



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOTECNOLOGIE MEDICHE E BIOLOGIA MOLECOLARE

XXII CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

Sviluppo di un metodo per il dosaggio plasmatico del busulfan mediante HPLC-ESI-  
MS/MS in studi di farmacocinetica su pazienti talassemici

Marialuisa Casella

A.A. 2009/2010

Docente Guida/Tutor: Prof. Giorgio Federici

Coordinatore: Prof. Giorgio Federici

# INDICE

1	INTRODUZIONE.....	2
1.1	Scopo .....	2
1.2	Il Busulfan.....	4
1.3	Farmacocinetica del busulfan.....	7
1.4	Tecniche analitiche comunemente utilizzate per il dosaggio del busulfan.....	11
1.5	La Spettrometria di Massa .....	13
2	SVILUPPO E VALIDAZIONE DEL METODO PER IL DOSAGGIO DEL BUSULFAN IN LC-MSMS .....	18
2.1	PARTE SPERIMENTALE.....	18
2.1.1	Reagenti e materiali .....	18
2.1.2	Standard di calibrazione e controlli di qualità.....	19
2.1.3	Procedura di estrazione dei campioni. ....	19
2.1.4	Strumentazione HPLC/ESI-MS/MS .....	20
2.1.4.1	Condizioni dello spettrometro di massa. ....	20
2.1.4.2	Condizioni cromatografiche. ....	25
2.2	VALIDAZIONE DEL METODO.....	26
3	ELABORAZIONE FARMACOCINETICA DEI RISULTATI.....	28
4	CONCLUSIONI.....	29
5	BIBLIOGRAFIA.....	31

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Scopo

Le talassemie sono un gruppo eterogeneo di anemie a carattere ereditario autosomico recessivo causate da diverse mutazioni a carico dei geni delle catene proteiche (le globine) dell'emoglobina. A causa di questa mutazione può essere totalmente assente o fortemente ridotta la sintesi della catena globinica corrispondente. In altri casi invece il difetto genico può determinare la formazione di una catena globinica instabile o con scarsa affinità per le catene complementari. Il risultato finale è comunque simile e cioè un squilibrio nei normali rapporti di sintesi dell'emoglobina, con presenza all'interno dell'eritroblasto di grandi quantità di catene libere e nel globulo rosso maturo di una minore quantità di emoglobina. Le diverse sindromi che si vengono a creare vengono distinte sulla base della catena globinica la cui sintesi viene alterata. In tal modo la sintesi della catena  $\alpha$  è ridotta nella  $\alpha$ -talassemia, la catena  $\beta$  nella  $\beta$ -talassemia, la sintesi di  $\delta$  e  $\epsilon$  nella  $\delta/\epsilon$ -talassemia, e così via.

Le  $\beta$ -talassemie sono diffuse soprattutto nelle popolazioni di origine mediterranea, africana e asiatica, situata in una fascia tropicale e subtropicale estesa dal Mediterraneo al sud-est Asiatico (soprattutto India, Bangladesh, Pakistan e Cina) (Figura. 1).



Figura 1. Rappresentazione schematica delle aree di maggior diffusione delle talassemie nel mondo.

Il trattamento palliativo della malattia comporta la trasfusione periodica del paziente ogni due-tre settimane e il trattamento quotidiano con un farmaco chelante del ferro. Poiché la talassemia è una malattia progressiva, con deterioramento di organi rilevanti (fegato,

cuore) il trattamento palliativo non evita la morte precoce che normalmente interviene intorno ai 15-20 anni di età. L'unica cura radicale è il trapianto di midollo osseo, che sostituisce l'organo emopoietico (il midollo appunto) con quello di un donatore sano e geneticamente compatibile.

Il protocollo terapeutico pre-impianto prevede l'uso di farmaci come il busulfan (14 mg/kg in 4 giorni) e la ciclofosfamida (200 mg/kg in 4 giorni) al fine di indurre una aplasia midollare completa e creare così il terreno ideale per l'impianto delle nuove cellule da trapiantare. La complicanza maggiore che si può verificarsi a seguito del trattamento con il busulfan è rappresentata da sindromi veno occlusive epatiche (VOD), oltre alla tossicità polmonare.

Studi effettuati in diversi centri di trapianto di midollo osseo hanno indicato che questo farmaco possiede una finestra terapeutica piuttosto stretta, difatti un basso dosaggio può causare il fallimento del trapianto mentre un sovradosaggio è sorgente di VOD.

Nell'ambito del monitoraggio terapeutico (TDM) del busulfan, e quindi della valutazione dell'esposizione ideale del chemioterapico, è considerato un indicatore di monitoraggio l'AUC (Area Under Curve ó Area Sotto la Curva) che corrisponde all'area relativa alla concentrazione plasmatica rispetto al tempo.

Negli ultimi anni, le tecniche di più largo impiego per il dosaggio plasmatico del busulfan si sono basate sulla gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) o alla rivelazione a cattura elettronica (GC-ECD). Anche la cromatografia liquida con rivelazione a ultravioletti (HPLC-UV) ha rappresentato una tecnica alternativa per la quantificazione di questo farmaco.

Scopo di questo lavoro è lo sviluppo di un metodo analitico basato sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa, con sorgente elettrospray (HPLC-ESI-MS/MS), con l'obiettivo di elaborare un metodo analitico caratterizzato da parametri di sensibilità, specificità e precisione tali da poter essere applicato ai fini clinici per il TDM del busulfan.

I campioni di plasma di pazienti pediatrici affetti da talassemia e sottoposti a trapianto di midollo osseo e quindi trattati con busulfan, sono forniti dall'Istituto Mediterraneo di Ematologia (IME) di Roma.

## 1.2 Il Busulfan

Il busulfan (1,4-butanediol dimetansolfonato, Peso Molecolare = 246 uma, Figura.2) è un potente agente citotossico e agente alchilante bifunzionale. In soluzione acquosa, si idrolizza rilasciando i gruppi metansolfonati, producendo carbocationi in grado di alchilare il DNA causando l'effetto citotossico.

Il busulfan è indicato, in associazione alla ciclofosfamide, come trattamento di condizionamento precedente al trapianto di cellule emopoietiche progenitrici (HPCT, Haematopoietic Stem Cell Transplantation) in soggetti di qualunque età anche in quella pediatrica. L'effetto della somministrazione di busulfan è una profonda mielosoppressione.

Le condizioni standard per la somministrazione orale di questo farmaco consistono in 16 dosi di 1 mg/kg somministrate ogni 6 ore per quattro giorni [Copelan EA *et al.* 1991, Geller *et al.*,1989 RB, Lu C *et al.*, 1984].

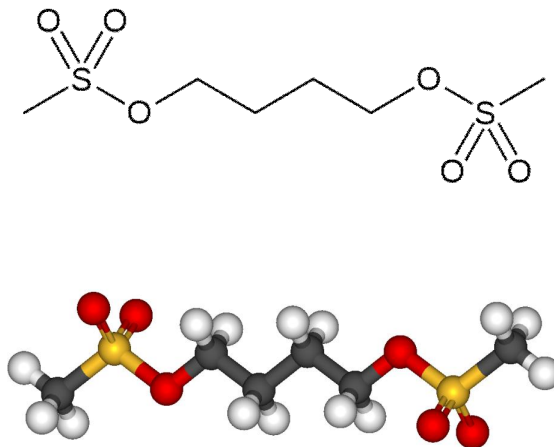


Figura 2. Formula di struttura del busulfan e sua rappresentazione tridimensionale.

Per quanto riguarda il suo metabolismo, il busulfan viene principalmente metabolizzato tramite coniugazione con il glutatone (attraverso la glutatone-S-trasferasi), il glutatone coniugato è poi ulteriormente metabolizzato dal fegato mediante ossidazione. Si pensa che nessuno dei metaboliti contribuisca significativamente all'efficacia o alla tossicità.

Il monitoraggio terapeutico dei farmaci (TDM) è utilizzato nella pratica clinica per l'ottimizzazione del trattamento terapeutico con svariati farmaci [Baccini C, 1993]. Attualmente gli agenti chemioterapici sono somministrati in base alle caratteristiche corporee del paziente e nonostante questa dose sia già personalizzata, l'efficacia clinica e

la tossicità della terapia variano notevolmente da un paziente all'altro. In parte, le variazioni farmacodinamiche possono essere spiegate in base a variazioni farmacocinetiche (variazioni nella velocità e nel grado di assorbimento, distribuzione, metabolizzazione ed eliminazione) [Ratain et al., 1990].

Negli studi in cui si cerca di ottimizzare la dose somministrata in base alla farmacocinetica, si devono innanzitutto definire i parametri di riferimento; spesso le concentrazioni plasmatiche (o sieriche) della quota totale del farmaco vengono considerate come unico parametro; in certi casi si considera la quota libera del farmaco, poichè questa è meglio correlata con l'effetto farmacodinamico [Conti M et al., 2005].

Per quantificare l'esposizione sistemica vengono utilizzati vari parametri. Spesso si utilizza l'Area Sotto la Curva (AUC) delle concentrazioni plasmatiche in funzione del tempo; nel caso di infusioni continue o croniche si utilizza, spesso, la concentrazione plasmatica allo stato stazionario ( $C_{ss}$ , la concentrazione di un farmaco o sostanza chimica in un fluido corporeo, di solito plasma, allo stadio stazionario si raggiunge quando velocità di somministrazione e di eliminazione si eguagliano).

I valori di AUC devono essere confrontati con un cosiddetto intervallo terapeutico, determinato da studi preliminari di efficacia/tossicità. I valori dei parametri al di sotto del limite inferiore dell'intervallo corrisponderanno a dosi per cui il farmaco diventa inefficace, mentre i valori dei parametri al di sopra del limite superiore dell'intervallo, corrisponderanno a dosi che inducono una certa tossicità.

Quando i valori del parametro di esposizione ricadono all'interno dell'intervallo terapeutico, un'efficacia terapeutica maggiore sarà associata a effetti collaterali minori.

Il busulfan possiede una finestra terapeutica piuttosto stretta, un sovradosaggio può comportare l'incremento del rischio di sviluppare un danno epatico veno-occlusivo (VOD), mentre una concentrazione troppo bassa può comportare il rigetto del trapianto [Slattery JT et al. 1995; Grochow LB et al. 1989, Dix SP et al. 1996].

Grochow et al, 1993 riportano un incremento di VOD in pazienti con valori di AUC superiori a 1500  $\mu\text{M}\cdot\text{min}$  e una riduzione di tale rischio per quei pazienti per i quali è stata effettuata la correzione della dose tale da rientrare nel range 900-1500  $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ .

(Vedi figura 3).

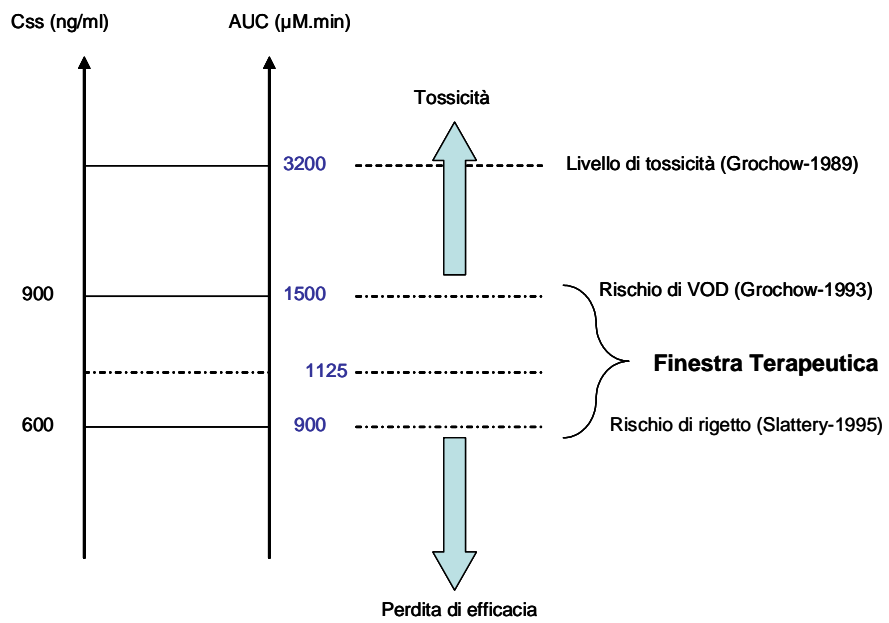


Figura 3. Finestra terapeutica del busulfan.

### 1.3 Farmacocinetica del busulfan

La farmacocinetica (studio dell'assorbimento, della distribuzione e della eliminazione dei farmaci) del busulfan viene monitorata attraverso alcuni parametri quali  $C_{max}$  (concentrazione massima osservata),  $T_{max}$  (tempo al quale si osserva la massima concentrazione) e AUC (Area sotto la curva). Vedi figura 4.

Il calcolo dell'Area sotto la curva (Area Under Curve, AUC) del busulfan in funzione del tempo è il parametro utilizzato per monitorare se il farmaco si trovi all'interno della finestra terapeutica. Questo valore viene determinato mediante la regola del trapezio scindendo l'area in vari trapezi, calcolandone l'area e facendone poi la sommatoria (vedi figura 5).

Il primo giorno l'AUC viene calcolato come  $AUC_{0-\infty}$  utilizzando la regola trapezoidale fino all'ultimo punto dosato (vedi figura 6) e stimando l'area dall'ultimo punto fino all'infinito mediante la costante di eliminazione ( $K_{el}$ ) ottenuta dal Log della concentrazione del busulfan in funzione del tempo [ Gibaldi M., Terrier D, 1982].

I successivi 3 giorni il calcolo dell'AUC viene effettuato semplicemente con la regola del trapezio nell'arco delle sei ore ( $AUC_{0-6}$ ), correggendo eventualmente la dose al fine di far rientrare i valori nella finestra terapeutica di sicurezza.

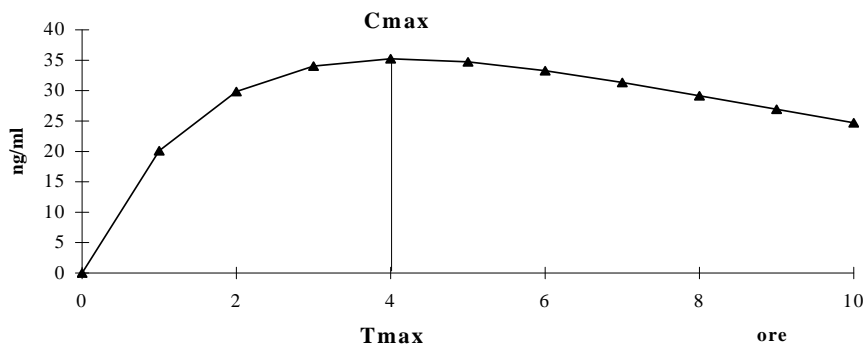


Figura 4. Il tempo di picco ( $T_{max}$ ) e la concentrazione di picco ( $C_{max}$ ) si ottengono direttamente dalla serie dei dati relativi ai singoli soggetti.



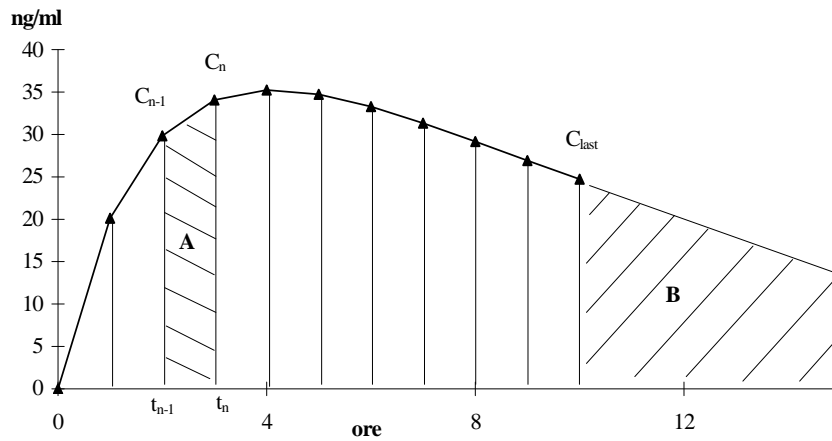


Figura 5. L'area del trapezio A è:  $(C_{n-1} + C_n) \times (t_n - t_{n-1}) / 2$ . La parte di area estrapolata ad infinito ( B ) si calcola dalla Kel :  $Kel = [\ln C_n - \ln C_{n-1}] / (t_n - t_{n-1})$ . Le dimensioni della AUC sono sempre date da *tempo x concentrazione* e nell'esempio riportato si avrà:  $AUC = ng \times h \times ml^{-1}$  oppure  $\mu M \times min$ .

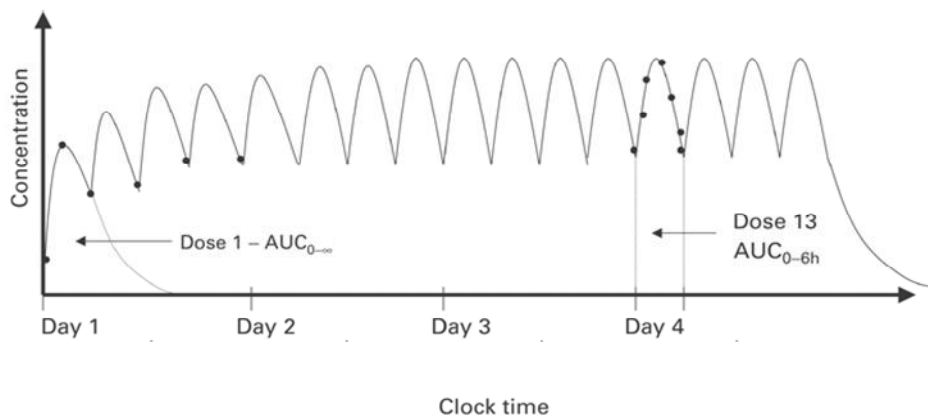


Figura 6. Rappresentazione grafica delle AUC nei 4 giorni di somministrazione del busulfan, il primo giorno si calcola  $AUC_{0-\infty}$  e nei giorni successivi  $AUC_{0-6h}$  secondo la regola trapezoidale. Da Bouligand et al., 2003.

Generalmente, le farmacocinetiche dei farmaci somministrati per via orale sono estremamente variabili soprattutto in pazienti pediatrici e sono correlate alla variabilità dell'assorbimento e alla clearance [ Hassan M *et al.*, 1991; Grochow LB, 1993, Tran HT *et al.*, 2000].

I primi studi effettuati su pazienti pediatrici, ai quali veniva fornita una somministrazione per via orale di busulfan uguale a quella fornita agli adulti (16 mg/kg) hanno evidenziato un aumento di rigetto dei trapianti rispetto agli adulti, una diminuzione di tossicità, aumento di recidiva neoplastica [Vassal G et al., 1989; Vassal G, et al., 1993]. questa estrema variabilità dipende dall'età, dai ritmi circadiani, farmaci e condizioni epatiche pre-trapianto.

Le proprietà farmacocinetiche del busulfan sono state diffusamente studiate per il busulfan somministrato per via orale; la farmacocinetica per via endovenosa è stata studiata su 124 pazienti valutabili dopo una infusione endovenosa di 2 ore per un totale di 16 dosi in 4 giorni. Si è ottenuta una disponibilità immediata e completa della dose di busulfan; una simile esposizione ematica è stata osservata quando si sono paragonate le concentrazioni plasmatiche nei pazienti trattati con questo farmaco per via orale ed endovenosa rispettivamente alle dosi di 1 mg/kg e 0.8 mg/kg. È stata confrontata (vedi figura 7) la dose 1 del busulfan somministrata oralmente con la dose 9 via endovena nello stesso paziente: i profili farmacocinetici dei pazienti trattati via endovena sono più consistenti di quelli per via orale [Lai A, et al. *Orphan Medicals Inc., Study report: Amendment 4 from OMC-BUS4-IRPF Code: F60002 IN C021*].

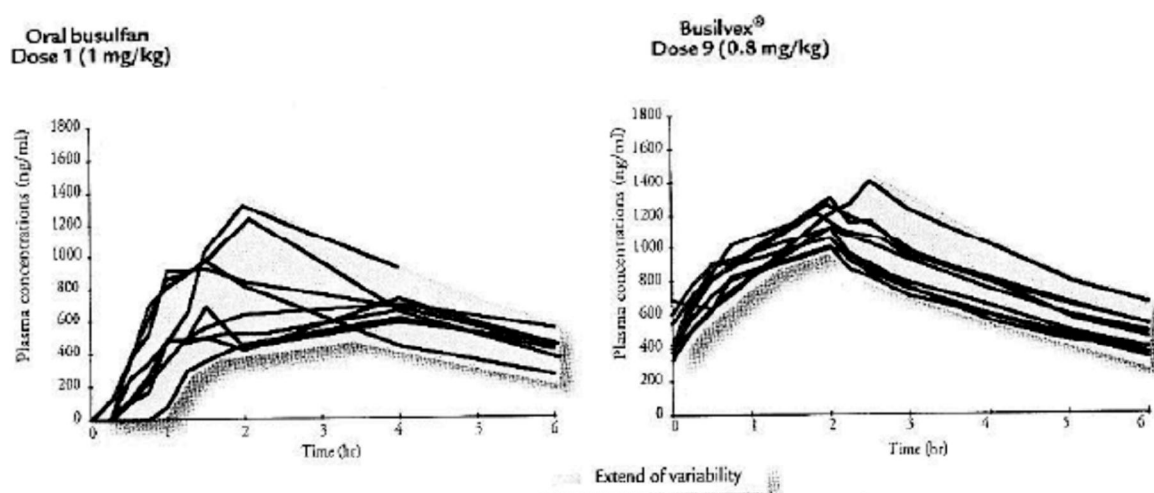


Figura 7. Confronto tra esposizione plasmatica orale ed endovenosa di busulfan.

Quindi la somministrazione endovenosa del busulfan permette di superare gli inconvenienti generati dalla somministrazione orale del farmaco; l'elevata variazione del processo di assorbimento dovuta all'incompleta dissoluzione delle compresse del farmaco, alla variabilità biologica dell'assorbimento intestinale e al vomito possono essere infatti evitate [Hassan et al., 1994]. Inoltre, il processo di assorbimento a seguito della somministrazione orale interessa il fegato aumentando i rischi di VOD, mentre la somministrazione endovena non coinvolge il fegato. Questo approccio ha portato a una diminuzione dell'incidenza di VOD dal 75% al 18% [Grochow LB, 1993].

Riassumendo, l'elevata variabilità di assorbimento del farmaco (causata da fenomeni di malassorbimento intestinale o vomito) può essere drasticamente abbattuta dalla somministrazione intravena del busulfan (i pazienti ricevono 16 dosi da 0,8 mg/kg ogni 6 ore con una infusione di 2 ore, per 4 giorni consecutivi).

Molti autori hanno suggerito che nei bambini il dosaggio del busulfan basato sul monitoraggio terapeutico attraverso l'AUC, può determinare la massima esposizione sistemica del busulfan minimizzandone la tossicità [ Yeager AM, et al., 1992, Schuler U, et al. 1994].

La finestra terapeutica ottimale non deve assumere valori di AUC superiori a 1500 µM.min e si interviene correggendo la dose in modo che l'AUC rientri nel range 900-1500 µM.min [Grochow et al,1993; Slattery et al., 1995].

La correzione della dose (corretta sulla base dei valori di concentrazione plasmatica) tiene conto del dato di AUC determinato a seguito della dose somministrata e della AUC Target (1125 µM.min); la relazione utilizzata per questo calcolo è:

$$\text{Dose corretta (mg)} = (\text{Dose somministrata} \times \text{AUC Target}) / \text{AUC determinata}$$

Nel laboratorio di Biochimica Metabolica del Policlinico di Tor Vergata, in collaborazione con l'Istituto Mediterraneo di Ematologia (IME) è stata messo a punto un metodo basato sulla spettrometria di massa per effettuare in modo rapido, accurato e preciso la determinazione plasmatica del busulfan in pazienti in età pediatrica, affetti da talassemia, sottoposti a chemioterapia prima del trapianto di midollo osseo.

## 1.4 Tecniche analitiche comunemente utilizzate per il dosaggio del busulfan

La necessità di dosare in modo accurato e sensibile, nell'ambito del monitoraggio terapeutico, il busulfan in modo tale da minimizzare gli effetti collaterali dovuti ad una sovrastima oppure a una sottostima della dose del farmaco, ha portato molti ricercatori ad individuare un metodo analitico adeguato a tale scopo fin dagli anni 80.

L'impiego della gas cromatografia (GC) è stato ampiamente diffuso; lo sviluppo di metodi basati sulla rivelazione mediante cattura elettronica (ECD) [Chen TL et al., 1988; Embree L et al., 1993; Burns RB et al., 1995] e mediante accoppiamento con spettrometria di massa (GC-MS) [Hassan M Ehrsson H, 1983; Vassal G et al., 1988] offrono elevata sensibilità ma costi di analisi elevati legati alla strumentazione impiegata e tempi di analisi piuttosto lunghi dovuti alla fase di derivatizzazione dell'analita.

Il busulfan è un composto molto polare con una bassa assorbanza nell'UV. Henner et al. [1987] hanno pubblicato un metodo per la determinazione del busulfan basato su una metodica con HPLC con derivatizzazione con dietilditiocarbammato (DDTC); Quernin et al [1998,1999] hanno messo a punto una metodica basata su due estrazione con toluene e derivatizzazione con 2,3,5,6-tetrafluorotiofenolo (TFTP) e rivelato mediante HPLC con UV con una corsa cromatografica di 40 minuti, la stessa procedura, ad eccezione dell'estrazione effettuata con acetato di etile è stata adottata per un metodo in GC-MS. Entrambi i metodi risultano essere sensibili ma richiedono almeno due ore per la fase di derivatizzazione, e, per il primo metodo, l'impiego di toluene, estremamente tossico.

Jenke et al. [2004] hanno messo a punto un metodo sensibile ma piuttosto laborioso basato sulla derivatizzazione precolonna del busulfan a 1,4-diiodobutano e rivelazione UV degli ioni ioduro generati da una dissociazione fotochimica dei derivati.

Quernin et al [2001] hanno eliminato lo step di derivatizzazione e hanno presentato un metodo rapido e sensibile basato su una estrazione liquido-liquido con acetato di etile e la determinazione attraverso l'accoppiamento della cromatografia liquida alla spettrometria di massa (LC-MS); tuttavia il metodo richiede ancora una lunga separazione cromatografica (10 minuti).

Zuccaro et al. (1992) hanno descritto un metodo LC-MS basato sull'evaporazione di particelle beam (l'eluente proveniente dalla colonna HPLC viene trasformato in aerosol all'interno di un nebulizzatore, l'aerosol viene desolvato in una camera riscaldata e le molecole di analita in esso presenti vengono selezionate da un sistema di skimmer per

l'ingresso nello spettrometro di massa) con ionizzazione ad impatto elettronico; e sebbene la sensibilità sia buona (LOQ = 100 ng/ml), questo tipo di sistema LC-MS risulta essere troppo laborioso ai fini della routine di un laboratorio.

Oliveira et al., 2005 hanno sviluppato un metodo sensibile e specifico mediante HPLC-ESI/MS/MS utilizzando però una procedura laboriosa per la sintesi dello standard interno (1,6-bis(metansolfonilossi)-esano).

Il metodo oggetto di questo studio, oltre a basarsi su una analoga rapida estrazione liquido-liquido dell'analita mediante acetato di etile, possiede il vantaggio di risolversi in una breve corsa cromatografica (la separazione cromatografica avviene in meno di due minuti), una elevata sensibilità e selettività fornita dalla frammentazione massa-massa (LC-MS/MS) che permette l'univoca identificazione dell'analita.

Inoltre, in questo metodo, si utilizza uno standard interno simile all'analita (eccezione fatta per otto atomi di idrogeno sostituiti da altrettanti di deuterio) e che quindi effettua una accurata correzione dei risultati analitici in funzione della variabilità di effetti delle condizioni fisiche di esercizio della strumentazione e della variabilità delle rese di estrazione.

## 1.5 La Spettrometria di Massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica utilizzata per identificare prodotti incogniti, per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole e per determinazioni quantitative di composti noti. Permette di rilevare le molecole in base al loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ) e può essere utilizzata in vari campi che vanno dall'analisi farmaceutica alle applicazioni in campo forense. Con tale tecnica è possibile effettuare sia analisi qualitative che quantitative e, almeno dal punto di vista teorico, ogni molecola, poiché possiede una massa, può essere analizzata con uno spettrometro di massa, purché si ottengano i requisiti fondamentali per tale analisi, ossia che la molecola possa essere portata in fase gassosa, che possa essere ionizzata e che venga analizzata sotto vuoto spinto. Ogni spettrometro di massa è composto da sei parti fondamentali:

1. sistema di introduzione del campione
2. sorgente (nella quale le molecole vengono ionizzate)
3. analizzatore (in cui gli ioni formati dalla sorgente vengono separati in base al rapporto  $m/z$ )
4. rivelatore (in cui il segnale di ogni  $m/z$  viene rivelato e amplificato)
5. elaboratore (che permette la ricostruzione dello spettro finale)
6. pompe da vuoto.

In figura 8 è rappresentato lo schema a blocchi di uno spettrometro di massa.

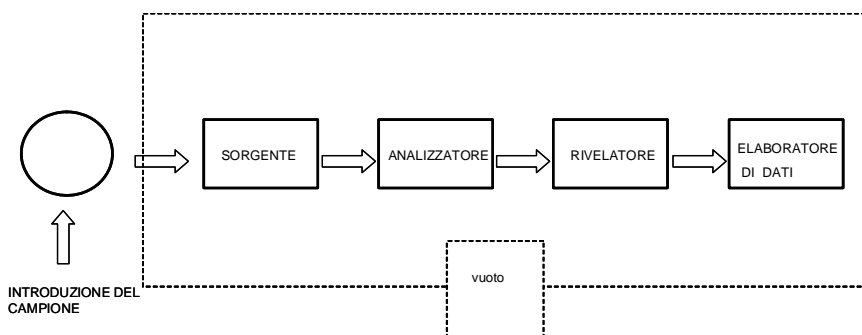


Figura 8. Schema a blocchi di uno spettrometro di massa

Sebbene questo schema sia del tutto generale, gli spettrometri di massa differiscono tra loro in potenzialità di analisi e costi, a seconda del tipo di sistema di introduzione del campione, di sorgente e di analizzatore con cui lo strumento è costruito. Ogni parte infatti influenza

fortemente le potenzialità dello spettrometro di massa selezionando il tipo di molecole che possono essere analizzate e le modalità con le quali il campione deve essere trattato prima di poter essere introdotto all'interno dello spettrometro. In biochimica clinica è necessario analizzare molecole molto diverse fra loro dal punto di vista delle proprietà chimico-fisiche quindi è necessario conoscere le potenzialità dei vari spettrometri di massa. Parametri decisivi per la scelta dello spettrometro di massa da utilizzare sono le caratteristiche chimico-fisiche del campione da analizzare come ad esempio la termolabilità, la polarità, la capacità di ionizzazione e la volatilità. Per piccole molecole, non termolabili apolari o trasformabili in apolari tramite reazione di derivatizzazione, è possibile utilizzare uno spettrometro di massa accoppiato ad un gas cromatografo, che viene indicato convenzionalmente con la sigla GC/MS. Tali tipi di spettrometro sono i meno costosi ed i più facili da utilizzare e sono caratterizzati dall'aver come sistema di introduzione del campione un gas cromatografo che ha la duplice funzione di portare in fase gassosa le molecole di campione facendo una rampa di temperatura, e di separare nel tempo, mediante un processo cromatografico, i vari analiti presenti nel campione. Le sorgenti utilizzate in tale tipo di strumento sono la sorgente ad impatto elettronico (EI) e la sorgente ad ionizzazione chimica (CI), spesso negli strumenti più moderni, intercambiabili tra loro. Nella sorgente ad impatto elettronico la ionizzazione avviene mediante collisione tra molecole dell'analita in fase gassosa ed un fascio di elettroni emessi da un filamento di tungsteno che funge da catodo. L'energia con cui tali elettroni vengono emessi in tali tipi di strumenti è fissa ed è pari a 70 eV. Poiché tale energia è superiore all'energia media di legame delle molecole, durante la collisione si avrà una frammentazione dell'analita dipendente dall'energia di legame presente all'interno di esso e quindi dalla sua struttura chimica. Con questo sistema di ionizzazione si formano ioni radicali positivi. Con tale sorgente definita *hard* nella maggior parte dei casi non è possibile ottenere lo ione molecolare dell'analita, ma solo una serie di frammenti a vari rapporti massa/carica che costituiranno, poiché l'energia applicata è costante, l'impronta digitale della molecola. È possibile se si utilizza tale sorgente fare una analisi qualitativa di un composto ricorrendo all'uso di librerie disponibili in commercio e confrontando lo spettro del composto di interesse con lo spettro di riferimento.

La sorgente alternativa in questo tipo di strumento è la sorgente a ionizzazione chimica, definita sorgente *soft*, nella quale la ionizzazione avviene per impatto dell'analita con un gas. Tale gas generalmente è metano o ammoniaca preventivamente ionizzato. Poiché la collisione tra l'analita ed il gas coinvolge energie di collisione minori rispetto a quelle che si hanno con la sorgente ad impatto elettronico, tale sorgente permette di vedere nello spettro

finale lo ione molecolare del composto o un addotto del composto con molecole di gas. Con l'utilizzo di tale sorgente non è possibile ricorrere all'uso delle librerie, poiché lo spettro è influenzato dal tipo di gas utilizzato per la ionizzazione e dal flusso con cui tale gas viene introdotto all'interno della sorgente. In tal modo si guadagna in sensibilità poiché si ha minore frammentazione dell'analita.

Gli analizzatori utilizzati in questo tipo di strumento possono essere analizzatori a settore, a trappola ionica o più frequentemente a quadrupolo.

I rivelatori sono costituiti da fotomoltiplicatori in grado di amplificare il segnale degli ioni che impattano sulla loro superficie con un meccanismo a cascata. I limiti di tale spettrometro sono dovuti al fatto che, poiché come sistema di introduzione del campione si utilizza un gas cromatografo, non è possibile analizzare molecole termolabili che si degraderebbero all'interno di esso per le alte temperature raggiunte, né tanto meno molecole polari poco volatili e ad alto peso molecolare. Riguardo a queste ultime, oltre alla difficoltà dovuta alla loro poca volatilità, bisogna tenere presente che i quadrupoli che sono gli analizzatori più usati, lavorano in un *range* di rapporto massa/carica  $m/z$  che in quelli più moderni arriva fino a 3.000.

Per i limiti di tali spettrometri, hanno preso piede, negli ultimi anni, spettrometri in grado di analizzare molecole fuori del campo di applicabilità della GC/MS. I più utilizzati sono quelli che utilizzano una sorgente Matrix Assisted Laser Ionization (MALDI) e quelli che utilizzano una sorgente Electron Spray Ionization (ESI), entrambi in grado, utilizzando tecniche di desorbimento, di analizzare molecole termolabili, polari ed in un vasto intervallo di massa.

Gli strumenti con sorgente ESI vengono comunemente chiamati LC/MS poiché con tali strumenti è possibile introdurre il campione in sorgente direttamente in fase liquida. In questo modo è possibile utilizzare come sistema di introduzione del campione un sistema a cromatografia liquida HPLC in linea con lo spettrometro di massa. In tale sorgente il campione viene portato in fase gassosa e ionizzato direttamente in sorgente facendolo passare attraverso un ago tenuto ad alto potenziale elettrico; in questo modo si formerà una nebbia di goccioline cariche che man mano che il solvente evaporerà avranno una densità di carica superficiale maggiore, fino a quando tale densità sarà talmente elevata che la goccia esploderà emettendo analiti ionizzati in fase gassosa. Una cortina di gas, generalmente azoto posta perpendicolarmente al flusso di ioni, impedirà alle particelle neutre di entrare all'interno del sistema di rivelazione. Tale tecnica è in grado di ionizzare le molecole a pressione atmosferica ed utilizza un sistema di vuoto a stadi che parte dall'analizzatore. La



caratteristica di tale sorgente è quella di produrre ioni multicarica per cui se la molecola ha un alto peso molecolare, e diversi siti di protonazione, si presenterà nello spettro a vari rapporti  $m/z$  ognuno corrispondente ad un diverso grado di protonazione. Con questa tecnica la ionizzazione avviene fornendo o togliendo protoni alla molecola, a seconda che si lavori in ioni positivi o negativi quindi risulta necessario introdurre in sorgente anche una certa quantità di acidi o basi a seconda che si voglia lavorare in modalità positiva o negativa. La caratteristica di questa sorgente di dare ioni multicarica permette di utilizzare come analizzatore di massa un sistema quadrupolare anche per l'analisi di molecole ad alto peso molecolare come le proteine; esistono dei software in grado di fare una deconvoluzione dello spettro multicarica e fornire il valore di massa reale del composto. In figura 9 è rappresentato il meccanismo di desolvatazione che avviene in una sorgente ESI nella quale le molecole vengono contemporaneamente ionizzate, desolvate e portate in fase gassosa.

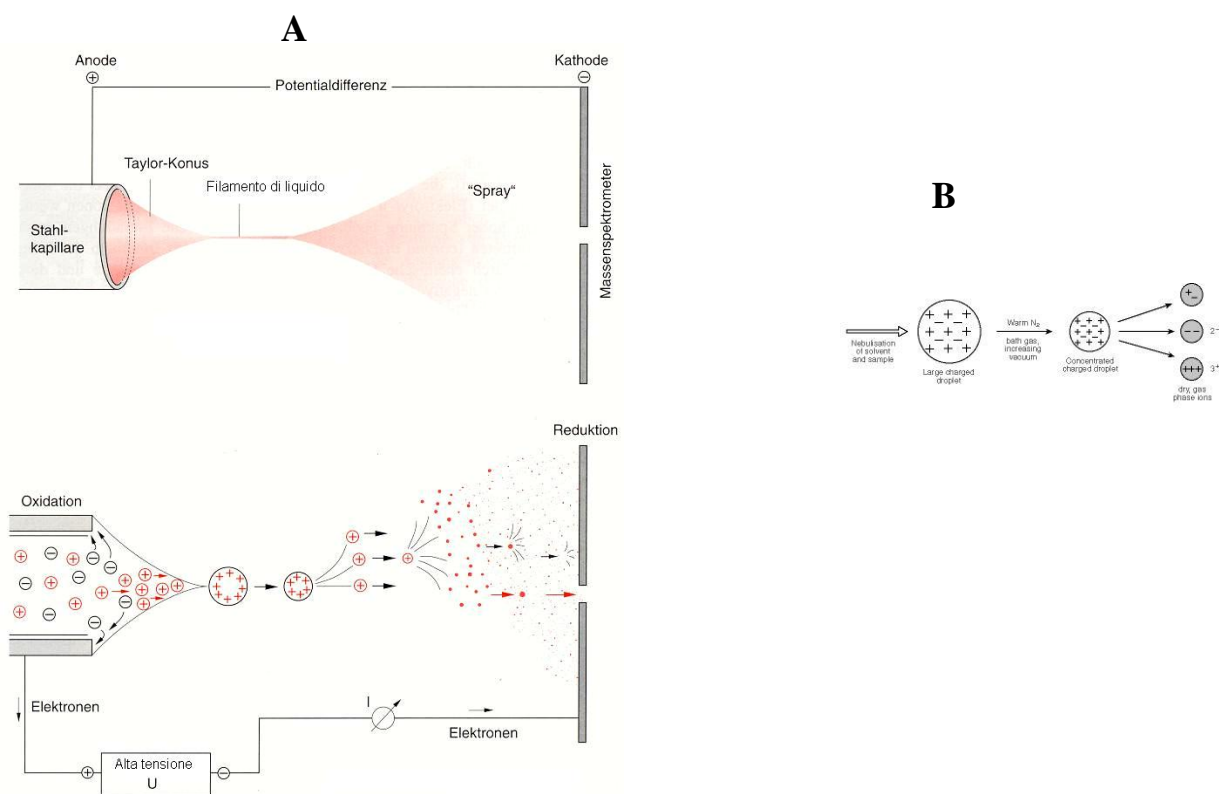


Figura 9. Rappresentazione del processo di desolvatazione che avviene all'interno di una sorgente ESI. Nella parte A della figura è rappresentata la sorgente ESI ed il meccanismo con il quale all'interno della sorgente grazie alla differenza di potenziale applicata si forma il fascio di ioni. Nella parte B è rappresentato il meccanismo di desolvatazione delle particelle cariche

Tutti gli spettrometri con le sorgenti *soft* menzionate sono in grado, tramite modifiche apportate allo schema generale, di fare una frammentazione di un dato ione con un

determinato rapporto  $m/z$ , e rilevare i rapporti  $m/z$  che ne derivano dovuti alla rottura della molecola. Un esempio di spettrometro di massa con sorgente ESI in grado di fornire un'energia di frammentazione ad un dato ione è il cosiddetto LC-MS/MS. Se il sistema di rivelazione è costituito da una serie di quadrupoli. Tale strumento prende il nome di strumento a triplo quadrupolo. Quando non si desidera frammentare la molecola che si sta analizzando i quadrupoli che costituiscono nel loro insieme l'analizzatore agiscono in maniera sincrona mandando direttamente gli ioni in uscita dalla sorgente al rivelatore in base al loro rapporto massa/carica; se invece si desidera frammentare lo ione che si sta analizzando, lo ione selezionato dal primo quadrupolo, entra all'interno della cella di collisione rappresentata dal secondo quadrupolo ed all'interno della quale viene immesso un gas, e, per collisione con il gas stesso, viene frammentato. I frammenti figli dello ione analizzato in uscita dalla cella di collisione, vengono rivelati dal terzo quadrupolo e mandati al detector. In questo modo si avrà uno spettro che rappresenta i prodotti di frammentazione dello ione selezionato.

Molti strumenti anziché adottare un sistema a quadrupoli, utilizzano per frammentare le molecole una trappola ionica in grado di fare una  $MS^n$ . In figura 10 è rappresentato lo schema di uno strumento a triplo quadrupolo.

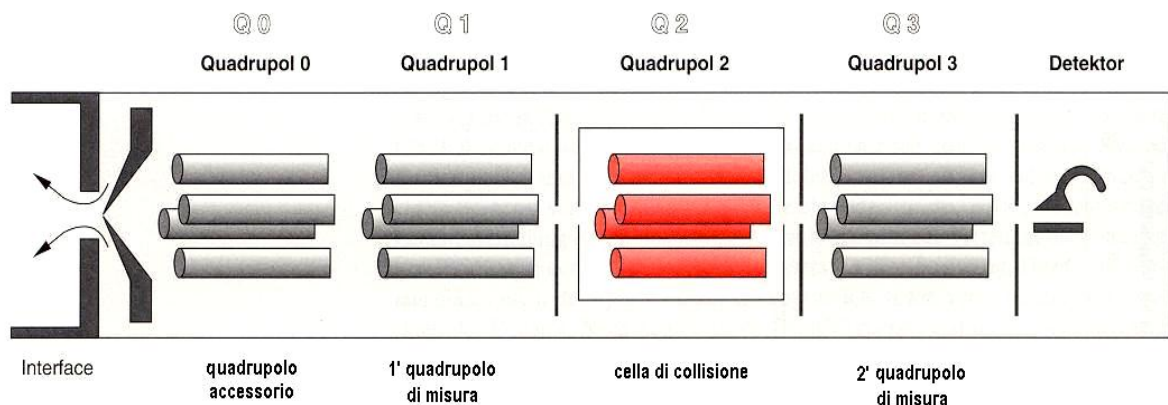


Figura 10. Schema di uno strumento a triplo quadrupolo. Il quadrupolo raffigurato in rosso rappresenta la cella di collisione

## 2 SVILUPPO E VALIDAZIONE DEL METODO PER IL DOSAGGIO DEL BUSULFAN IN LC-MSMS

### 2.1 PARTE SPERIMENTALE

#### 2.1.1 Reagenti e materiali

Il busulfan è stato ottenuto dalla Sigma Aldrich (purezza >99%). Il metanolo, l'acetato di etile, l'acido trifluoroacetico e l'acetonitrile (grado di purezza per HPLC) dalla Sigma. L'acetato di ammonio ed il solfato di zinco sono stati acquistati dalla Fluka. L'acqua deionizzata è stata prodotta in laboratorio mediante un bidistillatore.

Le provette in pyrex con tappo in teflon utilizzate durante la fase di purificazione del campione dalla matrice biologica, sono state acquistate dalla Laboindustria; le provette in teflon per lo stoccaggio delle soluzioni sono state acquistate dalla Eppendorf. Le vials in teflon con fondo interno conico da 200 µL e tappo in teflon sono state acquistate dalla Waters.

Lo standard interno (SI) utilizzato è il busulfan-d<sub>8</sub> (figura 11), in cui alcuni atomi di idrogeno sono sostituiti dall'isotopo dell'idrogeno, il deuterio. Lo SI è sintetizzato dalla EURISOTOP (Saint Aubin, Francia).

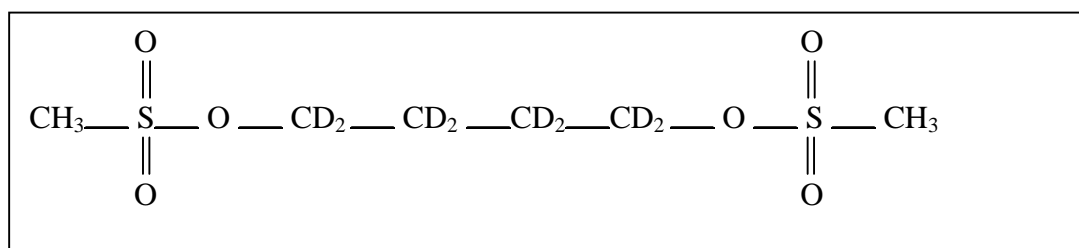


Figura 11. Formula dello standard interno busulfan-d<sub>8</sub>.

Per questo lavoro si è scelto di utilizzare uno standard interno che è una sostanza non contenuta nel campione avente proprietà chimico-fisiche il più possibile simili a quelle dell'analita da identificare e che viene aggiunta ad ogni campione nonché ad ogni soluzione di calibrazione. Esso viene utilizzato per eliminare l'imprecisione dovuta alla preparazione del campione e all'iniezione strumentale assumendo che un errore compiuto sull'analita venga compiuto anche sullo standard interno.

## 2.1.2 Standard di calibrazione e controlli di qualità

Si effettuano due distinte pesate di busulfan per la realizzazione di soluzioni madre (1mg/mL) da utilizzare per la retta di taratura e per i controlli di qualità (CQ). Una volta pesato il busulfan e ottenuta la soluzione madre, è necessario calcolare la concentrazione esatta del farmaco nella soluzione madre.

La diluizione di queste soluzioni madre è effettuata con acqua/ acetonitrile (H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN) 50/50 (V:V) fino ad ottenere le concentrazioni finali di (39, 78, 156, 312, 625, 1250, 2500) ng/mL utilizzate per la calibrazione e (250, 500, 1000) ng/mL per i controlli di qualità (CQ<sub>3</sub>, CQ<sub>2</sub>, CQ<sub>1</sub> rispettivamente). Viene effettuata la pesata di SI per la realizzazione di una soluzione madre di 1mg/mL in acetonitrile, conservata a -80°C, che viene poi diluita in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN 50/50 per ottenere la soluzione di lavoro a concentrazione nota (circa 1000 ng/mL).

Ogni volta che si prepara una soluzione madre è necessario calcolare la concentrazione esatta della madre e di conseguenza dei punti di curva, dei controlli di qualità e dello standard interno.

Le concentrazioni indicate precedentemente per punti di curva e controlli di qualità non sono le concentrazioni reali delle soluzioni bensì le concentrazioni calcolate in un millilitro di plasma (è già stata considerata una diluizione 1:100).

## 2.1.3 Procedura di estrazione dei campioni.

I campioni di sangue per il dosaggio del busulfan sono centrifugati a 3500 giri a 4°C per 5 minuti per la separazione del plasma. Il plasma è trasferito in provette Eppendorf da 2 mL. Le provette Eppendorf contenenti il plasma devono essere immediatamente messe in frigorifero a 620°C.

Per l'effettuazione dei punti di curva a 200µL di plasma si aggiungono 20 µL di SI e 20 µL dei punti di curva, analoga quantità per i CQ. Si vortexa per 1 minuto e si aggiungono 400 µL di solfato di zinco al 5% in acqua e poi 600 µL di acqua. Si vortexa e si centrifuga a 4500 g per 10 minuti, si preleva il surnatante e si aggiungono 100 µL di idrossido di sodio (NaOH) 100mM e 2 mL di acetato di etile. Infine si centrifuga a 4500 g per 5 minuti e si porta a secco sotto azoto a 37°C. Il residuo si discioglie in 100 µL di fase mobile (40/60 metanolo/acetato di ammonio 40 mM + acido formico 0.1%) e 10 µL sono analizzati in modalità positiva nel HPLC/ESI-MS/MS.

## 2.1.4 Strumentazione HPLC/ESI-MS/MS

Il cromatografo liquido impiegato per lo studio è un HPLC della Dionex serie Ultimate 3000; per la corsa cromatografica è stata utilizzata una colonna cromatografica Pinnacle ODS C18 Restek (100X2.1 mm, 3 $\mu$ m) mantenuta a temperatura ambiente per la durata dell'analisi.

Lo spettrometro di massa utilizzato come rivelatore è un triplo quadrupolo della Applied Biosystems API 3000 equipaggiato con una sorgente elettrospray ESI.

### 2.1.4.1 Condizioni dello spettrometro di massa.

Lo spettrometro di massa Api 3000 (Applied Biosystems) è equipaggiato con una sorgente ESI TurboIonSpray a temperatura di 350°C. L'analisi viene effettuata in modalità POSITIVA, in modalità MRM (*multiple reaction monitoring*) in modo da monitorare le transizioni dell'analita e dello standard interno (carichi positivamente) rispetto allo ione figlio più intenso generato a seguito della frammentazione.

Il peso molecolare del busulfano è 246 uma e dello standard interno 254 uma, quindi le molecole protonate positivamente saranno  $MH^+ = 247$  m/z per il busulfano e  $MH^+ = 255$  m/z per lo standard interno. Poichè si utilizza come fase mobile il tampone acetato di ammonio, gli addotti con ammonio risultano preponderanti rispetto allo ione molecolare protonato.

La scelta di questo tampone è stata fatta considerando la volatilità di questo sale, rispetto a un altrettanto efficace tampone (il fosfato, ad esempio), che, non essendo altrettanto volatile può dare problemi di deposito durante la fase di evaporazione del solvente. Inoltre, in modalità positiva, l'acetato di ammonio previene la formazione di addotti sodici con l'analita.

Dallo spettro di massa ottenuto infondendo il busulfano e lo standard interno nella fase mobile dell'HPLC, la molecola protonata ( $MH^+$ ) mostra una intensità modesta sia per il busulfano che per lo standard interno, mentre sono preponderanti gli addotti ammoniaci ( $MNH_4^+$ ) rispetto agli addotti a ( $M+Na^+$ ) a 269 m/z e ( $M+K^+$ ) 285m/z per il busulfano e ( $M+Na^+$ ) a 277 m/z e ( $M+K^+$ ) a 293 m/z. Nello spettro sono presenti anche gli ioni ( $MNH_4^+ + 2$ ) corrispondenti agli isotopi dell'atomo di  $S_{34}$  del busulfano e dello SI a 266 m/z e 274 m/z rispettivamente.

Le condizioni dello spettrometro sono state messe a punto utilizzando soluzioni concentrate (10 ng/ $\mu$ L) di busulfan e SI, introdotte separatamente per infusione diretta mediante una pompa a siringa nel flusso della fase mobile dell'HPLC. Gli spettri in *full scan* hanno evidenziato una intensità modesta per le molecole protonate ( $MH^+$ ) del busulfano e dello SI a favore degli addotti ammoniacali ( $MNH_4^+$ ), 264 m/z e 272 m/z rispettivamente per il busulfan e per lo SI. I parametri dello spettrometro di massa sono stati quindi ottimizzati per ottenere il massimo del segnale per gli addotti ammoniacali.

Per l'ottimizzazione di tali parametri sono state effettuate preventivamente analisi in Q1 scan sia per il busulfan (l'addotto ammoniacale 264 m/z) sia dello standard interno (l'addotto ammoniacale 272 m/z). In tal modo è stato possibile ottimizzare tutti i parametri strumentali dipendenti dalla massa e dalla struttura chimica del composto in questione in modo da avere un segnale massimo per i rispettivi addotti con lo ione ammonio. È stato inoltre possibile mediante questo esperimento determinare il rapporto m/z esatto a cui lo strumento misura l'addotto dei due composti con l'ammonio.

Le figure 12 e 13 mostrano lo spettro in Q1 scan del busulfan e dello SI.

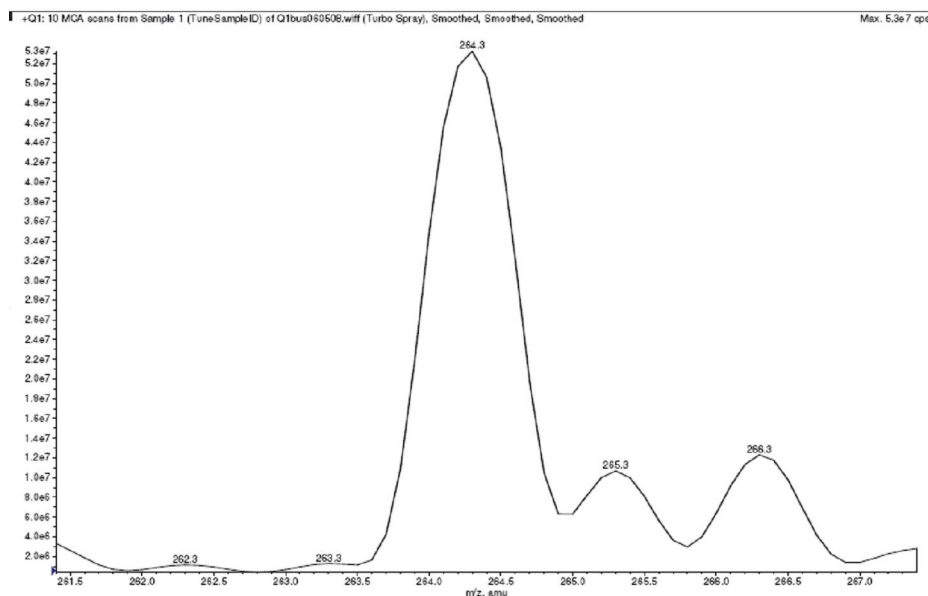


Figura 12. Spettro in Q1 scan del busulfan

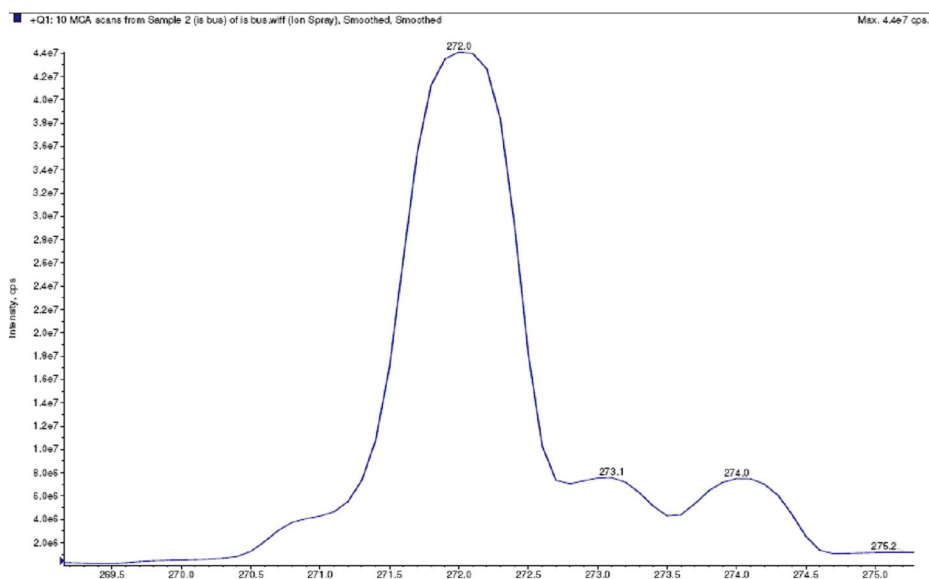


Figura 13. Spettro in Q1 scan dello SI

È stata inoltre determinata la concentrazione di acetato di ammonio sufficiente per la formazione quantitativa di addotti con l'ammonio, introducendo l'effluente della siringa di infusione miscelato, tramite una giunzione a T, all'effluente del HPLC con la colonna; entrambi confluiscono nell'interfaccia al flusso di 0.9 mL/hr dal motore a pistone e di 200 L/min dalle pompe HPLC; (tubi in peek da 1/16" e con 0.005" d.i.) come da figura 14.

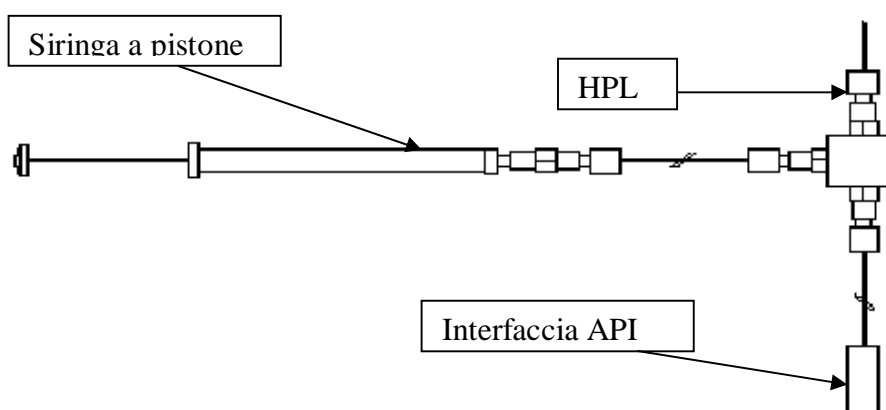


Figura 14. Schema di interfusione dello standard, mediante pompa a siringa nell'interfaccia API attraverso il flusso della fase mobile proveniente dall'HPLC.

Successivamente è stato effettuato un esperimento in  $\text{product ion scan}$  in modo da analizzare come gli addotti dell'ammonio del busulfan e dello standard interno si frammentavano (Figure 15 e 16).

Anche in questo caso è stata necessaria l'ottimizzazione dei parametri strumentali in modo da ottenere una energia di collisione tale da avere un frammento dei due composti il più intenso possibile. Una volta ottenuta la massa esatta degli ioni addotto con l'ammonio dei due composti e dei loro frammenti principali si è proceduto in modo da analizzare i due composti in modalità MRM ossia monitorando contemporaneamente per ogni composto il composto tal quale ed il suo frammento più intenso.

Le transizioni impiegate saranno, per il busulfano 264/151.1 m/z e per il busulfano deuterato utilizzato come standard interno 272/159.2 m/z.

Lo studio della struttura chimica dei due composti ha portato alla conclusione che la frammentazione principale pari ad una perdita di 113 Da per il busulfan e per lo SI.

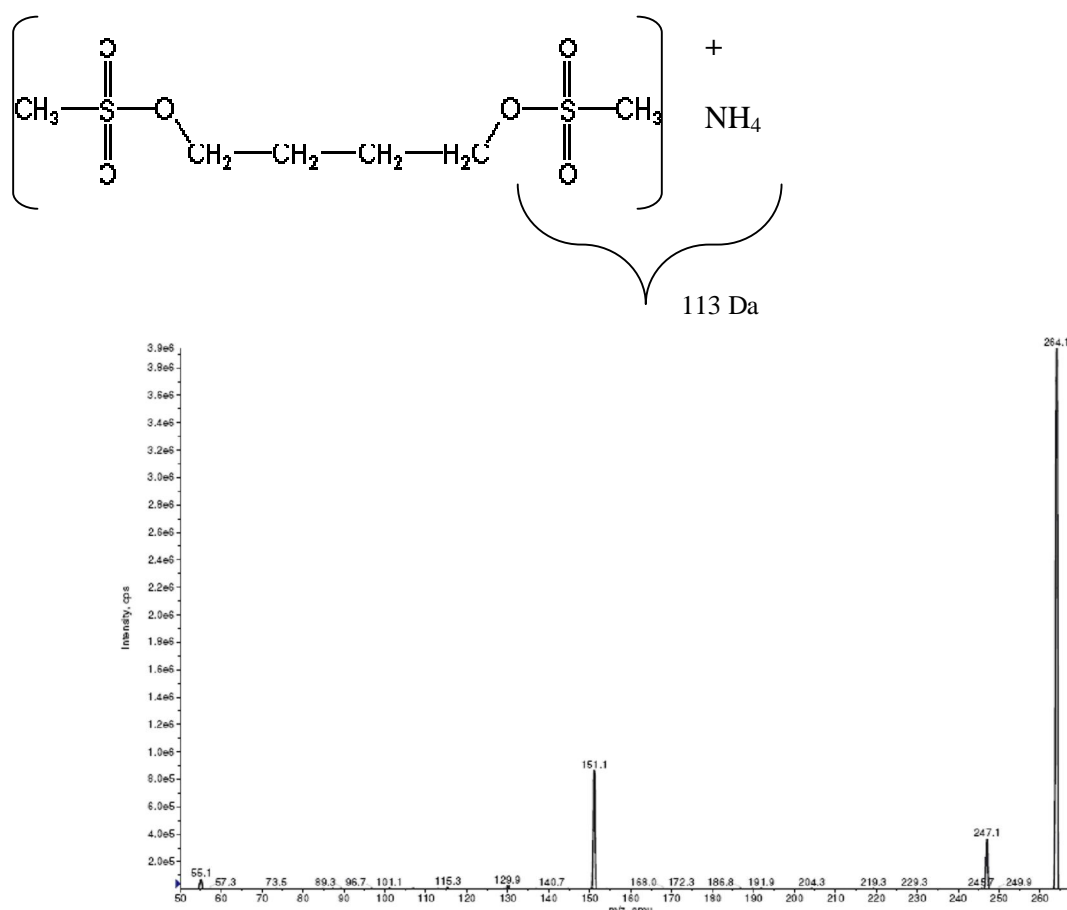


Figura 15 Product ion scan del busulfan



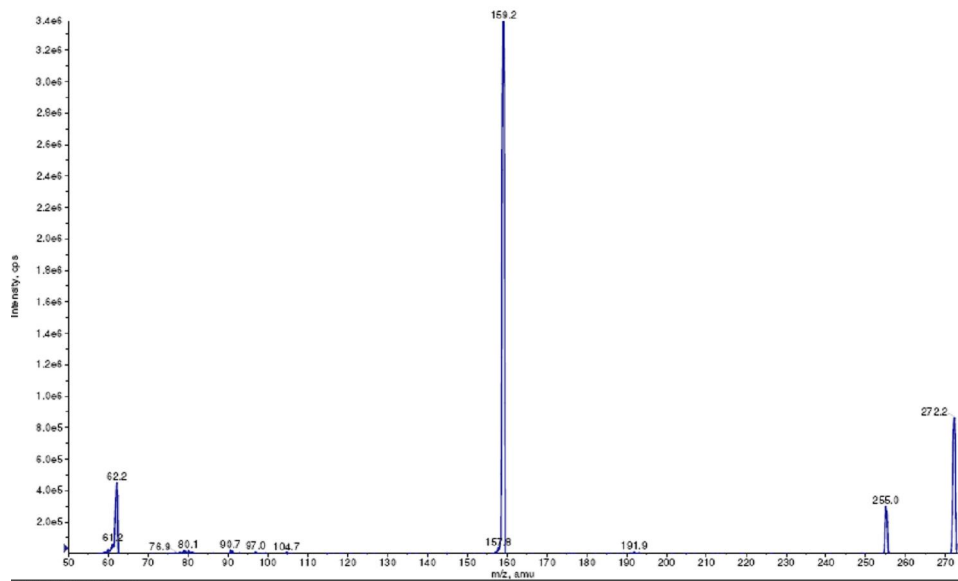


Figura 16 Product ion scan dello SI

In tabella 1 sono riportati i parametri strumentali principali ottimizzati per il dosaggio del busulfan e del suo standard interno.

**Tabella1.** Parametri strumentali ottimizzati per l'analisi in massa del BUSULFAN

Parametro	Valore (V)	Parametro	Valore (V)
<b>IS</b>	5500	<b>ST</b>	15
<b>DP</b>	25	<b>IQ2</b>	-20
<b>FP</b>	95	<b>CPX</b>	14
<b>EP</b>	11	<b>IQ1</b>	-11
<b>NEB</b>	8	<b>CUR</b>	8
<b>CAD</b>	3	<b>TEMP</b>	350°C

### 2.1.4.2 Condizioni cromatografiche.

La cromatografia viene effettuata con una colonna Pinnacle ODS C18 Restek (100X 2.1 mm, 3 $\mu$ m) mantenuta a temperatura ambiente per la durata dell'analisi. Il flusso della colonna è di 200  $\mu$ L/min. La corsa cromatografica consiste in una isocratica con metanolo/acetato di ammonio 20mM.

La durata della corsa cromatografica è 5 minuti. I picchi cromatografici del busulfan e dello standard interno escono rispettivamente a 1.62 e 1.64 minuti.

In figura 17 è riportato il cromatogramma (extract ions chromatogram (XIC)) di un campione reale.

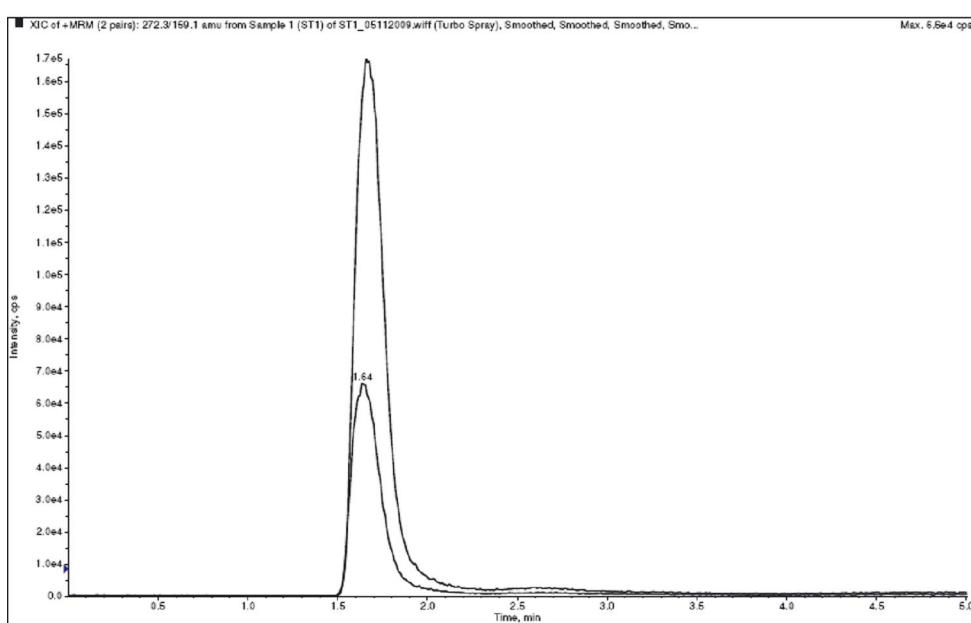


Figura 16. Cromatogramma (XIC) di un campione di plasma .

## 2.2 VALIDAZIONE DEL METODO

La specificità del dosaggio del busulfan è stato investigato analizzando un bianco costituito da un pool di campioni di plasma di soggetti non sottoposti a somministrazione di questo chemioterapico.

La curva di calibrazione (vedi figura 17), costituita da 7 livelli di concentrazione di busulfan (vedi paragrafo 2.1.2) e a una concentrazione fissata per lo SI, viene preparata secondo la metodica di estrazione sopra indicata utilizzando un pool di plasma di soggetti non sottoposti a busulfan. Viene considerato il rapporto delle aree dei picchi (area del picco dell'analita/area del picco dello SI) in funzione del rapporto delle concentrazioni del busulfan/standard interno secondo l'approccio della regressione lineare e pesando la curva mediante il fattore  $1/x$ . La concentrazione dello standard interno è stata considerata pari all'unità.

Il metodo risulta essere quindi lineare nell'intervallo 39-2500 ng/mL con un  $r^2 > 0.99$ .

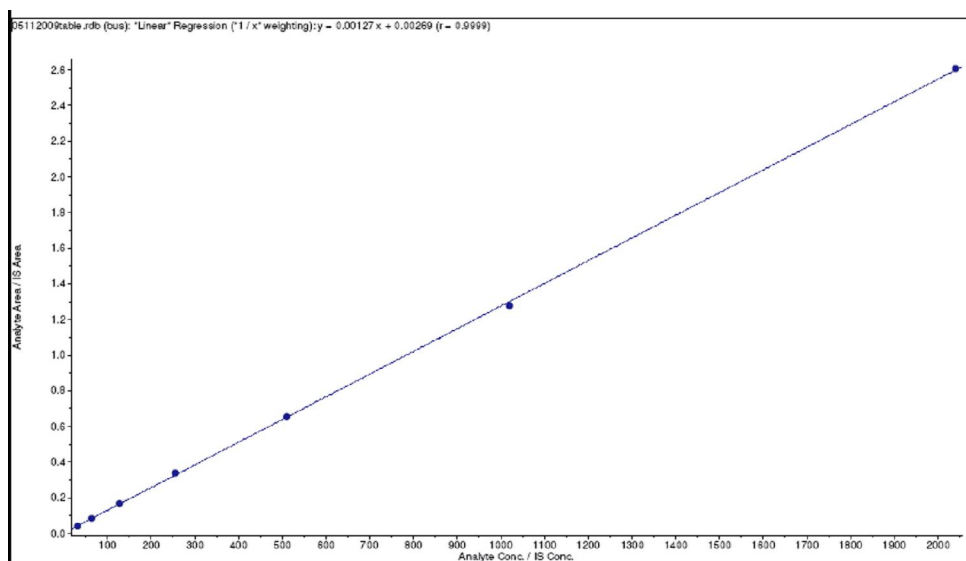


Figura 17. Retta di calibrazione del busulfan

Il limite di rilevabilità (LOD) per il metodo è **6 ng/mL** considerato come segnale per il quale si ha un rapporto segnale/rumore di 3/1 ed il limite di quantificazione (LOQ) è di **10 ng/mL** considerato come segnale per il quale si ha un rapporto segnale/rumore di 10/1.

Il parametro di precisione è connesso al concetto di riproducibilità analitica. La precisione indica la concordanza tra risultati di misure relative allo stesso campione ottenute

mediante analisi condotte lo stesso giorno (intra-day) o in giorni diversi (inter-day). Il parametro si valuta attraverso la determinazione della deviazione standard e del coefficiente di variazione (CV), il quale è un indice percentuale che correla l'errore della misura al valore medio di concentrazione ottenuto durante le analisi.

Le prove di riproducibilità intra-day ed inter-day sono state effettuate considerando i sette punti di calibrazione della retta di taratura ( ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6, ST7).

Il coefficiente di variazione per le prove inter-day è inferiore al 3,72% quelle intra-day inferiore al 4,32%.

Il recupero del busulfan (corretto sullo standard interno) dopo estrazione è stato calcolato considerando le aree di uno standard a cui non è stato effettuato nessun procedimento estrattivo, e di un pool di sangue privo di busulfan supplementato con la stessa concentrazione dello standard. Il recupero risulta essere maggiore del 70%.

I risultati delle prove di riproducibilità interday e intra-day sono riportati in tabella 2 e 3.

	<b>ST7</b>	<b>ST6</b>	<b>ST5</b>	<b>ST4</b>	<b>ST3</b>	<b>ST2</b>	<b>ST1</b>
1 giorno	38,53	76,41	155,78	307,75	644,05	1197,92	2551,35
2 giorno	39,31	72,99	160,38	324,55	623,18	1238,35	2516,01
3 giorno	41,72	72,79	152,34	309,57	645,68	1211,75	2517,97
4 giorno	38,71	77,25	154,63	322,9	626,61	1212,76	2488,96
media	39,57	74,11	155,78	316,19	642,38	1215,20	2518,57
dev std	1,47	2,30	3,38	8,76	11,63	16,86	25,55
cv %	<b>3,72</b>	<b>3,07</b>	<b>2,17</b>	<b>2,77</b>	<b>1,83</b>	<b>1,39</b>	<b>1,01</b>

Tabella 2. Prove riproducibilità inter-day

	<b>ST7</b>	<b>ST6</b>	<b>ST5</b>	<b>ST4</b>	<b>ST3</b>	<b>ST2</b>	<b>ST1</b>
1 ripetizione	35,52	73,67	165,62	324,12	617,15	1232,69	2541,60
2 ripetizione	37,56	77,27	162,89	323,79	637,03	1312,07	2471,86
3 ripetizione	38,70	76,94	161,36	325,89	629,98	1279,97	2509,62
media	36,26	75,96	174,96	324,60	628,05	1274,91	2507,69
dev std	1,61	1,99	2,16	1,13	10,08	39,93	34,91
cv %	<b>4,32</b>	<b>2,62</b>	<b>1,32</b>	<b>0,35</b>	<b>1,60</b>	<b>3,13</b>	<b>1,39</b>

Tabella 3. Prove riproducibilità intra-day

### 3 ELABORAZIONE FARMACOCINETICA DEI RISULTATI.

I pazienti sottoposti a somministrazione di busulfan vengono trattati prima del trapianto, per quattro giorni consecutivi con busulfan via endovena.

Giornalmente, i prelievi vengono effettuati al t=0, t=120 min, t=240 min, t=360 min.

Dal primo giorno di terapia vengono forniti i quattro valori di concentrazione plasmatica (espressa in  $\mu\text{moli/L}$ ) e il valore di  $\text{AUC}_{0-6}$  per il primo giorno e  $\text{AUC}_{0-6}$  per i successivi giorni (espresso in  $\mu\text{moli} \times \text{min/L}$ ).

Il calcolo dell' $\text{AUC}$  viene effettuato, secondo la regola dei trapezi, con il programma *boomer*.

Vedi esempio in figura 18.

Calculation of AUC and AUMC based on trapezoidal rule			
AUC and AUMC for alsabl.DAT		using Observed data	
Time	Concentration	AUC	AUMC
0.00000	0.00000		
140.000	4.29000	300.300	42042.0
245.000	1.78000	618.975	96468.8
365.000	1.04000	788.175	145411.
		<b>954.442</b>	232680.
Extrapolation with Slope = 0.6255E-02			

Figura 18. Esempio di calcolo per la determinazione dell' $\text{AUC}$  del busulfan mediante il programma boomer.

## 4 CONCLUSIONI

Negli ultimi quindici anni la somministrazione di chemioterapici guidata farmacocineticamente ha assunto un interesse crescente, poichè la valutazione dei parametri farmacocinetici come  $\int AUC$ , può determinare una maggiore efficacia e una minore tossicità del farmaco impiegato nella terapia chemioterapica.

Il busulfan è un agente alchilante utilizzato sin dal 1950 come chemioterapico nel trattamento antecedente il trapianto di midollo osseo [Hassan, 1999]; è un farmaco caratterizzato da un impiego in una stretta finestra terapeutica e da un'ampia variabilità farmacocinetica individuale e pertanto è un candidato ideale per il monitoraggio terapeutico.

Dati pubblicati da studi condotti su adulti e bambini hanno suggerito che una esposizione ideale al busulfan corrisponde a un intervallo di AUC di 900 ó 1500  $\mu\text{M}\cdot\text{min}$  e un  $C_{ss}$  di 600-900 ng/ml [Slattery JT et al., 1995; Chattergoon DS et al., 1997].

Minimizzare le variabilità individuali di esposizione al farmaco mediante somministrazioni guidate farmacocineticamente consente di ridurre i fenomeni di tossicità dovuti a sovradosaggio (soprattutto i rischi legati a VOD), e di diminuire il pericolo di rigetto del trapianto causato dal sottodosaggio del farmaco [McCune et al., 2000; Slattery JT et al., 1998].

Questo lavoro descrive un metodo di analisi altamente specifico, selettivo e sensibile per la quantificazione del busulfan in piccoli volumi di plasma da pazienti in età pediatrica, riducendo quindi al minimo l'invasività dei prelievi effettuati sul bambino. Infatti questo metodo richiede soltanto 200  $\mu\text{L}$  di plasma per il dosaggio del busulfan, riuscendo a determinare in un volume così piccolo concentrazioni del farmaco almeno 5 volte inferiori ad altri metodi che utilizzano l'UV e la derivatizzazione con fluorescenza come metodi di rivelazione [Heggie JR et al., 1997; Fifai N et al., 1997; Quernin M-H et al., 1999].

Un ulteriore vantaggio di questo metodo è che non richiede una procedura di derivatizzazione dell'analita rispetto ad altri metodi descritti in precedenza che utilizzano la GC-ECD oppure la GC-MS [Funakoshi K-I et al., 1994; Heggie JR et al., 1997; Rifai N et al., 1997; Quernin M-H et al., 1999; Bleyzac N et al., 2000; Lai W-K et al., 1998] diminuendo in tal modo i costi di analisi in termini economici e di tempo.

Inoltre, una semplice estrazione liquido-liquido mediante acetato di etile è sufficiente a fornire una adeguata estrazione del farmaco dal plasma umano. E sebbene altri metodi di estrazione del busulfan adottino l'estrazione liquido-liquido, l'acetato di etile rispetto al dietilere-diclorometano [Funakoshi K-I et al., 1994], al toluene [Quernin M-H et al., 1999]

e al diclorometano [Slattery JT et al., 1998] impiegati in altri lavori, possiede una tossicità inferiore (soprattutto rispetto al toluene) e un impatto ambientale sicuramente inferiore rispetto ai solventi clorurati.

Oltre alla valutazione sui tempi di analisi, la validazione del metodo si basa su criteri essenziali quali la specificità, selettività, sensibilità, precisione e accuratezza.

La specificità (capacità di un metodo di distinguere tra l'analita che si intende misurare e le altre sostanze) è garantita dalla frammentazione MS-MS condotta in modalità MRM (*multiple reaction monitoring*), che permette di raggiungere la specificità e la selettività necessarie.

Il limite di rilevabilità (LOD - *Limit Of Detection*) per il metodo messo a punto nel Laboratorio Biochimica Metabolica del Policlinico di Tor Vergata è di **6 ng/mL** ed il limite di quantificazione (LOQ - *Limit Of Quantitation*) è di **10 ng/mL**.

Le prove di riproducibilità intra-day ed inter-day sono state effettuate considerando i sette punti di calibrazione della retta di taratura. Il coefficiente di variazione per le prove inter-day è inferiore al 3,72% quelle intra-day inferiore al 4,72%.

Quindi il metodo oggetto di questa validazione unisce la sensibilità e specificità della rivelazione mediante MS/MS alla semplicità dell'estrazione liquido ó liquido del campione, fornendo così un metodo preciso e accurato.

Tale metodo è stato messo a punto nel laboratorio di Biochimica Metabolica del Policlinico di Tor Vergata in collaborazione con l'Istituto Mediterraneo di Ematologia che ha fornito campioni plasmatici di pazienti in età pediatrica, affetti da anemia mediterranea e provenienti dal Medio Oriente. A bambini, in attesa di trapianto di midollo osseo, viene applicato un protocollo che prevede l'utilizzo del busulfan come chemioterapico; in principio i primi pazienti sono stati trattati per via orale con questo farmaco, in seguito il protocollo ha previsto la più stabile e sicura somministrazione via endovena.

Attualmente questo metodo è impiegato nel Laboratorio di Biochimica Metabolica del Policlinico di Tor Vergata e nell'ambito del monitoraggio terapeutico. Già dal primo giorno di terapia il Laboratorio fornisce agli ematologi dell'IME i dati di AUC necessari all'eventuale correzione della dose del busulfan. e ad oggi ha fornito dati per più di 1500 pazienti .

## 5 BIBLIOGRAFIA

- Baccini C. *Monitoraggio terapeutico dei farmaci. In: Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio (vol.2 Biochimica Clinica)*, Edizioni Piccin, Padova, 1993.
- Bleyzac N, Barou P, Aulagner G, *J Chromatogr B Biomed Appl* 2000; **724**: 427-432.
- Bouligand J, Boland I, et al., *Bone Marrow Transplant.* 2003, 32: 979-986.
- Burs RB, Heggie JR, Embree L. *J Pharm Biomed Anal* 1995; **13**: 1073.
- Chattergoon DS, Saunders EF, Klein J, Calderwood S, Doule J, Freedman MH, Koren G *Bone Marrow Transplant.* 1997; **20**: 347.
- Chen TL, Grochow LB, Hurowitz LA, Brundrett RB *J Chromatogr* 1988; **425**: 303.
- Conti M, Tazzari V, Bezzi F, Baccini C, et al., *LigandAssay* 2005; (10) **2**: 90-96.
- Copelan EA, Biggs JC, Thompson JM, Crilley P et al. *Blood* 1991; **78**: 838.
- Dix SP, Wingard RJ, Mullins RE, Jerkunica I, Davidson TG, et al. *Bone Marrow Transplant.* 1996; **17**: 225.
- Embree L, Burns RB, Heggie JR, Phillips DE et al., *Cancer Chemother Pharmacol* 1993; **32**:137.
- Funakoshi K-I, Yamashita K, Chao W-F, YamaguchiM, Yashiki T. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994; **660**: 200-204.
- Geller RB, Saral R, Piantadosi S, Zaurak M, Vogelsang GB, Wingard JR et al. *Blood* 1989; **73**:2209.



- Gibaldi M, Perrier D. *Pharmacokinetics, Drugs and the pharmaceutical Sciences*, 2<sup>nd</sup> edn. Marcel Dekker: new York 1982.
- Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, Braine HG, et al. *Bone Marrow Transplant*. 1989; **25**: 55.
- Grochow LB, *Semin Oncol* 1993; **20** (Suppl. 4). 18-25.
- Hassan M, Ehrsson H *J Chromatogr* 1983; **277**:374.
- Hassan M, Ljungman P, Bolme P et al., *Blood* 1994; **84**: 2144-2150.
- Hassan M, Oberg G, Bekassy A.N. Aschan J, et al. *Cancer Chemother.Pharmacol*. 1991; **28**:130.
- Hassan M. *Med Oncol* 1999; **16**: 166-176.
- Heggie JR, Wu M, Burns RB, Ng CS, et al., *J Chromatogr B Biomed Appl* 1997; **692**: 437-444.
- Henner WD, Furlong EA, Flaherty MD, Shea TC, Peters WP *J Chromatogr* 1987; **416**: 426.
- Jenke A, Renner U, Schuler U S, Wauner S, et al., *J of Chromat B* 2004; **805**:147-153.
- Lai AA, Andersson B, Reardan DT. *Orphan Medicals Inc., Study report: Amendment 4 from OMC-BUS4-IRPF Code: F60002 IN C021*.
- Lai W-K, Pang C-P, Law L-K et al. *Clin Chem* 1998; **44**: 2506-2510.
- Lu C, Braine HG, Kaiser H, Saral R, Tutschka PJ, Santos GW. *Cancer Treat. Rep*. 1984;**68**:711.

- McCune JS, Gibbs JP, Slattery JP. *Clin Pharmacokinet* 2000; **39**: 155-165.
- Oliveira dos Reis E, Vianna-Jorge R, Suarez Kurz G, et al. *Rapid Comm Mass Spectr* 2005; **19**: 1666-1674.
- Pichini S, Altieri I, Bacosi A, Di Carlo S, Zuccaro P et al. *J Chromatogr* 1992; **581**: 143-146.
- Quernin M-H, Poonkuzhali B, Medard Y, et al. *J of Chromat B Biomed Appl* 1999; **721**:147-151.
- Quernin M-H, Poonkuzhali B, Montes C, et al. *J of Chromat B* 1998; **709**:47.
- Quernin M-H, Duval M, Litalien C, Vilmer E, Agrain E J, *J of Chromat B* 2001; **763**: 61-69.
- Ratain MJ, Schilsky RL, Conley BA et al. *J. Clin Oncol* 1990; **8**:1739-53.
- Rifai N, Sakamoto M, Lafi M, Guinan E. *Ther Drug Monit* 1997; **19**:169-174.
- Schuler U, Schroer S, Kuhnle A et al. *Bone Marrow Transplant.* 1994; **14**: 759-765.
- Slattery JT, Risler LJ *Therapeutic Drug Monitoring* 1998, 20:543-549.
- Slattery JT, Sanders JE, Buckner CD, et al. *Bone Marrow Transplant.* 1995; **16**: 31.
- Tran HT, Madden T, Petropoulos D, Worth LL, et al. *Bone Marrow Transplant.* 2000; **26**: 463.
- Vassal G, Fisher A, Challine D et al., *Blood* 1993; **82**: 1030-1034.
- Vassal G, Gouyette A, Hartmann O et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* 1989; **24**: 386-390.

- Vassal G, Re M, Gouyette A *J Chromatogr* 1988, **428**: 357.
- Yeager AM, Wagner JE, Graham ML et al., *Blood* 1992; **80**:2525-2428.