на CAP – свидетелство за специфичността на метода.

3.3.4. Точност и прецизност

3.3.4.1. Точност

Отчетена е възможността за вариации в матричния ефект при анализ на САР, в зависимост от производителя на лекарствения продукт. Ето защо параметърът точност е определен по метода на стандартната добавка. Към серия проби от таблетен прах, с идентично съдържание на САР, са добавени нарастващи количества от стандартната субстанция на пролекарството, отговарящи на 50 %, 100 % и 150 % от целевата концентрация на анализа. Пригответените проби се подлагат на шесткратен течнохроматографски анализ. Чрез получените резултати е изчислен аналитичният добив, изразен в % (Таблица 18):

Таблица 18. Оценка на точността на хроматографския метод

	Концентрационно ниво		
	50 %	100 %	150 %
Проба 1	98.97	98.22	101.46
Проба 2	101.02	99.18	100.69
Проба 3	99.91	100.14	99.84
Средна стойност	99.97	99.18	100.66

От представените резултати става ясно, че изчисленият аналитичен добив на САР попада в интервала 99.18 % - 100.66 %.

3.3.4.2. Прецизност

Оценени са повтаряемостта (последователно шесткратно анализиране на три концентрационни нива, в рамките на деня, при едни и същи аналитични условия, от един оператор) и възпроизводимостта в рамките на лабораторията (последователно шесткратно анализиране на три концентрационни нива, в различни дни) (Таблица 19).

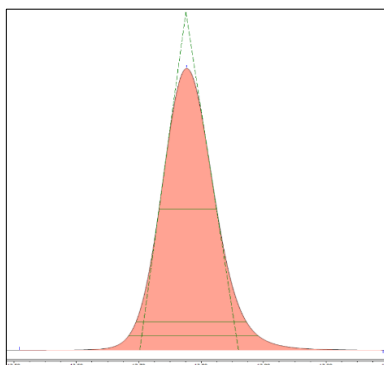
Таблица 19. Оценка на повтаряемостта и възпроизводимостта на хроматографския метод

Субстанция	Концентрация [µg/mL]	В рамките на един ден		В рамките на различни дни	
		SD	RSD [%]	SD	RSD [%]
САР	10	0.02025	0.2025	0.0105	0.1050
	60	0.07591	0.1265	0.0251	0.0418
	120	0.22511	0.1876	0.2543	0.2119

Изчислените RSD стойности са попадат в интервала 0.04 – 0.21 %.

3.3.5. Валидационни параметри, характеризиращи пригодността на системата за анализ

Проведени са тестове за определяне пригодността на системата за анализ за целите на проучвания, касаещи качествения контрол при таблетни състави, съдържащи САР. За целта е анализирана структурата на пика на антинеопластика (Фигура 29). Освен това са определени характеристиките на матричните пикове, както и стойността на мъртвото време на задържане (2.30 минути).



Фигура 29. Структура на пика на САР, при течнoхроматографски анализ на таблетни лекарствени форми

С помощта на събраните данни са изчислени валидационните параметри, представени в Таблица 20.

Таблица 20. Валидационни параметри, характеризиращи пригодността на системата за анализ

Параметър	Резултат
Фактор на задържане	4.6
Ефективност	106467
Резолуция	25.9
Фактор на симетрия	1.10
Селективност	3.1
Стабилност на разтвора при нормални условия (25°C)	36 h
Стабилност на разтвора при 4 °C	96 h
Стабилност на разтвора при 10 °C	72 h

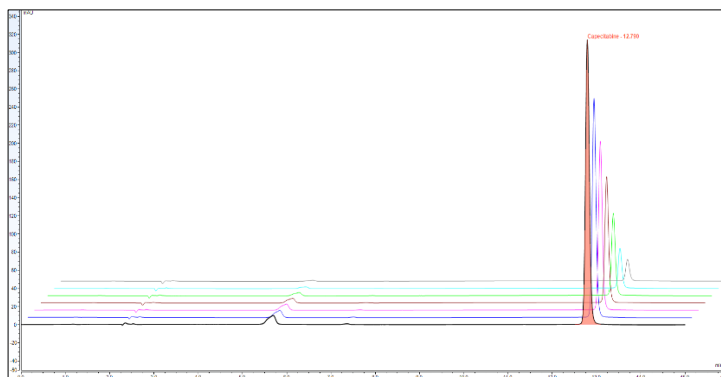
Резултатите сочат, че избраната система за анализ е пригодна за извършването на качествен и количествен анализ на САР в състава на таблетни лекарствени форми.

3.4. Аprobация на течнохроматографския метод

С цел апробиране на метода са извършени анализи на тестови проби от таблетна лекарствена форма на генеричен продукт, съдържащ 500.0 mg САР. Изследваното изделие представлява правилно съхранявани филмирани таблетки, с еднородна маса, които към момента на изследването са в срока на годност, обявен на опаковката.

Чрез подходящи разреждания на основния тестови разтвор (1.0 mg/mL) са приготвени образци, с концентрация на САР съответно 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0, 100.0 и 150.0 $\mu\text{g/mL}$. Всяко концентрационно ниво е подложено на трикратен течнохроматографски анализ, като получените резултати са сравнени с тези от анализа на стандартни разтвори със същата концентрация.

Концентрацията на лекарственото вещество в таблетната проба се изчислява чрез калибрационната крива, получена от серия изпитвания на стандартни разтвори на САР. Фигура 30 илюстрира хроматограмите на изпитваната серия тестови разтвори.



Фигура 30. Хроматограми на САР в изпитваната серия тестови разтвори, представени в перспектива

Установеното количество САР в тестовите проби (изчислено по метода на външния стандарт) е в диапазона 99.75 – 100.3 % спрямо посоченото върху опаковката на лекарствения продукт. Предвид точността и прецизността на разработеният течнохроматографски

метод, считаме че изследваната таблетна форма съдържа CAP в количества, отговарящи на обявената от производителя номинална стойност.

❖ *Заключение*

На база получените резултати, можем да заключим, че аprobационният етап е успешен, както и че представеният аналитичен протокол за работа може да бъде използван КК-изпитвания, удостоверяващи количественото съдържание на CAP в състава на таблетни лекарствени форми.

3.5. Обсъждане на резултатите

Действащото в България и Европейския съюз законодателство регламентира предоставянето на лекарства, задоволяващи изискванията за качество, ефикасност и безопасност. На тези три критерия следва да отговаря и обектът на настоящата работа – CAP, предлаган под формата на филмирани таблетки в доза 150 mg, 300 mg или 500 mg. Почти три десетилетия антинеопластикът се използва с успех в лечението на редица злокачествени заболявания, поради доказаната си ефективност и неинвазивен начин на прием. Въпреки това, грижейки се за онкологично болните си пациенти, здравните специалисти се сблъскват ежедневно с възможността да прилагат негодни за употреба лекарства. Такъв проблем може да възникне поради неспазване на добрите производствени практики, неправилно съхранение или фалшифициране на продукта.

Автентичните лекарствени продукти, съдържащи CAP, подлежат на рутинни изследвания за КК. Независимо от това, в световната практика са регистрирани случаи на отклонения от законовоизискуемите критерии, които поставят здравето и живота на пациентите в риск. В своето независимо проучване AlAmeri et al. (2012) установяват, че един от предлаганите на пазара генерични продукти, съдържащи пролекарството не отговаря на изискването за биоеквивалентност спрямо оригинала. През 2014 хърватската Агенцията за лекарствени продукти и медицински изделия съобщава за производствен дефект, при който таблетна форма на CAP с номинална доза от 150 mg, всъщност съдържа 500 mg. От друга страна, през 2019 година азиатски информационни източници алармират за разпространението на фалшив продукт, съдържащ антинеопластика. Във връзка с това, представители на местните здравни власти биват подведени под съдебна отговорност. Ето защо

считаме, че при съмнително ниска ефективност и/или токсична изява на даден лекарствен продукт, днес следва да се помисли не само за индивидуалните особености на пациента и неговото заболяване, но и за качеството на приемания лекарствен продукт.

Предвид изложените доклади, намираме проблема с терапевтичните и токсикологичните последици от приема на нискокачествени и/или фалшиви лекарствени продукти за особено актуален. При това е налице необходимост от разширяване обхвата и честотата на извършване на контролните лекарствени изпитвания. Аналитични тестове са нужни не само при допускане лекарствените продукти на пазара, но и когато те са част от терапии, даващи незадоволителни резултати, а също и когато са обект на нови предклинични, клинични и/или технологични проучвания. Освен това данните от токсикологичната практика разкриват още едно приложение на анализа на САР в състава на таблетни форми. Оказва се, че при отравяния с цитотоксичния агент връзката между клинициста и токсикохимичният аналитик е от жизненоважно значение, за установяване причинителя на токсичността, респективно за предприемането на последващо антидотно и/или поддържащо лечение.

Установихме, че аналитичните методи за качествено и количествено определяне на САР в състава на твърди дозирани форми е недостатъчен. От друга страна, в практиката, често се налага вътрелaborаторно разработване на нов метод за анализ на активните вещества поради: липса на достъп до метода за анализ посочен в разрешението за употреба; липса на фармакопейна монография; липса на идентичен аналитичен инструментариум. Ето защо разработването на точен, селективен и чувствителен протокол за анализ на САР в състава на лекарствени форми се превърна в цел на настоящата работа.

Поради неоспоримите си предимства, течнохромато-графските методи са най-често прилагания подход за анализ на САР в готови фармацевтични продукти. При изпълнението на поставените в настоящия труд задачи, избрахме разделителния метод, като го съчетахме с детекция в ултравиолетовата област. Освен това си поставихме за цел да предложим „зелена“ процедура, като алтернатива на представените в научната литература доклади, чиято мобилна фаза съдържа относително високи обемни съотношения на високотоксични разтворители. Първоначално изпитаните от нас

вода, етанол и/или калиевофосфатни буферни разтвори доведоха до получаването на несиметрични пикове на САР, което беше предотвратено чрез градиентното подаване на вода, 0.1 % разтвор на мравчена киселина и метанол, използвани от нас в предходни процедури. Оптимизираното съчетание на неподвижната фаза, температурния режим, скорост на потока и дължината на вълната на детектора, способстваха за постигането на висока чувствителност, както и съкращаване продължителността на метода. Това ни позволи да постигнем стойности на LOD и LOQ, надвишаващи тези на докладваните от Prakash et al. (2008), Pani Kumar et al. (2011), Devanboyina et al. (2013), Pujeri et al. (2013), Ravisankar et al. (2013), Sreevatsav et al. (2013) и Patil et al. (2015). Допълнително предимство на представения от нас метод е по-широкия работен обхват (от 0.1 до 500.0 $\mu\text{g/mL}$), като едновременно с това са покрити валидационните критерии за линейност - $R^2 = 0.9999$.

В сравнение с публикуваните течнохроматографски методи за определяне на САР в таблетни състави, разработената от нас процедура се отличава с добри стойности точността и прецизността. Това е от изключително значение, тъй като надеждността на аналитичните резултати има ключова роля в правилното и сигурно разрешаване на проблемите, свързани с реалното доказване на качеството на фармацевтичните продукти. Допълнително предимство на представения метод е способността му да отчете по недвусмислен начин наличието на САР в присъствието на най-често срещаните помощни вещества, влагани в оригиналния и генеричните продукти, съдържащи пролекарството. От направения обзор става ясно, че такива изпитвания не са провеждани в преобладаващата част проучвания.

Липсата на достъп до информация относно количествения състав на всички компоненти в продуктите, съдържащи САР, затруднява разработването на целесъобразен аналитичен метод способен да оцени количествено помощните вещества. Още едно ограничение на представената процедура е, че в нейния обхват не попадат евентуални онечиствания или деградационни продукти, които могат да се образуват при неправилно съхранение на продукта. Въпреки това, считаме че представеният аналитичен протокол може да бъде част от изпитвания за биоеквивалентност, мониториране количеството на САР в процеса на съхранение, както и при съмнение за произхода на продукта.

V. ИЗВОДИ

В резултат от проведените изследвания могат да бъдат направени следните изводи:

1. Течнохроматографски метод за качествено и количествено определяне на САР и 5-DFCR в проби от миша плазма

- ❖ Данните за интериндивидуална вариабилност на фармакокинетичните параметри на САР, както и възможността за възникване на CES2-свързана ГИ токсичност, създават необходимост от въвеждане на методи за количествена оценка на алтерациите в пусковия стадий от пролекарствената активация.
- ❖ Биоаналитичните хроматографски методи за количествено определяне и терапевтичен мониторинг на САР и/или неговите метаболити могат да послужат в проучвания, целящи да подобрят ефикасността и профила на безопасност на пролекарството.
- ❖ Разработеният HPLC метод се характеризира с висока аналитична надеждност и селективност, за точно количествено определяне на САР и неговия първи метаболит 5-DFCR в състава на плазмени проби от експериментални животни.
- ❖ Разработена е екологосъобразна и безопасна (за аналитичния персонал) процедура, основаваща се на ПП, за обработване на плазмени проби, от експериментални животни, третиран с САР.
- ❖ В условията на нашия експеримент, абсолютният етилов алкохол се явява най-удачен вариант за едновременно осъществяване на ПП и извличане на целевите анализи от плазмената фракция.
- ❖ Пробонабирането с вакутейнери, съдържащи EDTA.K₃ се явява най-оптималния вариант за отделяне на кръвна плазма, предвид наблюдавания висок аналитичен добив на САР и 5-DFCR.
- ❖ Комбинацията от процедури по време на преданалитичния етап способства за получаването на образци с минимално съдържание на съпътстващи матрични компоненти, което не компрометираща качествено или количествено определяне на САР и 5-DFCR.

- ❖ Високата аналитична надежност на резултатите, постигнати след оптимизация на пробоподготвителния и аналитичния етап са основание за използването на аналитичната процедура в предклинични проучвания, насочени към изследване потенциала на CES2-инхибитори да редуцират САР-обусловената ГИ токсичност.
- ❖ Предложения от нас HPLC метод може да се използва в рутинната изследователска практика за проучване на други аспекти на пусковия стадий от каскадата на активиране на САР.

2. Течнохроматографски метод за количествено определяне на професионалната експозиция с САР

- ❖ Системният мониторинг на повърхностното замърсяване с цитотоксични агенти представлява мярка за безопасност, целяща да предотврати възникването на остри и/или хронични усложнение при системна цитотоксична експозиция в работни условия.
- ❖ Широкото приложение на САР, заедно с нарастващия брой проучвания с негово участие, налагат необходимостта от въвеждане на надеждна аналитична процедура, която да допълва общоустановените мерки за безопасност
- ❖ Разработеният HPLC метод се характеризира с висока аналитична надежност и селективност за точно количествено определяне на САР в състава на смивни проби.
- ❖ Разработена е екологосъобразна и безопасна (за аналитичния персонал) процедура за пробонабиране и пробообработка на смивни образци, съдържащи САР.
- ❖ Комбинираният избор на материал за пробонабиране, десорбционен разтворител и техника на пробонабиране, способстват за постигане висок и възпроизводим аналитичен добив, независимо от характеристиките на изследваната повърхност.
- ❖ Аprobацията на разработената аналитична процедура послужи за успешно и обективното определяне на рисковите и високорисковите области в изследваното звено.
- ❖ Представената аналитична процедура следва да бъде от интерес за институции и здравни заведения, чиято рутинна работа

включва хронично излагане на работния персонал на цитостатика САР.

3. Течнохроматографски метод за определяне на качествено и количественото съдържание на САР в състава на таблетни лекарствени форми

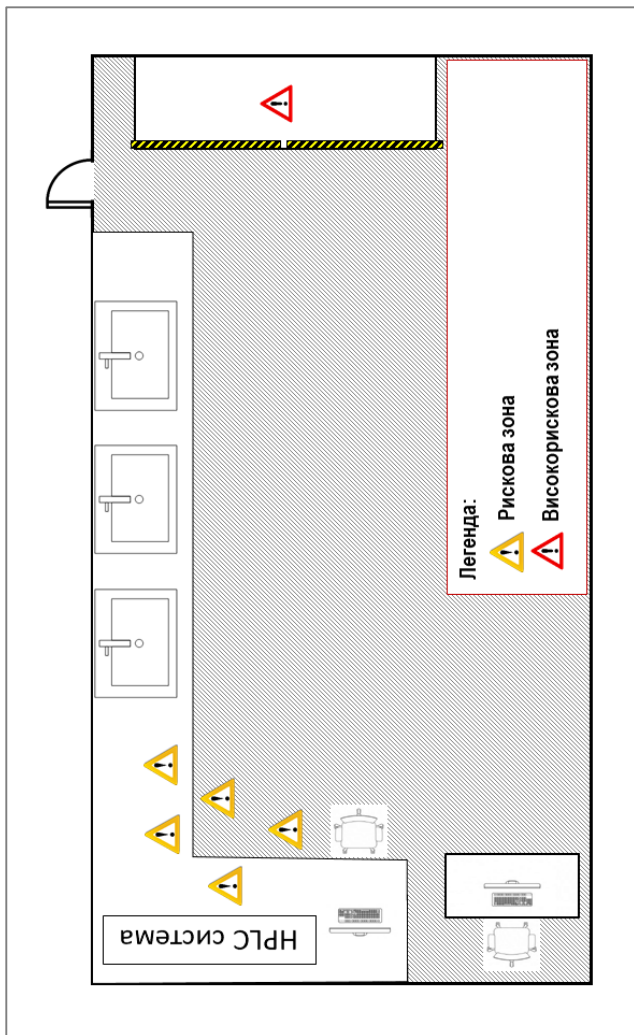
- ❖ Течнохроматографските методи за определяне на качествения и количествения състав на лекарствени форми, съдържащи САР, могат да послужат за предотвратяване на токсикологичните и терапевтичните последици от приема на нискокачествени и/или фалшиви лекарствени продукти.
- ❖ Недостатъчният брой аналитични процедури, липсата на достъп до методите за анализ, посочени в разрешението за употреба, както и възможността за вариации в аналитичния инструментариум налагат въвеждането на нови екологосъобразни методи за качествено и количествено определяне на САР в състава на таблетни лекарствени форми.
- ❖ Разработеният HPLC метод се характеризира с висока аналитична надеждност и селективност, за точно качествено и количествено определяне на САР в състава на таблетни лекарствени форми.
- ❖ Аprobацията на разработената аналитична процедура послужи успешно при определяне съдържанието на САР в състава на генеричен лекарствен продукт, наличен на българския пазар.
- ❖ Представеният аналитичен протокол следва да бъде от полза при изпитвания за КК, биоеквивалентност, мониториране количеството на САР в процеса на съхранение, както и при съмнение за произхода на продукта.

VI. ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН НАУЧЕН, НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН И ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР:

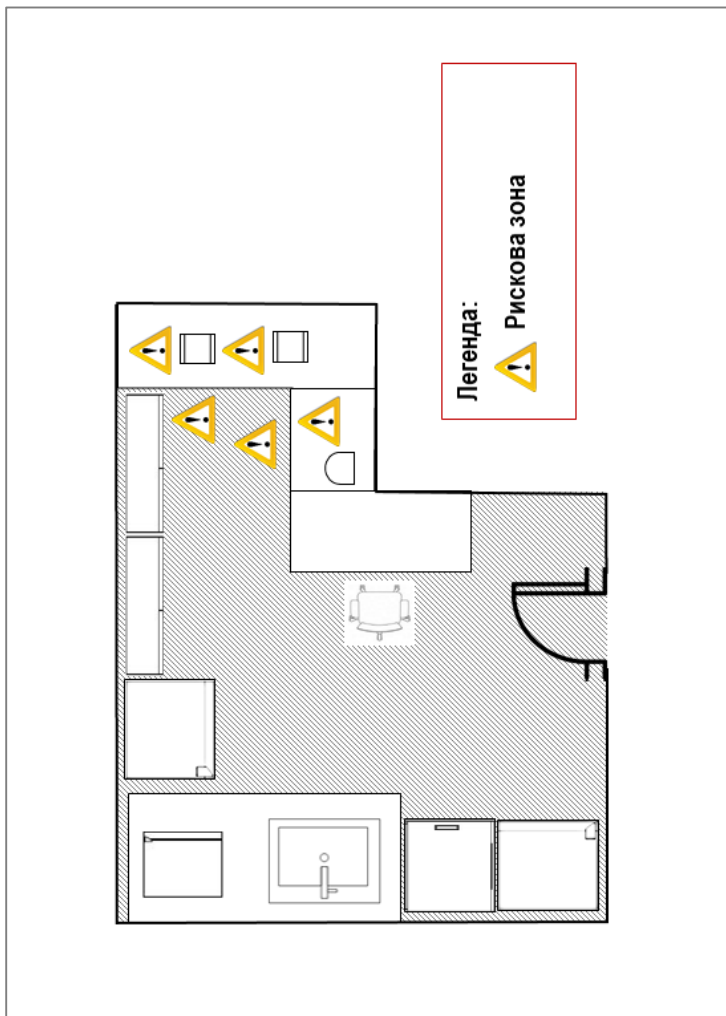
- ❖ За пръв път е разработен и валидиран HPLC базиран модел, насочен към определянето на субстрата и продукта на ензима CES при експериментални животни, третирани с CAP.
- ❖ Потвърдена е ефикасността на ПП в подготовката на биологични проби от експериментални животни, третирани с CAP.
- ❖ За пръв път в проучване, насочено към количествения анализ на CAP в биологични проби, се изследва и доказва влиянието на вакутейнерния антикоагулант върху аналитичния добив на пролекарството и неговия метаболит 5-DFCR.
- ❖ Поставени са основите за бъдещи предклинични изследвания, с помощта на които би могло да се провери потенциала на селективни CES2 природни и лекарствени инхибитори да редуцират CAP-обусловената ГИ-токсичност.
- ❖ За пръв път е разработен и валидиран HPLC метод за качествено и количествено определяне на CAP в състава на смивни проби от работна среда. Представеният работен протокол следва да допринесе за разширяване на познанията относно дозозависимите ефекти на хронична цитостатична експозиция при здрави хора.
- ❖ За пръв път в България е проведен мониторинг на цитостатичното повърхностно замърсяване в работни условия.
- ❖ Разработен и валидиран е алтернативен HPLC метод за качествено и количествено определяне на CAP в състава на лекарствени форми. Предложеният аналитичен подход следва да бъде от помощ при съмнения, свързани с качеството и ефективността на продукти, съдържащи пролекарството.
- ❖ Потвърдено е, че течнохроматографските методи за определяне на CAP и/или неговите метаболити в състава на биологични и небιологични проби притежават необходимата висока аналитична надеждност.
- ❖ За пръв дизайнът на преданалитичните и аналитичните процедури за определяне на пролекарството и/или 5-DFCR е конструиран с оглед безопасността на аналитичния персонал, както и изискванията на съвременната екотоксикология.

VII. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Рискови зони в научноизследователската лаборатория за течнохроматографски анализ



Приложение 2. Рискови зони в пробоподготвителната стая



VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ

1. **Stoeva S, Kolev I, Sabeva Y.** DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NEW RAPID AND SIMPLE HPLC-UV METHOD FOR ASSAY OF CAPECITABINE IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS. Сборник статии от Национална научна конференция „15 години фармация в Медицински университет – Пловдив. 2018; 45-50.
2. **Stoeva S, Conev N, Marinov P.** THE ROLE OF CARBOXYLESTERASE ENZYMES IN CAPECITABINE THERAPY. Scripta Scientifica Pharmaceutica. 2020; 7(1): 7-11.
3. **Stoeva S, Marinov P.** Analytical protocol for monitoring of workplace surface contamination with Capecitabine. Current Pharmaceutical Analysis. 2021; 17: 1. <https://doi.org/10.2174/1573412917666201217164305>. IF: 0.923

УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД, ПРЕДСТАВЕНИ НА НАЦИОНАЛНИ И МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Stoeva S, Kolev I, Sabeva Y.** - DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NEW RAPID AND SIMPLE HPLC-UV METHOD FOR ASSAY OF CAPECITABINE IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS. Национална научна конференция „15 години фармация в Медицински университет – Пловдив“ - 01 – 03 юни 2018 г., гр. ДЕВИН (Спечелено I място в секция „фармацевтични науки“).
2. **Stoeva S, Sabeva Y.** - Theoretical foundations of therapeutic drug monitoring. Пети фармацевтичен бизнесфорум с научно-практическа конференция, октомври 2018 г., гр. Варна.
3. **Stoeva S, Sabeva Y.** - Therapeutic drug monitoring in the field of oncology. Пети фармацевтичен бизнесфорум с научно-практическа конференция, октомври 2018 г., гр. Варна.
4. **Stoeva S, Kolev I, Sabeva Y.** - Възможности за повишаване ефективността на химиотерапията с Capecitabine. 28 години клинична токсикология във военноморска болница – Варна. 10 декември 2018 г., гр. Варна.
5. **Stoeva S, Marinov P.** - Reduction of gastrointestinal toxicity of Capecitabine via CES2 inhibitors of natural origin” в 4 th International

conference on natural products utilization: From plants to pharmacy shelf. 29.05 – 01.06.2019 г., к. к. Албена.

6. **Stoeva S**, Kolev I, Marinov P. - Development of an analytical procedure for qualitative and quantitative determination of Cаресitabine in plasma. Шести Фармацевтичен Бизнес Форум и Научно-практическа конференция под надслов “Фармацевтичното образование – знания за практиката. 25.10 – 27.10.2019 г., гр. Варна (Спечелено III място).
7. Hadzhieva N, **Stoeva S**, Kolev I. - Synthesis and structure characterization of new iodo-functionalized 5'-deoxy-5'-fluorocytidine analogues. Шести Фармацевтичен Бизнес Форум и Научно-практическа конференция под надслов “Фармацевтичното образование – знания за практиката. 25.10 – 27.10.2019 г., гр. Варна.

IX. УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- ❖ **„Изследване влиянието на специфични карбоксилестер-разни инхибитори върху ефективността на химиотерапията с *Saracitabine*“, съвместен научен проект (2019 г. – днес) на Катедра Фармакология, токсикология и фармакотерапия (към Фармацевтичен факултет на МУ-Варна) с Институт по Експериментална Морфология, Патология и Антропология с Музей (към Българска академия на науките, гр. София).**
- ◆ Научен ръководител: Проф. д-р Петко Пенков Маринов, д. м.
- ◆ Институционално финансиране: Фонд „Наука“ към Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ гр. Варна

Х. БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам сърдечни благодарности към научните си ръководители проф. д-р Петко Маринов и доц. Антоанета Цветкова за напътствията и професионализма в осъществяването на дисертационния труд. Те ме въведоха в интересната научна тематика и споделиха своите опит и знания.

Благодаря на доц. Илиян Колев, на доц. Юличка Събева и на колегите от Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“ за подкрепата и оказаната безрезервна помощ!

Благодаря на доц. Иван Илиев от Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей при БАН за помощта в осъществяването на биологичните експериментални проучвания.

На моето семейство за обичта и търпението!!!