Validatie van een LC-MS/MS methode voor Tariquidar, Elacridar en een mengsel van substraten voor P-gp en Bcrp1 en toepassing voor in vivo farmacokinetiek studies

29-8-2016 Nikkie Venekamp



# Afstudeeropdracht

Nikkie Venekamp
s1075352
Afstudeeropdracht analietische chemie (H16AAC)
42
2016
Nederlands Kanker Instituut (Antoni van Leeuwenhoek)
Algemeen Klinisch Laboratorium – Bio-Farmacologie
Plesmanlaan 121, 1066 CX Amsterdam
Olaf van Tellingen, PhD.
16 februari 2016 tot 31 augustus 2016

Gegevens opleidingsinstitu	ut:
Adres:	
Afdeling:	
Opleiding:	
Specialisatie:	
Afstudeerbegeleider:	

Paraaf:

Hogeschool Leiden Zernikedreef 11, 2333 CK Leiden Applied Science Chemie Chemische Analyse Bert Mast





# Inhoudsopgave

Abstract		5
Afkortingenlijst		5
1. Inleiding		8
1.1 Farmacolo	ogie	8
1.1.1 Blood	l-Hersen Barriere	8
1.1.2 Trans	porteiwitten	9
1.2 Inhibitore	n en substraten	10
1.2.1 Elacri	dar	10
1.2.2 Tariq	uidar	10
1.2.3 Subst	raten	. 11
1.3 Het onder	rzoek	. 12
1.4 Hypothes	e	. 13
1.5 Doelstellii	ng	. 14
1.6 High-Perf	ormance Liquid Chromatography	. 14
1.7 Massaspe	ctrometrie	16
1.8 LC-MS/M	S	16
1.8.1 Electr	ospray ionisation	17
1.8.2 Triple	Quadrupole analyzer	17
1.8.3 Electr	on multiplier detector	18
1.8.4 Scann	nodus massaspectrometer	19
2. LC-MS/MS	methode ontwikkeling en validatie	20
2.1 Methode	ontwikkeling	20
2.1.1 Tuner	n massaspectrometer	20
2.1.2 Chror	natografie	20
2.1.3 Interr	ne standaarden	21
2.1.4 Extra	ctievloeistof	21
2.2 Validatie.		21
3. Experiment	teel	24
3.1 Chemi	icaliën	24
3.2 Appar	atuur	24
3.3 Tunen	massaspectrometer	25
3.4 Chron	natografie	25
3.5 Extrac	tievloeistof	26
3.6 Bereic	ling van de oplossingen voor de validatie	26
3.6.1 S	tockoplossingen 10 mM in DMSO	. 27
3.6.2 S	tockoplossingen 100 uM in DMSO	27
3.6.3 B	ereiding van de interne standaard oplossing	28
3.6.4 B	ereiding van kalibratielijnen	28
3.6.5 B	ereiding van de QC oplossingen	29
3.6.6 N	Nobiele fase	30
3.6.7 S	ystem suitability test oplossing	30
3.7 Monst	tervoorbewerking van de kalibratielijn en QC monsters in de biologische matrix	30
3.8 Valida	tie experimenten	31

3	.9	Bere	eiding van de oplossingen voor de <i>in vivo</i> experimenten	32
	3.9.	1	Dosering experimenten met KO en WT muizen	32
	3.9.2	2	Het <i>in vivo</i> experiment in KO muizen	33
	3.9.3	3	Het <i>in vivo</i> experiment in WT muizen	33
	3.9.4	4	Het <i>in vivo</i> experiment in KO en WT muizen	33
3	.10	Mon	nstervoorbewerking van de <i>in vivo</i> monsters	34
4	Resu	ultate	n	35
4	.1	Met	hode ontwikkeling	35
	4.1.	1 Tun	en van de massaspectrometer	35
	4.1.2	2 Chr	omatografie	35
	4.1.3	3. Inte	erne standaard voor Tariquidar	37
	4.1.4	4 Extr	ractievloeistof	37
	4.1.	5 Pro	centueel verschil van de twee wegingen	38
4	.2 Va	lidatie	e in humaan plasma	38
	4.2.	1 Spe	cificiteit en selectiviteit	38
	4.2.2	2 Det	ectiegrens (LOD)	39
	4.2.3	3 Вер	alingsgrenzen (LLQ en ULQ)	39
	4.2.4	4 Line	eariteit	40
	4.2.	5 Juis	theid	43
	4.2.	6 Pred	cisie	44
	4.2.	7 Rec	overy en ion suppressie	45
	4.2.3	8 Stak	piliteit	47
4	.3	Valio	datie in muizenplasma	51
	4.3.	1	Specificiteit en selectiviteit	52
	4.3.2	2	Juistheid	53
	4.3.	3	Precisie	53
4	.4	Valio	datie in hersenhomogenaat van muizen	54
	4.4.	1	Specificiteit en selectiviteit	54
	4.4.2	2	Lineariteit	55
	4.4.	3	Juistheid	57
	4.4.4	4	Precisie	57
4	.5	In vi	<i>vo</i> experimenten	58
	4.5.	1	Dosering experimenten met KO en WT muizen	58
	4.5.	2	Hersenen-plasma ratio van KO muizen	61
	4.5.	3	Hersenen-plasma ratio van WT muizen	62
	4.5.4	4	Hersenen-plasma ratio van KO en WT muizen	64
5.	Sam	enva	tting	66
6.	Con	clusie		68
7.	Aan	bevel	ingen	69
Dar	nkwoc	ord		70
Ref	erenti	ies		71
Bijla	agen.			73

# Abstract

The Netherlands Cancer Institute is a cancer research center and dedicaded cancer hospital integrated in one organization. The work conducted in the department of Bio-Pharmacology is aimed at the therapy of brain tumors. Due to the presence of the Blood Brain Barrier (BBB), it is hard for many drugs to reach pharmacologically active levels in brain tumors. Drug efflux transporters present at the BBB transport these drugs out the brain. A compound that is recognized and transported is called a substrate. The interaction between a substrate and the transporter may be weak or strong. P-glycoprotein (P-gp) and Breast Cancer Resistant Protein (Bcrp1) are the two most important drug efflux transporters located at the BBB. A strategy to increase the brain distribution of substrate drugs is to block the activity of P-gp and Bcrp1 by inhibitors. The aim of this study is to assess the potency of two inhibitors, Elacridar and Tariquidar. These two inhibitors both block P-gp and Bcrp1 transporters, but with different potencies. To determine the potencies of these inhibitors towards P-gp and Bcrp1 at the BBB, *in vivo* experiments need to be carried out.

The aim of this work is to determine and compare the potencies of Elacridar and Tariquidar and to establish the plasma concentration required for a complete inhibition of transport by P-gp and Bcrp1. For this purpose, six substrate drugs ranging from weak to strong in their affinities towards P-gp and Bcrp1 were used. The hypothesis is that the efflux of a weak substrate may be more easily inhibited at a relative low plasma concentration of the inhibitor and vice versa. To analyze the substrate drugs in plasma and brain samples from these *in vivo* studies, a validated LC-MS/MS method is required. The primary aim of this project is to validate a LC-MS/MS method in which all compounds (six substrates and two inhibitors) can be analyzed simultaneously in one analytical run. The secondary aim was to apply this method to the samples of the *in vivo* study.

Four strains of mice are used to determine the concentrations of the inhibitors needed to achieve a complete inhibition of P-gp and/or Bcrp1. Double knock out (KO) mice (P-gp/Bcrp1 -/-) are deficient for both transporters and are used as a reference for the complete inhibition. Wild type (WT) mice (P-gp/Bcrp1 +/+) are proficient for both transporters and can be used to assess the inhibition potency of the inhibitors. Full inhibition of both transporters will be achieved when the brain concentration and brain-to-plasma ratio is similar to the double KO mice. The single KO mice (lacking P-gp or Bcrp1) will be used to investigate the inhibition of each transporter separately.

The mice received a continuous infusion of a mixture of six substrates (Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib and Verapamil) with or without an inhibitor. Firstly the dose rate of the infusion to yield plasma concentrations for each of the substrates between 50 nM and 100 nM needed to be optimized. The potency of the inhibitors will be assessed at concentrations of 500 nM, 1000 nM and 2000 nM.

Sample pre-treatment involved liquid-liquid extraction with *tert*-butylmethylether. Chromatograpic separation was performed on a reversed phase  $C_{18}$  column and a gradient with water (0,1% formic acid) and methanol. Compounds were detected by tandem-mass spectrometry with an electro spray ionization source operating in positive mode. Stable isotopes were available for use as internal standards, except for Tariqudiar. Elacridar-d4 was used instead as internal standard for tariquidar.

The method was fully validated for human plasma on the following parameters: specificity and selectivity, limit of detection, limits of determination, linearity, precision, accuracy, recovery, ion suppression and stability. For all compounds, besides Tariquidar, the calibration curves were linear over the tested dynamic range (1-200 nM). Quadratic curve fitting was used for tariquidar. All validation results were in compliance with the generally accepted criteria. The LC-MS/MS method was successfully validated in human plasma.

Next, a limited validation was performed for mouse plasma and brain homogenate samples for the following parameters: specificity and selectivity, linearity, precision and accuracy. The precision and accuracy requirements were not fully reached for Docetaxel en Tariquidar in mouse plasma. The results for the other analytes were in compliance with the requirements. In brain homogenate the linearity requirements were not reached for Riluzole and Vemurafenib, but deviations were marginal. The precision requirements were not reached in full for Riluzole, Tariquidar and Vemurafenib. The accuracy of the method met the requirements for all compounds. The results were acceptable for mouse plasma and brain homogenate to carry out this study.

The *in vivo* studies are still ongoing. By now, the infusion dose rate for the WT and double KO mice needed to achieve the target plasma levels of the inhibitors has been established. Based on these experiments some preliminary conclusions of the potencies of the inhibitors can be made. It appears that the brain concentrations of Erlotinib, Loperamide, Vermurafenib and Verapamil can be increased by administration of each of the inhibitors, Elacridar and Tariquidar. Moreover, Elacridar appears to be a better inhibitor for P-gp and Bcrp1 than Tariquidar, but more firm conclusions on the potencies of the inhibitors on P-gp an Bcrp1, require completion of the *in vivo* experiments, including the work with the single KO mice.

# Afkortingenlijst

ABC	ATP Binding Cassette
AC	Affinity Chromatography
ADP	Adenosinedifosfaat
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
AS	Academische standaard
ATP	Adenosinetrifosfaat
BHB/BBB	Bloed-Hersen Barriere/Blood-brain barrier
BCRP/Bcrp1/Abcg2	Breast Cancer Resistent Protein
BI	Betrouwbaarheidsinterval
CAD	Collisionally Activated Dissociation
CE	Collision Energy
CEM	Channcel Electron Multiplier
cps	counts per seconden
CrEL	Kolliphore EL
CXP	Collision cell exit Potential
DEV	Deviatie
DMSO	Dimethylsulfoxide
DP	Declustering Potential
EP	Entrance Potential
ESI	Electrospray Ionization
FP	Focusing Potential
GC	Gaschromatografie
GM	Totaal gemiddelde concentratie
HP	Hartpunctie
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IEC	Ion-Exchange Chromatography
IS	Interne Standaard(en)
КТ	Kamertemperatuur
КО	Knock Out type (P-gp/Bcrp1 <sup>-/-</sup> )
LC-MS/MS	Vloeistofchromatografie en massaspectrometrie
LLQ	Laagste bepalingsgrens (Lower Limit of Quantification)
LOD	Detectiegrens
LOF	Lack of Fit
m/z-ratio	Massa-lading verhouding
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MDR	Multidrug resistentie
MeOH	Methanol
MF	Mobile Fase
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massaspectrometrie
n	Aantal metingen
NKI	Nederlands Kanker Instituut
NP	Normal Phase
NPLC	Normal Phase Liquid Chromatography
P-gp/ABCB1/Abcb1	P-glycoproteïne
Q1	Quadrupole 1
Q2	Quadrupole 2
Q3	Quadrupole 3
QC	Kwaliteitscontrole(s)
RP	Reversed Phase
RPLC	Reversed Phase Liquid Chromatography
RSD	Relatieve Standaarddeviatie

SF	Stationaire Fase
SIM	Selected-ion Monitoring
Stdev.	Standaarddeviatie
SST	Systeem Suitability Test
TIC	Total Ion Current
t <sub>R</sub>	Retentietijd(en)
ULQ	Hoogste bepalingsgrens (Upper Limit of Quantification)
UV/VIS	Ultra Violet-Visible Spectroscopy
WT	<i>Wild Type</i> (P-gp/Bcrp1 <sup>+/+</sup> )
XIC	Extracted Ion Chromatogram

# 1. Inleiding

Voor u ligt het verslag van de afstudeeropdracht voor de specialisatie analietische chemie, die uitgevoerd is op de afdeling Bio-Farmacologie van het Nederlands Kanker Instituut (NKI). In dit document zal beschreven worden wat en met welke methode deze afstudeeropdracht is uitgevoerd. In de inleiding zal kort het onderzoek geïntroduceerd worden. Vervolgens zal de theoretische achtergrond van verschillende onderwerpen met betrekking tot het onderzoek, probleemstelling en doelstelling besproken worden.

Het NKI is een oncologisch onderzoekscentrum waar wetenschappelijk onderzoek gedaan wordt naar verschillende soorten kanker. Op de afdeling Bio-Farmacologie wordt er voornamelijk onderzoek gedaan naar geneesmiddelen, of een combinatie ervan, die hersentumoren bestrijden. Er worden *in vitro* en *in vivo* studies uitgevoerd om de farmacokinetiek en toxicologie van geneesmiddelen te bestuderen. Door de aanwezigheid van de BHB is de bereikbaarheid van een hersentumor sterk verlaagd. Het grootste aandachtspunt ligt bij de rol van transporteiwitten in de BHB die geneesmiddelen buiten de hersenen houden.

De twee transporteiwitten die in deze studie onderzocht zullen worden zijn P-glycoproteïne (P-gp/ABCB1/Abcb1) en *Breast Cancer Resistant Protein* (BCRP/Bcrp1/Abcg2). Deze twee transporteiwitten niet kunnen geblokkeerd worden door remmers (inhibitoren). Door de remmers kunnen de transporteiwitten niet meer het geneesmiddel uit de hersenen houden. Dit zal vervolgens invloed hebben op de concentratie van het geneesmiddel in de hersenen. Twee inhibitoren die in deze studie onderzocht gaan worden met *in vivo* experimenten zijn Elacridar en Tariquidar. Dit wordt gedaan met experimenten met muizen. Om de concentratie van het geneesmiddel te bepalen uit biologische matrices is er een gevoelige en selectieve analyse methode nodig. Ook is het van belang dat het geneesmiddel op de juiste manier geïsoleerd wordt uit de biologische matrix met een optimale monstervoorbewerkingsmethode. Kwantitatieve bepalingen van het geneesmiddel worden uitgevoerd met behulp van vloeistofchromatografie gekoppeld aan een massaspectrometer (LC-MS/MS). De methode zal volledig gevalideerd worden in humaan plasma en beperkt gevalideerd worden in muizenplasma en hersenhomogenaat. De gevalideerde methode zal vervolgens gebruikt worden om de *in vivo* monsters van de muizen experimenten te analyseren. Met de analysemethode en de *in vivo* experimenten kan bepaald worden hoe goed de inhibitoren werken onder verschillende omstandigheden.

# **1.1 Farmacologie**

De twee transporteiwitten die in deze studie toegepast gaan worden bevinden zich in verschillende organen en cellen in een organisme, zo ook in de BHB. In paragraaf 1.1.1 zal uitgelegd worden wat de BHB is en wat het voor functie heeft. Vervolgens zal in de volgende paragraaf specifiek uitgelegd worden wat de functie is van de transporteiwitten die in deze studie gebruikt worden.

# **1.1.1 Blood-Hersen Barriere**

De hersenen worden beschermd tegen endogene- en xenobiotische stoffen door de BHB. Naast bescherming van de hersenen zorgt de BHB ook voor de juiste regulatie van zouten en voedingstoffen die nodig zijn om de neuronale netwerken optimaal te laten functioneren.<sup>[1]</sup> De meeste medicijnen behoren tot deze endogene- en xenobiotische stoffen. Het is daarom niet gemakkelijk om een patiënt met een hersentumor goed te behandelen. Medicijnen en andere componenten kunnen wel door de BHB transporteren maar alleen als ze bepaalde eigenschappen bezitten. Stoffen die lipofiel zijn kunnen via transcellulair transport de hersenen in komen, dit betekent dat ze door het lipofiele karakter door de cel heen kunnen. Stoffen die hydrofiel zijn kunnen dit niet. Deze kunnen alleen via paracellulair transport in de hersenen komen. Door de *tight junctions* (zie figuur 1) die de cellen met elkaar verbindt, ontstaat er een barrière tussen de cellen. Alleen kleine hydrofiele stoffen kunnen via deze weg tussen de cellen door getransporteerd worden. Verder zijn er op de BHB transporteiwitten aanwezig die d.m.v. actief transport stoffen in en voornamelijk uit de hersenen kunnen transporteren, zie paragraaf 1.1.2. Receptor gemedieerde en adsorptie transcytose zijn ook nog twee manieren om stoffen door de BHB te kunnen transporteren, zie figuur 1.<sup>[2]</sup> Voor deze studie is de transport via transporteiwitten het meeste van belang en zal ook verder besproken worden in paragraaf 1.1.2.



Figuur 1| Schematische weergave van het transportmechanisme op de BHB.<sup>[2]</sup>

## 1.1.2 Transporteiwitten

Op de membraan van cellen zitten transporteiwitten, ook wel effluxpompen genoemd. De functie van deze transporteiwitten is het transporteren van endogene- en xenobiotische stoffen uit de cel. Geneesmiddelen zijn in het algemeen xenobiotische stoffen en hebben hierdoor een affiniteit voor de aanwezige transporteiwitten in een cel. Wanneer een geneesmiddel een affiniteit heeft voor een transporteiwit wordt dit geneesmiddel een substraat genoemd. Elke transporteiwit kan meerdere substraten hebben en deze substraten kunnen onderling verschillen in affiniteitssterkte.

Door de aanwezigheid van transporteiwitten op de celmembraan worden de substraten die zich in de cel bevinden uit de cel getransporteerd. Transporteiwitten kunnen onderverdeeld worden in verschillende families. Eén van deze families is de adenosinetrifosfaat (ATP) binding cassette (ABC) transporters. De ABC transporters transporteren substraten d.m.v. actief transport. Wanneer er sprake is van actief transport is er energie nodig. De nodige energie haalt de transporteiwit uit de reactie van ATP naar adenosinedifofaat (ADP). Bij deze reactie wordt ATP gehydrolyseerd naar ADP en komt er energie vrij, figuur 2.<sup>[3]</sup> Deze energie gebruikt de transporteiwit om de substraten uit de cel te transporteren.



Figuur 2 Schematische weergave van de werking van ABC transporters.<sup>[4]</sup>

#### P-glycoproteïne (P-gp)

P-gp is een transporteiwit en behoort tot ABC transporters. De familie ABC transporters is ook onderverdeeld in subfamilies. P-gp behoort tot subfamilie B, wordt daarom ookwel ABCB1 genoemd. Een andere naam die voor ABCB1 gebruikt wordt is Multidrug Resistentie1 (MDR1).<sup>[3]</sup> De benaming ABCB1 wordt gebruikt wanneer men spreekt over de humane vorm van P-gp. Wanneer men spreekt over een dierlijke vorm wordt Abcb1 toegepast. Abcb1a/b is de benaming voor een isoform van de transporter in knaagdieren, verder wordt de benaming gebruikt om de lokalisatie in het organisme aan te duiden. Abcb1a bevindt zich in de BHB en de darmen, Abcb1b komt daar niet voor. Dit geldt ook voor de andere ABC transporter die in deze studie toegepast wordt. P-gp bevindt zich voornamelijk in de BHB, lever, maag-darm kanaal en nieren en is intracellulair en extracellulair aanwezig.<sup>[3]</sup> P-gp bevindt zich ook op de membraan van kankercellen. Dit is efficiënt voor de cellen, op deze manier worden de geneesmiddelen (substraten) uit de kankercel getransporteerd. Hierdoor kan het geneesmiddel niet zijn werk doen. Om dit te voorkomen kan P-gp geblokkeerd worden door een inhibitor,

deze bindt zich aan P-gp waardoor deze niet meer in staat is om geneesmiddelen uit de cel te transporteren, zie paragraaf 1.2.

#### Breast Cancer Resistant Protein (Bcrp1)

Een andere belangrijke ABC transporter is BCRP, ook wel Bcrp1 (dierlijk) of Abcg2 genoemd. In dit verslag zal de benaming Bcrp1 toegepast worden omdat er *in vivo* experimenten uitgevoerd gaan worden in muizen. Men heeft deze ABC transporter zo genoemd omdat deze voor het eerst gekloond is in een borstkankercellijn. Bcrp1 wordt ook wel een half-transporter genoemd, deze heeft namelijk een ander eiwit nodig om een complex te vormen.<sup>[5]</sup> Uiteindelijk is dit complex de functionele transporter en kan het xenobiotische stoffen uit de cel transporteren. De functionele transporter heeft een massa van 145 kDa<sup>[5]</sup> en is daarmee kleiner dan P-gp, die een massa van 170 kDa heeft.<sup>[3]</sup> Net als Pg-p bevindt Bcrp1 zich meer in organen waar de klaring van xenobiotische stoffen plaatsvindt, zoals de lever, het maag-darm kanaal, nieren en BHB. Bcrp1 kan ook net als P-gp geblokkeerd worden, het vermogen van de remming op deze twee ABC transporters is in deze studie van groot belang.

## 1.2 Inhibitoren en substraten

In deze studie worden er twee inhibitoren toegepast die P-gp en Bcrp1 remmen. Elacridar en Tariquidar remmen zowel P-gp als Bcrp1, maar met verschillende potentie. De potentie om P-gp te remmen is echter aanzienlijk groter. Beide inhibitoren zijn ontwikkeld om P-gp te remmen, later bleek dat ze ook een inhibitor zijn voor Bcrp1. In dit onderzoek zal er gekeken worden naar het remmend vermogen van de inhibitoren. In deze paragraaf zullen enkele fysische en chemische eigenschappen van de inhibitoren besproken worden. Verder worden de substraten van P-gp en Bcrp1 die gebruikt gaan worden in dit onderzoek kort besproken.

#### 1.2.1 Elacridar

Elacridar (GF120918) is een krachtige en selectieve inhibitor voor beide transporteiwitten Pg-p en Bcrp1. De meeste Pg-p inhibitoren zijn zwakke of krachtige inhibitoren voor het cytochroom CYP3A4, wat kan leiden tot ongewenste farmacokinetische interacties. Elacridar heeft daarentegen een lage affiniteit voor CYP3A4 en is 100 maal krachtiger dan de veel gebruikte inhibitor cyclosporine A.<sup>[6]</sup> Daarnaast is Elacridar een krachtige inhibitor voor Bcrp1. Substraten voor Bcrp1 krijgen een hogere biologische beschikbaarheid wanneer ze in combinatie met Elacridar worden toegediend.<sup>[6]</sup>

De IUPAC naam van Elacridar is *N*-(4-[2-(1,2,3,4-tertrahydro-6,7-dimethoxy-2-isoquinolyl)ethyl]phenyl)-9,10-dihydro-5-methoxy-9-oxo-4-acridinecarboxamide.

De molecuulformule is  $C_{34}H_{33}N_3O_5$  en de moleculaire massa is 563,64 g/mol. Zie figuur 3 voor de chemische structuur van Elacridar. De oplosbaarheid van Elacridar in water is 0,0123 µg/mL<sup>[7]</sup> (<1 mM) en de oplosbaarheid in dimethylsulfoxide (DMSO) is 41 mg/mL (72,7 mM).<sup>[8]</sup>



Figuur 3 Chemische structuur van Elacridar.<sup>[8]</sup>

#### 1.2.2 Tariquidar

Tariquidar (XR9576) is net als Elacridar een sterke inhibitor voor P-gp. Tariquidar is een selectieve inhibitor en heeft een niet-competitieve interactie met substraten voor P-gp. Tariquidar gedraagt zich als een substraat voor Bcrp1 bij lage concentraties. Wanneer de concentratie hoger is dan 100 nM gedraagt Tariquidar zich als een inhibitor voor Bcrp1.<sup>[9]</sup> Door behandeling met deze inhibitoren worden deze cellen weer gevoeliger voor de medicijnen.<sup>[10]</sup>

De IUPAC naam van Tariquidar is 3-Quinolinecarboxamide,N-[2-[[[4-[2-(3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-2(1H)-isoquinolinyl)ethyl]phenyl]amino]carbonyl]-4,5-dimethoxyphenyl]-. De molecuulformule is  $C_{38}H_{38}N_4O_6$  en de moleculaire massa is 646,73 g/mol. In figuur 4 is de chemische structuur van Tariquidar weergegeven. De

oplosbaarheid van Tariquidar in water is in de literatuur niet bekend maar zal in dezelfde orde liggen als Elacridar (<<<1 mg/mL of <1 mM). De oplosbaarheid in DMSO is 52 mg/mL (80,4 mM). Door de slechte oplosbaarheid in water, worden stoffen met een lage oplosbaarheid in water in de praktijk voornamelijk opgelost in DMSO.<sup>[8]</sup>



Figuur 4| Chemische structuur van Tariquidar.<sup>[8]</sup>

#### 1.2.3 Substraten

Niet alle substraten die in deze studie toegepast worden zijn cytostatica, d.w.z. middelen die toegepast worden tegen kanker. Voor deze studie is het niet van belang dat de substraten cytostatica zijn. De substraten die toegepast worden in deze studie hebben wel een verschillende affiniteit voor P-gp en Bcrp1.

Docetaxel is er één van de substraten die wel een cytostatica is. Docetaxel wordt voornamelijk gebruikt in combinatie met andere cytostatica. Het remt de celdeling van kankercellen en bindt zich aan het microtubiliskelet van de cellen. Hierdoor stabiliseren de microtubili en zal er geen mitose (kerndeling) meer plaats vinden. Het vermenigvuldigen van (kanker)cellen is niet meer mogelijk. Docetaxel wordt toegepast bij onder andere borstkanker, longkanker, maagkanker en slokdarmkanker.<sup>[11]</sup>

Erlotinib is een tyrosinekinase remmer, deze remt de intracellulaire fosforylering van de epidermale groeifactor receptor. Hierdoor wordt de signaaloverdracht geblokkeerd en zullen cellen zich niet meer vermenigvuldigen.<sup>[12]</sup> Erlotinib wordt toegepast bij alvleesklierkanker en longkanker.<sup>[11]</sup>

Loperamide is geen cytostatica maar remt de beweging van de darmen. Het medicijn wordt toegepast tegen diarree.<sup>[11]</sup>

Riluzole vertraagt de voortgang van Amyotrofische Laterale Sclerose. De spierkracht gaat minder snel achteruit en de patiënt kan daardoor beter ademhalen.<sup>[11]</sup>

Vemurafenib is een proteïnekinase remmer. De vorming van geactiveerde B-Raf eiwitten wordt onderbroken. Deze geactiveerde B-Raf eiwitten kunnen celdeling veroorzaken zonder aanwezigheid van groeifactoren. Dit is een mutatie in het B-Raf gen en veel kankerpatiënten hebben deze mutatie.<sup>[12]</sup> Patiënten met deze mutatie krijgen een behandeling met Vemurafenib wanneer de melanoom (huidkanker) uitgezaaid is.

Verapamil is een calciumblokker en blokkeert de calciumkanalen in spiercellen. Hierdoor zullen de spieren minder snel samentrekken. Het gevolg is verwijding van de bloedvaten en verlaging van de bloeddruk. De zuurstoftoevoer naar het hart wordt verbeterd en daarmee wordt de hartslag ook verbeterd.<sup>[11]</sup>

De substraten met de bijbehorende moleculaire massa en molecuulformule zijn weergegeven in tabel 1. De substraten kunnen onderverdeeld worden in drie ordes: zwakke (+), gemiddelde (++) en sterke (+++) substraten. Hoe meer plusjes er achter een substraat staan hoe groter de affiniteit is voor het transporteiwit. Wanneer er het minteken achter een substraat staat heeft deze geen affiniteit voor het transporteiwit. Zie bijlage I voor de structuurformules van de substraten.<sup>[8]</sup>

Analiet	Moleculaire massa	Molecuulformule	Substraat	Affiniteit voor	Affiniteit voor
	(g/mol)		voor:	P-gp	Bcrp1
Docetaxel	807,88	C <sub>43</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>14</sub>	P-gp	+++	-
Erlotinib · HCl	429,89	$C_{22}H_{23}N_3O_4 \cdot HCI$	P-gp/Bcrp1	++	++
Loperamide · HCl	531,50	$C_{29}H_{33}CIN_2O_2 \cdot HCI$	P-gp	++	-
Riluzole	234,20	$C_8H_5F_3N_2OS$	P-gp/Bcrp1	+	+
Vemurafenib	489,92	$C_{23}H_{18}CIF_2N_3O_3S$	P-gp/Bcrp1	++	+++
Verapamil · HCl	491,06	$C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCI$	P-gp	+	-

 Tabel 1| Substraten voor P-gp en Bcrp1 met de bijbehorende moleculaire massa en moleculformule.<sup>[8]</sup>

# 1.3 Het onderzoek

In deze studie zal het remmend vermogen van de Elacridar en Tariquidar onderzocht gaan worden. Er worden verschillende omstandigheden getest, deze zijn verderop in de paragraaf beschreven. Het onderzoek zal beginnen met het opstellen van een analietische methode die nanomolairen kan kwantificeren. Er wordt een LC-MS/MS methode ontwikkeld, geoptimaliseerd en gevalideerd volgens de richtlijnen van het NKI. Deze richtlijnen zijn gebaseerd op de richtlijnen van de Amerikaanse Food and Drug Administration. Voor deze methode is het van belang dat alle analieten in één analietische run bepaald kunnen worden. Dat zijn in totaal twee inhibitoren (Elacridar en Tariquidar) en zes substraten (Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil). Verder zullen deze analieten allemaal een eigen interne standaard (IS) hebben, deze dienen ook in dezelfde analietische run bepaald te worden. Eerst zal er een volledige validatie uitgevoerd worden in humaan plasma, zie paragraaf 2.2. Vervolgens zal er een beperkte validatie uitgevoerd worden in muizenplasma en hersenhomogenaat van muizen. Bij een beperkte validatie wordt de methode alleen getest op de specificiteit en selectiviteit, juistheid en preciesie. Dit wordt gedaan i.v.m. het welzijn van de muizen. Wanneer de methode succesvol gevalideerd is voor de drie matrices zal de methode gebruikt worden voor analyse van de in vivo monsters. Dit zullen plasma- en hersenmonsters zijn van muizen. Deze monsters worden gebruikt om de ratio tussen de concentratie van substraten in de hersenen en in het plasma te berekenen. Deze ratio wordt de hersenen-plasma ratio genoemd. M.b.v. deze ratio kan bepaald worden of de substraten zich voor het grootste deel in de hersenen of in het plasma bevinden. Als de hersenen-plasma ratio laag is, is de concentratie van het substraat in de hersenen ook laag en vice versa.

De *in vivo* experimenten worden uitgevoerd in muizen die geen tumor dragen. Er worden vier type muizen gebruikt: één soort waar beide transporters aanwezig zijn (Wild Type (WT) (P-gp /Bcrp1<sup>+/+</sup>)), één soort waar geen transporters aanwezig zijn (*Knock Out* type (KO) (P-gp /Bcrp1<sup>-/-</sup>)), één soort waar alleen de P-gp transporter (Bcrp1 enkelvoudige KO (P-gp/Bcrp1<sup>+/-</sup>)) aanwezig is en één soort waarvan alleen de Bcrp1 transporter (P-gp enkelvoudige KO (P-gp/Bcrp1<sup>-/-</sup>)) aanwezig is.

In de WT muizen zijn beide transporters aanwezig. Deze muizen worden gebruikt om de maximale remming van beide inhibitoren op beide transporters te onderzoeken. Wanneer er geen transport van het substraat uit de hersenen plaatsvindt worden beide transporters maximaal geremd. Als er wel transport plaatsvindt worden de transporters niet maximaal geremd. Het is alleen nog niet duidelijk welke van de twee transporters er dan niet volledig geremd wordt. Om deze situatie te onderzoeken worden de enkelvoudige KO muizen voor gebruikt. In de P-gp enkelvoudige KO muizen is er geen P-gp aanwezig in het organisme, zo ook niet in de BHB. Wanneer de P-gp enkelvoudige KO muizen bloot gesteld worden aan Elacridar of Tariquidar, remmers van zowel P-gp als Bcrp1, kan bepaald worden hoe goed deze inhibitoren werken voor alleen Bcrp1 in de BHB. Dit kan ook gedaan worden voor P-gp in Bcrp1 single KO muizen. De enkelvoudige KO muizen worden gebruikt om vast te stellen hoe goed de remming van de transporter individueel is. Verder worden er ook gecombineerde P-gp/Bcrp1 KO muizen gebruikt, bij dit type zijn beide transporters niet aanwezig. De gecombineerde P-gp/Bcrp1 KO muizen worden gebruikt als referentie voor de maximale remming van de transporters.

De vier type muizen zitten aan een continu infuus via een intraperitoneale toediening. D.w.z. dat het infuus met de substraten en inhibitoren geïnjecteerd wordt in de buikholte. Door deze toedieningsvorm zullen de analieten niet al eerder opgenomen worden door het maag-darm kanaal en kunnen er constante plasmaspiegels (*steady-state*) bereikt worden t.o.v. een orale toediening. Vervolgens worden er bloedmonsters afgenomen op tijdsputen één, twee en drie uur. Na drie uur wordt de muis gedood en worden de hersenen verzameld. Zie figuur 5 voor een schematische weergave van het verloop van de toediening, verzameling van monsters, voorbewerking en analyse.



Figuur 5 Schematische weergave van het verloop van toediening, verzameling van monsters, voorbewerking en analyse.

De plasmaspiegels die voor de inhibitoren bereikt willen worden zijn 500 nM, 1000 nM en 2000 nM. Deze concentraties van de inhibitoren zijn gerelateerd aan de affiniteitssterkte van de substraten. Bij lage concentraties zijn de inhibitoren ook substraten. Het is dus nodig om hoge concentraties te gebruiken om wanneer ze als inhibitoren toegepast worden. Voor dit onderzoek worden de substraten onderverdeeld in drie ordes: de zwakke, gemiddelde en sterke substraten. Uiteindelijk is het per substraat de bedoeling dat het bekend wordt welke concentraties van de inhibitoren nodig zijn om de remming van de transporters net zo hoog te krijgen als in de controle muizen (KO). Dat wil zeggen dat de hersenen-plasma ratio van de WT muizen net zo hoog is als in de KO muizen. Als de hersenen-plasma ratio van de WT muizen niet meer dan 25% afwijkt van de hersenen-plasma ratio van de volledige KO muizen mag de remming als volledig beschouwd worden. Daarnaast zal er ook onderzocht gaan worden welke van de twee inhibitoren het beste werkt tegen P-gp en Bcrp1.

# **1.4 Hypothese**

De hypothese voor elke type muis is afhankelijk van de toegediende concentratie van de inhibitor en de sterkte van het substraat. De hypotheses die gesteld worden in deze paragraaf over de hersenen-plasma ratio geldt voor elk substraat individueel.

Voor de zwakke substraten wordt er verwacht dat er een lage concentratie (500 nM) van de inhibitoren al genoeg is om de transporters te remmen. Bij de sterke substraten wordt verwacht dat er een hogere concentratie (2000 nM) van de inhibitoren nodig is om de transporters remmen. Dit heeft te maken met het feit dat de sterke substraten sneller en gemakkelijker getransporteerd worden dan zwakke substraten. De plasmaspiegels van de substraten moeten tussen de 50 nM en 100 nM liggen. Deze concentraties zijn hoog genoeg om te kunnen meten met de LC-MS/MS, maar niet zo hoog dat de spiegels toxiciteit geven bij de muizen.

Bij de WT muizen wordt er verwacht dat de hersenen-plasma ratio zonder inhibitoren laag is. Alle transporters zijn aanwezig dus de concentraties van de substraten zal laag zijn in de hersenen. Wanneer de WT muizen de inhibitoren krijgen wordt er verwacht dat de hersenen-plasma ratio hoger wordt.

Voor de enkelvoudige KO muizen wordt er verwacht dat de concentratie van de substraten in de hersenen lager is t.o.v. de concentraties in het plasma bij een lagere concentratie van de inhibitoren. De transporter wordt bij een lagere concentratie niet volledig geremd, hierdoor zal de concentratie van de substraten in de hersenen lager zijn. De hersenen-plasma ratio is dan laag. Wanneer de concentratie van de inhibitoren toeneemt, zal de concentratie van de substraten in de hersenen ook toenemen omdat de transporter sterker geremd wordt door de inhibitoren. In dit geval zal de hersenen-plasma ratio dan groter worden. Verder wordt er bij de enkelvoudige KO muizen verwacht dat de hersenen-plasma ratio hoger is (onder dezelfde condities) ten opzichte van de WT muizen. Er is namelijk voor dit type maar één transporter aanwezig, het is gemakkelijker om één transporter te remmen dan twee.

Voor de volledige KO muizen wordt er verwacht dat de hersenen-plasma ratio hoog is, omdat er geen transporters aanwezig zijn. Verder wordt hier geen effect verwacht van de inhibitoren, Elacridar of Tariquidar. Als er wel een remmend effect waar te nemen is, duidt dit op een niet-specifiek effect. Het zou dan kunnen dat de toegediende substraten voor P-gp en Bcrp1 via een andere route of transporteiwit uit de hersenen getransporteerd wordt.

# **1.5 Doelstelling**

Het doel van deze studie is het onderzoeken van het remmend vermogen van Elacridar en Tariquidar op P-gp en Bcrp1. Met de hersenen-plasma ratio wordt het effect van Elacridar en Tariquidar op de transporters vergeleken. Om uiteindelijk er achter te komen welke inhibitor het beste werkt voor P-gp en Bcrp1 in de BHB en welke concentraties van de inhibitoren nodig zijn om de remming van de transporters in WT muizen zo volledig mogelijk te krijgen.

Om dit te bereiken is er een gevalideerde LC-MS/MS methode nodig waarbij alle analieten, twee inhibitoren, zes substraten en de bijbehorende interne standaarden, in één analietische run gemeten kunnen worden. Deze methode zal toegepast worden voor bepalingen van de concentraties Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil uit drie verschillende biologische matrices (humaan plasma, muizenplasma en muizen hersenhomogenaat).

# 1.6 High-Performance Liquid Chromatography

*High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) is een analyse techniek die veel gebruikt wordt in de analietische chemie om componenten in oplossing van elkaar te scheiden. Componenten kunnen op basis van verschillende eigenschappen van elkaar gescheiden worden. Dit kan o.a. op basis van polariteit (*Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography, Normal Phase Liquid Chromatography* (NPLC) en *Reversed Phase Liquid Chromatography* (RPLC)), molecuulgrootte (*Size Exclusion Chromatography*), affiniteit van moleculen (*Affinity Chromatography*) en elektrische lading (*Ion-Exchange Chromatography*). Voor elke scheidingsmethode wordt er een andere kolom gebruikt en is de kolom de basis voor het scheidingsmechanisme. In het algemeen is de kolom een roestvrij stalen buis met een kolomlengte van 10 - 30 cm en een interne diameter van één à vijf mm.<sup>[14]</sup> De vaste stationaire fase (SF) zit in de kolom en bestaat uit zeer kleine poreuze deeltjes van ongeveer 2 – 10 µm groot. In het geval bij scheiding op basis van polariteit kan de SF polair of apolair zijn. Dit is afhankelijk van de moleculen waar de SF uit opgebouwd is. Door de kolom stroomt een vloeibare mobiele fase (MF), ook wel eluens genoemd. Binnen in de kolom is er een evenwicht aanwezig tussen de MF en de SF.

Een *Reversed Phase* (RP) kolom is apolair en de inhoud van de kolom bestaat meestal uit silica moleculen die gemodificeerd zijn met bijvoorbeeld octadecyl-moleculen  $(C_{18})$ .<sup>[15]</sup> Door de aanwezigheid van de  $C_{18}$  moleculen is de inhoud van de kolom relatief apolair. De silica moleculen kunnen ook gemodificeerd zijn met andere moleculen bijvoorbeeld met octyl-moleculen ( $C_8$ ). Door te variëren in gemodificeerde moleculen kan de kolom relatief meer of minder apolair gemaakt worden.<sup>[15]</sup> De MF die gebruikt wordt bij RP is polair. Een veel gebruikte MF bij RP is water. Een RP kolom wordt gebruikt om relatief apolaire verbindingen van elkaar te scheiden. Bij een *Normal Phase* (NP) kolom is juist het tegenovergestelde het geval. De SF (silica) is bij NP relatief polair en er wordt dan gebruik gemaakt van een apolaire MF, bijvoorbeeld hexaan.

De MF wordt door het HPLC systeem gepompt en dit gebeurt onder een bepaalde volumestroom, genoemd de flow. De flow wordt uitgedrukt in het aantal milliliters MF per minuut (mL/min) dat door de kolom gepompt wordt. De pomp moet een reproduceerbaar, constant en een instelbare flow kunnen geven. In figuur 6 is een systematische weergave van een HPLC systeem weergegeven.<sup>[16]</sup>



Figuur 6 Systematische weergave van een HPLC systeem.[17]

Om storingen in de analyse te voorkomen moet de zuiverheid van de MF hoog zijn, dit wordt bereikt door gebruik te maken van HPLC-quality vloeistoffen en Milli-Q water. Wanneer de samenstelling van de MF gedurende de analietische run constant blijft spreekt men van een isocratische elutie. Als de polariteit van de componenten ver uit elkaar liggen, de complexiteit van het mengsel hoog of de analysetijd erg lang is kan er een gradiëntmethode gebruikt worden. Bij een gradiëntmethode verandert de samenstelling van het eluens gedurende de analyse. Bij een RP methode begint men dan met een hogere concentratie water in het eluens en wordt het eluens tijdens de run relatief meer apolair gemaakt. Dit wordt gedaan door organische modifers toe te voegen. Veel gebruikte organische modifers in de praktijk zijn methanol (MeOH), acetonitril en tetrahydrofuraan.

In het HPLC systeem zit een ontgasser, die onopgeloste gassen uit de MF verwijdert. Zeker bij een gradiëntanalyse is het van belang dat de ontgasser goed functioneert. Om lage druk gradiënt mengpompen goed te laten werken is de ontgasser noodzakelijk. Zodat er geen luchtbellen bij de kleppen (*check valves*) ontstaan, anders sluiten de kleppen niet goed meer en zal de MF in de tegengestelde richting terug lopen. Dit veroorzaakt druk fluctuaties in het systeem wat leidt tot verhoogde of verlaagde retentietijden ( $t_R$ ) op willekeurige tijdstippen.

Het monster wordt handmatig d.m.v. een injectiespuit of automatisch met een auto-injector op de kolom gebracht. De auto-injector zorgt ervoor dat het monster automatisch en steeds op dezelfde systematische

manier geïnjecteerd wordt op de voorkolom. De voorkolom is ter bescherming en het bestaat uit hetzelfde pakkingsmateriaal als de kolom. De voorkolom zorgt ervoor dat componenten, die niet tot het scheidingsmechanisme behoren, al (deels) opgevangen worden zodat de kolom langer mee gaat en minder snel vervuild is. Vervolgens gaat het door naar de kolom en daar bindt het analiet aan de SF. Naarmate de MF door de kolom stroomt, onder een hoge druk, elueert het analiet met de MF mee. Het analiet verlaat de kolom en wordt door een detector gedetecteerd.



**Figuur 7** | Voorbeeld chromatogram van Elacridar bepaald met een LC-MS/MS analyse.<sup>[6]</sup>

Een detector reageert op de aanwezigheid van een component en geeft vervolgens een elektrisch signaal. Het signaal wordt vervolgens gebruikt bij een kwantitatieve analyse om de concentratie van de aanwezige analieten te bepalen.<sup>[16]</sup> Dit signaal wordt door een gegevensverwerker geregistreerd en omgezet naar een chromatogram, zie figuur 7. De x-as van een chromatogram geeft de t<sub>R</sub> van de analietische run weer in minuten. De y-as geeft de intensiteit van het signaal weer, dit is een maat voor de concentratie van het analiet. In het voorbeeld chromatogram is het signaal uitgedrukt in *counts per seconden* (cps) omdat er hier gebruik gemaakt is van een massaspectrometer als detector. Veel verschillende soorten detectoren kunnen gekoppeld worden aan een LC-systeem. Enkele voorbeelden van verschillende meetprincipes zijn: Massaspectrometrie

(MS) (detectie op basis van massa-lading verhouding (m/z-ratio)), *Ultra Violet-Visible Spectroscopie* (UV/VIS) (detectie op basis van lichtabsorptie) en de fluorometer (detectie op basis van fluorescentie).

# **1.7 Massaspectrometrie**

MS is een veel gebruikte en veelzijdige analyse techniek die vele toepassingen heeft in de chemie. MS is een zeer gevoelige techniek en wordt gebruikt om componenten te detecteren, te identificeren en te kwantificeren op zeer laag niveau (nanomolair). Verder kan MS gebruikt worden voor kwantificatie en profilering van isotopen (meerdere vormen van een element die verschillen in het aantal neuronen, met als gevolg variatie in het molecuulgewicht<sup>[18]</sup>), het analyseren van simpele en complexe chemische en biologische mengsels en het bestuderen van de structuur van moleculen. De massaspectrometer meet de intensiteit van een ion als functie van de m/z-ratio. Voor elk ion is deze meetwaarde specifiek en zo kunnen moleculen van elkaar onderscheiden en geïdentificeerd worden.<sup>[19]</sup>

MS wordt voornamelijk gebruikt in combinatie met gaschromatografie (GC-MS) en vloeistofchromatografie (LC-MS). Een GC of HPLC systeem zit aan de massaspectrometer aangesloten via een geschikt interface. Het interface is een belangrijk onderdeel van de koppeling tussen LC-MS en GC-MS. Het ioniseren van moleculen vindt hier ook plaats en wordt ook wel de ionisatiekamer genoemd. Wanneer de kwaliteit van de interface laag is zal dit zichtbaar zijn in het chromatogram, de signalen zijn dan laag en de ruis is hoog.<sup>[20]</sup> In paragraaf 1.5 zal er kort besproken worden wat de voordelen zijn van LC-MS ten opzichte van GC-MS.

Nadat de analieten de analietische kolom verlaten moeten ze ionen vormen voordat ze geanalyseerd kunnen worden. Dit gebeurt in de ionisatiekamer en de componenten kunnen d.m.v. verschillende ionisatiebronnen geïoniseerd worden. Ionisatie vindt plaats onder atmosferische druk. Enkele voorbeelden van veel gebruikte ionisatietechnieken zijn: *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI), *Electron Impact Ionization* (EI), *Electrospray Ionization* (ESI), *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI). APCI, ESI en MALDI vallen onder de zachte ionisatie technieken, de analieten worden minder gefragmenteerd ten opzichte van andere ionisatietechnieken. Door deze zachte techniek kunnen eiwitten en andere biologische matrices geanalyseerd worden om hun moleculair gewicht te bepalen.<sup>[21]</sup> Harde ionisatie technieken zoals EI ioniseren de analieten sterker waardoor er meer fragmenten ontstaan en het *fingerprint* gebied van de analieten zichtbaar wordt.<sup>[20]</sup> In paragraaf 1.5.1 zal er dieper in gegaan worden op de ionisatie van analieten met behulp van ESI. Deze ionisatie technieken kunnen de analieten positief of negatief geladen in de gasfase brengen.

De gevormde ionen komen in de mass analyzer, deze scheidt de ionen op basis van hun m/z-ratio en registreert hun intensiteit. De ionen kunnen van elkaar gescheiden worden door ze te versnellen en bloot te stellen aan een magnetisch of elektrisch veld. Voorbeelden van mass analyzers zijn: quadrupole, *Time-of-Flight, Magnetic Sector Analyzer, Fourier Transform* MS en *Ion Trap* MS. De mass analyzers staan onder hoog vacuüm dit is nodig omdat ionen in de gasfase zeer reactief zijn en het helpt om de snelheid van de ionen door de mass analyzers te verhogen. Het is van belang dat de mass analyzer voldoet aan een aantal eisen om goed te functioneren. Enkele voorbeelden zijn de resolutie (het vermogen om ionen te scheiden met een kleine variatie in m/z-ratio's), nauwkeurigheid van de massa's (de onzekerheid in de bepaalde m/z-ratio's) en de mogelijkheid om met meerdere analyzers te werken (MS/MS)<sup>[22]</sup>. In deze studie wordt een triple quadrupole mass analyzer gebruikt, in paragraaf 1.5.2 zal dit onderwerp uitgebreider besproken worden.

Als laatste zal de ionenstroom door gaan naar de detector. Voornamelijk wordt de electron multipler detector gebruikt, zie paragraaf 1.5.3. Twee andere voorbeelden zijn de *Faraday cup* en *ion-to-photon* detector. Het aantal ionen die de mass analyzer verlaat is relatief laag. Om het signaal te verhogen wordt er een versterker gebruikt. Het signaal (elektrische stroom) wordt vervolgens verwerkt door een recorder tot een massaspectrum en wordt de m/z-ratio weergegeven als functie van de gemeten intensiteit in cps.

# **1.8 LC-MS/MS**

LC-MS is een techniek die bestaat uit een HPLC systeem dat aangesloten is op een massaspectrometer. De HPLC fungeert als scheidingsmechanisme en de massaspectrometer als detector. Deze twee systemen zijn op elkaar aangesloten via een geschikt interface. Dit is nodig omdat de HPLC met vloeibare oplossingen en de massaspectrometer in gasfase werkt. Het voordeel van LC-MS ten opzichte van GC-MS is dat er een groter scala aan componenten geanalyseerd kan worden. Componenten met een grote moleculaire massa, die polair of thermo instabiel zijn kunnen wel met een LC-MS geanalyseerd worden maar niet met een GC-MS analyse. Een

LC-MS systeem is hierdoor ook geschikt voor de analyse van biologische componenten zoals: peptiden, proteïnen, geneesmiddelen en metabolieten, biomarkers, oligonucleotiden en samenstellingen van olie en voedingsmiddelen.<sup>[19]</sup>

De techniek die in deze studie gebruikt gaat worden is een LC-MS/MS systeem, ook wel LC-Tandem MS genoemd. Het verschil met een LC-MS systeem is dat een LC-MS/MS systeem meerdere mass analyzers bevat. Hierdoor is het mogelijk om de selectiviteit en de fragmentatie te onderzoeken van specifieke ionen in een mengsel van ionen.<sup>[23]</sup>

#### **1.8.1 Electrospray ionisation**

De ionisatiebron die in deze studie gebruikt gaat worden is de ESI. ESI is een zachte ionisatie techniek die grote thermolabiele componenten in de vloeibare fase omzet naar de gasfase.<sup>[24]</sup> Dit gebeurt zonder fragmentatie van de componenten. In de ionisatiekamer zit een capillaire naald, hieruit sprayt het analiet in oplossing. Op het uiteinde van de capillaire naald staat een zeer hoge spanning (2-6 kV). Op ongeveer één tot drie centimeter van de capillaire naald bevindt zich de *heated capillairy* deze heeft verstelbare temperatuur van 100 – 400 °C. Door het spanningsverschil tussen de capillaire naald en de *heated capillairy* ontstaat er een sterk elektrisch veld. Hierdoor wordt de gesprayde oplossing verstrooid in een damp van geladen druppels.<sup>[24]</sup> Afhankelijk van de ingestelde modus worden de druppels door middel van oxidatie- en reductiereacties negatief of positief geladen. Door toevoer van een stroom stikstofgas (*drying gas*) worden de geladen druppels steeds kleiner. Door verdamping van het oplosmiddel neemt de ladingsdichtheid van elke druppel toe. Wanneer de elektrostatische kracht de oppervlakte spanning overschrijdt (Rayleigh limiet) worden de druppels steeds kleiner. Uiteindelijk zullen er alleen nog vrije ionen in de gasfase aanwezig zijn. Deze worden met behulp van een *nebulsing gas* (stikstof) en een elektrisch veld door de *sampling cone* naar de mass analyzers geleid.<sup>[24]</sup> Zie figuur 8 voor een schematische weergave van de ESI.



# 1.8.2 Triple Quadrupole analyzer

Een triple quadrupole is de meest toegepaste mass analyzer bij LC-MS/MS systemen en bestaat uit drie quadrupoles die lineair aan elkaar verbonden zijn, zie figuur 9.<sup>[23]</sup> De drie analyzers zijn onderverdeeld in de quadrupole 1 (Q1), quadrupole 2 (Q2) en de quadrupole 3 (Q3). Deze staan onder hoog vacuüm om de snelheid van de ionen door het systeem te bevorderen en storingen van luchtdeeltjes te voorkomen. Door het vacuüm zullen de ionen hun lading niet verliezen als ze tegen elkaar botsen. De Q1 en de Q3 zijn identiek aan elkaar en zijn beide mass analyzers die zijn uitgerust met vier parallelle cilindrische metalen staven met een diameter van ongeveer een halve cm en een lengte van vijftien cm. Tussen deze staven staat een combinatie van de gelijkstroom en radiofrequentie potentialen. De Q2, bestaat alleen uit een radiofrequentie potentiaal en wordt ook wel de *collision cell* genoemd.<sup>[23]</sup>



Figuur 9 Schematische weergave van een triple quadrupole.[23]

De ionen komen eerst binnen in de Q1, daar worden de ionen met de juiste m/z-ratio geselecteerd (*parent ion* of M+). Door de ingestelde gelijkstroom en radiofrequentie zullen alleen ionen met een bepaalde m/z-ratio in het magnetisch veld oscilleren. Ionen met de niet-geselecteerde m/z-ratio komen niet in resonantie en raken uit de golfbaan. Hierdoor botsen ze tegen de potentialen en zullen ze niet de Q2 of de detector bereiken. Andere componenten die aanwezig zijn, doordat het analiet zich in een complexe matrix bevindt, kunnen niet gedetecteerd worden wanneer deze niet de geselecteerde m/z-ratio hebben. Dit maakt deze techniek zeer gevoelig. Er kunnen meerdere massa's geselecteerd worden, dit gebeurt door de frequentie van de radiofrequentie potentiaal in de quadrupole steeds te veranderen. Dit kan bij de selectie in beide mass analyzers (Q1 en Q3).

De geselecteerde ionen gaan ze door naar de *collision cell* en worden gefragmenteerd. Dit proces heet *Collisionally Activated Dissociation* (CAD).<sup>[23]</sup> Om een lokaal hogedruk gebied te creëren zit de quadrupole in een keramische huls gevuld met helium, argon of xenon (*collision gas*).<sup>[23]</sup> In de *collision cell* botsen de ionen met neutrale gasmoleculen. Hierdoor wordt de interne energie van de ionen verhoogd door conversie van kinetische energie naar interne energie. Waardoor de ionen uiteindelijk fragmenteren. De keuze van het *collision gas*, de druk, de energie en de hoek waaronder de ionen met de neutrale gasmoleculen botsen, beïnvloedt de hoeveelheid waarmee de interne energie wordt verhoogd.

De gevormde fragmenten van een ion, genoemd *product ion*, worden naar de Q3 geleid en worden daar geselecteerd en naar de detector geleid. De detector zet het signaal van het *product ion* om in een grafisch massaspectrum. Elke meting die gedaan wordt, is slechts van één signaal voor één massa. Om een goed massaspectrum te verkrijgen worden er zeer veel metingen gedaan.

#### **1.8.3 Electron multiplier detector**

In deze studie wordt een *Cannel Electron Mulitplier* (CEM) gebruikt om de ionen die uit de Q3 van de triple quadrupole komen te kwantificeren.

De CEM bestaat uit een glazen buis deze staat net als de triple quadrupole onder vacuüm. Voor de CEM zit een deflector, een metalen plaat, die de ionen de CEM in leidt. De oppervlakte aan de binnenkant van deze glazen buis is gecoat met een weerstandsmateriaal, een loodoxide laag. Door deze laag krijgt de buis geleidingsvermogen en secundair emissie vermogen. Over deze loodoxide laag zit een dunne metalen laag van elektroden. De weerstand tussen de loodoxide laag en de elektroden zit tussen de 10<sup>8</sup> en 10<sup>13</sup> ohm.<sup>[25]</sup> Samen met een spanning die op de deflector gebracht wordt zorgt dit voor een sterk elektrisch veld in de glazen buis. Door het spanningsverschil tussen het begin en einde van de buis ontstaat er een elektrogradiënt, hierdoor worden de elektronen verder in de detector getrokken.<sup>[25]</sup> De spanning op de buis is afhankelijk van de polariteit van de ionen.

lonen die de buis ingeleid worden, worden versneld door het sterke aanwezige elektrische veld en botsen tegen de wanden van de buis, zie figuur 10. Wanneer de wanden getroffen worden door invallende ionen, worden er secundaire elektronen uitgezonden.<sup>[25]</sup> Deze botsen vervolgens ook weer tegen de wand. Dit proces wordt herhaald totdat er een puls van elektronen ontstaan is. De versterking van de puls kan variëren tussen de  $10^3 - 10^8$  elektronen. De elektrische stroom (signaal) wordt vervolgens door een recorder verwerkt tot een massaspectrum en wordt weergegeven in cps.



Figuur 10 | Schematische weergave van een CEM en het verloop van de ionen.<sup>[26]</sup>

#### 1.8.4 Scanmodus massaspectrometer

Wanneer er een mengsel van analieten in oplossing geïnjecteerd wordt in de HPLC ontstaat er een chromatogram. In dit chromatogram is voor elke analiet een piek waar te nemen met de bijbehorende  $t_R$ . De  $t_R$  is voor elk analiet verschillend. De MS/MS kan van elke piek in het chromatogram een eigen spectrum opnemen. Met de MS/MS kunnen er verschillende scanmodi uitgevoerd worden.

Er kan in de *Total Ion Current* (TIC) en in de *Selected-ion Monitoring* (SIM) modus gemeten worden. Zoals de naam al zegt worden er in de SIM modus alleen geselecteerde m/z-ratio's gedetecteerd. In deze studie wordt de TIC modus toegepast tijdens het tunen van de MS/MS. Er wordt een totale scan uitgevoerd en alle ionen worden gedetecteerd. Het TIC chromatogram geeft het signaal van alle ionen weer als functie van de tijd of het aantal scans. Het tunen houdt in dat de analieten zichtbaar gemaakt worden voor de massaspectrometer, zie paragraaf 2.1.1 voor verdere informatie over het tunen.

Al eerste wordt er in de Q1 een ion met een bepaalde massa geselecteerd (*parent ion*). Alleen dit ion zal verder gaan naar de Q2 en wordt vervolgens daar gefragmenteerd tot het *product ion*. Het *parent ion* kan volgens verschillende routes gefragmenteerd worden. Er wordt onderscheid gemaakt in verschillende fragmentatieroutes waarbij verschillende fragmenten ontstaat uit hetzelfde *parent ion*. In deze studie wordt de mode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) toegepast. In deze mode ontstaan er meerdere *product ions* uit hetzelfde *parent ion*, zie formule 1. In de tweede fase van de scan worden de *product ions* gescand met behulp van een MS2 scan. Met deze scan wordt zichtbaar welke ontstane *product ions* er geselecteerd moeten worden door de Q3 om vervolgens door de detector gedetecteerd te worden. Dit is een zeer gevoelige techniek omdat zowel in de Q1 als in de Q3 specifieke ionen geselecteerd worden.

$$ABCD^+ \rightarrow AB + CD^+$$
 $ABCD^+ \rightarrow AB^+ + CD$ 
(1)

Tijdens een MRM scan worden cyclussen uitgevoerd die continue herhaald worden tijdens de analyse. Eén cyclus bestaat uit een scan naar een geselecteerde massa, genoemd *dwell time*, en uit pauzes. In deze pauzes worden de voltages in het instrument veranderd en wordt de *collision cell* (Q2) geleegd. Een analyse bestaat uit meerdere cyclussen omdat één cyclus maar één datapunt oplevert per *product ion*. Het uiteindelijke chromatogram is een verzameling van meerdere datapunten tijdens de run van één analyse. Dit chromatogram is weergegeven als een *Extracted Ion Chromatogram* (XIC). Een XIC wordt toegepast wanneer er een analyse uitgevoerd wordt van de intensiteit van een TIC of SIM scan uitgezet als functie van de tijd.

# 2. LC-MS/MS methode ontwikkeling en validatie

# 2.1 Methode ontwikkeling

Voordat er analyses uitgevoerd kunnen worden is het van belang dat de juiste methode ontwikkeld wordt. In deze paragraaf zal besproken worden welke aspecten er onderzocht moeten worden om uiteindelijk een goede methode te ontwikkelen, te optimaliseren en te valideren. De aspecten die in dit hoofdstuk behandeld worden zijn: het tunen van de massaspectrometer, het bepalen van de juiste chromatografie, voor elke analiet een geschikte IS vinden en het bepalen van de optimale extractievloeistof.

#### 2.1.1 Tunen massaspectrometer

Voordat de analieten gedetecteerd kunnen worden moeten deze eerst 'herkenbaar' gemaakt worden voor de MS/MS. Dit wordt gedaan door het instrument te tunen voor de analieten, een eenmalige analyse voor elk analiet. Van elk analiet dient een zuivere oplossing gemaakt te worden en wordt de m/z-ratio voor het *parent ion* en *product ion* bepaald. De juiste instellingen worden onderzocht en geoptimaliseerd om zo elk analiet zo gevoelig mogelijk te kunnen meten.

Om het *parent ion* te selecteren wordt er een Q1 scan over een relevant massagebied (100-1000 amu) uitgevoerd. Wanneer deze bekend is wordt er een MS2 scan uitgevoerd en wordt het optimale *product ion* geselecteerd. Het *product ion* die de hoogste intensiteit weergeeft in het spectrum wordt gebruikt om het instrument verder te optimaliseren. Door dit *product ion* te selecteren wordt er uiteindelijk een hoger signaal bereikt dan wanneer er een *product ion* geselecteerd wordt die een lagere intensiteit heeft. Het optimaliseren van de parameters gebeurd met behulp van een MRM scan. De parameters *collison gas, curtain gas, ion spray voltage, heating gas, nebulizer gas* en de temperatuur zijn constante waarden. Deze kunnen aangepast worden maar dat is voor deze studie niet van toepassing. De volgende parameters worden per analiet geoptimaliseerd. Dit wordt gedaan om voor elk analiet een zo gevoelig en hoog mogelijk signaal te verkrijgen, zie paragraaf 4.1.1 voor de resultaten van het tunen.

- Collision Energy (CE): controleert de hoeveelheid energie die het parent ion nodig heeft om te versnellen en vervolgens te fragmenteren. Wanneer de CE hoog wordt ingesteld zal er meer energie ontstaan en het zal ion een hogere snelheid hebben. Hierdoor wordt het parent ion meer gefragmenteerd.<sup>[27]</sup>
- Collision cell exit Potential (CXP): deze parameter zorgt ervoor dat de ionen die geselecteerd zijn in de Q2 versneld en geleid worden naar de Q3.
- Declustering Potential (DP): het potentiaal verschil tussen de *orifice* en de grondtoestand. Hoe hoger het potentiaal verschil is, hoe groter het vermogen om de clusters van moleculen te fragmenteren. Wanneer de DP parameter te hoog ingesteld staat bestaat er een kans dat het analiet al fragmenteert in de ionisatiebron.<sup>[27]</sup>
- *Entrance Potential* (EP): een potentiaal die zorgt dat de ionen door het hoge druk gebied van de mass analyzers geleid worden<sup>[27]</sup>.
- *Focusing Potential* (FP): is gelijk met de DP en is alleen nog aanwezig is de oudere MS/MS systemen (API2000 en API3000). De FP zorgt samen met de DP voor verlaging van de chemische ruis.

De DP, FP en de EP zijn *pre-collision cell voltages*. Optimalisatie van deze parameters bestaat uit het geleidelijk veranderen van het voltage bereik, tijdens het verzamelen van de signalen van de ionen.<sup>[27]</sup>

#### 2.1.2 Chromatografie

De analieten en de bijbehorende IS dienen in één analietische run gemeten te worden. Naast het optimaal tunen van de massaspectrometer is het ook van belang dat de chromatografie van de HPLC optimaal is. In

totaal zijn er vijftien analieten die geanalyseerd worden. In verband met de hoeveelheid analieten zal de optimalisatie beginnen bij de keuze of een gradiënt of isocratische analyse toegepast gaat worden. Er gaat gekeken worden naar de verhouding MeOH en water in de MF. Verder zal de optimale injectievolume en academische standaard (AS) oplossing bepaald worden. De AS is een oplossing van MeOH en water waar het analiet in opgelost wordt, deze oplossing wordt gebruikt tijdens de validatie. De optimale verhouding MeOH en water in de AS is van belang voor de oplosbaarheid van de analieten. De t<sub>R</sub> van de analieten mag niet langer zijn dan vijftien minuten en de chromatografische pieken moeten symmetrisch zijn. Op basis van de verwachte concentraties in de plasma- en hersenmonsters zal het bereik van de kalibratielijn bepaald worden. De verwachte concentratie voor de substraten is tussen de 50 nM en 100 nM. De verwachte concentraties voor de inhibitoren zijn 500 nM, 1000 nM en 2000 nM.

#### 2.1.3 Interne standaarden

Om te corrigeren voor matrix effecten, ion suppressie en het verbeteren van de precisie van de analyse wordt er een IS toegevoegd. De concentratie van de IS moet in alle monsters hetzelfde zijn en moet in het concentratiebereik van de monsters liggen. De meest geschikte IS is een stabiel isotoop van het analiet. Dit is hetzelfde analiet alleen zijn ten minste drie <sup>1</sup>H-atomen vervangen door een deuterium atoom (<sup>2</sup>H). Bij andere elementen is dit ook mogelijk door bijvoorbeeld <sup>12</sup>C-atomen te vervangen door <sup>13</sup>C-atomen en/of <sup>14</sup>N-atomen door <sup>15</sup>N-atomen. In deze studie is voor elk analiet een stabiel isotoop aanwezig die gebruikt gaat worden als IS. Alleen voor Tariquidar dient nog een geschikte IS gevonden te worden. De IS dient zo gekozen te worden dat het qua structuur en chemische eigenschappen op Tariquidar lijkt. Ook is het van belang dat de IS op hetzelfde moment als Tariquidar uit de kolom elueert en de ionisatiekamer bereikt. De volgende IS zijn aanwezig: Docetaxel-d9, Elacridar-d4, Erlotinib-d6, Loperamide-d6, Riluzole [<sup>13</sup>C][<sup>15</sup>N<sub>2</sub>], Vemurafenib [<sup>13</sup>C] en Verapamild6.

#### 2.1.4 Extractievloeistof

Om de analieten zo optimaal mogelijk te extraheren uit de matrix, wordt de optimale extractie-vloeistof bepaald. Dit wordt gedaan door de recovery en de ion suppressie te bepalen. De recovery is de terugvinding van het analiet na de extractie. Ion suppressie is een vorm van matrixeffecten, zie ook paragraaf 2.2. Het oplosmiddel met de hoogste recovery en de laagste ion suppressie zal de optimale extractie vloeistof zijn. De oplosmiddelen die getest gaan worden zijn: diethylether, ethylacetaat en *tert*-butylmethylether.

# 2.2 Validatie

De geoptimaliseerde LC-MS/MS methode zal volgens het NKI opgestelde richtlijnen gevalideerd worden m.b.v. het statistiek programma IBM SPSS Statistics 22. Het is belangrijk dat de validatie voldoet aan alle opgestelde voorwaarden om aan te tonen dat de bioanalietische methode geschikt is voor een kwantitatieve bepaling van het geneesmiddel in een biologische matrix. Een methode wordt gevalideerd wanneer er een nieuwe methode ontwikkeld is of als de methode voor het eerst in het laboratorium wordt toegepast. De methode zal gevalideerd worden voor de volgende onderdelen:

#### • Bepalingsgrenzen:

De laagste bepalingsgrens (LLQ) en de hoogste bepalingsgrens (ULQ), zijn de laagste en de hoogste concentraties die met een correcte juistheid en precisie gekwantificeerd kunnen worden. Voor het bepalen van de LLQ en de ULQ wordt de relatieve standaarddeviatie (%RSD) en de afwijking tussen de gemeten concentratie en de nominale concentratie (%DEV) berekend. Dit wordt gedaan volgens formule 2 en 3, in formule 2 staat de s voor de standaarddeviatie (stdev.) en de  $\bar{x}$  voor het gemiddelde. De waarden van de %RSD en de %DEV moeten kleiner zijn dan 20%.

$$\% RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$
 (2)<sup>[28]</sup>

$$\% DEV = \frac{gemiddelde \ gemeten \ concentratie-nominale \ concentratie}{nominale \ concentratie} \cdot 100\%$$
(3)

#### • Detectiegrens (LOD):

De laagste concentratie die met de analyse methode bepaald kan worden is de LOD. Om de LOD te bepalen wordt de signaal/ruis verhouding vermenigvuldigd met drie en vergeleken met de laagste standaard.

#### • Juistheid:

De juistheid geeft de overeenstemming van het gemiddelde van een reeks waarden en de nominale waarden weer. De juistheid wordt bepaald met formule 4 en moet tussen de 85% en 115% liggen.<sup>[29]</sup>

$$Juistheid = \frac{gemiddelde \ gemeten \ concentratie}{nominale \ concentratie} \cdot 100\%$$
(4)

#### • Lineariteit:

Binnen de bepalingsgrenzen is een rechtlijnig verband aanwezig tussen het respons en de concentratie van het te bepalen analiet. De lineariteit zal getest worden op drie normen: de weegfactor, de lineariteits toets (F-toets of de *Lack of Fit* (LOF)-toets) en de aanwezigheid van een constante systematische- en proportionele fout (t-toets)<sup>[29]</sup>

De weegfactor is de responsfunctie die beschrijft welke kalibratielijn het beste model weergeeft  $(1/x^{pv})$  ten opzichte van je kalibratiepunten. Wanneer er een weegfactor van 2,0 gekozen wordt zal de kalibratielijn beter passen voor de kalibratiepunten in het lage gebied van de kalibratielijn. De kalibratielijn wordt zwaarder beoordeeld (gewogen) met een weegfactor van 2,0. Wanneer er een weegfactor van 1,0 toegepast wordt zal de kalibratielijn beter passen voor de kalibratiepunten in het hoge gebied van de kalibratielijn. Een weegfactor van 1,0 toegepast wordt zal de kalibratielijn beter passen voor de kalibratiepunten in het hoge gebied van de kalibratielijn. Een weegfactor van 1,0 toegepast wordt zal de kalibratielijn beter passen voor de kalibratiepunten in het hoge gebied van de kalibratielijn. Een weegfactor van 1,0 weegt dus minder zwaar en past beter wanneer de duplo kalibratiepunten meer spreiding hebben. De weegfactor wordt bepaald met behulp van SPSS.

De LOF wordt bepaald met formule 5. De kwadratensom van residuen (SS<sub>r</sub>) wordt opgesplitst in een kwadratensom ten gevolge van de spreiding in de meting (SS<sub>pe</sub>). SS<sub>r</sub> zal berekend worden met regressie analyse, SS<sub>pe</sub> zal berekend worden met ANOVA-analyse in SPSS en df<sub>r</sub> en df<sub>pe</sub> zijn de bijbehorende vrijheidsgraden.

$$F_{LOF} = \frac{(SS_r - SS_{pe})/(df_r - df_{pe})}{SS_{pe/df_{pe}}}$$
(5)

De grenswaarde voor F wordt opgezocht in de literatuur met een betrouwbaarheidsinterval (BI) van 95% ( $\alpha$ = 0,05) (df<sub>r</sub>-df<sub>pe</sub>; df<sub>pe</sub>)<sup>[30]</sup>. Wanneer F<sub>Lof</sub> < F<sub>( $\alpha$ =0,05</sub>) dan is er geen LOF en kan de kalibratielijn als lineair beschouwd worden.

De *student* t-toets wordt uitgevoerd om te testen of de analietische methode een constante systematische en/of proportionele fout bevat. Een constante systematische fout kan veroorzaakt worden door constante invloeden. Dit veroorzaakt een afwijking in één bepaalde richting. Wanneer er een constante systematische fout aanwezig is kan deze verholpen worden door de constante invloeden te verhelpen. Een proportionele fout wordt veroorzaakt door toevallige schommelingen in de meetomstandigheden. Dit zijn willekeurige fouten die per analyse kunnen verschillen en kunnen lastiger verholpen worden. Deze fout kan zowel positief of negatief zijn. Ook deze toets wordt uitgevoerd met SPSS en gaat uit van formule 6. Waarbij  $\alpha$  gelijk is aan het intercept,  $\beta$  is de helling en  $\epsilon$  de toevallige fout.<sup>[29]</sup>

Gemeten concentratie = 
$$\alpha + \beta \cdot de$$
 nominale concentratie +  $\epsilon$  (6)

 $\alpha \neq 0$ , de methode bevat een constante systematische fout.  $\beta \neq 1$ , de methode bevat een proportionele fout.

#### • Precisie:

De precisie is onderverdeeld in de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid. Zowel de herhaalbaarheid als de reproduceerbaarheid worden bepaald met een ANOVA-analyse. De herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid moeten kleiner zijn dan 15%.<sup>[29]</sup>

De herhaalbaarheid is de variatie van resultaten binnen één analietische run onder gelijke omstandigheden. De herhaalbaarheid, uitgedrukt als de %RSD, wordt bepaald met formule 7.<sup>[29]</sup> De MS<sub>WG</sub> staat voor de *Mean Square Within Groups* en de GM staat voor het totaal gemiddelde van de gemeten concentraties over alle series.

$$Herhaalbaarheid = \frac{(MS_{WG})^{0,5}}{GM} \cdot 100\%$$
 (7)

De reproduceerbaarheid is de variatie van resultaten tussen verschillende analietische runs onder verschillende omstandigheden. De reproduceerbaarheid wordt bepaald met formule 8.<sup>[29]</sup> De MS<sub>BG</sub> staat voor de *Mean Square Between Groups* en n is het aantal herhaalde analyses van de gemeten concentratie in één run.

$$Reproduce erbaarheid = \frac{\frac{(MS_{BG} - MS_{WG})^{0,5}}{n} \cdot 100\%$$
(8)

#### • Recovery en ion suppressie:

De terugvinding van het analiet na de extractie wordt bepaald met formule 9. Een hoge recovery is gewenst.

$$Recovery = \frac{helling \ kalibratielijn \ in \ biologische \ matrix}{helling \ gespikte \ kalibratielijn} \cdot 100\%$$
(9)

Ion suppressie is een vorm van matrixeffect wat veel negatieve invloed heeft op een gevoelige analyse zoals de LC-MS/MS. Andere aanwezige componenten in de oplossing, uit de biologische matrix, kunnen op hetzelfde moment uit de kolom elueren als het analiet. Hierdoor komen ze ook tegelijk de ionisatiekamer binnen en dat heeft een negatieve invloed op de ionisatie van het analiet, de precisie en de gevoeligheid van de metingen.<sup>[31]</sup> De ion suppressie wordt berekend volgens formule 10 en dient zo laag mogelijk te zijn.

$$Ion \ suppressie = \frac{(helling \ kalibratielijn \ in \ AS - helling \ gespikte \ kalibratielijn)}{helling \ kalibratielijn \ in \ AS} \cdot 100\%$$
(10)

#### • Specificiteit en selectiviteit:

Een analyse methode is specifiek als het alleen het analiet van interesse kan bepalen. Als het te bepalen analiet te onderscheiden is van andere aanwezige verbindingen waar men niet in geïnteresseerd is, is de methode selectief.

#### • Stabiliteit:

De invloed van de tijd en de bewaarcondities op de concentratie van de monsters en standaarden. De onderdelen die getest gaan worden in deze studie zijn:

- Stabiliteit van de analieten in de biologische matrix.
- Het vries-en-dooi cyclus van de monsters.
- Stabiliteit van opgewerkte monsters die bewaard worden onder verschillende omstandigheden. De omstandigheden die getest gaan worden in deze studie zijn: het bewaren onder een temperatuur van 4 °C in het donker, op kamertemperatuur (KT) in het licht en op KT in het donker.

# 3. Experimenteel

In dit hoofdstuk zal besproken worden welke chemicaliën en apparaten gebruikt zijn voor deze studie. Experimenten die uitgevoerd zijn om de optimale chromatografie en extractievloeistof zijn beschreven in dit hoofdstuk. Daarnast is ook beschreven hoeveel en welke QC monsters er nodig waren voor de validatie experimenten. Alle monsters worden op dezelfde manier voorbewerkt en zijn gemaakt uit dezelfde stockoplossingen. In dit hoofdstuk zal algemeen besproken worden hoe deze stockoplossingen, oplossingen voor het tunen en de voorbewerkte monsters gemaakt zijn.

# 3.1 Chemicaliën

- o Aqua, B. Braun, gedestilleerd water
- Blanco hersenhomogenaat van muizen, 19-11-2015
- o Blanco humaan plasma, Sanquin 31-03-2016
- o Blanco muizenplasma, 13-05-2015
- o BSA 1% in water
- o Diethylether ≥ 99,8%, CAS: 60-29-7, Sigma-Aldrich Chemie
- o Dimethylsulfoxide 99,9%, CAS: 67-68-5, Merck
- o Docetaxel, CAS: 114977-28-5, LC Laboratories
- o Docetaxel-d9, CAS: 940867-25-4, Toronto Research Chemicals
- Droog ijs (CO<sub>2</sub>)
- Elacridar (GF120918A), CAS: 143851-98-3, GlaxoSmithKline (GSK)
- o Elacridar-d4, CAS: 1189481-51-3, Toronto Research Chemicals
- o Ethylacetaat 99,8%, CAS: 141-78-6, Bio solve Chimi
- Erlotinib · HCl, CAS: 183319-69-9, Jansch
- o Erlotinib-d6, CAS: 1189953-78-3, Toronto Research Chemicals
- Kolliphor EL (CrEL), CAS: 61791-12-6, Sigma-Aldrich
- o Loperamide · HCl, CAS: 34552-83-5, Sigma-Aldrich
- o Loperamide-d6 · HCl, CAS: 1189469-46-2, Toronto Research Chemicals
- o Methanol 99,98%, ULC/MS, CAS: 67-56-1, Bio solve Chimi
- Mierenzuur >98,0%, CAS: 64-18-6, Sigma-Aldrich Chemie
- o Milli-Q water
- o Saline, NaCl 0,9%, B. Braun
- o Riluzole, CAS: 1744-22-5, Toronto Research Chemicals
- Riluzole [<sup>13</sup>C][<sup>15</sup>N<sub>2</sub>], CAS: 1189887-96-4, Toronto Research Chemicals
- Tariquidar, *CAS: 206873-63-4*
- o tert-butylmethylether 99,5%, CAS: 1634-04-4, Bio solve Chimi
- Vemurafenib, CAS: 918504-65-1, LC Laboratories
- Vemurafenib [<sup>13</sup>C], Alsachim
- Verapamil · HCl, CAS: 52-53-9, Toronto Research Chemicals
- o Verapamil-d6 · HCl, CAS: 1185032-80-7, Toronto Research Chemicals

# **3.2 Apparatuur**

- Analietische Balans: MC210P, 896B014, Sarotius
- Centrifuge: 5427R Eppendorf, 5417R Eppendorf
- Homogenisator, *MP*, *RES0051517*
- HPLC systeem: *Dionex, LC Packings, Ultimate 3000* 
  - Autosampler: Dionex, Ultimate 3000
    - Kolom: Agilent, C18, deeltjesgrootte: 3,0 μm (2,1 x 100 mm), PN 767753-902, SN USXS001919, LN B14129
    - Ontgasser: Dionex, LC Packings, Ultimate 3000
  - Pomp: Dionex, Ultimate 3000
  - Voorkolom: C18 (4 x 2,0 mm), PN AJO-4286
- Massaspectrometer:
  - Analyzer: API3000, LC/MS/MS systeem, PE SCIEX MS 10a
  - Detector: Chenneltron Galileo, Electro-optics Corporation
  - Electro spray: Turbo ionspray, Sciex Toronto, ASSY N°: 016 486, SER N°: 225970707

- Pipetten: Finnpipette F1, gekalibreerd op: 22-04-2016, Thermo Scientific
  - P2-P20: *FKLA2-20, KH27412*
  - P20-P200: FK2-200, GH85308
  - P100-P1000: FKTS2, LH57134
- Shaker: *IKA KS 130 basic*
- Ultrasoon bad: Branson 2510
- o SpeedVac concentrator: Thermo Scientific ,SC210A Savant, refrigerated Vapor Trap, RVT104 Savant
- Vortex: Vortex-2 Genie, Scientific Industries

#### 3.3 Tunen massaspectrometer

Deze studie werd gestart met het tunen van de massaspectrometer. De analieten werden als het ware herkenbaar gemaakt voor de massaspectrometer. Voor elk analiet werd het *parent ion* en *product ion* geselecteerd m.b.v. een Q1 scan en een MS2 scan. De volgende parameters CE, CXP, DP, EP en de FP werden, met de geselecteerde *parent ion* en *product ion*, geoptimaliseerd m.b.v. een MRM scan. Dit werd gedaan om het signaal te verhogen.

Voor het tunen was een zuivere oplossing met een concentratie van 10  $\mu$ M van elk analiet nodig. Deze oplossing werd gemaakt door een 10 mM stockoplossing 1000 maal te verdunnen in MeOH:water (20:80%). Van elke analiet was een stockoplossing van 10 mM aanwezig. Deze 10 mM stockoplossing is alleen gebruikt tijdens het tunen. Verderop in paragraaf 3.4.1 zal beschreven worden hoe de stockoplossingen voor de validatie bereid zijn. Vervolgens werd de bereide 10  $\mu$ M oplossing direct geïnfuseerd in de ionisatiebron m.b.v. een infusiepomp onder een flow van 10  $\mu$ L/min. Om een grotere stroom van volume te creëren werd de flow van de LC handmatig aangezet met een snelheid van 0,1 mL/min. Dit was een oplossing van 20% oplossing B en 80% oplossing A, zie paragraaf 3.6.6. Vervolgens werd het massagebied van de Q1 scan ingesteld van ca. 100 m/z tot 800 m/z. De Q1 scan werd gestart en het *parent ion* werd geselecteerd. Het gevonden *parent ion* ging vervolgens door naar de *collision cell* om gefragmenteerd te worden. Er werd een MS2 scan gestart met een massagebied van ca. 100 m/z tot 800 m/z en de fragmenten werden zichtbaar. Het fragment met het hoogste signaal werd geselecteerd als *product ion*. De derde scan die uitgevoerd werd is de MRM scan, hier werden de gevonden massa's voor het *parent ion* en *product ion* ingevoerd. Vervolgens kon elke parameter geoptimaliseerd worden door deze te selecteren en de scan te starten.

De parameters *collision gas, curtain gas, ion spray voltage, heating gas, nebulizer gas* en de temperatuur werden niet geoptimaliseerd. Deze zijn tijdens het tunen gezet op de standaard waarden van respectievelijk 8 L/min, 8 L/min, 5500 volt, 8000 mL/min, 8 L/min en 400 °C. De geoptimaliseerde parameters CE, CXP, DP, EP en FP waren voor elk analiet verschillend en zijn weergegeven in tabel 13a en 13b in paragraaf 4.1.1.

# 3.4 Chromatografie

Voor de bepaling van de chromatografie werd er werd er een gestart met een standaard gradiëntmethode onder de volgende condities:  $C_{18}$  (2,1 x 100 mm) kolom,  $C_{18}$  (4,0 x 2,0 mm) voorkolom, flow 0,2 mL/min, injectievolume 50 µL en kolomtemperatuur op KT. De standaard gradiëntmethode begon met een verhouding van 80% water met 0,1% mierenzuur (oplossing A) en 20% MeOH (oplossing B). Vervolgens liep de concentratie van oplossing A af tot 5% en de liep concentratie van oplossing B op naar 95%, dit gebeurde in een tijd van vijf minuten. Vervolgens bleef deze verhouding van de twee oplossingen constant (isocratisch) voor gedurende zeven minuten. Hierna gingen beide oplossing A en B constant om het systeem te equilibreren voor de volgende analyse, zie tabel 2.

	Oplossing A (%)	Oplossing B (%)	Tijd (minuten)
Start analyse	80	20	0,00
Gradiënt	5,0	95	5,00
Isocratisch	5,0	95	12,0
Terug naar begintoestand	80	20	12,2
Equilibreren	80	20	18,0

#### Tabel 2 | Verloop van de gradiëntmethode.

De software Analyst werd gebruikt om de methode voor de LC te bouwen. De software die gebruikt werd om methode te bouwen voor de LC-MS/MS was het programma Analyst. Nadat de parameters geoptimaliseerd waren voor de juiste *parent ions* en *product ions* werd er m.b.v. Analyst een methode gebouwd. De gevonden waarden voor de parameters, *parent ions* en *product ions* werden ingevoerd in de methode. Het kwantificeren van de analieten gebeurde in één analyse, de totale analysetijd was achttien minuten en bestond uit 686 cyclussen. Het *parent ion* en *product ion* werden voor 100 milliseconden per cyclus gescand. Elke cyclus duurde ca. 1,6 seconden.

Voor het bepalen van de juiste chromatografie werd er een 100 nM oplossing in 20:80% MeOH:water gemaakt. Deze oplossing werd vervolgens gebruikt om verschillende parameters te optimaliseren zoals: de gradiëntmethode, de verhouding MeOH:water in de AS oplossing en het injectievolume. De eerste analyse werd gestart met de standaard methode zoals beschreven in de eerste anlinea. Op basis van de resultaten uit deze eerste analyse werd de methode geoptimaliseerd.

Als eerste is er gevarieerd in de beginconcentratie van oplossing A en oplossing B. De volgende begin concentraties zijn getest: 80% oplossing A en 20% oplossing B, 70% oplossing A en 30% oplossing B en 60% oplossing A en 40% oplossing B. Vervolgens is er gevarieerd in het aantal minuten van de toename van oplossing B en afname van oplossing A. De volgende tijden zijn getest: één min., twee min., drie min., vier min. en vijf min.

Standaard werd er een AS oplossing van 20:80% MeOH:water toegepast maar door de lage oplosbaarheid van Elacridar, Tariquidar en Vemurafenib in water werd verwacht dat deze verhouding niet de optimaal was. Er werd een 100 nM oplossing gemaakt in verschillende verhoudingen van MeOH:water namelijk: 20:80%, 30:70%, 40:60%, 50:50%, 60:40%, 70:30% en 80:20%.

Vervolgens werd er een 100 nM oplossing gemaakt in 60:40% MeOH:water en werd het optimale injectievolume bepaald. De volgende volumina zijn getest: 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 30  $\mu$ L, 40  $\mu$ L en 50  $\mu$ L.

De uiteindeljike condities waren: gradiëntmethode zoals beschreven in tabel 2, flow 0,2 mL/min, injectievolume 30  $\mu$ L en de verhouding MeOH:water in AS oplossing was 60:40%. Zie paragraaf 4.1.2 voor de resultaten.

# 3.5 Extractievloeistof

Ook voor de monstervoorbewerking werd er standaard een vloeistof-vloeistof extractie uitgevoerd. Hierbij moest nog wel de optimale extractievloeistof bepaald worden. De drie extractievloeistoffen die getest werden waren diethylether, ethylacetaat en *tert*-butylmethylether.

Er werden twaalf monsters in humaan plasma met een concentratie van 100 nM en twaalf blanco monsters in humaan plasma voorbewerkt volgens paragraaf 3.7. Aan de 100 nM standaarden werd voor de monstervoorbewerking 50  $\mu$ L IS oplossing van 100 nM toegevoegd. Het residu van deze monsters (aan het einde van de voorbewerking) werd opgelost in 100  $\mu$ L AS. Aan de blanco monsters werd voor de monstervoorbewerking 50  $\mu$ L AS toegevoegd. Het residu werd vervolgens opgelost in een oplossing van de analieten en IS in AS met een eindconcentratie van 100 nM. Dit zijn de gespikte monsters. Er werden ook vier monsters in AS gemaakt (zie paragraaf 3.6.5) met een concentratie van 100 nM. Deze waren direct klaar voor injectie. Vervolgens werd de recovery en de ion suppressie berekend volgens formule 11 en formule 12. De resultaten van dit experiment zijn beschreven in paragraaf 4.1.4.

$$Recovery = \frac{gemiddelde \ piekoppervlakte \ standaard \ in \ biologische \ matrix}{gemiddelde \ piekoppervlakte \ gespikte \ monster} \cdot 100\%$$
(11)

 $Ion \ suppressie = \frac{(gemiddelde \ piekoppervlakte \ AS - gemiddelde \ piekoppervlakte \ gemiddelde \ piekoppervlakte \ AS}{gemiddelde \ piekoppervlakte \ AS} \cdot 100\%$ (12)

# 3.6 Bereiding van de oplossingen voor de validatie

In deze paragraaf zal besproken worden hoeveel vaste stof van elk analiet is ingewogen. Vanuit de ingewogen stockoplossingen is uiteindelijk de stockoplossing voor de validatie gemaakt is. Ook is in deze paragraaf de bereiding van de kalibratielijn, kwaliteitscontrole (QC) oplossingen, IS oplossing en MF beschreven. Wanneer een oplossing beschreven wordt als stockoplossing is dit een oplossing gemaakt in DMSO.

## 3.6.1 Stockoplossingen 10 mM in DMSO

#### Stockoplossingen inhibitoren en substraten 10 mM

Voor elke oplossing werd een bepaalde hoeveelheid afgewogen op de analietische balans. Vervolgens werd er berekend hoeveel  $\mu$ L DMSO er toegevoegd moest worden om uit te komen op een concentratie van 10 mM. De analieten zijn twee maal ingewogen, dit is gedaan omdat er twee stockoplossingen nodig waren. Eén stockoplossing voor de standaarden, hier werd de kalibratielijn mee gemaakt en één stockoplossing voor de QC. De QC stockoplossing werd tijdens de validatie gebruikt om de validatie parameters te bepalen en om het systeem tijdens de analyse te checken. Zie tabel 3 voor de afgewogen hoeveelheid vaste stof in mg en de toegevoegde hoeveelheid DMSO in  $\mu$ L per analiet. Deze twee wegingen mochten maximaal 3% van elkaar verschillen om verder gebruikt te worden voor de kalibratielijn en de validatie. Dit werd bepaald m.b.v. een LC-MS/MS analyse, zie paragraaf 4.1.5 voor de resultaten.

	И	/eging 1	Weging 2	
Analiet	Afgewogen hoeveelheid (mg)	Toegevoegde hoeveelheid DMSO (µL)	Afgewogen hoeveelheid (mg)	Toegevoegde hoeveelheid DMSO (μL)
Docetaxel	36,10	4468	34,63	4287
Elacridar	20,26	3594	20,40	3619
Erlotinib	19,39	4510	4,57	1064
Loperamide	20,12	3786	19,98	3759
Riluzole	9,32	3980	9,55	4078
Tariquidar	28,20	4294	28,41	4393
Vemurafenib	20,46	4176	20,34	4152
Verapamil	9,33	1900	9,79	1994

 Tabel 3
 De afgewogen hoeveelheid vaste stof in mg en de toegevoegde hoeveelheid DMSO per analiet.

#### Aanwezige IS stockoplossingen

De IS stockoplossingen waren al opgelost aanwezig, alleen Verapamil-d6 moest nog opgelost worden. De aanwezige 5 mg werd direct in het oorspronkelijke epje opgelost en verdund door 1006  $\mu$ L DMSO toe te voegen. De uiteindelijke concentratie was 10 mM. Zie tabel 4 voor de concentraties van de aanwezige IS stockoplossingen. Alle 10 mM analiet stockoplossingen en de IS stockoplossingen werden bewaard bij een temperatuur van -20 °C.

IS	Concentratie (mM)
Docetaxel-d9	1,22
Elacridar-d4	0,88
Erlotinib-d6	2,50
Loperamide-d6	1,92
Riluzole <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	4,20
Vemurafenib <sup>13</sup> C	2,01
Verapamil-d6	10,0

 Tabel 4| Aanwezige IS stockoplossingen met de bijbehorende concentratie in mM.

#### 3.6.2 Stockoplossingen 100 uM in DMSO

#### Standaardstockoplossing en QC stockoplossing 100 µM

Nadat het procentuele verschil tussen de twee wegingen bepaald was met de LC-MS/MS, werden de 100  $\mu$ M stockoplossingen in DMSO gemaakt. In deze stockoplossingen werden alle analieten gemengd en deze hadden allemaal een eindconcentratie van 100  $\mu$ M. In tabel 5 is weergegeven welke wegingen er voor de standaard stockoplossing en de QC stockoplossing gebruikt zijn. Van elk analiet werd 100  $\mu$ L gepipetteerd en vervolgens aangevuld met 9200  $\mu$ L DMSO om uiteindelijk een concentratie van 100  $\mu$ M te verkrijgen. Van deze stockoplossing werd 500  $\mu$ L uitgemonsterd in verschillende epjes en bewaard bij een temperatuur van -20 °C.

Analiet	Wegingen gebruikt voor de standaard oplossing	Wegingen gebruikt voor de QC oplossing
Docetaxel	Weging 2	Weging 1
Elacridar	Weging 1	Weging 2
Erlotinib	Weging 1	Weging 2
Loperamide	Weging 1	Weging 2
Riluzole	Weging 1	Weging 2
Tariquidar	Weging 1	Weging 2
Vemurafenib	Weging 2	Weging 1
Verapamil	Weging 2	Weging 1

#### IS stockoplossing 100 $\mu M$

Er werd ook een 100  $\mu$ M stockoplossing in DMSO gemaakt van alle IS stockoplossingen, alle IS hadden een eindconcentratie van 100  $\mu$ M. In tabel 6 is weergegeven hoeveel  $\mu$ L stockoplossing er per IS gebruikt is. De totale hoeveelheid van 742,4  $\mu$ L werd aangevuld met 1257,6  $\mu$ L DMSO om tot een uiteindelijke concentratie van 100  $\mu$ M te komen. Van deze stockoplossing werd 500  $\mu$ L uitgemonsterd in verschillende epjes en bewaard bij een temperatuur van -20 °C.

**Tabel 6** Bereiding van de 100  $\mu$ M IS stockoplossing in DMSO.

IS	Concentratie stock (mM)	Hoeveelheid volume stock (µL)
Docetaxel-d9	1,22	164
Elacridar-d4	0,88	227
Erlotinib-d6	5,00	80,0
Loperamide-d6	1,92	104
Riluzole <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	4,20	47,6
Vemurafenib <sup>13</sup> C	2,01	99,6
Verapamil-d6	10,0	20,0
Totaal		742

#### 3.6.3 Bereiding van de interne standaard oplossing

Voor elke analyse is het nodig dat er genoeg IS oplossing aanwezig is. De in paragraaf 3.6.2 beschreven IS stockoplossing van 100  $\mu$ M werd tijdens elke analyse verdund in MeOH:water (60:40%). Er werd 5  $\mu$ L IS stockoplossing gepipetteerd en aangevuld met 4995  $\mu$ L MeOH:water (60:40%), de eindconcentratie van deze oplossing is 100 nM. Deze oplossing werd voor elke analyse vers gemaakt.

#### 3.6.4 Bereiding van kalibratielijnen

#### Stock kalibratielijn in DMSO

Voor het maken van de kalibratielijn werd de standaard stockoplossing van 100  $\mu$ M in DMSO, beschreven in paragraaf 3.6.2, gebruikt. Voor elke analietische run werd er een nieuwe kalibratielijn gemaakt. Eerst werd er een stock kalibratielijn gemaakt in DMSO met concentraties van 0,1  $\mu$ M tot en met 20  $\mu$ M, zie tabel 7.

Concentratie stock (µM)	Hoeveelheid volume stock (µL)	Hoeveelheid DMSO (µL)
0,10	50 μL van stock 1 μM	450
0,20	20 μL van stock 1 μM	80,0
0,50	50 μL van stock 1 μM	50,0
1,0	50 μL van stock 10 μM	450
2,0	20 μL van stock 10 μM	80,0
5,0	50 μL van stock 10 μM	50,0
10	50 μL van stock 100 μM	450
20	20 μL van stock 100 μM	80,0

 Tabel 7 | Bereiding van stock kalibratielijn in DMSO.

#### Kalibratielijn in blanco humaan plasma of hersenhomogenaat

Vervolgens werd vanuit deze stock kalibratielijn een kalibratielijn in blanco humaan plasma of blanco hersenhomogenaat gemaakt, zie tabel 8. Er was een kalibratielijn in hersenhomogenaat nodig wanneer er QC monsters in hersenhomogenaat geanalyseerd werden. Bij alle andere experimenten (validatie in humaan plasma en muizenplasma) was een kalibratielijn in humaan plasma noodzakelijk. De eindconcentraties van de

kalibratielijnen in de drie matrices hadden een bereik van 1 nM tot en met 200 nM. Deze werden vervolgens opgewerkt en geanalyseerd met de LC-MS/MS.

Concentratie standaard (nM)	5 μL stock (μM)	Hoeveelheid blanco humaan plasma of blanco hersenhomogenaat (μL)
1,00	0,10	495
2,00	0,20	495
5,00	0,50	495
10,0	1,0	495
20,0	2,0	495
50,0	5,0	495
100	10	495
200	20	495

Tabel 8| Bereiding van de kalibratielijn in blanco humaan plasma of blanco hersenhomogenaat.

#### Kalibratielijn in AS (MeOH:water (60:40%))

Er werd ook een kalibratielijn in AS (MeOH:water (60:40%)) gemaakt, zie tabel 9. De kalibratielijn in AS was niet noodzakelijk voor elke analietische run, eveneens afhankelijk van het experiment. De eindconcentraties van de standaarden in de AS-kalibratielijn hadden een bereik van 1 nM tot en met 200 nM, zie tabel 9. De kalibratielijn in AS hoefde niet opgewerkt te worden en was direct klaar voor analyse.

Concentratie standaard (nM)	5 μL stock (μM)	Hoeveelheid IS oplossing 100 nM (μL)	Hoeveelheid AS (μL)
1,00	0,10	250	245
2,00	0,20	250	245
5,00	0,50	250	245
10,0	1,0	250	245
20,0	2,0	250	245
50,0	5,0	250	245
100	10	250	245
200	20	250	245

#### Tabel 9| Bereiding van de kalibratielijn in AS.

#### 3.6.5 Bereiding van de QC oplossingen

#### QC stockoplossing in DMSO

De QC oplossingen werden ook voor elke analyse vers bereid. De QC monsters werden gekwantificeerd met de kalibratielijn in blanco humaan plasma of blanco hersenhomogenaat (afhankelijk van de matrix van de QC monsters). Eerst werden er QC stockoplossingen bereid in DMSO vanuit de 100  $\mu$ M stockoplossing in DMSO, beschreven in paragraaf 3.6.2. Zie tabel 10 voor de bereiding van de QC stockoplossingen in DMSO. De eindconcentraties van deze stockoplossingen waren 0,5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M en 10  $\mu$ M.

Concentratie stock (µM)	Hoeveelheid volume stock (µL)	Hoeveelheid DMSO (µL)
0,10	50 μL van stock 1,0 μM	450
0,20	20 μL van stock 1,0 μM	80,0
0,50	50 μL van stock 1,0 μM	50,0
1,0	20 μL van stock 10 μM	180
2,5	25 μL van stock 10 μM	75,0
5,0	50 μL van de stock 10 μM	50,0
10	50 μL van stock 100 μM	450
20	20 $\mu$ L van stock 100 $\mu$ M	80,0

#### Tabel 10 | Bereiding van de stock QC stockoplossingen in DMSO.

#### QC oplossingen in de biologische matrix

Vervolgens werden deze stockoplossingen doorverdund in blanco humaan plasma, blanco muizenplasma of blanco muizen hersenhomogenaat, zie tabel 11. De bereiding van het hersenhomogenaat is beschreven in paragraaf 3.10. De eindconcentraties van de QC oplossingen in de biologische matrix waren 1 nM, 2 nM, 5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM en 200 nM. De QC monsters in de biologische matrix werden vervolgens opgewerkt en geanalyseerd met de LC-MS/MS.

Concentratie QC (nM)	5 μL stock (μM)	Hoeveelheid blanco humaan-,		
		muizenplasma/hersenhomogenaat (μL)		
1,00	0,10	495		
2,00	0,20	495		
5,00	0,50	495		
25,0	2,5	495		
50,0	5,0	495		
100	10	495		
200	20	495		

 Tabel 11 | Bereiding van QC oplossingen in blanco humaan plasma, blanco muizenplasma of blanco muizen hersenhomogenaat.

#### QC oplossingen in AS

De stockoplossingen 0,5 nM, 2,5 nM en 10 nM beschreven in tabel 11 werden doorverdund in de 100 nM IS en de AS oplossing, zie tabel 12. De eindconcentratie van de oplossingen in AS zijn 5 nM, 25 nM en 100 nM. De QC oplossingen werden direct geïnjecteerd in de LC-MS/MS.

Concentratie QC (nM)	5 μL stock (μM)	Hoeveelheid IS oplossing 100 nM (μL)	Hoeveelheid AS (μL) (MeOH:water 60:40%)
5,00	0,50	250	245
25,0	2,5	250	245
100	10	250	245

## 3.6.6 Mobiele fase

De MF bestond uit twee oplossingen: oplossing A en oplossing B. Oplossing A bestond uit MilliQ water aangezuurd met mierenzuur met een eindconcentratie van 0,1% en gemaakt door 1 mL mierenzuur toe te voegen aan 999 mL MilliQ water. Oplossing B bestond uit 100% methanol HPLC-Grade. Deze twee oplossingen werden door de HPLC tijdens de analyse in de juiste verhouding gemengd, deze verhoudingen zijn weergegeven in tabel 2 in paragraaf 3.4.

#### 3.6.7 System suitability test oplossing

De laatste oplossing die voor elke analyse opnieuw vers gemaakt wordt is de system suitability test (SST) oplossing. Deze oplossing werd gemaakt door 5  $\mu$ L van de 10  $\mu$ M stockoplossing, van de stock kalibratielijn in DMSO, te pipetteren in een schoon epje. Zie paragraaf 3.6.4 voor de bereiding van deze oplossing. Vervolgens werd er 495  $\mu$ L IS oplossing van 100 nM in MeOH:water (6040%) aan toegevoegd, zie paragraaf 3.6.3. De eindconcentratie van deze oplossing van 100 nM voor de analieten. Deze oplossing werd voor elke analyse in viervoud geanalyseerd om te controleren of er een fout in het systeem zit en of de analieten en IS in de juiste verhoudingen aanwezig zijn in de oplossing.

# 3.7 Monstervoorbewerking van de kalibratielijn en QC monsters in de biologische matrix

De monsters in de biologische matrix werden voorbewerkt zodat ze geanalyseerd konden worden met de LC-MS/MS. Zonder de voorbewerkingsmethode was het niet mogelijk om een monster in biologische matrix te analyseren. De monsters van de kalibratielijn en de QC in een biologische matrix ondergaan de monster voorbewerkingsmethode die beschreven wordt in deze paragraaf. De monstervoorbewerking van deze studie bestond uit een vloeistof-vloeistof extractie. De monsters die in de AS oplossing gemaakt werden, konden direct geanalyseerd worden met de LC-MS/MS zonder voorbewerking. Elke analietische run bestond standaard uit een kalibratielijn in humaan plasma/hersenhomogenaat met een bereik van 1 nM tot 200 nM, humaan plasma/hersenhomogenaat blanco monster (met IS) en humaan plasma/hersenhomogenaat dubbele blanco monster (zonder IS). De Deze monsters werden in duplo onafhankelijk van elkaar voorbewerkt en geanalyseerd.

De eerste stap van de voorbewerkingsmethode werd uitgevoerd voor de standaarden van de kalibratielijn in humaan plasma/hersenhomogenaat, de (dubbele) blanco humaan plasma/hersenhomogenaat monsters en

voor de QC monsters in de drie verschillende biologische matrices. Van deze monsters werd 100 µL gepipetteerd in een epje van twee milliliter, dit werd in duplo uitgevoerd. Vervolgens werd aan elk monster 50 µL 100 nM IS oplossing in MeOH:water (60:40%) toegevoegd. De IS oplossing werd niet toegevoegd aan de dubbel blanco monsters, in plaats daarvan werd er 50 µL MeOH:water (60:40%) aan toegevoegd. Vervolgens werd er aan elk monster één milliliter tert-butylmethylether toegevoegd en werden de epjes geschud op de shaker. De shaker werd ingesteld op 480 omwentelingen per minuut voor vijftien minuten lang. Vervolgens werden de monsters afgedraaid in de centrifuge voor één minuut met een snelheid van 14000 rpm bij een temperatuur van vier graden Celsius. In het epje waren twee lagen ontstaan, een organische laag en een waterlaag. Deze twee lagen werden van elkaar gescheiden door de waterlaag te bevriezen met droog ijs (CO<sub>2</sub>). De organische laag werd overgegoten in een nieuw epje van anderhalve milliliter. De epjes werden open in de SpeedVac gezet voor ongeveer anderhalf uur en het oplosmiddel werd verdampt op KT (low drying rate). Het residu werd opgelost in 100 µL MeOH:water (60:40%). De monsters werden voor vijf seconden gemixt met behulp van een vortex. Vervolgens werden de monsters vijf minuten in een ultrasoon bad gezet om al het residu goed op te lossen. Om de oplossing helder te krijgen werden de monsters nogmaals afgedraaid met behulp van de centrifuge. Dit werd gedaan voor twee minuten met een snelheid van 14000 rpm bij een temperatuur van vier graden Celsius. Na deze stap waren de monsters klaar voor analyse met de LC-MS/MS.

# 3.8 Validatie experimenten

#### Specificiteit en selectiviteit

Voor de bepaling van de specificiteit en de selectiviteit werden er drie verschillende blanco humaan plasma monsters uit verschillenden batches geanalyseerd. Van de drie verschillende blanco plasma monsters werden er blanco- en een dubbele blanco monsters in duplo opgewerkt, zie paragraaf 3.7. Samen met een kalibratielijn (in duplo) werden deze vervolgens geanalyseerd. Deze analyse werd op drie verschillende dagen uitgevoerd.

#### **Detectiegrens (LOD)**

Voor de bepaling van de LOD zijn dezelfde blanco monsters gebruikt als bij de bepaling van de specificiteit en de selectiviteit. De LOD werd bepaald door de gemiddelde piekhoogte van de blanco monsters te vermenigvuldigen met drie.

#### Bepalingsgrenzen (LLQ en ULQ)

De LLQ en de ULQ werden bepaald door QC monsters te analyseren in het lage (1 nM, 2 nM en 5 nM) en hoge (50 nM, 100 nM en 200 nM) gebied van de kalibratielijn. Voor elke concentratie werden er zes QC monsters opgewerkt (paragraaf 3.7) en gelijktijdig geanalyseerd met een kalibratielijn. Dit experiment werd op drie verschillende dagen uitgevoerd.

#### Lineariteit

Voor het bepalen van de lineariteit werd er per dag één kalibratielijn in humaan plasma in duplo opgewerkt volgens paragraaf 3.7 en geanalyseerd op drie verschillende dagen. De gegevens van de kalibratielijnen werden getest op de weegfactor, lineariteit (LOF-toets) en op de aanwezigheid van een constante systematische- en proportionele fout (t-toets). Deze bepalingen zijn uitgevoerd m.b.v. een lineaire regressie analyse in SPSS.

#### Juistheid

Voor de bepaling van de juistheid werden er QC monsters met een concentratie van 5 nM, 25 nM en 100 nM in zesvoud opgewerkt volgens paragraaf 3.7 en geanalyseerd. Dit werd gedaan op drie verschillende dagen gelijktijdig met een kalibratielijn. Per concentratie werd het gemiddelde en de stdev. berekend van alle drie de dagen. Vervolgens werd de juistheid van die drie dagen berekend volgens formule 4 in paragraaf 2.2.

#### Preciesie

Voor de bepaling van de precisie zijn dezelfde QC monsters met een concentratie van 5 nM, 25 nM en 100 nM gebruikt als bij de bepaling van de juistheid. De preciesie werd bepaald met een ANOVA analyse in SPSS.

#### **Recovery en ion suppressie**

Voor de bepaling van de recovery en de ion suppressie werd er een kalibratielijn in plasma opgewerkt, zie paragraaf 3.7. Verder werd er nog een kalibratielijn in AS gemaakt volgens paragraaf 3.6.4. Er werd ook nog

een gespikte kalibratielijn bereid. Dit werd gedaan door blanco monsters op te werken en na de monstervoorbewerking het residu op te lossen in AS met de analieten en inhibitoren. Deze drie kalibratielijnen werden geanalyseerd in één analietische run. Dit werd uitgevoerd voor drie verschillende dagen.

#### Stabiliteit

De stabiliteit van de analieten is op drie manieren getest. Dit is gedaan door de stabiliteit in de biologische matrix, van het vries-en-dooi cyclus en in de opgewerkte monsters te testen.

De stabiliteit in de biologische matrix is getest door QC monsters met een concentratie van 5 nM, 25 nM, en 100 nM te bereiden in humaan plasma. Van elke concentratie werden er twee oplossingen in humaan plasma bereid. Vervolgens werd één van deze twee oplossingen bewaard op de tafel bij KT. De andere oplossing werd op de tafel in een bak met ijs bewaard. Dit werd in de ochtend voorbereid. Aan het einde van de middag werden de twee oplossingen in viervoud uitgemonsterd. Deze werden gelijktijdig met een kalibratielijn opgewerkt (paragraaf 3.7) en geanalyseerd. Op deze manier werd er bepaald of het nodig was om tijdens de monstervoorbewerking op ijs te werken.

Er werd gekeken naar de stabiliteit van de analieten na een aantal vries-en-dooi cycli. Het bevriezen en ontdooien van de monsters kan invloed hebben op de concentratie van het analiet in de biologische matrix. Wanneer een monster één maal ontdooid en vervolgens daarna weer bevroren werd, was dit één cyclus. Per concentratie werden en vier oplossingen in humaan plasma gemaakt en bewaard in de vriezer bij een temperatuur van -20°C. Op dag 1 werden alle vier de oplossingen per concentratie in humaan plasma ontdooid op KT en vervolgens weer ingevroren. Op dag 2 werd dit gedaan voor drie van de vier oplossingen, op dag 3 voor twee van de vier en op dag 4 één van de vier. Op deze manier had elke oplossing één cyclus, twee, drie of vier cyclussen ondergaan. Deze werden uitgemonsterd in viervoud gelijktijdig met een kalibratielijn opgewerkt en geanalyseerd.

De stabiliteit in de opgewerkte monsters werd bepaald zodat het bekend werd onder welke omstandigheden de opgewerkte monsters bewaard konden worden. Er werden drie omstandigheden getest: bewaren onder een temperatuur van 4°C in het donker, bij KT in het donker en bij KT in het licht. Van elke concentratie werden er 48 monsters opgewerkt. Aan het einde van de monstervoorbewerking werd het residu opgelost en werden alle monsters bij elkaar gevoegd. Vervolgens werd er 400 µL uitgemonsterd in twaalf andere epjes. Vier van deze epjes werden bewaard onder 4 °C in het donker, KT in het donker en KT in het licht. Vervolgens werden deze monsters gemeten op verschillende dagen. Elke dag werd er een nieuwe kalibratielijn en een verse AS oplossing bereid. Per concentratie werd de AS oplossing onafhankelijk in viervoud geanalyseerd.

#### 3.9 Bereiding van de oplossingen voor de in vivo experimenten

In deze paragraaf zal besproken worden hoe de oplossingen bereid zijn voor de *in vivo* experimenten. Paragraaf 3.9.1 beschrijft onder welke condities en met welke concentraties de optimalisatie gestart is. Er zijn meerdere experimenten uitgevoerd met variërende stockoplossingen van de inhibitoren en substraten om de optimale dosering te bepalen. Voor de substraten moesten er plasmaconcentraties bereikt worden tussen de 50 nM en 100 nM. Voor de inhibitoren moesten er plasmaconcentraties 500 nM, 1000 nM en 2000 nM bereikt worden. Daarnaast werd de snelheid van de pomp van het infuus en tijd van toediening gevarieerd. De dosering voor de muizen is eerst bepaald met Elacridar. Wanneer de oplossingen voor de juiste doseringen optimaal waren voor Elacridar, werden deze oplossingen ook gemaakt met Tariquidar en vervolgens getest. Op deze manier is de juiste dosering voor de KO muizen en WT muizen bepaald voor de substraten en inhibitoren, zie paragraaf 4.5.1 voor de resultaten.

#### 3.9.1 Dosering experimenten met KO en WT muizen

De juiste dosering van de substraten en Elacridar werd als eerste bepaald. Dit werd gedaan door een klein experiment uit te voeren met acht muizen. Vier KO muizen en vier WT muizen. Voor elk substraat werd er ca. 10 mg afgewogen en opgelost in DMSO. Deze stockoplossing had een eindconcentratie van 30 mg/mL. Vervolgens werd er ca. 8,5 mg Elacridar afgewogen. Deze afgewogen hoeveelheid werd opgelost in ca. 300  $\mu$ L van de 30 mg/mL substraat stockoplossing in DMSO (van elk substraat 50  $\mu$ L). Deze mixoplossing in DMSO had voor Elacridar een eind concentratie van 30 mg/mL en voor de substraten en 5 mg/mL. Door het volume van de stockoplossingen van de substraten te variëren konden er verschillende doseringen voor de muizen getest worden. De resultaten van deze experimenten zijn beschreven in paragraaf 4.5.1. De stockoplossingen van de

substraten werden bewaard bij een temperatuur van -20 °C. De stockoplossingen van Elacridar en Tariquidar werden voor elk experiment opnieuw bereid door opnieuw in te wegen en op te lossen.

#### Bereiding van de infusieoplossing

Op de dag van het experiment werd de infusieoplossing vers bereid. De infusieoplossing had standaard een verhouding van CrEL, mixoplossing in DMSO, Saline van 1:1:8. Er werd 450  $\mu$ L CrEL in een buis gebracht m.b.v. een naald. Hier werd 450  $\mu$ L van de mixoplossing in DMSO aan toegevoegd. Vervolgens werd er al roerend, m.b.v. de vortex, 3600  $\mu$ L Saline toegevoegd. Omdat de dosering nog geoptimaliseerd moest worden verschilde de eindconcentratie van de infusieoplossing per experiment.

Daarnaast werd de infusiesnelheid, de tijd van toediening en de bloedafname op verschillende tijdspunten ook geoptimaliseerd. De resultaten zijn beschreven in paragraaf 4.5.1.

De muizen kregen een oplossing van alle substraten en één van de inhibitoren via een intraperitoneale toediening. De infusie start voor drie minuten op een snelheid van 5  $\mu$ L/min. Vervolgens zaten de muizen gedurende vijf uur aan een continu infuus met een infusiesnelheid van 3  $\mu$ L/min. Op tijdspunten één uur, drie uur en vijf uur werd er bloed afgenomen uit de staart van de muis. Van tijdspunten één uur en drie uur werd er ongeveer 50  $\mu$ L bloed afgenomen. Na vijf uur werd het dier onder narcose gebracht met isofluraan en werd er een hartpunctie (HP) uitgevoerd. Hierbij werd al het bloed van de muis verzameld met een injectiespuit, dit is ongeveer 1 mL. De muis werd vervolgens gedood door cervicale dislocatie (breking van de nek) en de organen hart, hersen, lever, longen, milt en nieren werden verzameld.

Na optimalisatie van de dosering en de infusieparameters, zie paragraaf 4.5.1 was de uiteindelijke infusiesnelheid 20  $\mu$ L/min voor vijf minuten en 3  $\mu$ L/min voor drie uur. De infusie duurde drie uur en op tijdspunten één uur, twee uur en drie uur werd er bloed afgomen. Na drie uur werd de HP uitgevoerd en werden de hersenen en andere weefsels verzameld zoals hierboven beschreven.

#### 3.9.2 Het in vivo experiment in KO muizen

In dit experiment kregen vier KO muizen Elacridar, vier KO muizen kregen Tariquidar en vier KO muizen kregen geen inhibitor toegediend. De eindconcentraties van de substraten in de infusieoplossing waren: Docetaxel 2,7·10<sup>-2</sup> mg/mL, Erlotinib 6,7·10<sup>-2</sup> mg/mL, Loperamide 6,2·10<sup>-2</sup> mg/mL, Riluzole 8,9·10<sup>-3</sup> mg/mL, Vemurafenib 4,2·10<sup>-3</sup> mg/mL en Verapamil 4,4·10<sup>-2</sup> mg/mL. Elke muis (met Elacridar, Tariquidar of geen inhibitor) kreeg dezelfde concentratie van de substraten toegediend. De eindconcentratie, in de infusieoplossing, van zowel Elacridar als Tariquidar was 0,83 mg/mL. Zie paragraaf 4.5.2 voor de resultaten.

#### 3.9.3 Het in vivo experiment in WT muizen

Dit experiment werd uitgevoerd met negen WT muizen. Drie WT muizen kregen Tariquidar toegediend, drie WT muizen kregen Elacridar toegediend en drie WT muizen kregen geen inhibitor toegediend. De eindconcentratie van Docetaxel in de infusieoplossing verschilde per inhibitor. De eindconcentratie in de infusieoplossing van Docetaxel met de inhibitor Elacridar was  $6,7\cdot10^{-2}$  mg/mL en met Tariquidar was dit  $4,3\cdot10^{-2}$  mg/mL. De eindconcentraties van de andere substraten in de infusieoplossing waren: Erlotinib  $6,7\cdot10^{-3}$  mg/mL, Loperamide  $6,2\cdot10^{-2}$  mg/mL, Riluzole  $8,9\cdot10^{-3}$  mg/mL, Vemurafenib  $4,2\cdot10^{-3}$  mg/mL en Verapamil  $4,4\cdot10^{-2}$  mg/mL. Elke muis (met Elacridar, Tariquidar of geen inhibitor) kreeg dezelfde concentratie van de substraten toegediend. De eindconcentratie van Elacridar in de infusieoplossing was 3,5 mg/mL en voor Tariquidar was dit 2,2 mg/mL. Zie paragraaf 4.5.3 voor de resultaten.

#### 3.9.4 Het in vivo experiment in KO en WT muizen

Voor dit experiment zijn er vier KO en vier WT muizen gebruikt. Zowel de KO muizen als de WT muizen kregen dezelfde concentraties van de substraten toegediend. De eindconcentraties in de infusieoplossing waren: Docetaxel:  $5,3\cdot10^{-2}$  mg/mL, Erlotinib  $3,3\cdot10^{-3}$  mg/mL, Loperamide  $8,9\cdot10^{-2}$  mg/mL, Riluzole  $3,6\cdot10^{-3}$  mg/mL, Vemurafenib  $4,2\cdot10^{-3}$  mg/mL en Verapamil  $8,9\cdot10^{-2}$  mg/mL. Beide type muizen kregen Elacridar toegediend maar met een verschillende concentratie. De eindconcentratie in de infusieoplossing van Elacridar voor de KO muizen was 0,83 mg/mL en voor de WT muizen was dit 2,5 mg/mL. Zie paragraaf 4.5.4 voor de resultaten van dit experiment.

# 3.10 Monstervoorbewerking van de in vivo monsters

De bloedmonsters werden gecentrifugeerd bij 5000 rpm voor vijf minuten bij een temperatuur van 4 °C. Vervolgens werd het plasma gepipetteerd en overgebracht in een schone buis. De hersenen werden gehomogeniseerd. Aan de buizen, waar de nog niet gehomogeniseerde hersenen in zaten, werden drie ivoren balletjes toegevoegd. Vervolgens werd er 3 mL 1% koude BSA toegevoegd aan de buizen en deze werden in de homogenisator gezet. De hersenen wogen gemiddeld 300 mg, dit was ca. een tien maal verdunning. De homogenisator schudt de buizen met een snelheid van zes m/sec voor één minuut lang. Door de aanwezigheid van de ivoren balletjes in de buizen werden de hersen gehomogeniseerd met de 1% BSA oplossing. Vervolgens werd het hersenhomogenaat overgebracht in een schone buis. De plasma- en hersenmonsters werden opgeslagen bij -20°C tot analyse. Het was belangrijk dat de plasma- en hersenmonsters tijdens het afdraaien e.d. koud bleven, dit werd gedaan door op ijs te werken.

De monsters van de muizen werden ook voorbewerkt m.b.v. een vloeistof-vloeistof extractie. Van de plasma monsters is geen 100  $\mu$ L plasma aanwezig. Er werd van elk tijdspunt 5  $\mu$ L plasma gepipetteerd. Dit werd vervolgens aangevuld met 95  $\mu$ L humaan blanco plasma om tot een eindvolume van 100  $\mu$ L te komen. Vervolgens werd de monstervoorbewerking voor de muizenplasma monsters op dezelfde manier uitgevoerd als beschreven in paragraaf 3.7. Van het hersenhomogenaat werd 100  $\mu$ L gepipetteerd omdat daar wel genoeg volume van aanwezig was. Ook deze hersenmonsters werden op dezelfde manier voorbewerkt als beschreven in paragraaf 3.7. Een analietische run met de *in vivo* plasmamonsters bestond uit een kalibratielijn in humaan plasma in duplo, (dubbele) blanco humaan plasmamonsters in duplo, de *in vivo* plasmamonsters en QC monsters. De QC monsters in deze run dienen als controle voor het systeem en werden bereid volgens paragraaf 3.6.5 in muizenplasma. Een analietische run met de *in vivo* hersenmonsters in duplo, de *in vivo* hersenmonsters bestond uit een kalibratielijn in hersenhomogenaat in duplo, (dubbele) blanco hersenmonsters in duplo, de *in vivo* hersenmonsters bestond uit een kalibratielijn in hersenhomogenaat in duplo, (dubbele) blanco hersenmonsters in duplo, de *in vivo* hersenmonsters bestond uit een kalibratielijn in hersenhomogenaat in duplo, (dubbele) blanco hersenmonsters in duplo, de *in vivo* hersenmonsters en QC monsters in hersenhomogenaat bereid volgens paragraaf 3.6.5.

# 4 Resultaten

# 4.1 Methode ontwikkeling

In deze paragraaf zullen de resultaten besproken worden van het tunen van de massaspectrometer, de chromatografie, de IS van Tariquidar, de optimale extractievloeistof en het procentuele verschil tussen de twee wegingen.

# 4.1.1 Tunen van de massaspectrometer

Voor elke analiet werd er een oplossing gemaakt van 10  $\mu$ M in MeOH:water (20:80%). Het tunen van de massaspectrometer werd vervolgens uitgevoerd zoals beschreven is in paragraaf 3.3. In de onderstaande tabellen zijn de geoptimaliseerde waarden beschreven voor de analieten, zie tabel 13a, en voor de IS, zie tabel 13b. De parameters die niet geoptimaliseerd zijn werden gezet op de standaard waarden. Dit zijn de volgende parameters: *Collision gas:* 8 L/min, *curtain gas:* 8 L/min, *ion spray voltage:* 5500 volt, *heating gas:* 8 L/min, *nebulizer gas:* 8 L/min en de temperatuur: 400 °C. Verder kregen de ionen een positieve lading en werd er in de positieve modus geanalyseerd met de MS. De LC werd handmatig aangezet onder een flow van 0,1 mL/min. Dit was een oplossing van 20% oplossing B en 80% oplossing A, zie paragraaf 3.6.6.

		<u> </u>						
	Docetaxel	Elacridar	Erlotinib	Loperamide	Riluzole	Tariquidar	Vemurafenib	Verapamil
Q1 (m/z)	808,8	564,2	395,0	479,1	235,1	647,7	490,1	455,4
MS2 (m/z)	527,2	252,1	279,3	266,3	138,1	355,4	383,1	165,4
DP	22	150	120	70	100	180	130	127
FP	14	21	20	30	30	30	60	40
EP	9	13	14	14	13	11	13	12
CE	14	55	43	36	49	44	39	39
СХР	16	23	26	25	12	9	9	15
Signaal (cps)	6,4 · 10 <sup>5</sup>	5,0 · 10⁵	1,9 · 10 <sup>6</sup>	2,0 · 10 <sup>6</sup>	2,4 · 10 <sup>5</sup>	2,4 · 10 <sup>5</sup>	1,3 · 10 <sup>4</sup>	2,2 · 10 <sup>6</sup>

 Tabel 13a|
 Weergave van de geoptimaliseerde parameters voor de analieten.

#### Tabel 13b Weergave van de geoptimaliseerde parameters voor de IS.

	Docetaxel-d9	Elacridar-d6	Erlotinib-d6	Loperamide-d6	Riluzole [ <sup>13</sup> C][ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]	Vemurafenib [ <sup>13</sup> C]	Verapamil -d6
Q1 (m/z)	817,6	568,3	400,3	483,2	238,0	496,2	461,3
MS2 (m/z)	527,5	252,3	278,3	272,2	140,9	389,0	165,2
DP	95	135	120	70	115	135	125
FP	10	35	40	40	40	50	40
EP	9	14	13	11	11	13	12
CE	14	55	43	36	49	39	39
СХР	14	22	25	26	12	11	14
Signaal (cps)	8,3 · 10 <sup>4</sup>	4,5 · 10 <sup>5</sup>	1,2 · 10 <sup>6</sup>	$2,5 \cdot 10^{6}$	3,4 · 10 <sup>5</sup>	4,2 · 10 <sup>4</sup>	3,2 · 10 <sup>6</sup>

Nadat de parameters geoptimaliseerd waren werd er een Q1 scan gestart met de geoptimaliseerde parameters. Vervolgens werd er een MS2 scan gestart met de geoptimaliseerde parameters. Op deze manier werd er gecheckt of het signaal van het *parent ion* en *product ion* hoog genoeg was. Zie bijlage IIa en IIb voor de MRM-spectra van de Q1 en de MS2 scans.

# 4.1.2 Chromatografie

De gevonden waarden voor de parameters, *parent ions* en *product ions* na het tunen werden ingevoerd in de LC-methode. Het kwantificeren van de analieten gebeurde in één analyse, de totale analysetijd was achttien minuten en bestond uit 686 cyclussen. Het *parent ion* en *product ion* werden voor 100 milliseconden per cyclus gescand. Elke cyclus duurde ca. 1,6 seconden. Vervolgens werd de gradiëntmethode, verhouding MeOH:water in AS en het injectievolume geoptimaliseerd, zie ook paragraaf 3.4. Dit werd gedaan op basis van de pieksymmetrie en de ratio tussen het piekoppervlak en de piekhoogte.

De uiteindelijke gekozen verhouding van 60:40% MeOH:water in de AS oplossing was niet voor elk analiet de optimale verhouding. Toch werd deze verhouding gekozen omdat alle analieten in één analietische run

geanalyseerd werden. Zodat deze verhouding wel optimaal was voor de slecht oplosbare analieten (Elacridar, Tariquidar en Vemurafenib).

Bij volumina 40  $\mu$ L en 50  $\mu$ L was er fronting van de piek aanwezig. Dit werd veroorzaakt door overbelading van de kolom (te hoog injectievolume). Om deze rede is er gekozen om een injetievolume van 30  $\mu$ L toe te passen. Tabel 14 geeft een samenvatting weer van de geoptimaliseerde parameters.

Parameter	
Gradiënt	20% oplossing A en 80% oplossing B in vijf minuten (zie tabel 12)
Kolom	C <sub>18</sub> (2,1 x 100 mm)
Voorkolom	C <sub>18</sub> (4,0 x 2,0 mm)
Kolom temperatuur	КТ
Flow	0,2 mL/min
Injectievolume	30 μL
Druk	ca. 109 bar
AS	60:40% MeOH:water

 Tabel 14|
 Samenvatting van de geoptimaliseerde gradiëntmethode.

Er werd een oplossing gemaakt in AS en werd deze geanalyseerd met de geoptimaliseerde methode. De eindconcentraties van alle analieten in deze oplossing waren 100 nM, zie figuur 11 voor het chromatogram. In tabel 15 zijn de  $t_R$  van de analieten weergeven met de bijbehorende kleur die de analieten in het chromatogram hebben. Er is geen verschil waar te nemen tussen het chromatogram in AS en de chromatogrammen in de biologische matrices.



**Figuur 11** | XIC+MRM chromatogram van alle analieten met de bijbehorende IS in AS met een concentratie van 100 nM, met op de x-as de tijd in minuten en de y-as de intensiteit in cps.
Analiet	t <sub>R</sub> (min.)	IS	t <sub>R</sub> (min.)
Docetaxel	 10,2	Docetaxel-d9	10,2
Elacridar	 8,3	Elacridar-d4	8,3
Erlotinib	 7,9	Erlotinib-d6	7,9
Loperamide	 8,6	Loperamide-d6	 8,6
Riluzole	 9,4	Riluzole [ <sup>13</sup> C][ <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]	 9,4
Tariquidar	 8,5	-	-
Vemurafenib	 10,8	Vemurafenib [13C]	 10,8
Verapamil	 7,9	Verapamil-d6	 7,9

**Tabel 15** | Analieten en IS met de bijbehorende kleur in het chromatogram en  $t_R$  in minuten.

In tabel 15 en in figuur 11 is waar te nemen dat de analieten dezelfde  $t_R$  hebben als de bijbehorende IS. Voor Tariquidar is er geen stabiel isotoop die gebruikt kan worden als IS aanwezig, in paragraaf 4.1.3 zal besproken worden welke IS het meest geschikt is voor Tariquidar. Verder is in de figuur waar te nemen dat de pieken een hoog signaal hebben en goed van elkaar te onderscheiden zijn. Aan de  $t_R$  is te zien dat Erlotinib en Verapamil het minste apolair zijn van de analieten. Vemurafenib is daarentegen het meeste apolair van de analieten.

#### 4.1.3. Interne standaard voor Tariquidar

Voor Tariquidar is het nodig dat de IS ongeveer op dezelfde tijd de analietische kolom verlaat zodat Tariquidar en de gekozen IS tegelijk ioniseren. Verder is het nodig dat de chemische structuur van de IS overheen komt met Tariquidar. De t<sub>R</sub> van Tariquidar is 8,5 minuten. Er zijn twee IS aanwezig die bijna dezelfde t<sub>R</sub> hebben als Tariquidar. Dat zijn Elacridar-d4 en Loperamide-d6, zie tabel 15. Als er gekeken wordt naar de chemische structuur van Tariquidar (figuur 4), Elacridar-d4 (figuur 3, de structuur van een stabiel isotoop is immers hetzelfde als de structuur van het oorspronkelijke analiet) en Loperamide-d6 (bijlage I) valt het op dat Tariquidar en Elacridar-d4 qua chemische structuur het meest op elkaar lijken. Verder komen Tariquidar en Elacridar-d4 overheen in functie, het zijn beide inhibitoren voor P-gp en Bcrp1. Er is gekozen om Elacridar-d4 te gebruiken als IS voor Tariquidar.

#### 4.1.4 Extractievloeistof

De monstervoorbewerking bestond uit een vloeistof-vloeistof extractie. De drie extractievloeistoffen die getest zijn, waren: diethylether, ethylacetaat en *tert*-butylmethylether. Zie paragraaf 3.5 hoe dit experiment is uitgevoerd. De recovery en ion suppressie werden vervolgens berekend volgens formule 11 en formule 12. Zie tabel 16a en tabel 16b voor de berekende recovery en ion suppressie per analiet in humaan plasma.

Analieten	diethylether (%)	ethylacetaat (%)	tert-butylmethylether (%)
Docetaxel	54,0	35,8	54,3
Elacridar	49,7	38,9	50,4
Erlotinib	57,7	57,4	59,3
Loperamide	53,5	38,6	56,4
Riluzole	49,2	42,4	52,4
Tariquidar	56,7	31,9	69,5
Vemurafenib	59,3	38,1	76,3
Verapamil	51,5	39,3	55,5

Tabel 16a| Recovery van de vloeistof-vloeistof extractie in humaan plasma met verschillende extractievloeistoffen.

 Tabel 16b | Ion suppressie van de analieten met verschillende extractievloeistoffen.

Analieten	diethylether (%)	ethylacetaat (%)	tert-butylmethylether (%)
Docetaxel	59,4	46,7	-1,55
Elacridar	22,9	19,7	-18,5
Erlotinib	10,8	14,4	-19,9
Loperamide	8,75	9,7	-26,3
Riluzole	15,1	5,6	-19,7
Tariquidar	41,0	24,0	-15,1
Vemurafenib	22,3	19,7	-22,6
Verapamil	14,0	16,0	-19,0

De ion suppressie is voor *tert*-butylmethylether is voor elk analiet negatief. Dit wordt veroorzaakt doordat de gemiddelde piekhoogte in de AS lager is dan de gemiddelde piekhoogte in de gespikte monsters. De oorzaak van de lagere piekhoogte in de AS is dat de analieten adsorberen in een zuivere oplossing. Dit probleem is ook

waargenomen bij de bepaling van de recovery en ion suppressie tijdens de validatie, zie paragraaf 4.2.7. Echter is er besloten op basis van de hoogste recovery en de laagste ion suppressie dat *tert*-butylmethylether de optimale extractievloeistof is.

# 4.1.5 Procentueel verschil van de twee wegingen

Om de methode goed te valideren zijn er twee stockoplossingen nodig van verschillende wegingen. Eén stockoplossing voor de standaarden en één stockoplossing voor de QC monsters, dit zijn de controlemonsters. Zie paragraaf 3.6.2 voor de twee wegingen die gebruikt zijn voor de 100  $\mu$ M standaard stockoplossing en de 100  $\mu$ M QC stockoplossing. Het procentuele verschil tussen de twee wegingen mocht niet hoger zijn dan 3%.

Elke weging, beschreven in paragraaf 3.6.1, werd verdund in AS en 100 nM IS oplossing (zie paragraaf 3.6.3) en hadden een eindconcentratie van 100 nM. Deze oplossingen werden onafhankelijk van elkaar in viervoud geanalyseerd met behulp van de LC-MS/MS. Vervolgens werd de piekhoogte van het analiet gedeeld door de piekhoogte van de bijbehorende IS en werd de gemiddelde ratio berekend. Het procentuele verschil tussen de twee wegingen per analiet werd berekend, zie tabel 17 voor de procentuele verschillen.

Analiet	Ratio weging 1	, Ratio weging 2	Verschil (%)
Docetaxel	1,69	1,70	0,729
Elacridar	1,87	1,85	1,08
Erlotinib	1,31	1,28	2,36
Loperamide	0,775	0,772	0,461
Riluzole	0,877	0,872	0,657
Tariquidar	0,322	0,330	2,18
Vemurafenib	0,752	0,758	0,767
Verapamil	1,05	1,06	1,45

 Tabel 17 | Procentueel verschil tussen de twee wegingen per analiet.

De procentuele verschillen tussen de twee wegingen vallen allemaal onder de drie procent. Dit betekent dat de twee wegingen gebruikt mogen worden voor de stockoplossingen en de QC oplossingen.

# 4.2 Validatie in humaan plasma

In deze paragraaf zullen de resultaten besproken worden van de validatie van humaan plasma. Het statistiek programma IBM SPSS Statistics 22 is gebruikt om de verkregen data te toetsen. De chromatogrammen zijn verkregen m.b.v. het programma Analyst. De grafieken zijn verkregen m.b.v. Microsoft Excel 2010 en GraphPad Prism 6.

# 4.2.1 Specificiteit en selectiviteit

Voor de bepaling van de specificiteit en de selectiviteit werden er drie verschillende blanco humaan plasma monsters uit verschillenden batches geanalyseerd. Van de drie verschillende blanco plasma monsters werden er blanco- en een dubbele blanco monsters in duplo opgewerkt. Samen met een kalibratielijn (in duplo) werden deze vervolgens geanalyseerd. Deze analyse werd op drie verschillende dagen uitgevoerd. Zie figuur 12 voor een chromatogram van de dubbele blanco in humaan plasma.



Figuur 12 | XIC + MRM chromatogram van de dubbele blanco humaan plasma.

Uit het chromatogram blijkt dat er meerdere storingen aanwezig zijn op dezelfde m/z-ratio als de analieten. Alleen voor Tariquidar (roze) is deze storing aanwezig op een andere t<sub>R</sub>. Tariquidar heeft namelijk een t<sub>R</sub> van 8,5 min. en de storing zit op een t<sub>R</sub> van 11 min.. Omdat deze storing meer dan twee minuten verschilt met Tariquidar heeft deze geen invloed op Tariquidar zelf. Verder is er geen verband aanwezig in het piekoppervlakte van de stroringpiek wanneer de concentratie van Tariquidar toeneemt. Toen er een blanco ASmonster geanalyseerd werd, was deze storing niet aanwezig. Hieruit kunnen we concluderen dat deze storing uit de matrix komt en dat dit geen Tariquidar is.

Voor de andere storingen werd het signaal-ruis verhouding bepaald. Dit werd gedaan door de gemiddelde piekhoogte in cps van alle blanco plasma monsters en dubbele blanco plasma monsters op de drie verschillende dagen te berekenen. Vervolgens werd deze gemiddelde piekhoogte van de (dubbele)blanco plasma monsters vergeleken met de gemiddelde piekhoogte van de laagste standaard (1 nM), zie tabel 18.

Analiet	Gemiddelde piekhoogte blanco (cps)	Gemiddelde piekhoogte std. 1 nM (cps)
Docetaxel	15,6	462
Elacridar	156	2,55·10 <sup>3</sup>
Erlotinib	826	7,94·10 <sup>3</sup>
Loperamide	1,27·10 <sup>3</sup>	2,05·10 <sup>4</sup>
Riluzole	312	<b>1,92</b> ·10 <sup>3</sup>
Tariquidar	34,7	577
Vemurafenib	495	1,08·10 <sup>4</sup>
Verapamil	54,8	1,23·10 <sup>3</sup>

 Tabel 18 | Gemiddelde gemeten piekhoogte per analiet voor blanco humaan plasma en de laagste standaard 1 nM.

Uit de waarden uit tabel 18 blijkt dat het gemiddelde signaal van de storingen in de blanco plasma monsters veel lager is dan het gemiddelde signaal van de laagste standaarden. Omdat het gemiddelde signaal van de blanco plasma monsters voor elk analiet tenminste tien keer lager is dan het gemiddelde signaal van de laagste standaarden uit de kalibratielijn, is dit signaal acceptabel.

# 4.2.2 Detectiegrens (LOD)

Voor de bepaling van de LOD zijn dezelfde monsters gebruikt als bij de bepaling van de specificiteit en de selectiviteit in paragraaf 4.2.1. Uit deze paragraaf blijkt dat het gemiddelde signaal van de blanco plasma monsters tenminste tienmaal lager is dan het signaal van de laagste standaard. Dit signaal mag als ruis beschouwd worden. De laagste concentratie uit de kalibratielijn mag valt binnen de LOD als de signaal-ruis verhouding minimaal een driemaal verschil heeft. Voor elk analiet voldoet het gemiddelde signaal van standaard 1 nM aan deze eis. De LOD is vastgesteld op een concentratie van 0,1 nM.

# 4.2.3 Bepalingsgrenzen (LLQ en ULQ)

De LLQ en de ULQ werden bepaald door QC monsters te analyseren in het lage (1 nM, 2 nM en 5 nM) en hoge (50 nM, 100 nM en 200 nM) gebied van de kalibratielijn. Voor elke concentratie werden er zes QC monsters opgewerkt en gelijktijdig geanalyseerd met een kalibratielijn. Dit experiment werd op drie verschillende dagen uitgevoerd.

Voor de bepaling van de bepalingsgrenzen werd de %RSD en de %DEV berekend volgens formule 2 en 3 weergegeven in paragraaf 2.2. De resultaten voor de LLQ bij een concentratie van 1 nM en ULQ voor een concentratie van 200 nM zijn weergegeven in tabel 19a en tabel 19b. De %RSD en de %DEV waarden moesten kleiner zijn dan 20%.

	Da	g 1	Da	g 2	Da	g 3	Gemi	ddelde
Analiet	RSD (%)	DEV (%)						
Docetaxel	15	-21	15	9,0	6,2	-14	4,1	0,19
Elacridar	8,4	-1,9	10	8,9	7,9	1,0	2,8	4,3
Erlotinib	3,1	-9,3	7,5	-16	4,2	-11	3,3	-5,2
Loperamide	1,2	-4,9	1,7	-1,1	1,3	-4,6	3,1	-2,8
Riluzole	6,3	-3,4	11	-16	19	-12	2,1	-2,9
Tariquidar	7,8	-17	18	2,0	15	-4,2	3,6	8,6
Vemurafenib	4,5	-4,2	2,1	-8,4	3,4	-7,5	3,2	-0,39
Verapamil	12	-9,0	25	-18	10	-15	2,8	-5,0

Tabel 19a | Resultaten weergegeven in %RSD en %DEV voor de LLQ in humaan plasma, QC 1 nM.

In tabel 19a zijn er twee waardes die niet binnen de eis van 20% vallen. Eén ervan is de %DEV-waarde van Docetaxel op dag 1, heeft een waarde van -21%. De rest van de twee dagen viel de %DEV-waarde van Docetaxel wel binnen de eis. Het gemiddelde van deze drie %DEV-waarden is -8,9% en valt wel binnen de grens. Om deze rede is de LLQ voor Docetaxel is vastgesteld op 1 nM.

De tweede waarde die buiten de eis valt is de %RSD-waarde van Verapamil op dag 2 van 25%. De %RSDwaarden op de andere twee dagen vallen wel binnen de eis van 20%. Omdat de gemiddelde %RSD-waarde (16%) wel binnen de eis valt is de LLQ voor Verapamil is vastgesteld op 1 nM. De %RSD- en %DEV-waarden van de andere analieten vallen wel binnen de 20%. De LLQ voor de andere analieten is vastgesteld op een concentratie van 1 nM omdat de %RSD-waarden en de %DEV-waarden binnen de eis van 20% vallen.

	Da	ig 1	Da	g 2	Da	g 3	Gemi	ddelde
Analiet	RSD (%)	DEV (%)						
Docetaxel	4,2	-1,4	3,4	1,3	4,6	0,67	12	-8,9
Elacridar	3,1	1,8	3,1	9,0	2,3	2,2	8,8	2,7
Erlotinib	3,0	-3,6	2,0	-4,4	4,8	-7,2	4,9	-12
Loperamide	3,3	-2,9	1,6	-1,2	4,6	-4,2	1,4	-3,5
Riluzole	2,7	0,08	1,5	-2,4	2,2	-6,5	12	-11
Tariquidar	6,6	14	2,4	11	1,8	1,3	14	-6,6
Vemurafenib	4,0	5,3	1,3	-3,0	4,2	-3,5	3,3	-6,7
Verapamil	2,0	-2,1	2,6	-4,6	3,8	-8,4	16	-14

Tabel 19b| Resultaten weergegeven in %RSD en %DEV voor de ULQ in humaan plasma, QC 200 nM.

Uit de berekende %RSD- en %DEV-waarden uit tabel 19b kan geconcludeerd worden dat de waarden aan de eis voldoen. De waarden zijn allemaal lager dan 20%. De standaard 200 nM uit de kalibratielijn mag voor elk analiet als de ULQ beschouwd worden. De data van de QC 1 nM en QC 200 nM voor het bepalen van de ULQ en LLQ is te vinden in bijlage III.

# 4.2.4 Lineariteit

Voor het bepalen van de lineariteit werd er per dag één kalibratielijn in humaan plasma in duplo opgewerkt en geanalyseerd op drie verschillende dagen. De gegevens van de kalibratielijnen werden getest op de weegfactor, lineariteit (LOF-toets) en op de aanwezigheid van een constante systematische- en proportionele fout (t-toets). Deze bepalingen zijn uitgevoerd m.b.v. een lineaire regressie analyse in SPSS. In figuur 13a en 13b zijn de kalibratielijnen van Elacridar en Tariquidar weergegeven. Deze zijn geanalyseerd op drie verschillende dagen. De grafieken en de bijbehorende functies van de kalibratielijnen werden bepaald in GraphPad Prism 6, hierbij zijn ook de juiste weegfactoren toegepast. Het gemiddelde piekoppervlakte van het analiet werd gedeeld door het gemiddelde piekoppervlakte van de IS, deze ratio is uitgezet op de y-as. Op de x-as is de concentratie in nM weergeven. De kalibratielijnen met de bijbehorende functies van de andere analieten zijn weergegeven in bijlage IV.



**Figuur 13a** *Kalibratielijnen in humaan plasma van Elacridar geanalyseerd op de drie verschillende dagen.* 



**Figuur 13b**| Kalibratielijnen in humaan plasma van Tariquidar geanalyseerd op drie verschillende dagen. Dag 1: y=-8,57·10<sup>-6</sup>x<sup>2</sup> (±1,30·10<sup>-6</sup>) + 9,48·10<sup>-3</sup>x (±2,08·10<sup>-4</sup>) − 1,21·10<sup>-3</sup> (±1,36·10<sup>-3</sup>), R<sup>2</sup>=0,999. Dag 2: y=-2,76·10<sup>-6</sup>x<sup>2</sup>(±1,03·10<sup>-6</sup>) + 8,92·10<sup>-3</sup>x (±1,64·10<sup>-4</sup>) + 1,51·10<sup>-3</sup> (±1,08·10<sup>-3</sup>), R<sup>2</sup>=0,999. Dag 3: y=-6,51·10<sup>-6</sup>x<sup>2</sup> (±1,25·10<sup>-6</sup>) + 7,32·10<sup>-3</sup>x (±2,00·10<sup>-4</sup>) + 3,20·10<sup>-3</sup> (±1,31·10<sup>-3</sup>), R<sup>2</sup>=0,998.

In figuur 13a is waar te nemen dat de kalibratielijnen van Elacridar lineair zijn. In figuur 13b valt het op dat de kalibratielijnen van Tariquidar niet lineair zijn. De LOF (mate waarin de kalibratielijn lineair is) is bepaald voor alle kalibratielijnen in deze studie en is beschreven onder het kopje LOF-toets op blz. 38 en 39.

#### Weegfactor

R<sup>2</sup>=0,999.

De kalibratielijnen werden getoetst op de beste weegfactor. Dit werd gedaan door een regressie analyse uit te voeren m.b.v. SPSS. Tabel 20 geeft de berekende en uiteindelijk gekozen weegfactor weer per analiet per dag.

Analiet	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Uiteindelijk gekozen weegfactor
Docetaxel	2,0	1,5	2,0	2,0
Elacridar	1,5	1,0	2,0	1,0
Erlotinib	2,0	2,0	2,0	2,0
Loperamide	2,0	1,0	2,0	2,0
Riluzole	1,5	1,5	2,0	1,0
Tariquidar	2,0	1,5	2,0	1,0
Vemurafenib	2,0	2,0	2,0	2,0
Verapamil	2,0	1,5	2,0	2,0

 Tabel 20
 De berekende weegfactor op drie verschillende dagen in humaan plasma.

De uiteindelijke weegfactor werd ingevoerd in de software (Analyst) van de LC-MS/MS om de kalibratielijn te berekenen. In deze software kon geen weegfactor van 1,5 toegepast worden. Wanneer de uitkomst een weegfactor van 1,5 was werd dit afgerond naar een weegfactor van 1,0.

Voor Docetaxel is er gekozen om een weegfactor van 2,0 te gebruiken. Er komt tweemaal een weegfactor van 2,0 uit. Verder past een weegfactor van 2,0 beter in het lage gebied van de kalibratielijn, dit is voordeliger voor Docetaxel want die geeft een lage piek in het chromatogram, zie figuur 10. Voor Elacridar en Riluzole is er besloten om een weegfactor van 1,0 te gebruiken. Deze past beter voor de gehele kalibratielijn en afgerond komt er twee keer een weegfactor van 1,0 uit. Voor Erlotinib, Loperamide Vemurafenib en Verapamil past een weegfactor van 2,0 het beste. Voor Tariquidar is er gekozen om een weegfactor van 1,0 toe te passen omdat er geen stabiel isotoop aanwezig is als IS. Echter geldt deze weegfactor alleen voor het lineaire bereik van Tariquidar, zie tabel 22. De weegfactor houdt in dat er een weging van  $1/x^1$  of  $1/x^2$  is toegepast, afhankelijk van het analiet.

#### Lineariteit (Lack of Fit-toets)

De uiteindelijk gekozen weegfactoren werden toegepast bij de kalibratielijnen. Vervolgens werden de kalibratielijnen getoetst op de LOF. Deze bepaling werd uitgevoerd m.b.v. een variantie analyse met een BI van 95%. De kwadratensom van residuen (SS<sub>r</sub>) wordt opgesplitst in een kwadratensom ten gevolge van de spreiding in de meting (SS<sub>pe</sub>). Deze twee waarden werden bepaald m.b.v. een regressie analyse en een ANOVA-analyse in

SPSS. Deze twee waarden en de bijbehorende vrijheidsgraden werden ingevuld in formule 5, beschreven in paragraaf 2.2. Met deze formule is de FLOF berekend en vervolgens vergeleken met de grenswaarde, gevonden met de bijbehorende vrijheidsgraden. Wanneer de FLOF kleiner is dan de grenswaarde is er geen LOF en mag de kalibratielijn als lineair beschouwd worden.

Om te corrigeren met de IS werd het piekoppervlakte van het analiet gedeeld door het piekoppervlakte van de IS. Vervolgens werden de x- (nominale concentratie) en de y-waarden (piekoppervlak analiet/IS) vermenigvuldigd met een factor 10000. Dit is gedaan om de SS<sub>r</sub>- en SS<sub>pe</sub>-waarden te vergroten. In de formule werd dit weer verrekend door deze waarden te delen door een factor 10000, zie het onderstaande voorbeeld. Tabel 21 beschrijft de waarden uit SPSS voor Elacridar die nodig zijn voor het bepalen van de LOF. Daaronder volgt een voorbeeld van de berekening voor de LOF van Elacridar op dag 1.

 Tabel 21 | Waarden uit SPSS voor de LOF bepaling van Elacridar dag 1.

Weegfactor	2,00	
SSr	5,02	
df <sub>r</sub>	14,0	
SSpe	2,13	
Dfpe	8,00	

Deze waarden uit SPSS werden ingevuld in formule 5 uit paragraaf 2.2:

$$F_{LOF} = \frac{((5,02/1,00 \cdot 10^4)/(2,13/1,00 \cdot 10^4)) - (14,0-8,00)}{(2,13/1,00 \cdot 10^4)/8,00} = 1,81$$

Vervolgens werd de grenswaarde bij een vrijheidsgraden van zes en acht opgezocht. Dit was 3,58 met een BI van 95%. De berekende  $F_{LOF}$  (1,18) voor de kalibratielijn, met een bereik van 1 nM tot 200 nM, van Elacridar op dag 1 is kleiner dan de grenswaarde (3,58). Er is geen LOF en de kalibratielijn mag als lineair beschouwd worden. Deze berekening is gedaan voor alle kalibratielijnen, zie bijlage V voor de resultaten van de LOF-toets voor de andere analieten.

Wanneer de kalibratielijn niet lineair was bij een bereik van 1 nM tot 200 nM, werd het bereik van de kalibratielijn verkleind totdat de kalibratielijn wel lineair was. Dit deed zich onder andere voor bij Tariquidar. Hierbij veranderde ook het aantal vrijheidsgraden en de grenswaarde. De grenswaarde die gebruikt is bij een bereik van 1 nM tot 200 nM was  $F_{\alpha=0,05}$  (6,8) = 3,58, bij een bereik van 1 nM tot 100 nM was  $F_{\alpha=0,05}$  (5,7) = 3,97 en bij een bereik van 1 nM tot 50 nM was  $F_{\alpha=0,05}$  (4,6) = 4,53. In tabel 22 is het lineair bereik in nM van elke kalibratielijn per dag weergegeven.

Analiet	Dag 1 lineair bereik (nM)	Dag 2 lineair bereik (nM)	Dag 3 lineair bereik (nM)
Docetaxel	1-200	1-200	1-200
Elacridar	1-200	1-200	1-50
Erlotinib	1-200	1-200	1-200
Loperamide	1-200	1-200	1-200
Riluzole	1-200	1-200	1-50
Tariquidar	1-100	1-100	1-50
Vemurafenib	1-200	1-200	1-50
Verapamil	1-200	1-200	1-200

 Tabel 22 | Het lineair bereik in nM voor alle kalibratielijnen in humaan plasma van drie dagen.

Het valt op dat het lineair bereik van Elacridar, Riluzole en Vemurafenib op dag drie lager was dan op de andere dagen. Omdat het lineair bereik op de andere twee dagen wel van 1 nM tot 200 nM liep en deze verandering voor meerder analieten geldt, wordt dit gezien als een fout in de analyse van dag drie. De kalibratielijnen van Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil mogen als lineair beschouwd worden met een bereik van 1 nM tot 200 nM.

Tariquidar heeft voor dag één en dag twee een lineair bereik van 1 nM tot 100 nM. Voor dag drie liep dit bereik van 1 nM tot 50 nM. De kalibratielijn van Tariquidar is niet lineair met een bereik van 1 nM tot 200 nM. Dit komt omdat de IS (Elacridar-d4) geen stabiel isotoop is van Tariquidar. Hierdoor corrigeert de IS niet goed en is dit te zien aan de kalibratielijn, zie figuur 13b. De kalibratielijn van Tariquidar mag als lineair beschouwd

worden met een bereik van 1 nM tot 100 nM. De QC monsters die een hogere concentratie hebben dan 100 nM, kunnen gekwantificeerd worden door een kwadratische functie door de kalibratielijn te trekken. Wanneer de *in vivo* monsters geanalyseerd worden zullen de monsters verdund moeten worden om in het lineaire gebied van de kalibratielijn te vallen. Of er moet een kwadratische functie toegepast worden. Het toepassen van een kwadratische functie heeft de voorkeur omdat de afwijking in de kalibratielijn nog acceptabel is. Wanneer deze afwijking te groot wordt is het nodig om de monsters te verdunnen.

#### Constante systematische- en proportionele fout (student t-toets)

Als laatste werden de kalibratielijnen getest of ze behept zijn met een constante systematische- en/of proportionele fout. De t-toets gaat uit van formule 6 beschreven in paragraaf 2.2. Wanneer het intercept ( $\alpha$ )  $\neq$  0 en de helling ( $\beta$ )  $\neq$  1 met een BI van 95%, bevat de methode een constante systematische- en proportionele fout. Zie tabel 23 voor een voorbeeld met Elacridar.

Elacridar	Intercept (α)	BI	(95%)	Helling (β)	BI (	95%)
Dag 1	2,16·10 <sup>-3</sup>	-0,180	0,184	1,00	0,987	1,01
Dag 2	0,178	-0,138	0,495	0,999	0,977	1,02
Dag 3	-1,13·10 <sup>-3</sup>	-0,212	0,210	1,00	0,969	1,03

Tabel 23 Resultaten van de t-toets van de kalibratielijnen in humaan plasma voor Elacridar.

De waarden in de tabel zijn bepaald met SPSS door de nominale concentratie te vergelijken met de gemeten concentratie. In de tabel is waar te nemen dat het intercept ( $\alpha$ ) nul is met een BI van 95% voor alle drie de dagen. De methode is niet behept met een constante systematische fout. Ook de helling ( $\beta$ ) is één met een BI van 95% voor alle drie de dagen. De methode is niet behept met een proportionele fout. Dit is voor elk analiet bepaald en het resultaat was dat de methode voor elk analiet niet behept was met een constante systematische- en proportionele fout. De waarden voor de bepaling van de t-toets van de andere analieten zijn weergegeven in bijlage VI.

#### 4.2.5 Juistheid

Voor de bepaling van de juistheid werden er QC monsters met een concentratie van 5 nM, 25 nM en 100 nM in zesvoud opgewerkt en geanalyseerd. Dit werd gedaan op drie verschillende dagen gelijktijdig met een kalibratielijn. Per concentratie werd het gemiddelde en de stdev. berekend van alle drie de dagen. Vervolgens werd de juistheid van die drie dagen berekend volgens formule 4 in paragraaf 2.2. In figuur 14a, 14b en 14c is de juistheid per analiet per concentratie weergegeven in procenten. De stdev. is ook omgerekend naar procenten en weergegeven als foutenbalken. Met de rode lijnen zijn de grenswaarden aangegeven. De ondergrens is 85% en de bovengrens is 115%.







Figuur 14c| Juistheid in procenten van de QC 100 nM in humaan plasma.

In figuur 14a t/m 14c is waar te nemen dat de juistheid voor elk analiet binnen de grenswaarden van 85% en 115% valt. Dit betekent dat de methode voldoet aan de juistheid. Zie bijlage VII voor de data van figuur 14a tot en met 14c.

#### 4.2.6 Precisie

Voor de bepaling van de precisie zijn dezelfde QC monsters met een concentratie van 5 nM, 25 nM en 100 nM gebruikt als bij de bepaling van de juistheid.

#### Herhaalbaarheid

De waarden die nodig zijn om de herhaalbaarheid te berekenen werden bepaald m.b.v. van een *one-way* ANOVA-analyse in SPSS. Dit waren de waarden  $MS_{WG}$  en GM, zie paragraaf 2.2 voor toelichting van deze twee waarden. Vervolgens werden deze waarden ingevuld in formule 7 beschreven in paragraaf 2.2. De herhaalbaarheid was berekend over de gemeten concentraties van drie dagen voor elk analiet. De herhaalbaarheid moet kleiner zijn dan 15%. Zie tabel 24 voor de resultaten van de herhaalbaarheid in humaan plasma.

Analiet	QC 5 nM (%)	QC 25 nM (%)	QC 100 nM (%)
Docetaxel	5,3	4,2	4,6
Elacridar	15,6	2,6	12,2
Erlotinib	3,1	1,6	3,7
Loperamide	2,4	1,6	3,0
Riluzole	4,4	2,5	3,2
Tariquidar	5,7	3,9	2,8
Vemurafenib	10,6	4,9	4,5
Verapamil	2.0	1.5	3.1

 Tabel 24| Resultaten voor de herhaalbaarheid per analiet in humaan plasma.

In tabel 24 is waar te nemen dat de herhaalbaarheid van Elacridar bij een concentratie van 5 nM niet onder de 15% valt. Dit betekent dat de methode voor deze concentratie voor Elacridar niet herhaalbaar is. Dit is echter geen probleem omdat de verwachte concentraties van de *in vivo* monsters van Elacridar tussen de 500 nM en 2000 nM zullen liggen. Deze monsters worden nog twintig maal verdund bij de monstervoorbewerking. De uiteindelijke concentraties zullen dan tussen de 25 nM en 100 nM liggen. Voor deze concentraties is de methode wel herhaalbaar. Voor de andere analieten voldoen de waarden wel aan de eis en is de analysemethode herhaalbaar.

#### Reproduceerbaarheid

De waarden die nodig waren voor de berekening van de reproduceerbaarheid kwamen uit dezelfde *one-way* ANOVA-analyse die uitgevoerd was bij de bepaling van de herhaalbaarheid. Dit waren de waarden MG<sub>WG</sub>, MG<sub>BG</sub>, GM en n, zie paragraaf 2.2 voor de toelichting van deze waarden. Deze waarden werden ingevuld in formule 8 beschreven in paragraaf 2.2. In tabel 25 zijn de resultaten van de reproduceerbaarheid weergegeven in procenten. De reproduceerbaarheid moet onder de 15% liggen en is berekend over de gemiddelde gemeten concentraties van drie dagen.

Analiet	QC 5 nM (%)	QC 25 nM (%)	QC 100 nM (%)
Docetaxel	9,0	8,3	5,8
Elacridar	2,2	8,2	14,2
Erlotinib	7,7	7,0	3,8
Loperamide	7,9	8,1	4,7
Riluzole	5,0	8,1	5,9
Tariquidar	8,1	8,8	7,1
Vemurafenib	8,2	4,2	7,4
Verapamil	7,5	7,5	3,8

 Tabel 25 | Resultaten voor de reproduceerbaarheid per analiet in humaan plasma.

Alle waarden in tabel 25 vallen onder de 15% en voldoen aan de eis. Dit betekent dat de analysemethode reproduceerbaar is voor alle analieten. Zie bijlage VIII voor de resultaten uit SPSS voor de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid.

#### 4.2.7 Recovery en ion suppressie

Voor de bepaling van de recovery en de ion suppressie werd er een kalibratielijn in plasma opgewerkt. Verder werd er nog een kalibratielijn in AS gemaakt volgens paragraaf 3.4.4. Er werd ook nog een gespikte kalibratielijn bereid. Dit werd gedaan door blanco monsters op te werken en na de monstervoorbewerking het residu op te lossen in AS met de analieten en inhibitoren. Deze drie kalibratielijnen werden geanalyseerd in één analietische run. Dit werd uitgevoerd voor drie verschillende dagen. Het absolute piekoppervlak (cps) werd vervolgens uitgezet tegen de concentratie (nM). Zie figuur 15 voor de drie kalibratielijnen van Elacridar geanalyseerd op dag één.



**Figuur 15** Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Elacridar geanalyseerd op dag 1. Kalibratielijn in AS:  $7,92 \cdot 10^3 x (\pm 1,48 \cdot 10^2) + 5,37 \cdot 10^4 (\pm 2,13 \cdot 10^3), R^2=0,995.$ Kalibratielijn in plasma:  $7,14 \cdot 10^3 x (\pm 2,04 \cdot 10^2) + 6,60 \cdot 10^3 (\pm 2,04 \cdot 10^2), R^2=0,989.$ Gespikte kalibratielijn: $5,90 \cdot 10^3 x (\pm 1,61 \cdot 10^2) + 4,60 \cdot 10^4 (\pm 2.31 \cdot 10^3).$  R<sup>2</sup>=0.990.

#### Recovery

Voor de bepaling van de recovery werd de helling van de kalibratielijn in plasma gedeeld door de helling van de gespikte kalibratielijn. Dit werd vermenigvuldigd met 100 om in procenten uit te komen. Deze formule is ook beschreven in paragraaf 2.2.

$$Recovery = \frac{7,14 \cdot 10^3}{5,90 \cdot 10^3} \cdot 100\% = 121\%$$

Deze berekening werd uitgevoerd voor alle drie de dagen. Zie tabel 26 voor de berekende recovery van Elacridar voor drie dagen en de gemiddelde berekende recovery in procenten.

. ,	
	Recovery (%)
Dag 1	121
Dag 2	122
Dag 3	108
Gemiddelde	117
Stdev.	7,88

Tabel 26 | Recovery van Elacridar berekend voor drie dagen en de gemiddelde recovery in procenten.

De recovery is meer dan 100%. Dit komt omdat de helling van de gespikte kalibratielijn lager is dan de helling van de kalibratielijn in plasma. Er werd verwacht dat de gespikte kalibratielijn een hogere helling zou hebben omdat er een zuivere AS-oplossing aan het eind van de monstervoorbewerking toegevoegd werd. Deze monsters hebben dus niet de hele monstervoorbewerking ondergaan. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat het residu, met het analiet, beter oplost in 60:40% MeOH:water wanneer het uit de biologische matrix komt en de monstervoorbewerking ondergaan is. Tijdens het overgieten van de organische laag in een schoon epje komen er wat eiwitten en andere componenten mee. Dit is ook waar te nemen na het indampen, er is dan een geel vast geel/oranje laagje aanwezig op de bodem van het epje. Door de aanwezigheid van deze componenten in het residu lost het analiet beter op dan wanneer het in een zuivere AS-oplossing zit. De AS-oplossing is te zuiver, het analiet adsorbeert aan de wand van het epje. Dat is het geval bij de gespikte kalibratielijn en AS-kalibratielijn. Het analiet zit een zuivere oplossing van 60:40% MeOH:water en wordt later

pas toegevoegd aan de opgewerkte blanco monsters. In die blanco monsters zijn deze eiwitten en andere componenten uit de matrix ook aanwezig maar het analiet heeft al een enige tijd in de 60:40% MeOH:water oplossing gezeten. Voordat het analiet toegevoegd wordt aan de opgewerkte blanco monsters is het al geadsorbeert en niet meer 100% in oplossing. De recovery, van in dit geval voor Elacridar, wordt dan meer dan 100%, dit is ook zichtbaar bij sommige andere analieten die slecht oplosbaar zijn. Bij Tariquidar en Vemurafenib is de recovery ook hoger dan 100%, dit komt ook omdat de analieten adsoberen aan de wand van het epje in een zuivere AS-oplossing. Zie tabel 27 voor de recovery van de andere analieten van de drie verschillende dagen, samen met de gemiddelde recovery en de bijbehorende stdev. in procenten.

Analiet	Dag 1 (%)	Dag 2 (%)	Dag 3 (%)	Gemiddelde (%)	Stdev. (%)
Docetaxel	111	102	85	99	12,9
Erlotinib	118	115	112	115	3,03
Loperamide	106	105	108	107	1,33
Riluzole	111	117	67	98	27,4
Tariquidar	125	116	121	121	4,59
Vemurafenib	187	200	117	168	44,4
Verapamil	109	102	129	113	13,7

 Tabel 27 | Recovery van alle analieten met de bijbehorende stdev.

Bij Docetaxel en Riluzole dag drie zit de recovery wel onder de 100%. Dit komt omdat de helling van de gespikte kalibratielijn daar hoger is dan de helling van de kalibratielijn in plasma. De gemiddelde recovery ligt in de orde van 100%. Het is niet mogelijk om precies vast te stellen hoeveel procent er verloren gaat tijdens de monstervoorbewerking. Wel kan er geconcludeerd worden dat er niet veel analiet verloren gaat van het analiet tijdens de monstervoorbewerking.

#### Ion suppressie

De ion suppressie werd bepaald m.b.v. van de helling van de kalibratielijn in AS en de helling van de gespikte kalibratielijn. De formule is beschreven in paragraaf 2.2. De hellingen werden in de formule ingevuld en de ion suppressie werd berekend in procenten.

$$Ion \ suppressie = \frac{(7,92 \cdot 10^3 - 5,90 \cdot 10^3)}{7,92 \cdot 10^3} \cdot 100\% = 25,4\%$$

Deze berekening werd uitgevoerd voor alle drie de dagen. In tabel 28 is de ion supressie weergegeven van Elacridar bepaald op drie verschillende dagen.

 Tabel 28 | Ion suppressie van Elacridar berekend voor drie dagen en de gemiddelde ion suppressie.

	Ion suppressie (%)
Dag 1	25,4
Dag 2	15,3
Dag 3	9,15
Gemiddelde	16,6
Stdev.	8,21

De ion suppressie is ook berekend voor de andere analieten. De resultaten zijn weergegeven in tabel 29 samen met de gemiddelde ion suppressie en de bijbehorende stdev. in procenten.

Tabel 29	lon suppressie	van alle analie	eten met de bij	ibehorende stdev
----------	----------------	-----------------	-----------------	------------------

Analiet	Dag 1 (%)	Dag 2 (%)	Dag 3 (%)	Gemiddelde (%)	Stdev. (%)
Docetaxel	23,0	17,1	20,3	20,1	2,95
Erlotinib	6,12	0,35	-2,91	1,19	4,57
Loperamide	13,7	7,67	9,57	10,3	3,10
Riluzole	24,4	11,1	19,2	18,2	6,71
Tariquidar	27,1	18,7	24,1	23,3	4,24
Vemurafenib	39,8	42,1	-3,99	26,0	26,0
Verapamil	3,74	-3,76·10 <sup>-2</sup>	18,3	7,35	9,71

In tabel 29 is waar te nemen dat er veel variatie aanwezig is tussen de drie dagen. De ion suppressie is berekend uit de helling van de AS kalibratielijn en de gespikte kalibratielijn. Het probleem van de adsorptie van

de analieten in een zuivere AS-oplossing is bij beide van deze kalibratielijnen aanwezig. Hierdoor kan de helling van deze twee kalibratielijnen wel met elkaar vergeleken worden. Bij Vemurafenib valt het op dat de ion suppressie op dag drie niet overheen komt met de ion suppressie van de andere twee dagen. Dit komt omdat de helling van de kalibratielijn in AS lager is dan helling van de gespikte kalibratielijn. Dit wordt echter weer veroorzaakt door adsorptie van Vemurafenib aan de wand van het epje in een zuivere AS-oplossing. De gemiddelde ion suppressie voor Docetaxel, Elacridar, Riluzole, Tariquidar en Vemurafenib ligt in de orde van 20%. Voor Loperamide is de gemiddelde ion suppressie 10%, voor Erlotinib 1,2% en voor Verapamil 7,4%. Zie bijlage IX voor de kalibratielijnen van de andere analieten met de bijbehorende hellingen die gebruikt zijn om de recovery en ion suppressie te berekenen.

#### 4.2.8 Stabiliteit

De stabiliteit van de analieten is op drie manieren getest. Dit is gedaan door de stabiliteit in de biologische matrix, van het vries-en-dooi cyclus en in de opgewerkte monsters te testen.

#### Stabiliteit in de biologische matrix

De stabiliteit in de biologische matrix is getest door QC monsters met een concentratie van 5 nM, 25 nM, en 100 nM te bereiden in humaan plasma. Van elke concentratie werden er twee oplossingen in humaan plasma bereid. Vervolgens werd één van deze twee oplossingen bewaard op de tafel op KT. De andere oplossing werd op de tafel in een bak met ijs bewaard. Dit werd in de ochtend voorbereid. Aan het einde van de middag werden de twee oplossingen in viervoud uitgemonsterd. Deze werden gelijktijdig met een kalibratielijn opgewerkt en geanalyseerd. Op deze manier werd er bepaald of het nodig was om tijdens de monstervoorbewerking op ijs te werken. De gemiddelde concentratie werd voor elke analiet berekend en uitgezet in een grafiek, zie figuur 16a t/m 16c. De stdev. van de gemeten concentraties zijn berekend en weergegeven in de figuur als foutenbalken.



Figuur 16a | Stabiliteit van QC 5 nM in humaan plasma.



Figuur 16b | Stabiliteit van QC 25 nM in humaan plasma.



QC 100 nM in humaan plasma

Figuur 16c | Stabiliteit van QC 100 nM in humaan plasma.

In figuur 16a t/m 16c is waar te nemen dat de gemiddelde concentraties van de monsters bewaard op ijs lager zijn dan de gemiddelde concentraties van de monsters die niet op ijs zijn bewaard. Het resultaat van dit experiment gaat tegen de verwachting in. De verwachting van dit experiment was dat de concentraties stabieler zouden zijn wanneer ze op ijs bewaard zouden worden. Een verklaring voor de lagere concentraties van de monsters bewaard op ijs is dat de analieten minder goed in oplossing zijn bij een lagere temperatuur. De monsters werden de hele dag op ijs bewaard vervolgens gekoeld opgewerkt en geanalyseerd. De analieten zijn door de lage temperatuur minder goed in oplossing dan in de monsters die niet op ijs zijn voorbewerkt. Hierdoor wordt er een lagere concentratie gemeten door de LC-MS/MS. In de grafieken is waar te nemen dat de gemiddelde concentraties van beide omstandigheden ca. in de orde van 5 nM, 25 nM en 100 nM liggen. Verder vallen de DEV%- en RSD%-waarden binnen de grens van 20%. Zie bijlage Xa voor de DEV% en RSD% resultaten. Hieruit kan geconcludeerd worden dat er geen significant verschil is tussen de twee omstandigheden. De analieten zijn stabiel en op basis van deze resultaten werd de monstervoorbewerking niet op ijs uitgevoerd. Zie bijlage Xa voor de data die behoort bij figuur 16a t/m 16c.

#### Vries-en-dooi cyclus

Er werd gekeken naar de stabiliteit van de analieten na een aantal vries-en-dooi cycli. Het bevriezen en ontdooien van de monsters kan invloed hebben op de concentratie van het analiet in de biologische matrix. Wanneer een monster één maal ontdooid en vervolgens daarna weer bevroren werd, was dit één cyclus. Per concentratie werden en vier oplossingen in humaan plasma gemaakt en bewaard in de vriezer bij een temperatuur van -20°C. Op dag 1 werden alle vier de oplossingen per concentratie in humaan plasma ontdooid op KT en vervolgens weer ingevroren. Op dag 2 werd dit gedaan voor drie van de vier oplossingen, op dag 3 voor twee van de vier en op dag 4 één van de vier. Op deze manier had elke oplossing één cyclus, twee, drie of vier cyclussen ondergaan. Deze werden uitgemonsterd in viervoud gelijktijdig met een kalibratielijn opgewerkt en geanalyseerd. De gemiddelde concentratie werd berekend en uitgezet in een grafiek. De stdev. is in de grafiek weergegeven als foutenbalk. Zie figuur 17a t/m 17c voor de resultaten van QC 5 nM, QC 25 nM en QC 100 nM.



QC 5 nM in humaan plasma

Figuur 17a | Stabiliteit van het vries-en-dooi cyclus in humaan plasma voor QC 5 nM.



Figuur 17b| Stabiliteit van het vries-en-dooi cyclus in humaan plasma voor QC 25 nM.



Figuur 17c| Stabiliteit van het vries-en-dooi cyclus in humaan plasma voor QC 100 nM.

In figuur 17a t/m 17c is waar te nemen dat er geen significant verschil is tussen cyclus één en cyclus vier. Sommige concentraties liggen wel wat hoger of lager dan de nominale concentratie maar dat is voor dit experiment niet van belang. Het gaat er om of er een verschil in concentratie waar te nemen is tussen de vier cycli. Verder vallen de DEV%- en RSD%-waarden binnen de 20%, zie bijlage Xb voor de DEV%- en de RSD%-waarden. Er is geen significant verschil dus het aantal cycli heeft geen invloed op de concentratie van het analiet. Zie bijlage Xb voor de data die behoort bij figuur 17a t/m 17c.

#### Stabiliteit in de opgewerkte monsters

De stabiliteit in de opgewerkte monsters werd bepaald zodat het bekend werd onder welke omstandigheden de opgewerkte monsters bewaard konden worden. Er werden drie omstandigheden getest: bewaren onder een temperatuur van 4°C in het donker, bij KT in het donker en bij KT in het licht. Van elke concentratie werden er 48 monsters opgewerkt. Aan het einde van de monstervoorbewerking werd het residu opgelost en werden alle monsters bij elkaar gevoegd. Vervolgens werd er 400 µL uitgemonsterd in twaalf andere epjes. Vier van deze epjes werden bewaard onder 4 °C in het donker, KT in het donker en KT in het licht. Vervolgens werden deze monsters gemeten op verschillende dagen. Elke dag werd er een nieuwe kalibratielijn en een verse AS oplossing bereid. Per concentratie werd de AS oplossing onafhankelijk in viervoud geanalyseerd.

Na analyse werd het piekoppervlak van het analiet gedeeld door het piekoppervlak van de IS. Vervolgens werd deze ratio omgezet naar de recovery in procenten door te delen door de gemiddelde ratio van de AS en te vermenigvuldigen met 100. De gemiddelde recovery van de drie omstandigheden en de AS is weergegeven in een grafiek met de standaardfouten in procenten. Zie figuur 18a t/m 18c voor de stabiliteit van de opgewerkte monsters van Elacridar van verschillende dagen onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 18a** Stabiliteit van Elacridar met een concentratie van 5 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 18b** Stabiliteit van Elacridar met een concentratie van 25 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 18c** Stabiliteit van Elacridar met een concentratie van 100 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.

In figuur 18a is waar te nemen dat er al na één dag een recovery van ca. 50% is voor alle drie de omstandigheden. Dit is ook waar te nemen bij de rest van de dagen. Echter is dit geen recovery van 50% voor de drie verschillende omstandigheden. Het piekoppervlak van Elacridar is de AS-oplossing is twee keer zo hoog dan gebruikelijk bij een concentratie van 5 nM. Wanneer er gekeken werd naar de gemiddelde ratio (piekoppervlakte analiet/IS) na één dag, valt het op dat Elacridar in de AS-oplossing een ratio heeft van 0,328. In de opgewerkte monsters heeft Elacridar een ratio van ca. 0,182. De ratio van Elacridar in de AS-oplossing is bijna twee keer hoger dan de gemiddelde ratio van de monsters bewaard onder de verschillende omstandigheden. De ratio's van de AS-oplossing zijn op 100% gesteld om de recovery's van de andere

omstandigheden te bepalen. Wanneer de ratio van de AS-oplossing dan tweemaal hoger is dan de ratio van de andere omstandigheden is de recovery van de AS-oplossing eigenlijk 200% en die van de andere omstandigheden 100%. Dit is ook waar te nemen in figuur 18a, de recovery van de AS-oplossing is 100% en die van de andere van de andere omstandigheden 50%. Dit probleem is waar te nemen op alle dagen dat er een analyse is uitgevoerd.

Een mogelijke verklaring voor het probleem zou zijn dat er in het chromatogram van de AS-oplossing nog een signaal aanwezig is met dezelfde m/z-ratio's en t<sub>R</sub> als Elacridar. Dit signaal zal dan onder het Elacridar signaal zitten. Hierdoor zou dan het Elacridar signaal in de AS-oplossing hoger zijn en wordt er een hogere concentratie Elacridar gemeten, terwijl dit dan niet de werkelijke concentratie van Elacridar is. Om te testen of er nog een twee signaal aanwezig was onder het signaal van Elacridar is de AS-oplossing, werden er een aantal blanco AS-monsters geanalyseerd. Hieruit bleek dat er inderdaad een signaal aanwezig was op dezelfde t<sub>R</sub> als Elacridar. Dit signaal werd ook waargenomen als Elacridar door Analyst. Het piekoppervlak van het signaal in de blanco monsters werd afgetrokken van het piekoppervlak van het signaal van Elacridar over. Echter werkte dit alleen voor de analyse na één dag en na vier dagen. Voor de analyse na zeven en 29 dagen was het piekoppervlak van het signaal uit de blanco AS-monsters nergens vanaf getrokken.

Hieruit bleek wel dat het piekoppervlak van Elacridar van de analyses na zeven en 29 dagen significant lager was dan de analyses na één dag en vier dagen. Dit werd veroorzaakt doordat het LC-MS/MS systeem een aantal weken buiten gebruik geweest is na de analyse na vier dagen. In de MS/MS zijn er drie elektronische kaarten (*Dacs and vacuum*, lens p/s en de *high voltage* p/s) vervangen. Hierdoor zijn de signalen van alle analieten verlaagd. Het lagere signaal was geen probleem voor deze twee analyses omdat de uiteindelijke recovery's rond de 50% liggen. De vraag of Elacridar stabiel is in de opgewerkte monsters onder verschillende omstandigheden kan evengoed beantwoord worden. Ondanks de lagere signalen werd er besloten om de validatie af te ronden onder deze omstandigheden, zie ook paragraaf 4.3.1 en 4.4.1.

Een mogelijke verklaring voor het hogere piekoppervlak van Elacridar in de AS-oplossing is dat de AS-oplossing gecontamineerd is met Elacridar. De AS-oplossing werd op elke dag vers bereid maar de gebruikte 60:40% MeOH:water oplossing kwam wel elke keer uit dezelfde 20 mL buis. Hoogstwaarschijnlijk is deze buis gecontamineerd en is er een hoger signaal gemeten voor Elacridar.

Een fout die optreedt bij een lage concentratie, in dit geval QC 5 nM, is relatief groter t.o.v. dezelfde fout bij een hogere concentratie. Dit is ook terug te zien in figuur 18b. De recovery is daar ca. 80%. Ook dit wordt veroorzaakt door een hogere concentratie Elacridar in de AS. In figuur 18c is dit probleem niet waar te nemen omdat de fout wegvalt door de hogere concentratie van 100 nM.

In figuur 18a bij 4°C in het donker van de meting na 29 dagen is een recovery te vinden van meer dan 100%. Dit is hoger dan de recovery van de AS, met de fout van de contaminatie. Het is niet mogelijk dat er een pipeteer fout opgetreden is, aangezien alle monsters met dezelfde concentratie bij de monstervoorbewerking met elkaar gemengd zijn. In principe zijn alle monsters hetzelfde en zijn alleen de bewaaromstandigheden verschillend. Voor deze hoge recovery is geen verklaring gevonden.

Uit de grafieken kan wel afgelezen worden dat Elacridar stabiel is voor zeven dagen. Voor 29 dagen is er meer variatie tussen de verschillende bewaaromstandigheden. Het is voor 29 dagen minder betrouwbaar om te concluderen dat Elacridar stabiel is. Echter is dit geen probleem aangezien de monsters op dezelfde dag voorbewerkt en geanalyseerd worden. Mocht het toch nodig zijn om de monsters opgewerkt te bewaren, maakt het niet uit onder welke omstandigheid dit gebeurt. Dit geldt ook voor de andere analieten, zie bijlage Xc.

Bij de grafieken van Tariquidar valt het op dat er wel wat variatie is tussen de dagen. Dit is te verklaren doordat Tariquidar slecht oplosbaar is en er geen stabiel isotoop aanwezig is. Deze grafieken zijn samen met de grafieken voor de andere analieten weergegeven in bijlage Xc.

# 4.3 Validatie in muizenplasma

In deze paragraaf zullen de resultaten besproken worden van de beperkte validatie in muizenplasma. Een beperkte validatie houdt in dat er maar één analyse wordt gedaan op één dag. Deze analyse bestond uit een kalibratielijn in humaan plasma, blanco en dubbele blanco monsters en per concentratie zes QC monsters. Deze

hadden een concentratie van 5 nM, 25 nM en 100 nM, de bereiding is beschreven in paragraaf 3.4.5. Door een te kort aan blanco muizenplasma werden de QC monsters in muizenplasma gekwantificeerd met een kalibratielijn in humaan plasma. Met deze analyse werd de specificiteit en selectiviteit, juistheid en precisie bepaald.

# 4.3.1 Specificiteit en selectiviteit

Voor de bepaling van de specificiteit en de selectiviteit zijn er drie verschillende blanco matrices geanalyseerd. Per matrix zijn er twee blanco en twee dubbele blanco monsters opgewerkt en geanalyseerd. Deze zijn vergeleken met de laagste QC monster van 5 nM. 100% blanco humaan plasma, 100% blanco muizenplasma en muizenplasma, twintigmaal verdund, in blanco humaan plasma zijn de drie verschillende matrices die geanalyseerd zijn. De twintigmaal verdunde blanco monsters werden ook geanalyseerd omdat de *in vivo* monsters ook twintigmaal verdund werden. Zie figuur 11 voor het chromatogram van de dubbele blanco in humaan plasma. In figuur 19a en 19b zijn de chromatogrammen weergegeven van de 100% dubbele blanco muizenplasma en twintigmaal verdunde dubbele blanco muizenplasma in humaan plasma.



**Figuur 19a en 19b** XIC + MRM chromatogram van de dubbele blanco in 100% muizenplasma en twintigmaal verdunde dubbele blanco muizenplasma in humaan plasma.

In de twee figuren is waar te nemen dat de chromatogrammen erg op elkaar lijken. In beide matrices er een signaal (roze) duidelijk zichtbaar. Dit signaal was ook zichtbaar in de dubbele blanco monsters in humaan plasma, zie paragraaf 4.2.1. Dit signaal zit op een andere  $t_R$  dan Tariquidar en is een storing uit de matrix. De signalen die zichtbaar zijn voor de andere analieten worden getest of deze binnen de ruis vallen. In tabel 30 zijn de gemiddelde piekhoogtes in cps van de blanco monsters in 100% humaan plasma, 100% muizenplasma, de twintigmaal verdunde muizenplasma en de QC 5 nM in muizenplasma weergegeven.

monster.				
Analiet	Gemiddelde piekhoogte 100% blanco humaan	Gemiddelde piekhoogte 100% blanco	Gemiddelde piekhoogte twintig maal verdunde	Gemiddelde piekhoogte QC 5
	plasina (cps)	muizenpiasma (cps)	bianco muizenpiasma (cps)	
Docetaxel	58,6	24,6	58,0	1,05·10 <sup>3</sup>
Elacridar	203	240	541	4,34·10 <sup>3</sup>
Erlotinib	494	222	812	9,90·10³
Loperamide	479	479	1,11·10 <sup>3</sup>	3,04·10 <sup>4</sup>
Riluzole	269	269	693	1,74·10 <sup>3</sup>
Tariquidar	48,8	48,8	21,1	1,48·10 <sup>3</sup>
Vemurafenib	46,6	16,9	43,1	635
Verapamil	823	556	961	2,66·10 <sup>4</sup>

 Tabel 30 | Gemiddelde piekhoogtes van de blanco matrices vergeleken met de gemiddelde piekhoogtes van de laagste QC monster.

Wanneer de gemiddelde piekhoogte van de blanco monsters tienmaal lager is dan de gemiddelde piekhoogte van de QC 5 nM monsters, is het signaal van de blanco monsters acceptabel. In tabel 30 is waar te nemen dat alle gemiddelde piekhoogtes van alle analieten ruim onder de gemiddelde piekhoogtes van de QC 5 nM vallen.

Het signaal uit de blanco monsters is acceptabel. Wanneer de piekhoogtes van QC 5 nM in tabel 30 vergeleken worden met de piekhoogtes van standaard 1 nM in tabel 18 valt het op dat de piekhoogtes niet veel van elkaar verschillen. Terwijl de concentraties wel verschillend zijn. Het verlaagde signaal van QC 5 nM wordt veroorzaakt doordat er drie elektronische kaarten vervangen zijn in de MS/MS, zie ook paragraaf 4.2.8 en 4.4.1. De validatie in muizenplasma en hersenhomogenaat en de *in vivo* exerpimenten zijn uitgevoerd onder de nieuwe omstandigheden met de vervangende elektronische kaarten.

# 4.3.2 Juistheid

De juistheid werd berekend m.b.v. formule 4 beschreven in paragraaf 2.2. Per concentratie werden er zes QC monsters opgewerkt en geanalyseerd. Deze werden gekwantificeerd met een kalibratielijn in humaan plasma. De juistheid is uitgezet in de een grafiek met de bijbehorende stdev. in procenten, zie figuur 20a t/m 20c. De grenswaarden zijn aangegeven met een rode lijn. De ligt ondergrens op 85% en de bovengrens op 115%.





Figuur 20c| Juistheid in procenten van de QC 100 nM in muizenplasma.

In figuur 20a t/m 20c is waar te nemen dat de juistheid van Tariquidar hoger is dan de bovengrens. De juistheid van Tariquidar ligt voor QC 5 nM op 130%, voor QC 25 nM 139% en voor QC 100 nM 132%. Dit wordt veroorzaakt doordat er geen stabiel isotoop van Tariquidar als IS toegepast wordt. De methode is niet juist voor Tariquidar in muizenplasma. Mogelijk zou de methode wel juist zijn wanneer de QC monsters gekwantificeerd worden met een kalibratielijn in muizenplasma. Dit is niet mogelijk omdat er niet genoeg muizenplasma aanwezig is. QC 25 nM van Docetaxel valt ook buiten de grenswaarden met 118%. Dit betekent dat de methode voor 25 nM niet juist is. De verwachte concentratie van Docetaxel zal tussen de 50 nM en de 100 nM liggen. Deze monsters worden ook nog eens twintig maal verdund. De concentratie die dan gemeten zal worden zal ca. 2,5 nM tot 5 nM zijn. QC 5 nM en QC 100 nM van Docetaxel valt met de afwijking net binnen de grenswaarde of ligt op de grens. De methode is niet juist voor Docetaxel. Alle andere analieten vallen wel binnen de grenswaarden. De methode is wel juist voor de drie QC concentraties van Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil. Zie bijlage XI voor de data die behoord bij figuur 20a t/m 20c.

# 4.3.3 Precisie

De precisie van een analyse op één dag gemeten werd bepaald door het gemiddelde te berekenen van de zes QC monsters. Van deze zes QC monsters is het 95% BI berekend. Daarnaast zijn ook de %DEV- en de %RSD-waarde berkend. Wanneer de %DEV- en %RSD-waarden meer dan 15% afwijken is de methode niet precies. In

tabel 31 is de gemiddelde concentratie in nM met een BI van 95% weergegeven voor Elacridar. Ook zijn de berekende %DEV- en %RSD-waarden in deze tabel weergegeven.

	actue concentratie berekent	a met een 55% Bi voe		Inplasifia
QC	Gemiddelde (nM)	95% Bl (nM)	DEV (%)	RSD (%)
5,00 nM	4,83	4,65 – 5,00	-3,47	3,48
25,0 nM	23,0	22,8 – 23,2	-8,00	0,788
100 nM	88,3	86,4 – 90,2	-11,7	2,06

 Tabel 31 | Gemiddelde concentratie berekend met een 95% BI voor Elacridar in muizenplasma.

De %DEV- en %RSD-waarden van Elacridar vallen binnen de grenswaarde van 15%. De methode is voor Elacridar precies. Verder is de methode precies voor Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil, zie bijlage XII.

De methode is niet precies voor Docetaxel QC 25 nM. Het gemiddelde is 29,5 nM (95% BI 28,8 – 30,3 nM). De %DEV-waarde hoger dan 15%, namelijk 18,1%. De %RSD-waarde (2,41%) wijkt niet meer dan 15% af.

Voor Tariquidar is de methode niet precies. QC 5 nM heeft een gemiddelde concentratie van 6,51 nM (95% BI 6,21 – 6,80 nM), QC 25 nM heeft een gemiddelde concentratie van 34,9 nM (95% BI 33,9 – 35,8 nM) en QC 100 nM heeft een gemiddelde concentratie van 132 nM (95% BI 129 – 136 nM). De %DEV-waarde van elke concentratie wijkt meer dan 15% af. De %DEV-waarden zijn: QC 5 nM 30,1%. QC 25 nM 39,5% en voor QC 100 nM 32,3%. De %RSD-waarden wijken niet meer dan 15% af.

# 4.4 Validatie in hersenhomogenaat van muizen

In deze paragraaf wordt de beperkte validatie in hersenhomogenaat van muizen besproken. Er werd één analyse uitgevoerd op één dag. Er is getest of de QC monsters in hersenhomogenaat gekwantificeerd konden worden met een kalibratielijn in humaan plasma. Dit was niet mogelijk, er was te veel spreiding en de QC monsters waren niet juist en precies. Er werd opnieuw een analyse uitgevoerd met een kalibratielijn in hersenhomogenaat. Deze analyse bestond uit een kalibratielijn in hersenhomogenaat, twee blanco, twee dubbele blanco en per concentratie zes QC monsters. De QC monsters zijn gekwantificeerd met een kalibratielijn in hersenhomogenaat en de resultaten voor de specificiteit en selectiviteit, lineariteit, juistheid en precisie zijn beschreven in de volgende paragraven.

# 4.4.1 Specificiteit en selectiviteit

Er werden, gelijktijdig met een kalibratielijn in hersenhomogenaat, twee blanco monsters en twee dubbele blanco monsters opgewerkt en geanalyseerd. Zie figuur 21 voor het chromatogram van de dubbele blanco in hersenhomogenaat van muizen.



**Figuur 21** XIC + MRM chromatogram van de dubbele blanco hersenhomogenaat van muizen.

Het valt op de er geen signaal op ca. 11 min. Aanwezig is. Deze was wel aanwezig in de plasma monsters. Dit is een extra bevestiging dat die piek een matrix effect is wat alleen in plasma aanwezig is. In de figuur is waar te nemen dat er geen storende pieken zijn. Er werd getest of de signalen in de dubbele blanco binnen de ruis vielen. Zie tabel 32 voor de gemiddelde piekhoogtes van de (dubbele)blanco monsters vergeleken met de gemiddelde piekhoogtes van de QC 5 nM monsters in cps.

 Tabel 32 |
 Gemiddelde piekhoogtes van de blanco monsters in hersenhomogenaat vergeleken met de gemiddelde piekhoogtes van de laagste QC monster.

Analiet	Gemiddelde piekhoogte blanco	Gemiddelde piekhoogte QC 5 nM
	hersenhomogenaat (cps)	(cps)
Docetaxel	34,8	897
Elacridar	241	1,37·10 <sup>3</sup>
Erlotinib	227	6,66·10 <sup>3</sup>
Loperamide	296	1,04.104
Riluzole	320	1,13·10 <sup>3</sup>
Tariquidar	17,7	402
Vemurafenib	208	5,05·10 <sup>3</sup>
Verapamil	230	9,38·10 <sup>3</sup>

In tabel 32 is waar te nemen dat wanneer de gemiddelde piekhoogte van de blanco vermenigvuldigd werd met tien dat de piekhoogte dan nog ruim onder de gemiddelde piekhoogte van QC 5 nM valt. Dit betekent dat het signaal van de blanco monsters acceptabel zijn. De QC 5 nM valt buiten de ruis en zit niet onder de LOD. Ook hier verschilt het signaal van de QC 5 nM in hersenhomogenaat niet veel in vergelijking met het signaal van standaard 1 nM in paragraaf 4.2.1. Ook hier is het lagere signaal een oorzaak van de vervaning van de elektronische kaarten, zie paragraaf 4.2.1 en 4.3.1.

# 4.4.2 Lineariteit

Omdat het nodig is om de QC monsters te kwantificeren met een kalibratielijn in hersenhomogenaat kon ook de lineariteit van de kalibratielijn getest worden. In figuur 22 is de kalibratielijn van Elacridar weergeven bepaald op één dag. Deze kalibratielijn is getest op de weegfactor, de LOF en de aanwezigheid van een constante systematische- en proportionele fout. In de figuur is de ratio van het piekoppervlak van Elacridar gedeeld door het piekoppervlak van de IS uitgezet tegen de concentratie in nM. De kalibratielijnen van de andere analieten zijn weergegeven in bijlage XIII.



**Figuur 22** Kalibratielijn in hersenhomogenaat van Elacridar geanalyseerd op één dag.  $y=3,97\cdot10^{-2}x$  $(\pm7,10\cdot10^{-4}) + 4,16\cdot10^{-2} (\pm1,02\cdot10^{-2}), R^2=0,996.$ 

#### Weegfactor

De weegfactor werd voor elke kalibratielijn bepaald en toegepast. Dit werd op dezelfde manier gedaan als bij de bepaling van de weegfactor in humaan plasma, beschreven in paragraaf 4.2.4. Alleen werd er op één dag een kalibratielijn opgewerkt en geanalyseerd i.p.v. drie dagen. De weegfactoren die berekend zijn voor de kalibratielijn in de hersenhomogenaat waren dezelfde weegfactoren als de kalibratielijn in humaan plasma. Deze weegfactoren gelden alleen voor het lineaire bereik van de kalibratielijn. Wanneer de kalibratielijn niet lineair was werd er geen weegfactor toegepast. De weegfactoren zijn dus voor Docetaxel 2,0, Elacridar 1,0, Erlotinib 2,0, Loperamide 2,0, Riluzole 1,0, Tariquidar 1,0, Vemurafenib 2,0 en Verapamil 2,0.

# Lineariteit (Lack of Fit-toets)

De LOF-toets is getest op de kalibratielijnen van de analieten in hersenhomogenaat. Dit ging volgens dezelfde manier als de LOF-toets voor de kalibratielijnen in humaan plasma beschreven in paragraaf 4.2.4. De  $F_{LOF}$  is voor elke kalibratielijn berekend en vergeleken met de F-toets waarde gevonden bij de bijbehorende vrijheidsgraden. Het aantal vrijheidsgraden die gebruik zijn voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Tariquidar en Verapamil waren (6,8). Het aantal vrijheidsgraden die gebruikt zijn voor Riluzole en Vemurafenib waren (5,6). Het lineair bereik is bepaald voor elke kalibratielijn en samen met de berekende  $F_{LOF}$  en de grenswaarden weergegeven in tabel 33.

Analiet	FLOF	F <sub>(α=0,05)</sub> (6,8)/(5,6)	lineair bereik (nM)
Docetaxel	1,30	3,58	1-200
Elacridar	2,34	3,58	1-200
Erlotinib	3,33	3,58	1-200
Loperamide	2,30	3,58	1-200
Riluzole	3,84	4,39	5-200
Tariquidar	2,06	3,58	1-200
Vemurafenib	1,97	4,39	5-200
Verapamil	2,09	3,58	1-200

Tabel 33 | De berekende  $F_{LOF}$ , de grenswaarden en het lineair bereik per analiet weergegeven.

Voor Riluzole en Vemurafenib vielen de standaarden van 1 nM en 2 nM buiten de kalibratielijn. De lineariteit van de kalibratielijnen met deze punten werd berekend en deze waren niet lineair. De 1 nM en 2 nM standaarden vielen lager uit dan de rest van de kalibratielijn. Hierdoor was de gehele kalibratielijn niet meer lineair. Echter zag deze kalibratielijn er wel lineair uit. De standaarden 1 nM en 2 nM zijn verwijderd uit de kalibratielijnen en de lineariteit werd opnieuw bepaald. De kalibratielijnen waren dit maal wel lineair. Een mogelijke verklaring voor de afwijkende standaarden is omdat de MS/MS een lager signaal geeft met de vervangende kaarten, zie paragraaf 4.2.8. Na vervaning van de kaarten was het signaal sterk verlaagd, hierdoor werd het lasiger om monsters in het lage gebied van de kalibratielijn en is het lineair bereik voor Riluzole en Vemurafenib 5 nM – 200 nM. Zie bijlage XIV voor de resultaten uit SPSS die gebruikt zijn om de lineariteit te bepalen.

#### Constante systematische- en proportionele fout (student t-toets)

Verder werd er m.b.v. SPSS getest of de methode een constante systematische- en/of een proportionele fout bevat. Dit werd op dezelfde manier gedaan als bij de validatie in humaan plasma, zie paragraaf 4.2.4. In tabel 34 zijn de resultaten van de t-toets weergegeven van elke kalibratielijn in hersenhomogenaat geanalyseerd op één dag. De t-toets werd uitgevoerd met een 95% BI voor het lineaire bereik van de kalibratielijn.

Tabel o I   nesar		to van ac kanor	attenjiten in nerse	momogenaat.			
Analiet	Intercept (α)	В	I (95%)	Helling (β)		BI (95%)	
Docetaxel	-4,63·10 <sup>-4</sup>	-0,111	0,110	1,00	0,956	1,05	
Elacridar	-1,96·10 <sup>-3</sup>	-0,556	0,552	1,00	0,962	1,04	
Erlotinib	1,50·10 <sup>-3</sup>	-6,45·10 <sup>-2</sup>	0,0675	1,00	0,974	1,03	
Loperamide	-1,01·10 <sup>-3</sup>	-8,01·10 <sup>-2</sup>	7,80·10 <sup>-2</sup>	0,999	0,968	1,03	
Riluzole	-3,00·10 <sup>-3</sup>	-1,216	1,21	1,00	0,951	1,05	
Tariquidar	0,00·10 <sup>0</sup>	-0,7201	0,721	1,00	0,950	1,05	
Vemurafenib	-2,19·10 <sup>-3</sup>	-0,2536	0,249	0,999	0,958	1,04	
Verapamil	-1,01·10 <sup>-3</sup>	-0,0820	0,0800	1,00	0,968	1,03	

Tabel 34 | Resultaten van de t-toets van de kalibratielijnen in hersenhomogenaat.

In tabel 34 is waar te nemen dat de waarden voor het intercept ( $\alpha$ ) nul is met een BI van 95%, de methode bevat geen constante systematische fout. Verder is de helling ( $\beta$ ) één met een BI van 95%, dit betekent dat de methode niet behept is met een proportionele fout. Zie bijlage XIV voor de resultaten uit SPSS die gebruikt zijn bij de bepaling van de t-toets.

# 4.4.3 Juistheid

De juistheid werd op dezelfde manier bepaald zoals beschreven in paragraaf 4.3.2. Alleen werden er zes QC monsters opgewerkt in hersenhomogenaat en gekwantificeerd met een kalibratielijn in hersenhomogenaat. De juistheid is berekend volgens formule 4 beschreven in paragraaf 2.2 en is in figuur 23a t/m 23c weergegeven met de bijbehorende stdev. in procenten.



Figuur 23a en 23b| Juistheid in procenten van de QC 5 nM en QC 25 nM in hersenhomogenaat.



Figuur 23c Juistheid in procenten van de QC 100 nM in hersenhomogenaat.

Zoals In figuur 23a t/m 23c waar te nemen is valt de juistheid van alle analieten en van elke concentratie binnen de grens van 85% en 115%. De methode met een kalibratielijn in hersenhomogenaat is juist. Zie bijlage XVI voor de data die behoord bij figuur 23a t/m 23c.

# 4.4.4 Precisie

De precisie werd op dezelfde manier bepaald als beschreven in paragraaf 4.3.3 voor muizenplasma. In tabel 35 is de gemiddelde concentratie in nM weergegeven met een 95% Bl. De %DEV- en %RSD-waarden zijn voor elke concentratie bepaald. Deze waarden mochten niet meer dan 15% afwijken.

Tabel 35 Gen	niddelde concentratie berek	enu met een 95% Bi v	oor Elacridar in hers	sennomogenaat.
QC	Gemiddelde (nM)	95% BI (nM)	DEV (%)	RSD (%)
5,00 nM	5,64	4,80 - 6,47	12,7	14,1
25,0 nM	25,0	22,0 – 28,0	0,133	11,4
100 nM	94,9	91,7 - 98,1	-5,08	3,24

Tabel 35 Gemiddelde concentratie berekend met een 95% BI voor Elacridar in hersenhomogenaat.

De %DEV en de %RSD-waarden valt binnen de 15%. Dit betekent dat methode precies is voor Elacridar QC 5 nM, QC 25 nM en QC 100 nM in hersenhomogenaat. De %DEV-waarden van de andere analieten vallen binnen de grenswaarde van 15%. Alleen de %RSD-waarden van Riluzole, Tarquidar en Vemurafenib voor QC 5 nM wijken meer dan 15% af. De %RSD-waarde (15,7%) van Riluzole QC 25 nM wijkt ook meer dan 15% af, zie ook bijlage XVI. De spreiding van de QC 5 monsters van deze analieten is erg hoog. Daarnaast is een fout in het lage concentratiegebied veel groter wanneer dezelfde fout zich in het hoge concentratie gebied voor doet. Een

mogelijke oorzaak zou kunnen zijn dat het signaal van de MS/MS sterk verlaagd was. Hierdoor werd het lastiger om in het lage concentratiegebied goed te kwantificeren. De methode is niet precies voor Riluzole, Tariquidar en Vemurafenib.

# 4.5 In vivo experimenten

In deze paragraaf worden de resultaten van de *in vivo* experimenten besproken. De *in vivo* experimenten werden gestart met het bepalen van de optimale doseringen en optimalisatie van de andere parameters. Het doel van de optimalisatie is om voor elk analiet een dosering te vinden wat uiteindelijk leidt tot een plasmaconcentratie van ca. 500 nM, 1000 nM en 2000 nM voor de inhibitoren. Deze concentraties zijn nodig omdat er verwacht wordt dat zwakke substraten een lagere (500 nM) concentratie van de inhibitor nodig heeft dan sterke substraten. Daarnaast moeten de plasmaspiegels van de substraten tussen de 50 nM en 100 nM liggen. Deze concentraties zijn hoog genoeg om te kunnen meten met de LC-MS/MS, maar niet zo hoog dat de spiegels toxiciteit geven bij de muizen.

Nadat deze doseringen gevonden zijn kon met het daadwerkelijke experiment worden gestart. Hierin worden de plasma- en hersenconcentraties en de hersenen-plasma ratio van de substraten in WT en KO muizen met elkaar vergeleken, met als doel het remmend vermogen van de inhibitoren (Elacridar en Tariquidar) op P-gp en Bcrp1 in de BHB vast te stellen. Deze experimenten zijn nog vollop in gang en in deze paragraaf kan daarom slechts in beperkte mate over de uitkomsten gesproken worden. In de hier besproken experimenten hebben de muizen ook nog niet de optimale dosering toegediend gekregen. Deze experimenten zijn besproken in paragraaf 4.5.2 t/m 4.5.4.

# 4.5.1 Dosering experimenten met KO en WT muizen

In paragraaf 3.6 is de werkwijze van het eerste experiment beschreven. Vanuit dit experiment werden de concentraties van de stockoplossingen, de infusiesnelheid, de duur van het toedienen en de bloedafname op verschillende tijdspunten geoptimaliseerd. Het eerste experiment werd gestart met stockoplossingen in DMSO van 30 mg/mL, dit was voor zowel de substraten als voor Elacridar. Deze stockoplossingen werden gemixed en doorverdund tot de infusieoplossing met een eindconcentratie van 3 mg/mL voor Elacridar en 0,5 mg/mL voor de substraten. Op basis van de gevonden plasmaspiegels werden deze concentraties aangepast. Dit experiment is eerst uitgevoerd met de inhibitor Elacridar en pas later, nadat er een schatting gemaakt kon worden van de juiste dosering, werd dit experiment ook uitgevoerd met Tariquidar. Dit werd gedaan omdat er minder vaste stof aanwezig was van Tariquidar om veel experimenten uit te voeren. Het eerste optimalisatie experiment is uitgevoerd met WT muizen, later zijn er ook experimenten uitgevoerd met KO muizen.

De mixoplossing in DMSO:CrEL:Saline (1:1:8) werd aangemaakt zoals beschreven in paragraaf 3.6 en had een eindconcentratie van 3 mg/mL voor Elacridar en 0,5 mg/mL voor de substraten. Vier WT muizen kregen deze oplossing toegediend voor 3 min. op een snelheid van 10  $\mu$ L/min en vervolgens 5 uur op een snelheid van 1  $\mu$ L/min, zie paragraaf 3.7. Na analyse van de *in vivo* monsters was het resultaat dat de concentraties van de substraten verlaagd moesten worden en de concentratie van Elacridar verhoogd moest worden, zie tabel 36 voor de resultaten.

Analiet	Concentratie in infusieoplossing (mg/mL)	Plasmaconcentratie (nM)	Nodige factor
Docetaxel	0,5	212	/2
Elacridar	3	390	x5
Erlotinib	0,5	2280	/20
Loperamide	0,5	69	0
Riluzole	0,5	836	/8
Tariquidar	-	-	-
Vemurafenib	0,5	2320	/20
Verapamil	0,5	115	0

 Tabel 36|
 Overzicht van het eerste experiment uitgevoerd in WT muizen met de concentratie in de infusieoplossing, het resultaat en de nodige verdunningsfactor voor het vervolg experiment.

Aan de hand van de gemeten concentraties is er berekend met welke factor de concentraties verlaagd of verhoogd moesten worden. De concentraties van de substraten werden verlaagd door nieuwe stockoplosisngen in te wegen. De nieuwe concentraties van de stockoplossingen werden: Docetaxel 6,0 mg/mL,

Erlotinib 0,6 mg/mL, Loperamide 10 mg/mL, Riluzole 2,0 mg/mL, Vemurafenib 0,75 mg/mL en Verapamil 10 mg/mL, zie ook tabel 37.

In tabel 36 is waar te nemen dat de concentratie van Elacridar te laag was. De verhoging van de concentratie Elacridar in het plasma van de WT muizen kon op drie manieren bereikt worden:

- De verhouding 1:1:8 veranderen naar 1:1:3.
- De infusiesnelheid verhogen naar 6 µL/min.
- De concentratie in de stockoplossing verhogen naar 50 mg/mL.

De CrEL, mixoplossing in DMSO en Saline oplossing met een verhouding van 1:1:3 bleek niet stabiel voor vijf uur, want na een half uur was er al neerslag zichtbaar in de oplossing. Een verhouding van 1:1:8 was dus nodig om de oplossing stabiel te houden.

De stockoplossing van Elacridar werd verhoogd naar 50 mg/mL, deze concentratie zit tegen de maximale oplosbaarheid van Elacridar aan. Na een stabiliteitstest bleef Elacridar in oplossing met deze concentratie. Vervolgens werd er een experiment gestart met de 50 mg/mL stockoplossing en een hogere infusiesnelheid van 6  $\mu$ L/min. Het verhogen van de infusiesnelheid konden de muizen niet aan. De muizen konden het grote volume aan vocht niet voldoende snel kwijt en het experiment is gestaakt na drie uur. Ook was de plasmaconcentratie (gemiddeld 9600 nM) van Elacridar erg hoog. Om deze reden werd de duur van het experiment verlaagd naar 3 uur. De tijdspunten van bloedafname werden 1 uur, 2 uur en de HP op 3 uur. De infusiesnelheid werd ook verlaagd naar 3  $\mu$ L/min. De concentratie van de stockoplossing (50 mg/mL) bleef gelijk.

Vervolgens werd er een experiment gestart met vier WT muizen en vier KO muizen. Hierbij werden de nieuwe stockoplossingen van de substraten toegepast: Docetaxel 6,0 mg/mL, Erlotinib 0,6 mg/mL, Loperamide 10 mg/mL, Riluzole 2,0 mg/mL, Vemurafenib 0,75 mg/mL en Verapamil 10 mg/mL. Door het volumina van deze stockoplossingen te varrieren werden er verschillende doseringen getest. Wanneer de plasmaconcentratie van een substraat te hoog was werd het volumina verlaagd en vice versa, om uiteindelijk een plasmaconcentratie te bereiken tussen de 50 nM en 100 nM.

Ook werd er een stockoplossing van 50 mg/mL ingewogen voor Elacridar. Het targetlevel van Elacridar was 2000 nM. Verder werden ook de resultaten uit de vorige alinea toegepast (verhouding 1:1:8 en duur van het experiment 3 uur). De plasmaconcentratie (ca. 2470 nM) van Elacridar in de WT muizen was acceptabel. De plasmaconcentratie (ca. 1426 nM) in de KO muizen was nog te laag en diende verhoogt te worden. Dit werd gedaan door meer volume van de 50 mg/mL stock toe te voegen aan de infusieoplossing.

Onder deze condities werd er een vervolg experiment gestart met KO muizen. Deze kregen Elacridar, Tariquidar of geen inhibitor toegediend, zie tabel 37.

	Concentratie	Volume (µL)	Eindconcentratie in	Gem.	Nodige factor
	(mg/mL)		(mg/mL)	(nM)	
Docetaxel	6,0	20	2,7·10 <sup>-2</sup>	31	x2,0
Elacridar	50	75	0,83	1,2·10 <sup>3</sup>	X1,7
Erlotnib	0,60	25	6,7·10 <sup>-3</sup>	1,2·10 <sup>2</sup>	0
Loperamide	10	28	6,2·10 <sup>-2</sup>	91	0
Riluzole	2,0	20	8,9·10 <sup>-3</sup>	1,0·10 <sup>2</sup>	0
Tariquidar	50	75	0,83	1,7·10 <sup>3</sup>	0
Vemurafenib	0,75	25	4,2·10 <sup>-3</sup>	85	0
Verapamil	10	20	4,4·10 <sup>-2</sup>	96	0

**Tabel 37**Overzicht van een experiment uitgevoerd in KO muizen met de concentratie van de stockoplossing, volumina,<br/>eindconcentratie in de infusieoplossing, het resultaat en de nodige verdunningsfactor voor het vervolg experiment.

Uit dit experiment bleek dat de plasmaconcentraties van de substraten in het juiste bereik (50 nM tot 100 nM) liggen. Alleen de concentratie van Docetaxel moet nog verhoogt worden. De plasmaconcentratie van Elacridar was nog aan de lage kant en dient ook verhoogt te worden. De plasmaconcentratie van Tariquidar ca. 1700 nM is, dit was acceptabel.

Er was een tweede experiment met Tariquidar uitgevoerd in WT muizen. De eindconcentratie van Tariquidar in de infusieoplossing was 2,2 mg/mL. De substraten hadden dezelfde concentraties als in het eerste experiment met Tariquidar, zie tabel 37. De concentratie van Docetaxel werd verhoogd door 32  $\mu$ L van de stockoplossing toe te voegen i.p.v. 20  $\mu$ L. Na analyse bleek dat de plasmaconcentraties van alle substraten tussen de 50 nM en 100 nM lagen. Verder was de concentratie van Tariquidar gemiddeld 3180 nM. Dit was te hoog en op basis hiervan werd berekend dat er voor Tariquidar een stockconcentratie nodig is van ongeveer 2,0 mg/mL om het targetlevel van 2000 nM in WT muizen te bereiken.

De uiteindelijke concentraties van de stockoplossingen die gebruikt zullen worden voor de substraten zijn weergeven in tabel 38. Het volume Docetaxel verschilt wanneer er Elacridar of Tariquidar toegediend wordt. In tabel 38 zijn de volumina en de concentraties weergegeven voor Elacridar en Tariquidar voor de verschillende targetlevels van 500 nM, 1000 nM en 2000 nM in WT muizen. De dosering van Elacridar met een targetlevel van 2000 nM was nog onbekend. De KO muizen worden gebruikt als referentie voor een volledige remming van de transporters. Deze KO muizen krijgen ook de inhibitoren toegediend om de specificiteit van de inhibitoren te beoordelen. Echter zijn de doses voor de inhibitoren voor de KO muizen nog niet bekend.

		Toegediend met Elacridar		Toegediend met Tariquidar	
Analiet	Concentratie stockoplossing	Volume stockoplossing	Eindconcentratie infusieoplossing	Volume stockoplossing	Eindconcentratie infusieoplossing
	(mg/mL)	(μL)	(mg/mL)	(μL)	(mg/mL)
Docetaxel	6,00	50,0	6,67·10 <sup>-2</sup>	32,0	4,33·10 <sup>-2</sup>
Erlotinib	0,600	50,0	6,67·10 <sup>-3</sup>	50,0	6,67·10 <sup>-3</sup>
Loperamide	10,0	28,0	6,22·10 <sup>-2</sup>	28,0	6,22·10 <sup>-2</sup>
Riluzole	2,00	20,0	8,89·10 <sup>-3</sup>	20,0	8,89·10 <sup>-3</sup>
Vemurafenib	0,750	25,0	4,16·10 <sup>-3</sup>	25,0	4,16·10 <sup>-3</sup>
Verapamil	10,0	20,0	4,44·10 <sup>-2</sup>	20,0	4,44·10 <sup>-2</sup>

 Tabel 38
 Uiteindelijke doseringen van de substraten met de bijbehorende eindconcentraties voor zowel WT als KO muizen.

**Tabel 39** Uiteindelijke doseringen van de inhibitoren voor verschillende targetlevels met de bijbehorende eindconcentraties voor WT muizen.

	Elacridar		Tariquidar	
Targetlevel	Volume stockoplossing 50 mg/mL (μL)	Eindconcentratie Elacridar infusieoplossing (mg/mL)	Volume stockoplossing 50 mg/mL (μL)	Eindconcentratie Tariquidar infusieoplossing (mg/mL)
2000 nM	-	-	175	1,94
1000 nM	150	1,67	85,0	0,944
500 nM	75,0	0,833	45,0	0,500

Het volume van de inhibitoren en substraten werd gemixt en aangevuld met DMSO tot een eindvolume van 450  $\mu$ L. De mixoplossing werd uiteindelijk tienmaal verder verdund met 450  $\mu$ L CrEL en 3600  $\mu$ L saline (1:1:8). De muizen ontvingen deze infusieoplossing met de substraten, één inhibitor of geen inhibitor. De eindconcentraties van de analieten in de infusieoplossing zijn weergegeven in tabel 38 en tabel 39.

De 50 mg/mL stockoplossing voor Elacridar werd op de dag van het *in vivo* experiment afgewogen en opgelost. Dit werd elke keer opnieuw gedaan. Door de hoge concentratie van Elacridar in de stockoplossing is Elacridar niet goed meer in oplossing wanneer de stockoplossing een aantal vries-en-dooi cycli ondergaan heeft. Om zeker te zijn dat de stockoplossing goed opgelost is werd er, per dag dat er een *in vivo* experiment uitgevoerd werd, ca. 12 mg Elacridar afgewogen en opgelost in 240 µL DMSO. Voor Tariquidar was dit niet het geval. Toch werd Tariquidar per experiment opnieuw ingewogen en opgelost. Ook dit werd gedaan door ca. 11 mg af te wegen en op te lossen in 220 µL DMSO. Op deze manier werd er minimaal ingewogen en zo min mogelijk vaste stof verspild.

De uiteindelijke verhouding, infusiesnelheid, duur van het experiment zijn beschreven in tabel 40. Deze waarden werden toegepast bij de vervolgexperimenten. Een infusieoplossing, zoals beschreven in tabel 40, met een eindvolume van 4,5 mL kan gebruikt worden voor de behandeling van vier muizen. Elke muis zat verbonden aan een spuit van 1,0 mL en gebruikte voor één geheel experiment 640 µL van de infusieoplossing.

 Tabel 40 | Uiteindelijke waarden voor de parameters toepasbaar voor elke type muis.

Parameter	
Verhouding CrEL, mixoplossing in DMSO, Saline	450 μL + 450 μL + 3600 μL (1:1:8)
Infusiesnelheid	20 μL/min voor 5 minuten
	3 μL/min voor 3 uur
Tijdspunten voor bloedafname	1 uur, 2 uur en 3 uur HP

# 4.5.2 Hersenen-plasma ratio van KO muizen

De resultaten die in deze paragraaf, en in de volgende paragraven, besproken worden zijn van een aantal doseringsexperimenten. Deze experimenten waren uitgevoerd om de uiteindelijke dosering van de substraten, beschreven in paragraaf 4.5.1, te bepalen. De hersenen-plasma ratio van deze experimenten kon evengoed berekend en vergeleken worden ondanks de nog niet geoptimaliseerde dosering. De optimale parameters uit tabel 40 werden wel bij elk experiment toegepast.

In deze paragraaf is de hersenen-plasma ratio bepaald van twaalf KO muizen. Vier KO muizen kregen Elacridar, vier KO muizen kregen Tariquidar en vier KO muizen kregen geen inhibitor toegediend. De eindconcentraties van de substraten in de infusieoplossing zijn beschreven in tabel 37. Elke muis kreeg dezelfde concentratie van de substraten toegediend. De eindconcentratie, in de infusieoplossing, van zowel Elacridar als Tariquidar was 0,83 mg/mL. In dit experiment was het targetlevel voor Elacridar en Tariquidar in de plasmamonsters 2000 nM. Zie figuur 24 voor de het resultaat per substraat. De hersenen-plasma ratio van elke muis individueel is weergegeven als een rode stip, blauwe vierkant of zwarte driehoek. Het gemiddelde van deze punten is weergegeven met de zwarte lijn.



Figuur 24 | De hersenen-plasma ratio per analiet uitgezet tegen de inhibitor uitgevoerd in KO muizen.

M.b.v. een *one way*-ANOVA analyse in Prism was er bepaald of er een significant verschil aanwezig is tussen de drie condities. Dit was uitgevoerd met een BI van 95%. Een significant verschil tussen twee omstandigheden is in de figuur weergegeven met een ster en een zwarte lijn.

De plasmaconcentratie van Elacridar was gemiddeld 1142 nM en van Tariquidar was dat 2186 nM. De plasmaconcentratie van Elacridar is in dit experiment te laag. Voor Tariquidar is de plasmaconcentratie goed. Voor beide inhibitoren is het nodig om een plasmaconcentratie van 2000 nM te bereiken. De plasmaconcentratie van Tariquidar komt niet volledig overheen met de genoemde plasmaconcentratie (ca. 1700 nM) in tabel 37. Dit komt omdat de analyse in duplo is uitgevoerd om de gemiddelde waarden uit figuur 25 en bijlage XVII te verkrijgen. Hierdoor ligt de gemiddelde plasmaconcentratie voor Tariquidar wat hoger in vergelijking met de plasmaconcentratie in tabel 37.

Verder was de hersenconcentratie van Elacridar gemiddeld 1640 nM en voor Tariquidar was dit gemiddeld 1370 nM. Zie bijlage XVII voor de gemiddelde plasma- en hersenconcentraties en de hersenen-plasma ratio van de substraten.

In figuur 24 is waar te nemen dat er voor Erlotinib een significant verschil aanwezig is tussen Elacridar en Tariquidar. Verder is er voor Riluzole tussen geen inhibitor en Elacridar een significant verschil aanwezig. Dit was niet volgens de verwachting omdat dit experiment met KO muizen is uitgevoerd. In deze KO muizen zijn geen P-gp en Bcrp1 transporters aanwezig. Door de afwezigheid van deze transporteiwitten zal het substraat/geneesmiddel langer in de hersenen blijven. Verder was het ook niet nodig om deze te blokkeren aangezien ze niet aanwezig zijn. Er werd dus verwacht dat er geen significant verschil aanwezig zou zijn tussen de gemiddelde waarden van geen inhibitor, Elacridar en Tariquidar. Voor de andere substraten is er geen significant verschil aanwezig.

Voor Riluzole was de hersenen-plasma ratio in de KO muizen die Elacridar kregen, hoger dan de KO muizen die geen inhibitor toegediend kregen, zie figuur 24. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat Riluzole via een andere route of m.b.v. een ander transporteiwit dan P-gp of Bcrp1 uit de hersenen getransporteerd wordt. De muizen hadden immers alleen een KO voor P-gp en Bcrp1. De concentratie Riluzole in de hersenen zal dan lager worden. Wanneer er een inhibitor aanwezig is, in dit geval Elacridar, zou deze de andere route of transporteiwit kunnen blokkeren. Hierdoor zal de concentratie van het substraat in de hersenen hoger zijn dan wanneer er geen inhibitor aanwezig is.

Voor Erlotinib was de hersenen-plasma ratio voor Tariquidar hoger dan die van Elacridar, zie figuur 24. Een mogelijke verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat Erlotinib, net als Riluzole, via een andere route of m.b.v. een andere transporteiwit uit de hersenen getransporteerd wordt. Als er geen inhibitor aanwezig is zal Erlotinib uit de hersenen getransporteerd worden. Als er wel een inhibitor (Elacridar) aanwezig is maar deze niet de andere weg of transporteiwit blokkeert, zal Erlotinib ook uit de hersenen getransporteerd worden. Als er een inhibitor (Tariquidar) aanwezig is die wel deze andere weg of transporteiwit blokkeert, zal Erlotinib ook uit de hersenen getransporteerd worden. Als er een inhibitor (Tariquidar) aanwezig is die wel deze andere weg of transporteiwit blokkeert, zal Erlotinib in de hersenen blijven. Dit verhoogt de hersenen-plasma ratio. Verder is er meer spreiding aanwezig tussen de KO muizen die Tariquidar kregen in vergelijking met de KO muizen die geen inhibitor of Elacridar kregen. Als deze spreiding van de KO muizen die Tariquidar kregen kleiner zou zijn, zou het mogelijk kunnen zijn dat er geen significant verschil aanwezig was tussen Elacridar en Tariquidar. Voor verder onderzoek naar mogelijk transport, via een andere route of m.b.v. een andere transporteiwit, uit de hersenen zijn er meer experimimenten nodig met KO muizen.

Verder is in figuur 24 waar te nemen dat de hersenen-plasma ratio voor Docetaxel en Vemurafenib laag is. Dit betekent dat de concentratie van deze substraten in de hersenen lager is dan in het plasma, zie ook bijlage XVII. Door deze lage hersenconcentratie is het lastig om goed te kwantificeren.

Uit eerdere studies bleek dat Docetaxel en Vemurafenib juist goed de hersenen bereiken en hoge concentraties gaven, dit is nu niet het geval. Doordat er in deze studie met een continu infuus gedoseerd werd, werden er constante concentraties (*steady-state*) van de substraten en inhibitoren bereikt. Hierdoor is er geen grote piekspiegel aanwezig. Dit wordt bijvoorbeeld wel bereikt met een orale dosering. Door de afwezigheid van deze piekspiegel is het voor Docetaxel en Vemurafenib mogelijk lastiger om in de hersenen te komen. Met deze piekspiegel hadden de twee substraten wel een hoge concentratie in de hersenen en dus ook een hogere hersenen-plasma ratio. Op basis van de resultaten in figuur 24 zou de concentratie van Docetaxel en Vemurafenib verhoogd moeten worden. Uit dit experiment kan geconcludeerd worden dat de concentraties van Docetaxel en Vemurafenib toe te voegen aan de infusieoplossing. Zie bijlage XVII voor de gemiddelde plasma- en hersenconcentratie met de bijbehorende gemiddelde hersenen-plasma ratio.

# 4.5.3 Hersenen-plasma ratio van WT muizen

In dit experiment zijn er negen WT muizen gebruikt. Drie WT muizen kregen Tariquidar toegediend, drie WT muizen kregen Elacridar toegediend en drie WT muizen kregen geen inhibitor toegediend. De cannula was bij één muis die Tariquidar toegediend kreeg niet goed aangesloten om deze rede waren de concentraties van de substraten erg laag. De resultaten van deze muis zijn niet meegenomen bij de bepaling van de hersenenplasma ratio. De eindconcentraties van de substraten in de infusieoplossing zijn weergegeven in tabel 38. Elke muis kreeg dezelfde concentratie van de substraten toegediend. De eindconcentratie van 3,5 mg/mL en voor Tariquidar 2,2 mg/mL. In dit experiment was het targetlevel voor Elacridar en Tariquidar in de plasmamonsters 2000 nM. Zie figuur 25 voor het resultaat.



Figuur 25 | De hersenen-plasma ratio per analiet uitgezet tegen de inhibitor uitgevoerd in WT muizen.

De plasmaconcentratie van Elacridar was 1605 nM en van Tariquidar was dat 2685 nM. De plasmaconcentratie van Elacridar is te laag en dient verhoogt te worden. De plasmaconcentratie van Tariquidar is te hoog in dit experiment. De gemiddelde concentratie ligt ver boven de gewenste concentratie van 2000 nM. De Elacridar concentratie in de hersenen was gemiddeld 2036 nM. De Tariquidar concentratie in de hersenen was gemiddeld 509 nM. Zie bijlage XVII voor de gemiddelde plasma- en hersenconcentraties en de hersenen-plasma ratio voor de substraten.

Om te bepalen of er een significant verschil aanwezig is tussen de drie omstandigheden is er een *one way*-ANOVA analyse in Prism uitgevoerd met een BI van 95%. In figuur 25 is er waar te nemen dat er voor Docetaxel en Riluzole geen significant verschil aanwezig is. Dit betekent dat de inhibitoren bij deze concentratie weinig effect hebben op P-gp en Bcrp1. Voor Erlotinib, Loperamide, Vemurafenib en Verapamil is er wel een significant verschil aanwezig tussen de drie omstandigheden. Voor Erlotinib, Loperamide en Verapamil is er voor de muizen die Elacridar of Tariquidar toegediend kregen een significant verschil aanwezig met de muizen die geen inhibitor toegediend kregen. De gemiddelde ratio van Elacridar, voor deze drie substraten, is hoger dan de gemiddelde ratio van Tariquidar. Echter is dit verschil niet heel groot en zou dit verschil verkleind kunnen worden wanneer Tariquidar in dezelfde concentratie wordt toegediend als Elacridar. Er kan wel geconcludeerd worden dat de inhibitoren zorgen voor een hogere concentraties van de inhibitoren nodig zijn om P-gp en Bcrp1 in de BHB te remmen. Dit kan bevestigd worden uit dit experiment. Er is namelijk een significant verschil aanwezig tussen geen inhibitor en Elacridar of Tariquidar voor de zwakke (Verapamil en Loperamide) en de gemiddelde (Erlotnib) substraten.

In figuur 25 is waar te nemen dat er voor Vemurafenib een significant verschil aanwezig is tussen geen inhibitor en Elacridar. Hieruit kan voorzichtig geconcludeerd worden dat Elacridar mogelijk een betere inhibitor is voor P-gp en Bcrp1 dan Tariquidar.

De hersenen-plasma ratio van Docetaxel en Vemurafenib is in dit experiment aan de lage kant. Dit betekent dat de concentratie van Docetaxel en Vemurafenib in de hersenen erg laag is, zie ook bijlage XVIII.

Ook zijn de resultaten van het experiment voor Tariquidar minder betrouwbaar omdat er uiteindelijk maar twee muizen (n=2) gebruikt zijn voor de resultaten. Ten opzichte van het experiment met Elacridar, deze was namelijk uitgevoerd in drie muizen (n=3). Dit geeft een betrouwbaarder resultaat voor de hersenen-plasma ratio van de muizen die Elacridar toegediend kregen. Uit dit experiment kan er geconcludeerd worden dat de concentraties van Docetaxel, Elacridar en Vemurafenib in de infusieoplossing verhoogd moeten worden. Dit kan bereikt worden door een hoger volumina van de stockoplossing toe te voegen. Verder was de plasmaconcentratie van Tariquidar te hoog. Uit dit experiment bleek dat er ongeveer een concentratie van 2,0 mg/mL nodig is om een plasmaconcentratie van 2000 nM te bereiken. Zie bijlage XVIII voor de gemiddelde plasma- en hersenconcentraties met de berekende gemiddelde ratio.

#### 4.5.4 Hersenen-plasma ratio van KO en WT muizen

Voor dit experiment werden er vier KO en vier WT muizen gebruikt. Zowel de KO muizen als de WT muizen kregen dezelfde concentraties van de substraten toegediend. De eindconcentraties in de infusieoplossing waren: Docetaxel: 0,053 mg/mL, Erlotinib 0,0033 mg/mL, Loperamide 0,089 mg/mL, Riluzole 0,0036 mg/mL, Vemurafenib 0,0042 mg/mL en Verapamil 0,089 mg/mL. Beide type muizen kregen Elacridar toegediend maar met een verschillende concentratie. De eindconcentratie in de infusieoplossing van Elacridar voor de KO muizen was 0,83 mg/mL en voor de WT muizen was dit 2,5 mg/mL. Ook in dit experiment was het targetlevel voor Elacridar en Tariquidar in de plasmamonsters 2000 nM. In figuur 26 is het verschil tussen de KO muizen en WT muizen per substraat weergegeven.



Figuur 26 De hersenen-plasma ratio per analiet uitgezet tegen het type muis.

De plasmaconcentratie van Elacridar was in dit experiment voor de KO muizen gemiddeld 1265 nM. Dit is aan de lage kant. De plasma concentratie van Elacridar in de WT muizen was gemiddeld 2470 nM. Deze plasmaconcentratie is wat aan de hoge kant maar is wel nog acceptabel. De hersenconcentratie van Elacridar in de KO muizen was 1259 nM, voor de WT muizen was dit 2300 nM, zie ook bijlage XIX.

Er is een t-toets uitgevoerd m.b.v. Prism om het significante verschil tussen de KO muizen en de WT muizen te bepalen. Dit is gedaan met een BI van 95%. De bedoeling van dit experiment was om te bepalen of er m.b.v. Elacridar een volledige remming in de WT muizen mogelijk was. De KO muizen werden gebruikt als referentie en geven de controle waarden weer. Bij deze muizen zijn geen P-gp en Bcrp1 transporters aanwezig en kunnen deze waarden als de maximale remming beschouwd worden. Bij Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole en Verapamil is er geen significant verschil aanwezig tussen de KO muizen en de WT muizen. Dit zou betekenen dat de P-gp en Bcrp1 transporters volledig geremd worden met een Elacridar concentratie van 2,5 mg/mL. Echter is er veel spreiding aanwezig bij bijvoorbeeld de KO muizen van Docetaxel en Loperamide. Verder is er bij de WT muizen van Riluzole één waarde die afwijkt van de andere drie waarden. Door deze hogere waarde is de gemiddelde ratio van de WT muizen zelfs hoger dan de maximale remming. Als deze waarde wat lager had gelegen, lag de gemiddelde ratio van de WT muizen ook dichter bij de gemiddelde ratio van de KO muizen. Er kon dan met meer zekerheid gezegd worden dat de transporters ook daadwerkelijk maximaal geremd werden. Deze onzekerheid in de spreiding geldt voor alle substraten waar geen significant verschil aanwezig is.

In figuur 26 is waar te nemen dat er bij Vemurafenib een significant verschil aanwezig is tussen de KO muizen en de WT muizen. De hersenen-plasma ratio's van zowel de KO als de WT muizen liggen dicht bij elkaar en de spreiding is laag. Uit de figuur kan geconcludeerd worden dat de maximale remming voor Vemurafenib niet bereikt is met een Elacridar concentratie van 2,5 mg/mL. De gemiddelde hersenen-plasma ratio van de WT muizen ligt nog een stuk lager dan gemiddelde hersenen-plasma ratio van de KO muizen (referentie).

Ook uit dit experiment blijkt dat de hersenen-plasma ratio's van Docetaxel en Vemurafenib erg laag zijn. De concentraties van deze twee substraten in de infusieoplossing dient verhoogt te worden. Zie bijlage XIX voor de gemiddelde plasma- en hersenconcentraties met de bijbehorende hersenen-plasma ratio.

# 5. Samenvatting

Door de aanwezigheid van transporteiwitten op de BHB is het lastig voor geneesmiddelen om in de hersenen te komen en daar te blijven. De transporteiwitten kunnen geremd worden door inhibitoren. Op deze manier zullen de transporteiwitten met een lager vermogen de geneesmiddelen (substraten) uit de hersenen transporteren. De inhibitoren die in deze studie onderzocht zijn, zijn Elacridar en Tariquidar. Deze twee inhibitoren remmen zowel P-gp als Bcrp1 maar met verschillende potentie. Om het remmend vermogen van Elacridar en Tariquidar te onderzoeken zijn er *in vivo* experimenten uitgevoerd. Dit is uitgevoerd met muizen. Deze kregen zes substraten toegediend samen met één inhibitor. Er zijn plasmamonsters en hersenmonsters van deze muizen verzameld en geanalyseerd met een gevalideerde LC-MS/MS methode. Alle analieten (zes substraten, twee inhibitoren) diende in één analietische run geanalyseerd te worden. De methode is volledig gevalideerd in humaan plasma en beperkt gevalideerd in muizenplasma en hersenhomogenaat van muizen.

Eerst werd er een methode ontwikkeld en werden er verschillende meetinstellingen voor de HPLC en de MS bepaald. Verder was er geen stabiel isotoop van Tariquidar aanwezig om als IS te gebruiken. Een andere IS, die tijdens dit project gebruikt werd, moest gekozen worden als IS voor Tariquidar. Na een aantal test analyses is er gekozen om Elacridar-d4 als IS te gebruiken. Deze had een vergelijkbare t<sub>R</sub> met Tariquidar en lijkt qua structuur en chemische eigenschappen op Tariquidar. Na de ontwikkeling en optimalisatie werden er een aantal analyses uitgevoerd om het bereik van de kalibratielijn te bepalen. Hierbij was het al zichtbaar dat de kalibratielijn van Tariquidar niet lineair zou zijn. Ook zijn er tijdens de ontwikkeling en optimalisatie problemen ondervonden met de oplosbaarheid van Elacridar, Tariquidar en Vemurafenib. Om dit probleem deels op te lossen is er gekozen om te werken met een AS-oplossing met een verhouding MeOH:water 60:40% i.p.v. een verhouding MeOH:water 20:80%.

Vervolgens werd de methode gevalideerd volgens het protocol voor bio-analietische methoden van het NKI. De volgende parameters werden getoetst: specificiteit en selectiviteit, detectielimiet, bepalingsgrenzen, lineariteit, juistheid, precisie, recovery en ion suppressie en de stabiliteit. Aan de resultaten van de lineariteit in humaan plasma en de juistheid en precisie in muizenplasma is te zien dat Elacridar-d4 als IS voor Tariquidar niet volledig corrigeert. Echter is Elacridar-d4 een goed alternatief als IS voor Tariquidar.

Tijdens de bepaling van de recovery, ion suppressie en de stabiliteit was er opnieuw een probleem met de oplosbaarheid van een aantal analieten. Dit was vooral aanwezig bij de monsters in een zuivere AS-oplossing. Dit probleem was niet aanwezig bij de opgewerkte monsters in de biologische matrix. Door eiwitten en andere componenten die mee gaan tijdens de vloeistof-vloeistof extractie lossen de analieten beter op in de biologische matrix dan in een zuivere AS-oplossing. Hierdoor zijn een aantal recovery's hoger dan 100% en is de ion suppressie voor sommige analieten negatief. Ondanks dit probleem kon er wel bepaald worden of de analieten stabiel waren.

De analyse na zeven en 27 dagen van de stabiliteit en alle analyses die uitgevoerd zijn voor de validatie van muizenplasma en hersenhomogenaat zijn uitgevoerd na de vervanging van de elektronische kaarten. Hierdoor is het signaal verlaagd en kan er niet goed gekwantificeerd worden in het lage gebied (<10 nM).

De validatie in muizenplasma gekwantificeerd met een kalibratielijn in humaan plasma is wel acceptabel. Voor de resultaten binnen de grenswaarden voor de juistheid en precisie in muizenplasma, zouden de QC monsters gekwantificeerd moeten worden met een kalibratielijn in muizenplasma.

De resultaten van de lineariteit, juistheid in hersenhomogenaat vallen wel binnen de grenswaarden. Dit komt mede doordat de QC monsters gekwantificeerd werden met een kalibratielijn in hersenhomogenaat. De methode is alleen niet precies voor Riluzole, Vemurafenib en Tariquidar. Dit komt mogelijk door het lage signaal van de MS.

Nadat de methode gevalideerd was werden de experimenten om de juiste dosering te bepalen uitgevoerd. Er konden geen experimenten in P-gp enkelvoudige KO muizen (P-gp/Bcrp1<sup>-/+</sup>) uitgevoerd worden omdat deze muizen slecht leverbaar waren tijdens dit project. Verder waren er wel Bcrp1 enkelvoudige KO muizen (P-gp/Bcrp1<sup>+/-</sup>) aanwezig, alleen zijn hier geen relevante experimenten mee uitgevoerd. In dit project zijn er alleen resultaten beschreven van de experimenten uitgevoerd in KO muizen (P-gp/Bcrp1<sup>-/-</sup>) en WT muizen (P-

gp/Bcrp1 <sup>+/+</sup>). Echter waren dit alleen experimenten om de optimale doseringen te bepalen. Door gebrek aan tijd zijn de *in vivo* experimenten, om het uiteindelijke doel te behalen, nog niet uitgevoerd en verwerkt in dit verslag. Wat dus het remmend vermogen is van de inhibitoren, en de inhibitoren individueel, op P-gp en Bcrp1 kan niet beantwoord worden. Hierbij kan ook niet beantwoord worden welke concentratie van de inhibitoren er uiteindelijk nodig is om een maximale remming van de transporters te bereiken.

De targetconcentratie (50 nM tot 100 nM) in het plasma voor de substraten is voor elk substraat bereikt. Echter dient de concentratie van Docetaxel en Vemurafenib verhoogt te worden i.v.m. de lage concentratie in de hersenen. De targetconcentraties 2000 nM zijn voor zowel Elacridar als Tarquidar bereikt.

Uit de resultaten, beschreven in paragraaf 4.5, blijkt dat de concentraties van Docetaxel en Vemurafenib in de hersenen erg laag zijn. Deze twee substraten komen niet goed in de hersenen omdat er met een continu infuus gewerkt wordt. Doordat er constant een bepaalde hoeveelheid substraat toegediend wordt ontstaat er ook een constante plasmaspiegel. Dit was ook de bedoeling zodat er een evenwicht ontstond tussen de plasmaspiegels en de hersenspiegels en de hersenen-plasma ratio's goed vergeleken konden worden. Door deze toedieningsvorm ontstaat er geen hoge piekspiegel, wat wel aanwezig is bij bijvoorbeeld een orale toediening. Door deze piekspiegel krijgen de hersenen als het ware een opdonder van de substraten en komen ze in de hersenen. De afwezigheid van deze piekspiegel kan een verklaring zijn voor een lage concentratie in de hersenen.

Het experiment, beschreven in paragraaf 4.5.2, toont aan dat er voor Erlotinib en Riluzole een significant verschil aanwezig is tussen de inhibitoren. Dit gaat tegen de verwachting in omdat het experiment met KO muizen uitgevoerd is. Er zijn in deze muizen geen transporters aanwezig en er zou geen significant verschil aanwezig moeten zijn. Een verklaring hiervoor is dat de deze substraten via een andere route of transporteiwit uit de hersenen getransporteerd worden.

Uit het experiment, beschreven in paragraaf 4.5.3, kan er geconcludeerd worden dat de inhibitoren effect hebben op de concentratie van Erlotinib, Loperamide, Vemurafenib en Verapamil in de hersenen. Door toediening van een inhibitor worden de concentraties van deze substraten in de hersenen verhoogd. Daarnaast is Elacridar mogelijk een betere inhibitor voor P-gp en Bcrp1 dan Tariquidar.

In het experiment, beschreven in paragraaf 4.5.4, geven de KO muizen, bij een hoge hersenen-plasma ratio, de maximale remming weer. De concentraties van Docetaxel en Vemurafenib zijn minimaal in de hersenen. Hierdoor is er geen goed beeld bereikt van de maximale remming van Docetaxel en Vemurafenib. Echter is het bekend geworden dat een concentratie van 2,5 mg/mL Elacridar niet genoeg is om de maximale remming voor Vemurafenib te bereiken. Voor de andere substraten geeft dit experiment wel een goed beeld van een schatting van de concentratie Elacridar om de maximale remming te bereiken.

# 6. Conclusie

Deze studie was gestart met het opzetten en valideren van een LC-MS/MS methode. De monstervoorberwerking bestond uit een vloeistof-vloeistof extractie met *tert*-butylmethylether. Een LC-systeem was gekoppeld met een MS/MS-systeem. De analysemethode bestond uit een RP analyse met een C<sub>18</sub> kolom, een gradiëntanalyse is uitgevoerd met MilliQ-water (0,1% mierenzuur) en MeOH en ionisatie in de positieve modus werd bereikt met een ESI. Waarbij alle analieten (twee inhibitoren, zes substraten en de bijbehorende IS) gemeten kunnen worden in één analietische run. De methode is volledig gevalideerd in humaan plasma en is getest op: de bepalingsgrensen, detectielimiet, juistheid, lineariteit, precisie, recovery en ion suppressie, specificiteit en selectiviteit en stabiliteit. De LC-MS/MS methode is succesvol gevalideerd in humaan plasma en de validatieparameters voldoen aan de gestelde eisen voor een bio-analietische methode.

Een beperkte validatie is uitgevoerd in muizenplasma en hersenhomogenaat. De specificiteit en selectiviteit, juistheid, lineariteit en precies is getest. De validatieparameters voldoen niet allemaal aan de gestelde eisen voor een bio-analietische methode, toch is de methode is wel acceptabel om het doel van dit onderzoek te bereiken.

Deze gevalideerde methode is vervolgens gebruikt om het remmend vermogen van Elacridar en Tarquidar op P-gp en Bcrp1 in de BHB te onderzoeken. De *in vivo* experimenten met de optimale doseringen om dit te onderzoeken zijn nog vollop gaande. Hierdoor is het effect van Elacridar en Tariquidar op de transporters en de vergelijking van de twee inhibitoren nog niet volledig bepaald. Ook is het nog niet bekend welke concentraties er nodig zijn om de remming van de transporters in WT muizen zo volledig mogelijk te krijgen. Wel kan er geconcludeerd worden dat Elacridar en Tariquidar zorgen voor een toename van de concentraties van Erlotinib, Loperamide, Vemurafenib en Verapamil in de hersenen en dat deze minder snel uit de hersenen getransporteerd worden. Daarnaast kan er geconcludeerd worden dat Elacridar mogelijk een betere inhibitor is voor P-gp en Bcrp1 dan Tariquidar.

# 7. Aanbevelingen

Monsters in muizenplasma kunnen beter gekwantificeerd worden met een kalibratielijn in muizenplasma in plaats van een kalibratielijn in humaan plasma.

Voor verhoging van het signaal en gevoelerige analyses dient de MS/MS gerepareerd te worden zodat de *in vivo* monsters in het lage concentratiegebied beter gekwantificeerd kunnen worden.

Voor hogere concentraties van Docetaxel en Vemurafenib dient de concentratie van deze twee substraten verhoogd te worden in de infusieoplossing.

Wanneer er een stabiel isotoop van Tariquidar toegepast wordt als IS zal de kalibratielijn beter gecorrigeerd worden.

Om het effect van de inhibitoren op de transporters individueel te onderzoeken zijn er *in vivo* experimenten nodig met enkelvoudige KO muizen.

Om er achter te komen welke concentraties van de inhibitoren nodig zijn om de remming in de WT muizen zo volledig mogelijk te krijgen en met zekerheid te bepalen welke inhibitor een betere remmer is voor P-gp en Bcrp1 zijn er meer *in vivo* experimenten met de optimale dosering nodig.

# Dankwoord

Na een stage van negen maanden heb ik erg veel nieuwe ervaringen opgedaan en veel nieuwe mensen leren kennen. Ik ben erg blij dat ik hier bij het NKI-AVL stage heb mogen lopen. Het is een veelzijdige plek waar veel verschillende soorten en interessante onderzoeken gedaan worden. Graag wil ik daar een aantal mensen voor bedanken.

Als eerste wil ik Olaf van Tellingen bedanken voor het beantwoorden van al mijn vragen, het leren van nieuwe technieken en het vele malen uitleggen van farmacokinetische onderwerpen. Verder wil ik Mark de Gooijer en Levi Buil bedanken voor het leren van transwell experimenten, de goede uitleg en de vele kopjes koffie. Daarnaast wil ik Jacqueline Berbee bedanken voor de oneindige gesprekken over validatie. Verder wil ik nog Tarini Gajadien bedanken voor de gezellige trein- en busreizen en Ronak en Isabel voor de leuke muziek, gekkigheid en borrels.

Daarnaast wil ik Bert Mast en de andere docenten van de opleiding Chemie bedanken voor de leuke een leerzame studietijd.

Als laatste wil ik mijn ouders, broertjes, zusje en vriend bedanken voor jullie steun Als ik er even door heen zat hielpen en motiveerde jullie mij altijd weer.

Nikkie Venekamp

Amsterdam, 21 juli 2016

# Referenties

- 1. https://www.hersenstichting.nl/alles-over-hersenen/de-hersenen/bloed-hersenbarriere/bloedhersenbarriere; *Geraadpleegd op 16-02-2016*
- 2. https://pubs.acs.org/cen/science/85/8523sci1.html; Geraadpleegd op 16-02-2016.
- 3. Srivalli K.M.R.; Lakshimi P.K.; "Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook." *Brailian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**. vol. 48, no. 3, 353-367. *Geraadpleegd op 9-02-2016*.
- 4. http://physiologyonline.physiology.org/content/22/2/122; *Geraadpleegd op 10-02-2016*.
- Haimeur A.; Conseil G.; Deeley R.G.; Cole S.P.C.; "The MRP-Related and BCRP/ABCG2 Multidrug Resistance Proteins: Biology, Substrate Specificity and Regulation." *Current Drug Metabolism* 2004. no. 5, 21-53. *Geraadpleegd op 10-02-2016.*
- Stokvis E.; Rosing H.; Causon R.C.; Schellens J.H.M.; Beijnen J.H.; "Quantitative analysis of the Pglycoprotein inhibitor Elacridar (GF120918) in human and dog plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection." J Mass Spectrom. 2004. no. 39, 1122-1130. Geraadpleegd op 29-01-2016.
- 7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334925; Geraadpleegd op 29-02-2016.
- 8. http://www.selleckchem.com/; Geraadpleegd op 29-01-2016.
- 9. http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cn100078a; Geraadpleegd op 29-02-2016.
- 10. http://www.cancer.gov/; Geraadpleegd op 10-02-2016.
- 11. http://www.apotheek.nl/; Geraadpleegd op 29-03-2016
- 12. http://www.farmacotherapeutischkompas.nl; Geraadpleegd op 29-03-2016.
- 13. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/; Geraadpleegd op 10-02-2016.
- 14. https://nl.wikipedia.org/wiki/Chromatografie; Geraadpleegd 29-01-2016.
- 15. http://www.sigmaaldrich.com/analietical-chromatography/analietical-products.html?TablePage=9657304; *Geraadpleegd op 29-01-2016.*
- 16. http://www.waters.com/waters/en\_NL/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\_NL; *Geraadpleegd 29-01-2016.*
- 17. https://www.idex-hs.com/education-and-tools/educational-materials/hplc-center; *Geraadpleegd op 29-01-2016.*
- 18. http://www.encyclo.nl/begrip/isotopen; Geraadpleegd 16-02-2016.
- 19. https://www.thermofisher.com/nl/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learningcenter/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-mass-spectrometry.html; *Geraadpleegd op 16-02-2016.*
- 20. https://books.google.nl/books?id=bM4Ftfx2rgEC&pg=PA99&lpg=PA99&dq=interface+ionisation+chamber &source=bl&ots=yIBmGZJpRJ&sig=Ah6BbKq6lg1klnedz6y37s9I9hQ&hl=nl&sa=X&ved=OahUKEwjSlqC9z\_TL AhUG6g4KHUsRBMYQ6AEISDAG#v=onepage&q=interface%20ionisation%20chamber&f=false; Geraadpleegd op 04-04-2016.
- 21. http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analietical\_Chemistry/Instrumental\_Analysis/Mass\_Spectrometry/Mas s\_Spectrometers\_(Instrumentation)/Electrospray\_Ionization\_Mass\_Spectrometry; *Geraadpleegd 16-02-2016.*
- 22. http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=thcseDsHqnOxmOllEcCzBmCR&subNav=oibelDsHqnOx mOllEcCzBmCRnB; *Geraadpleegd op 04-04-2016.*
- 23. de Hoffmann E.; "Tadem Mass Spectrometrie: a Primer." *Journal of Mass spectrometrie* **1996**. vol. 31, 129-137. *Geraadpleegd op 06-04-2016*.
- 24. Banerjee S.; Mazumdar S.; "Electorspray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Acces the Information beyond the Molecular Weight of the Analiete" *Internation Journal of Analietical Chemistry* **2012**. vol. 2012, 0-40. *Geraadpleegd 16-02-2016*.

- 25. Seidman A.; Avrahamim Z.; Sheinfux B.; Grinberg J.; "Channel Electron Multipliers" *United States Patents* **1974.** no. 480,683. *Geraadpleegd op 11-04-2016.*
- 26. http://www.doping.chuv.ch/en/lad\_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations-laboratoireappareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ms.htm; *Geraadpleegd op 11-04-2016.*
- 27. Analyst 1.6.2 Software, *Manual Compound Optimization Tutorial*, **RUO-IDV-05-0258-A.** Release date: april 2013, *AB SCIEX; Geraadpleegd op 14-04-2016*.
- 28. http://www.miniwebtool.com/relative-standard-deviation-calculator/; Geraadpleegd op 19-01-2016.
- 29. Ouwehand M.; van Tellingen O.; Nooijen W.J.; Jansen E.; "De validatie voor bioanalietische methoden Farmacokinetiek" *NKI/AvL* **2002**. *Geraadpleegd op 15-01-2016*.
- 30. http://www.socr.ucla.edu/applets.dir/f\_table.html; Geraadpleegd op 15-01-2016.
- 31. http://www.chromatographyonline.com/ion-suppression-major-concern-mass-spectrometry?id=&sk=&date=&pageID=2; *Geraadpleegd op 20-01-2016.*
### Bijlagen

Bijlage I:	Structuurformules van Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil.
Bijlage IIa:	MRM-spectra van Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil.
Bijlage IIb:	MRM-spectra van Docetaxel-d6, Elacridar-d4, Erlotinib-d6, Loperamide-d6, Riluzole[13C][15N2], Vemurafenib[13C] en Verapamil-d6.
Bijlage III:	Resultaten van de bepalingsgrenzen QC 1 nM en QC 200 nM in humaan plasma.
Bijlage IV:	Kalibratielijnen van Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil in humaan plasma.
Bijlage V:	Resultaten uit SPSS voor de bepaling van de LOF-toets voor Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil.
Bijlage VI:	Resultaten uit SPSS voor de bepaling van de t-toets voor Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil.
Bijlage VII:	Resultaten van de juistheid voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in humaan plasma.
Bijlage VIII:	Resultaten uit SPSS voor bepaling van de precisie voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib, Verapamil in humaan plasma.
Bijlage IX:	Kalibratielijnen van Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil voor de bepaling van de recovery en de ion suppressie.
Bijlage Xa:	Resultaten van de bepaling van de stabiliteit in de biologische matrix.
Bijlage Xb:	Resultaten van de bepaling van de stabiliteit van de analieten na een aantal vries-en-dooi cycli.
Bijlage Xc:	Grafieken van de stabiliteit in de opgewerkte monsters van Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil.
Bijlage XI.	Resultaten van de juistheid voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in muizenplasma.
Bijlage XII.	Resultaten van de precisie voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in muizenplasma.
Bijlage XIII.	Kalibratielijnen van Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil in hersenhomogenaat.
Bijlage XIV.	Resultaten uit SPSS voor de bepaling van de LOF-toets en de t-toets voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil
Bijlage XV.	Resultaten van de juistheid voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in hersenhomogenaat.
Bijlage XVI.	Resultaten van de precisie voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in hersenhomogenaat.
Bijlage XVII.	Resultaten van het in vivo experiment met KO muizen voor Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil.
Bijlage XVIII.	Resultaten van het in vivo experiment met WT muizen voor Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil.
Bijlage XIX.	Bijlage XIX. Resultaten van het in vivo experiment met KO muizen en WT muizen voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil.
Bijlage XX.	Werkplan

## *Bijlage I. Structuurformules van Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil*

Tabel 41| Structuurformules van de substraten.Docetaxel





## Bijlage IIa. MRM-spectra van Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil

Figuur 27a en b| Q1 (m/z: 808,6) en MS2 (m/z: 527,3) spectra van Docetaxel.



**Figuur 28a en b** Q1 (*m*/*z*: 564,2) en MS2 (*m*/*z*: 252,1) spectra van Elacridar.



Figuur 29a en b| Q1 (m/z: 394,3) en MS2 (m/z: 278,0) spectra van Erlotinib.



Figuur 30a en b| Q1 (m/z: 477,3) en MS2 (m/z: 266,2) spectra van Loperamide.



Figuur 31a en b| Q1 (m/z: 235,1) en MS2 (m/z: 138,1) spectra van Riluzole.



**Figuur 32a en b**| *Q1 (m/z: 647,7) en MS2 (m/z: 335,1) spectra van Tariquidar.* 



Figuur 33a en b| Q1 (m/z: 490,1) en MS2 (m/z: 382,9) spectra van Vemurafenib.



Figuur 34a en b| Q1 (m/z: 455,4) en MS2 (m/z: 165,1) spectra van Verapamil.



## Bijlage IIb. MRM-spectra van Docetaxel-d9, Elacridar-d4, Erlotinib-d6, Loperamide-d6, Riluzole [<sup>13</sup>C][<sup>15</sup>N<sub>2</sub>], Vemurafenib [13C] en Verapamil-d6

Figuur 35a en b| Q1 (m/z: 817,6) en MS2 (m/z: 527,5) spectra van Docetaxel-d9.



Figuur 36a en b| Q1 (m/z: 568,3) en MS2 (m/z: 252,3) spectra van Elacridar-d4.



Figuur 37a en b| Q1 (m/z: 400,3) en MS2 (m/z: 278,0) spectra van Erlotinib-d6.



Figuur 38a en b| Q1 (m/z: 483,2) en MS2 (m/z: 272,2) spectra van Loperamide-d6.



Figuur 39a en b| Q1 (m/z: 238,0) en MS2 (m/z: 140,9) spectra van Riluzole[<sup>13</sup>C][<sup>15</sup>N<sub>2</sub>].



**Figuur 40a en b**| *Q1 (m/z: 496,1) en MS2 (m/z: 389,0) spectra van Vemurafenib*[<sup>13</sup>*C*].



Figuur 41a en b| Q1 (m/z: 461,3) en MS2 (m/z: 165,2) spectra van Verapamil-d6.

#### Bijlage III. Resultaten van de bepalingsgrenzen QC 1 nM en QC 200 nM voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in humaan plasma

Analiet		GM (nM)	Stdev.	RSD (%)	DEV (%)
Docetaxel	Dag 1	0,787	0,117	14,9	-21,3
	Dag 2	1,09	0,167	15,4	8,98
	Dag 3	0,856	0,053	6,16	-14,4
Elacridar	Dag 1	0,981	0,083	8,41	-1,88
	Dag 2	1,09	0,111	10,2	8,85
	Dag 3	1,01	0,080	7,88	1,02
Erlotinib	Dag 1	0,907	0,028	3,09	-9,27
	Dag 2	0,836	0,063	7,52	-16,4
	Dag 3	0,891	0,038	4,22	-10,9
Loperamide	Dag 1	0,952	0,012	1,22	-4,85
	Dag 2	0,989	0,017	1,68	-1,10
	Dag 3	0,954	0,012	1,29	-4,63
Riluzole	Dag 1	0,966	0,060	6,25	-3,42
	Dag 2	0,840	0,093	11,0	-16,1
	Dag 3	0,879	0,166	18,9	-12,1
Tariquidar	Dag 1	0,826	0,064	7,75	-17,4
	Dag 2	1,02	0,183	18,0	1,95
	Dag 3	0,958	0,143	15,0	-4,18
Vemurafenib	Dag 1	0,910	0,107	11,7	-9,00
	Dag 2	0,818	0,205	25,1	-18,2
	Dag 3	0,848	0,088	10,4	-15,2
Verapamil	Dag 1	0,958	0,043	4,54	-4,18
	Dag 2	0,916	0,019	2,12	-8,43
	Dag 3	0,925	0,031	3,38	-7,48

 Tabel 42a
 Resultaten van de bepaling van de LLQ bij 1 nM in humaan plasma voor alle analieten.

 Tabel 42b
 Resultaten van de bepaling van de ULQ bij 200 nM in humaan plasma voor alle analieten.

Analiet		GM (nM)	Stdev.	RSD (%)	DEV (%)
Docetaxel	Dag 1	197	8,28	4,20	-1,42
	Dag 2	203	6,92	3,41	1,33
	Dag 3	201	9,18	4,56	0,67
Elacridar	Dag 1	204	6,35	3,12	1,75
	Dag 2	218	6,72	3,08	9,00
	Dag 3	204	4,72	2,31	2,17
Erlotinib	Dag 1	193	5,78	3,00	-3,58
	Dag 2	190	3,88	2,04	-4,83
	Dag 3	186	8,87	4,78	-7,17
Loperamide	Dag 1	194	6,31	3,25	-2,92
	Dag 2	198	3,08	1,56	-1,17
	Dag 3	192	8,76	4,57	-4,17
Riluzole	Dag 1	200	5,34	2,67	0,083
	Dag 2	195	2,93	1,50	-2,42
	Dag 3	187	4,10	2,19	-6,50
Tariquidar	Dag 1	228	15,0	6,58	13,8
	Dag 2	222	5,20	2,35	10,8
	Dag 3	203	3,73	1,84	1,25
Vemurafenib	Dag 1	196	3,97	2,03	-2,08
	Dag 2	191	5,04	2,64	-4,58
	Dag 3	183	7,03	3,84	-8,42
Verapamil	Dag 1	211	8,48	4,02	5,33
	Dag 2	194	2,45	1,26	-3,00
	Dag 3	193	8,10	4,20	-3,50

#### Bijlage IV. Kalibratielijnen van Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in humaan plasma



**Figuur 42** Kalibratielijnen in humaan plasma van Docetaxel geanalyseerd op de drie verschillende dagen.

Dag 1:  $y=3,54\cdot10^{-2}x$  (±4,62·10<sup>-4</sup>) -8,99·10<sup>-4</sup> (±1,15·10<sup>-3</sup>), R<sup>2</sup>=0,998. Dag 2:  $y=3,53\cdot10^{-2}x$  (±6,19·10<sup>-4</sup>) + 3,15·10<sup>-3</sup> (±1,53·10<sup>-3</sup>), R<sup>2</sup>=0,996. Dag 3:  $y=2,99\cdot10^{-2}x$  (±5,01·10<sup>-4</sup>) + 5,39·10<sup>-3</sup> (±1,24·10<sup>-3</sup>), R<sup>2</sup>=0,996.



**Figuur 44** Kalibratielijnen in humaan plasma van Loperamide geanalyseerd op de drie verschillende dagen.

Dag 1:  $y=1,44\cdot10^{-2}x$  (±1,87·10<sup>-4</sup>) + 2,79·10<sup>-3</sup> (±4,64·10<sup>-4</sup>), R<sup>2</sup>=0,998. Dag 2:  $y=3,64\cdot10^{-2}x$  (±1,85·10<sup>-3</sup>) + 1,19·10<sup>-2</sup> (±4,59·10<sup>-3</sup>), R<sup>2</sup>=0,965. Dag 3:  $y=1,53\cdot10^{-2}x$  (±2,71·10<sup>-4</sup>) + 2,34·10<sup>-3</sup> (±6,71·10<sup>-3</sup>), R<sup>2</sup>=0,996.



**Figuur 46** Kalibratielijnen in humaan plasma van Vemurafenib geanalyseerd op de drie verschillende dagen.

Dag 1:  $y=1,49\cdot10^{-2}x (\pm 1,40\cdot10^{-4}) + 1,83\cdot10^{-3} (\pm 3,46\cdot10^{-4}), R^2=0,999$ . Dag 2:  $y=1,74\cdot10^{-2}x (\pm 2,43\cdot10^{-4}) + 1,45\cdot10^{-3} (\pm 6,03\cdot10^{-4}), R^2=0,997$ . Dag 3:  $y=1,37\cdot10^{-2}x (\pm 2,66\cdot10^{-4}) + 2,15\cdot10^{-3} (\pm 6,60\cdot10^{-4}), R^2=0,995$ .



**Figuur 43** *Kalibratielijnen in humaan plasma van Erlotinib geanalyseerd op de drie verschillende dagen.* 

Dag 1:  $y=2,60\cdot10^{-2}x (\pm 1,78\cdot10^{-4}) + 4,52\cdot10^{-3} (\pm 4,41\cdot10^{-4}), R^2=0,999.$ Dag 2:  $y=2,71\cdot10^{-2}x (\pm 2,98\cdot10^{-4}) + 6,52\cdot10^{-3} (\pm 7,39\cdot10^{-4}), R^2=0,998.$ Dag 3:  $y=2,39\cdot10^{-2}x (\pm 5,45\cdot10^{-4}) + 4,37\cdot10^{-3} (\pm 1,35\cdot10^{-3}), R^2=0,993.$ 



**Figuur 45** Kalibratielijnen in humaan plasma van Riluzole geanalyseerd op de drie verschillende dagen.

Dag 1:  $y=1,67\cdot10^{-2}x (\pm 1,36\cdot10^{-4}) + 7,18\cdot10^{-3} (\pm 1,95\cdot10^{-3}), R^2=0,999$ . Dag 2:  $y=1,80\cdot10^{-2}x (\pm 1,31\cdot10^{-4}) + 4,63\cdot10^{-3} (\pm 1,89\cdot10^{-3}), R^2=0,999$ . Dag 3:  $v=1,69\cdot10^{-2}x (\pm 2,05\cdot10^{-4}) + 6,82\cdot10^{-3} (\pm 2,94\cdot10^{-3}), R^2=0,998$ .



**Figuur 47** *Kalibratielijnen in humaan plasma van Verapamil geanalyseerd op de drie verschillende dagen.* 

Dag 1:  $y=1,93\cdot10^{-2}x$  (±1,12·10<sup>-4</sup>) + 2,52·10<sup>-3</sup> (±2,78·10<sup>-4</sup>), R<sup>2</sup>=1,00. Dag 2:  $y=2,20\cdot10^{-2}x$  (±1,96·10<sup>-4</sup>) + 3,03·10<sup>-3</sup> (±4,86·10<sup>-4</sup>), R<sup>2</sup>=0,999. Dag 3:  $y=1,81\cdot10^{-2}x$  (±2,91·10<sup>-4</sup>) + 2,87·10<sup>-3</sup> (±7,20·10<sup>-4</sup>), R<sup>2</sup>=0,996.

## *Bijlage V. Resultaten uit SPSS voor de bepaling van de LOF-toets voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil*

Analiet		1/x <sup>pv</sup>	SSr	df <sub>r</sub>	SS <sub>pe</sub>	Df <sub>pe</sub>	Factor	F <sub>LOF</sub>	F <sub>(α=0,05)</sub> (6,8) /(5,7)/(4,6)
Docetaxel	Dag 1	2,00	<b>3,10</b> ⋅10 <sup>-5</sup>	14,0	1,10.10-5	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	2,42	3,58
	Dag 2	2,00	1,45·10 <sup>-2</sup>	14,0	1,16·10 <sup>-2</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	0,34	3,58
	Dag 3	2,00	3,71·10 <sup>-5</sup>	14,0	2,01·10 <sup>-5</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	1,13	3,58
Elacridar	Dag 1	1,00	5,02	14,0	2,13	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	1,81	3,58
	Dag 2	1,00	13,4	14,0	8,05	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	0,88	3,58
	Dag 3	1,00	2,82	10,0	1,42	6,00	1,00·10 <sup>4</sup>	1,48	4,53
Erlotinib	Dag 1	2,00	4,01·10 <sup>-6</sup>	14,0	2,05·10 <sup>-6</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	1,28	3,58
	Dag 2	2,00	1,13·10 <sup>-5</sup>	14,0	9,40·10 <sup>-5</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	0,27	3,58
	Dag 3	2,00	4 <i>,</i> 38·10⁻⁵	14,0	1,62·10 <sup>-5</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	2,27	3,58
Loperamide	Dag 1	2,00	5,18·10 <sup>-6</sup>	14,0	1,74·10 <sup>-6</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	2,65	3,58
	Dag 2	2,00	5,08·10 <sup>-4</sup>	14,0	2,78·10 <sup>-4</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	1,10	3,58
	Dag 3	2,00	1,08·10 <sup>-5</sup>	14,0	3,00·10 <sup>-6</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	3,45	3,58
Riluzole	Dag 1	1,00	1,85	14,0	1,22	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	0,69	3,58
	Dag 2	1,00	1,71	14,0	1,22	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	0,53	3,58
	Dag 3	1,00	1,32	10,0	8,96·10 <sup>-1</sup>	6,00	1,00·10 <sup>4</sup>	0,71	4,53
Tariquidar	Dag 1	1,00	0,165	12,0	0,124	7,00	1,00·10 <sup>4</sup>	0,46	3,97
	Dag 2	1,00	3,72·10 <sup>-1</sup>	12,0	1,30·10 <sup>-1</sup>	7,00	1,00·10 <sup>4</sup>	2,61	3,97
	Dag 3	1,00	2,66·10 <sup>-1</sup>	10,0	2,20·10 <sup>-1</sup>	6,00	1,00·10 <sup>4</sup>	0,32	4,53
Vemurafenib	Dag 1	2,00	2,81·10 <sup>-6</sup>	14,0	1,38·10 <sup>-6</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	1,39	3,58
	Dag 2	2,00	8,69·10 <sup>-6</sup>	14,0	3,85·10 <sup>-6</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	1,67	3,58
	Dag 3	2,00	1,06.10-5	14,0	4,57·10 <sup>-6</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	1,74	3,58
Verapamil	Dag 1	2,00	2,14·10 <sup>-6</sup>	14,0	1,02·10 <sup>-6</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	1,46	3,58
·	Dag 2	2,00	4,83·10 <sup>-6</sup>	14,0	1,60·10 <sup>-6</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	2,69	3,58
	Dag 3	2.00	2.66·10 <sup>-1</sup>	10.0	2.20·10 <sup>-1</sup>	6.00	1.00.104	0.316	4.53

# Bijlage VI. Resultaten uit SPSS voor de bepaling van de t-toets voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil

Analiet		Intercept (α)	, BI	(95%)	Helling (β)		BI (95%)
Docetaxel	Dag 1	8,27·10 <sup>-4</sup>	-6,68·10 <sup>-2</sup>	6,84·10 <sup>-2</sup>	1,00	0,973	1,03
	Dag 2	-1,20·10 <sup>-3</sup>	-9,40·10 <sup>-2</sup>	9,16·10 <sup>-2</sup>	1,00	0,963	1,04
	Dag 3	-7,37·10 <sup>-4</sup>	-9,00·10 <sup>-2</sup>	8,85·10 <sup>-2</sup>	1,00	0,964	1,04
Elacridar	Dag 1	2,16·10 <sup>-3</sup>	-0,180	0,184	1,00	0,987	1,01
	Dag 2	0,178	-0,138	0,495	0,999	0,977	1,02
	Dag 3	-1,13·10 <sup>-3</sup>	-0,212	0,210	1,00	0,969	1,03
Erlotinib	Dag 1	-1,21·10 <sup>-3</sup>	-3,59·10 <sup>-2</sup>	3,35·10 <sup>-2</sup>	1,00	0,987	1,01
	Dag 2	-1,11·10 <sup>-3</sup>	-5,37·10 <sup>-2</sup>	5,15·10 <sup>-2</sup>	1,00	0,979	1,02
	Dag 3	-6,94·10 <sup>-4</sup>	-0,122	0,120	1,00	0,952	1,05
Loperamide	Dag 1	2,72·10 <sup>-3</sup>	-6,72·10 <sup>-2</sup>	7,26·10 <sup>-2</sup>	0,999	0,971	1,03
	Dag 2	-7,84·10 <sup>-2</sup>	-0,166	9,22·10 <sup>-3</sup>	1,01	0,972	1,04
	Dag 3	-2,03·10 <sup>-3</sup>	-9,71·10 <sup>-2</sup>	9,30·10 <sup>-2</sup>	1,00	0,962	1,04
Riluzole	Dag 1	-1,90·10 <sup>-3</sup>	-0,272	0,268	1,00	0,982	1,02
	Dag 2	1,67·10 <sup>-3</sup>	-0,214	0,218	0,999	0,984	1,01
	Dag 3	8,32·10 <sup>-4</sup>	-0,267	0,269	0,999	0,960	1,04
Tariquidar	Dag 1	-9,20·10 <sup>-4</sup>	-0,158	0,156	1,00	0,985	1,02
	Dag 2	-4,17·10 <sup>-3</sup>	-0,249	0,241	1,00	0,977	1,03
	Dag 3	-2,80·10 <sup>-4</sup>	-0,290	0,289	1,00	0,958	1,04
Vemurafenib	Dag 1	-2,24·10 <sup>-4</sup>	-4,93·10 <sup>-2</sup>	4,88·10 <sup>-2</sup>	1,00	0,980	1,02
	Dag 2	-2,88·10 <sup>-3</sup>	-7,62·10 <sup>-2</sup>	7,04·10 <sup>-2</sup>	1,00	0,971	1,03
	Dag 3	-2,21·10 <sup>-3</sup>	-0,107	0,103	1,00	0,958	1,04
Verapamil	Dag 1	8,37·10 <sup>-6</sup>	-3,07·10 <sup>-2</sup>	3,07·10 <sup>-2</sup>	0,999	0,987	1,01
	Dag 2	-1,39·10 <sup>-3</sup>	-4,47·10 <sup>-2</sup>	4,19·10 <sup>-2</sup>	1,00	0,983	1,02
	Dag 3	-3,41·10 <sup>-3</sup>	-0,210	0,203	1,00	0,971	1,03

 Tabel 44 | Resultaten van de t-toets van de kalibratielijnen in humaan plasma voor alle analieten.

# Bijlage VII. Resultaten van de juistheid voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in humaan plasma

Analiet	OC (nM)	GM (nM)	Stdev. (%)	Juistheid (%)
Docetaxel	5,00	4,86	8,97	97,2
	25,0	24,7	8,06	98,8
	100	94,8	6,34	94,8
Elacridar	5,00	4,43	4,88	88,5
	25,0	21,9	6,41	87,4
	100	92,9	8,76	92,9
Erlotinib	5,00	4,61	6,64	92,2
	25,0	23,5	5,69	94,0
	100	90,8	4,40	90,8
Loperamide	5,00	4,96	6,97	99,2
	25,0	24,9	6,98	99,7
	100	95,5	4,72	95,5
Riluzole	5,00	4,94	5,96	98,8
	25,0	24,2	7,06	96,8
	100	90,9	5,35	90,9
Tariquidar	5,00	5,25	9,32	105
	25,0	27,4	9,13	109
	100	106	6,93	106
Vemurafenib	5,00	4,44	11,3	88,8
	25,0	22,4	5,40	89,7
	100	90,8	6,96	90,8
Verapamil	5,00	4,83	6,35	96,6
	25,0	24,6	6,39	98,4
	100	94,5	4,21	94,5

Tabel 451 Resultaten van de juistheid van OC 5 nM. OC 25 nM. OC 100 nM voor alle analieten.

## Bijlage VIII. Resultaten uit SPSS voor bepaling van de precisie voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib, Verapamil in humaan plasma

	QC (nM)	MS <sub>WG</sub>	MS <sub>BG</sub>	GM (nM)	n	Herhaalbaarheid	Reproduceerbaarheid
						(%)	(%)
Docetaxel	5,00	0,067	1,21	4,86	6,00	5,33	8,97
	25,0	1,09	26,3	24,7	6,00	4,23	8,29
	100	18,6	202	94,8	6,00	4,55	5,83
Elacridar	5,00	0,478	0,533	4,43	6,00	15,6	2,17
	25,0	0,322	19,4	21,9	6,00	2,59	8,15
	100	128	1,18·10 <sup>3</sup>	92,9	6,00	12,2	14,2
Erlotinib	5,00	0,021	0,780	4,61	6,00	3,12	7,71
	25,0	0,139	16,2	23,5	6,00	1,59	6,96
	100	11,1	81,8	90,8	6,00	3,67	3,78
Loperamide	5,00	0,014	0,930	4,96	6,00	2,35	7,88
	25,0	0,159	24,7	24,9	6,00	1,60	8,12
	100	8,09	128	95,5	6,00	2,98	4,69
Riluzole	5,00	0,046	0,410	4,94	6,00	4,35	4,99
	25,0	0,377	23,7	24,2	6,00	2,54	8,14
	100	8,51	179	90,9	6,00	3,21	5,87
Tariquidar	5,00	0,090	1,17	5,25	6,00	5,71	8,09
	25,0	1,11	35,9	27,4	6,00	3,86	8,80
	100	8,85	341	106	6,00	2,82	7,06
Vemurafenib	5,00	0,223	1,02	4,44	6,00	10,6	8,20
	25,0	1,20	6,48	22,4	6,00	4,88	4,19
	100	16,6	287	90,8	6,00	4,49	7,39
Verapamil	5,00	0,009	0,788	4,83	6,00	1,98	7,46
	25,0	0,144	20,6	24,6	6,00	1,54	7,51
	100	8,51	86,8	94,5	6,00	3,08	3,82

#### Bijlage IX. Kalibratielijnen van Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil voor de bepaling van de recovery en de ion suppressie



**Figuur 48a|** Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Docetaxel geanalyseerd op dag 1.

Kalibratielijn in AS:  $2,26 \cdot 10^2 x$  ( $\pm 8,71 \cdot 10^1$ ) +  $1,29 \cdot 10^3$  ( $\pm 2,16 \cdot 10^2$ ),  $R^2=0,980$ . Kalibratielijn in plasma:  $1,93 \cdot 10^3 x$  ( $\pm 7,12 \cdot 10^1$ ) +  $6,06 \cdot 10^2$ ( $\pm 1,76 \cdot 10^2$ ),  $R^2=0,981$ . Gespikte kalibratielijn:  $1,74 \cdot 10^3 x$  ( $\pm 8,48 \cdot 10^2$ ) +  $8,60 \cdot 10^3$  ( $\pm 2,10 \cdot 10^2$ ),  $R^2=0,968$ .



Concentratie (nM)

**Figuur 48c** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Docetaxel geanalyseerd op dag 3.* 

Kalibratielijn in AS:  $2,54 \cdot 10^3 x (\pm 5,40 \cdot 10^1) + 1,87 \cdot 10^3 (\pm 1,34 \cdot 10^2)$ ,  $R^2=0,994$ . Kalibratielijn in plasma:  $1,73 \cdot 10^3 x (\pm 9,32 \cdot 10^1) + 1,69 \cdot 10^3 (\pm 2,24 \cdot 10^2)$ ,  $R^2=0,964$ . Gespikte kalibratielijn:  $2,02 \cdot 10^3 x (\pm 1,37 \cdot 10^2) + 3,19 \cdot 10^3 (\pm 3,39 \cdot 10^2)$ ,  $R^2=0,940$ .



**Figuur 49b** Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Elacridar geanalyseerd op dag 3.

Kalibratielijn in AS: 7,83·10<sup>3</sup>x (±1,76·10<sup>2</sup>) + 5,25·10<sup>4</sup> (±1,76·10<sup>2</sup>), R<sup>2</sup>=0,993. Kalibratielijn in plasma: 7,66·10<sup>3</sup>x (±2,60·10<sup>2</sup>) + 1,01·10<sup>4</sup> (±3,73·10<sup>3</sup>), R<sup>2</sup>=0,984. Gespikte kalibratielijn: 7,11·10<sup>3</sup>x (±1,51·10<sup>2</sup>) + 4,91·10<sup>4</sup> (±2,16·10<sup>3</sup>), R<sup>2</sup>=0,994.



**Figuur 48b** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Docetaxel geanalyseerd op dag 2.* 

Kalibratielijn in AS:  $2,51 \cdot 10^2 x$  ( $\pm \cdot 10^1$ ) +  $1,29 \cdot 10^3$  ( $\pm 2,16 \cdot 10^2$ ),  $R^2=0,980$ . Kalibratielijn in plasma:  $1,93 \cdot 10^3 x$  ( $\pm 7,12 \cdot 10^1$ ) +  $6,06 \cdot 10^2$ ( $\pm 1,76 \cdot 10^2$ ),  $R^2=0,981$ . Gespikte kalibratielijn:  $1,74 \cdot 10^3 x$  ( $\pm 8,48 \cdot 10^2$ ) +  $8,60 \cdot 10^3$  ( $\pm 2,10 \cdot 10^2$ ),  $R^2=0,968$ .



Concentratie (nM)

**Figuur 49a** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn* van Elacridar geanalyseerd op dag 2.

Kalibratielijn in AS: 7,62·10<sup>3</sup>x (±1,37·10<sup>2</sup>) + 4,70·10<sup>4</sup> (±1,97·10<sup>3</sup>),  $R^2$ =0,996. Kalibratielijn in plasma: 7,87·10<sup>3</sup>x (±1,48·10<sup>2</sup>) + 6,96·10<sup>3</sup> (±2,12·10<sup>3</sup>),  $R^2$ =0,995. Gespikte kalibratielijn: 6,46·10<sup>3</sup>x (±2,86·10<sup>2</sup>) + 4,84·10<sup>4</sup> (±4,10·10<sup>3</sup>),  $R^2$ =0,973.



**Figuur 50a**| *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Erlotinib geanalyseerd op dag 1.* 

Kalibratielijn in AS:  $1,33\cdot10^4x$  ( $\pm 3,70\cdot10^2$ ) +  $2,81\cdot10^3$  ( $\pm 9,17\cdot10^2$ ),  $R^2=0,989$ . Kalibratielijn in plasma:  $1,48\cdot10^4x$  ( $\pm 3,70\cdot10^2$ ) +  $3,35\cdot10^3$ ( $\pm 9,18\cdot10^2$ ),  $R^2=0,991$ . Gespikte kalibratielijn:  $1,25\cdot10^4x$  ( $\pm 2,18\cdot10^2$ ) +  $2,41\cdot10^3$  ( $\pm 5,41\cdot10^2$ ),  $R^2=0,996$ .



**Figuur 50b**| *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Erlotinib geanalyseerd op dag 2.* 

Kalibratielijn in AS:  $1,34\cdot10^4x$  ( $\pm 3,26\cdot10^2$ ) +  $2,65\cdot10^3$  ( $\pm 7,99\cdot10^2$ ),  $R^2=0,992$ . Kalibratielijn in plasma:  $1,53\cdot10^4x$  ( $\pm 4.83\cdot10^2$ ) +  $5.34\cdot10^3$ ( $\pm 1,20\cdot10^3$ ),  $R^2=0,986$ . Gespikte kalibratielijn:  $1,33\cdot10^4x$  ( $\pm 7,50\cdot10^2$ ) +  $7,75\cdot10^3$  ( $\pm 1,80\cdot10^3$ ),  $R^2=0,960$ .



**Figuur 51a** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Loperamide geanalyseerd op dag 1. Kalibratielijn in AS: 6,41·10<sup>4</sup>x (\pm1,92·10<sup>3</sup>) + 1,60·10<sup>4</sup> (\pm4,76·10<sup>3</sup>), R^{2}=0,988. Kalibratielijn in plasma: 5.89·10<sup>4</sup>x (\pm1,63·10<sup>2</sup>) + 1,38·10<sup>4</sup> (\pm4,04·10<sup>3</sup>), R^{2}=0,989. Gespikte kalibratielijn: 5,53·10<sup>4</sup>x (\pm1,76·10<sup>3</sup>) + 1,64·10<sup>4</sup> (\pm4,37·10<sup>3</sup>), R^{2}=0,986.* 



**Figuur 51c** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Loperamide geanalyseerd op dag 3. Kalibratielijn in AS: 6,66·10<sup>4</sup>x (±1,86·10<sup>3</sup>) + 2,31·10<sup>4</sup> (±4,60·10<sup>3</sup>), R^2=0,989. Kalibratielijn in plasma: 6,50·10<sup>4</sup>x (±1,28·10<sup>3</sup>) + 2,55·10<sup>4</sup> (±4,49·10<sup>3</sup>), R^2=0,989. Gespikte kalibratielijn: 6,02·10<sup>4</sup>x (±1,28·10<sup>3</sup>) + 3,43·10<sup>4</sup> (±3,18·10<sup>3</sup>), R^2=0,994.* 



**Figuur 50c** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Erlotinib geanalyseerd op dag 3.* 

Kalibratielijn in AS:  $1,39\cdot10^4x (\pm 3,04\cdot10^2) + 5,63\cdot10^3 (\pm 7,53\cdot10^2)$ ,  $R^2=0,993$ . Kalibratielijn in plasma:  $1,60\cdot10^4x (\pm 5,65\cdot10^2) + 1,31\cdot10^4 (\pm 1,40\cdot10^3)$ ,  $R^2=0,983$ . Gespikte kalibratielijn:  $1,43\cdot10^4x (\pm 8,39\cdot10^2) + 1,72\cdot10^4 (\pm 3,39\cdot10^2)$ ,  $R^2=0,992$ .



**Figuur 51b**| Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Loperamide geanalyseerd op dag 2. Kalibratielijn in AS:  $6,45 \cdot 10^4 x (\pm 1,85 \cdot 10^3) + 1,69 \cdot 10^4 (\pm 4,57 \cdot 10^3)$ ,  $R^2=0,989$ . Kalibratielijn in plasma:  $6,27 \cdot 10^4 x (\pm 1,90 \cdot 10^3) + 3,01 \cdot 10^4 (\pm 4,58 \cdot 10^3)$ ,  $R^2=0,988$ . Gespikte kalibratielijn:  $5,96 \cdot 10^4 x (\pm 2,41 \cdot 10^3) + 3,49 \cdot 10^4 (\pm 5,98 \cdot 10^3)$ ,  $R^2=0,978$ .



**Figuur 52a** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Riluzole geanalyseerd op dag 1.* Kalibratielijn in AS:  $2,29 \cdot 10^3 x (\pm 2,28 \cdot 10^1) + 8,94 \cdot 10^3 (\pm 3,28 \cdot 10^2)$ ,  $R^2=0,999$ . Kalibratielijn in plasma:  $2,44 \cdot 10^3 x (\pm 1,76 \cdot 10^2) + 8,92 \cdot 10^3 (\pm 2,53 \cdot 10^3)$ ,  $R^2=0,932$ . Gespikte kalibratielijn:  $2,21 \cdot 10^3 x (\pm 1,39 \cdot 10^2) + 6,27 \cdot 10^3 (\pm 2,00 \cdot 10^3)$ ,  $R^2=0,947$ .



Concentratie (nM)

**Figuur 52b** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte* kalibratielijn van Riluzole geanalyseerd op dag 2.

Kalibratielijn in AS: 2,66 $\cdot$ 10<sup>3</sup>x (±2,67 $\cdot$ 10<sup>1</sup>) + 7,48 $\cdot$ 10<sup>3</sup> (±3,83 $\cdot$ 10<sup>2</sup>), R<sup>2</sup>=0,999. Kalibratielijn in plasma: 2,77 $\cdot$ 10<sup>3</sup>x (±7,47 $\cdot$ 10<sup>2</sup>) + 9,77 $\cdot$ 10<sup>3</sup> (±1,28 $\cdot$ 10<sup>3</sup>), R<sup>2</sup>=0,992. Gespikte kalibratielijn: 2,36 $\cdot$ 10<sup>3</sup>x (±8,27 $\cdot$ 10<sup>2</sup>) + 1,57 $\cdot$ 10<sup>4</sup> (±1,40 $\cdot$ 10<sup>3</sup>), R<sup>2</sup>=0,986.



Concentratie (nM)

**Figuur 53a|** Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Tariquidar geanalyseerd op dag 1.

Kalibratielijn in AS:  $1,56\cdot10^3x (\pm 2,94\cdot10^1) + 1,20\cdot10^2 (\pm 2,94\cdot10^2)$ ,  $R^2=0,996$ . Kalibratielijn in plasma:  $1,43\cdot10^3x (\pm 4,23\cdot10^1) + 1,01\cdot10^3 (\pm 4,23\cdot10^2)$ ,  $R^2=0,990$ . Gespikte kalibratielijn:  $1,14\cdot10^3x (\pm 5,46\cdot10^1) + 1,17\cdot10^3 (\pm 5,46\cdot10^2)$ ,  $R^2=0,973$ .

AS

Plasma

Spike



Riluzole dag 3 6.0  $10^{5}$  AS 4.0  $10^{5}$  Plasma2.0  $10^{5}$  50 100 150 200 250

Concentratie (nM)

**Figuur 52c|** Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Riluzole geanalyseerd op dag 3. Kalibratielijn in AS: 2,74·10<sup>3</sup>x ( $\pm$ 2,76·10<sup>1</sup>) + 8,72·10<sup>3</sup> ( $\pm$ 3,97·10<sup>2</sup>), R<sup>2</sup>=0,999. Kalibratielijn in plasma: 1,48·10<sup>3</sup>x ( $\pm$ 1,10·10<sup>2</sup>) + 1,31·10<sup>4</sup> ( $\pm$ 1,36·10<sup>3</sup>), R<sup>2</sup>=0,933. Gespikte kalibratielijn: 2,22·10<sup>3</sup>x ( $\pm$ 3,15·10<sup>2</sup>) + 1,29·10<sup>4</sup> ( $\pm$ 4,52·10<sup>3</sup>), R<sup>2</sup>=0,997.



**Figuur 53b** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Tariquidar geanalyseerd op dag 2.* Kalibratielijn in AS:  $1,71\cdot10^3x (\pm 2,77\cdot10^1) - 7,24\cdot10^1 (\pm 2,77\cdot10^2)$ ,  $R^2=0,997$ . Kalibratielijn in plasma:  $1,62\cdot10^3x (\pm 4,39\cdot10^1) + 1,59\cdot10^3 (\pm 4,39\cdot10^2)$ ,  $R^2=0,991$ . Gespikte kalibratielijn:  $1,39\cdot10^3x (\pm 3,55\cdot10^1) + 1,03\cdot10^3 (\pm 3,55\cdot10^2)$ ,  $R^2=0,992$ .



**Figuur 53c|** Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Tariquidar geanalyseerd op dag 3.

Kalibratielijn in AS:  $1,94 \cdot 10^3 x (\pm 2,63 \cdot 10^1) + 4,72 \cdot 10^1 (\pm 2,63 \cdot 10^2)$ ,  $R^2=0,998$ . Kalibratielijn in plasma:  $1,78 \cdot 10^3 x (\pm 5,11 \cdot 10^1) + 1,52 \cdot 10^3 (\pm 5,11 \cdot 10^2)$ ,  $R^2=0,990$ . Gespikte kalibratielijn:  $1,47 \cdot 10^3 x (\pm 3,24 \cdot 10^1) + 1,06 \cdot 10^3 (\pm 3,24 \cdot 10^2)$ ,  $R^2=0,994$ .

**Figuur 54a** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Vemurafenib geanalyseerd op dag 1. Kalibratielijn in AS: 2,03·10<sup>3</sup>x (±1,69·10<sup>2</sup>) + 1,50·10<sup>3</sup> (±4,19·10<sup>2</sup>), R^2=0,911. Kalibratielijn in plasma: 2,28·10<sup>3</sup>x (±9,75·10<sup>1</sup>) - 8,82·10<sup>2</sup> (±2,42·10<sup>2</sup>), R^2=0,975. Gespikte kalibratielijn: 1,22·10<sup>3</sup>x (±7,08·10<sup>1</sup>) + 9,26·10<sup>2</sup> (±1,75·10<sup>2</sup>), R^2=0,955.* 



Concentratie (nM)

**Figuur 54b** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Vemurafenib geanalyseerd op dag 2. Kalibratielijn in AS: 2,17·10<sup>3</sup>x (\pm1,37·10<sup>2</sup>) + 2,02·10<sup>3</sup> (\pm3,39·10<sup>2</sup>), R^2=0,947. Kalibratielijn in plasma: 2,51·10<sup>3</sup>x (\pm1,22·10<sup>2</sup>) – 1,11·10<sup>3</sup> (\pm3,01·10<sup>2</sup>), R^2=0,968. Gespikte kalibratielijn: 1,26·10<sup>3</sup>x (\pm2,69·10<sup>1</sup>) + 2,56·10<sup>2</sup> (\pm6,65·10<sup>1</sup>), R^2=0,994.* 



**Figuur 54c** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Vemurafenib geanalyseerd op dag 3. Kalibratielijn in AS: 2,03·10<sup>3</sup>x (±1,31·10<sup>2</sup>) + 2,51·10<sup>3</sup> (±3,23·10<sup>2</sup>), R^2=0,941. Kalibratielijn in plasma: 2,38·10<sup>3</sup>x (±1,10·10<sup>2</sup>) + 1,32·10<sup>3</sup> (±2,65·10<sup>2</sup>), R^2=0,973. Gespikte kalibratielijn: 2,03·10<sup>3</sup>x (±3,34·10<sup>1</sup>) + 2,31·10<sup>2</sup> (±8,27·10<sup>1</sup>), R^2=0,996.* 





**Figuur 55a Kalib**ratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Verapamil geanalyseerd op dag 1.

Kalibratielijn in AS:  $4,13\cdot10^4x (\pm 1,27\cdot10^3) + 1,97\cdot10^4 (\pm 3,15\cdot10^3)$ ,  $R^2=0,987$ . Kalibratielijn in plasma:  $4,33\cdot10^4x (\pm 1,15\cdot10^3) + 1,88\cdot10^4 (\pm 2,85\cdot10^3)$ ,  $R^2=0,990$ . Gespikte kalibratielijn:  $3,97\cdot10^4x (\pm 1,16\cdot10^3) + 1,52\cdot10^4 (\pm 2,86\cdot10^3)$ ,  $R^2=0,988$ .



**Figuur 55c** *Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn* van Verapamil geanalyseerd op dag 3.

Kalibratielijn in AS:  $4,33\cdot10^4x (\pm 1,11\cdot10^3) + 1,91\cdot10^4 (\pm 2,76\cdot10^3)$ ,  $R^2=0,991$ . Kalibratielijn in plasma:  $4,55\cdot10^4x (\pm 1,36\cdot10^3) + 2,63\cdot10^4 (\pm 3,36\cdot10^3)$ ,  $R^2=0,988$ . Gespikte kalibratielijn:  $3,53\cdot10^4x (\pm 9,65\cdot10^3) + 9,35\cdot10^4 (\pm 2,39\cdot10^4)$ ,  $R^2=0,489$ . **Figuur 55b|** Kalibratielijn in AS, plasma en de gespikte kalibratielijn van Verapamil geanalyseerd op dag 2.

Kalibratielijn in AS:  $4,26 \cdot 10^4 x (\pm 1,12 \cdot 10^3) + 1,45 \cdot 10^4 (\pm 2,78 \cdot 10^3)$ ,  $R^2=0,990$ . Kalibratielijn in plasma:  $4,36 \cdot 10^4 x (\pm 1,09 \cdot 10^3) + 2,01 \cdot 10^4 (\pm 2,70 \cdot 10^3)$ ,  $R^2=0,991$ . Gespikte kalibratielijn:  $4,26 \cdot 10^4 x (\pm 2,46 \cdot 10^3) + 2,43 \cdot 10^4 (\pm 6,09 \cdot 10^3)$ ,  $R^2=0,955$ .

Bijlage Xa. Resultaten van d	e bepaling van	de stabiliteit in de	e biologische matrix
------------------------------	----------------	----------------------	----------------------

Tabel 47a   Resultaten van de bepaling van de stabiliteit in de biologische matrix bewaard op ijs.								
Analiet	QC (nM)	GM (nM)	Stdev.	DEV (%)	RSD (%)			
Docetaxel	5,00	4,81	0,084	-3,85	1,75			
	25,0	24,3	0,661	-3,00	2,72			
	100	88,5	0,876	-11,5	0,99			
Elacridar	5,00	4,88	0,057	-2,35	1,18			
	25,0	25,1	0,529	0,400	2,11			
	100	94,1	1,91	-5,88	2,03			
Erlotinib	5,00	4,50	0,078	-9,95	1,72			
	25,0	22,9	0,450	-8,30	1,96			
	100	88,9	4,96	-11,1	5,58			
Loperamide	5,00	4,85	0,091	-3,00	1,87			
	25,0	25,1	0,275	0,500	1,10			
	100	90,1	1,89	-9,93	2,10			
Riluzole	5,00	4,73	0,169	-5 <i>,</i> 50	3,59			
	25,0	24,1	0,435	-3,70	1,81			
	100	90,7	2,52	-9,28	2,78			
Tariquidar	5,00	4,94	0,250	-1,15	5,06			
	25,0	24,9	1,08	-0,60	4,34			
	100	86,4	1,47	-13,6	1,70			
Vemurafenib	5,00	4,86	0,237	-2,80	4,88			
	25,0	23,3	1,23	-6,70	5,26			
	100	86,7	2,12	-13,3	2,45			
Verapamil	5,00	4,95	0,185	-1,10	3,75			
	25,0	24,1	0,359	-3,50	1,49			
	100	90,7	3,19	-9,35	3,52			

 Tabel 47b|
 Resultaten van de bepaling van de stabiliteit in de biologische matrix niet bewaard op ijs.

Analiet	QC (nM)	GM (nM)	Stdev.	DEV (%)	RSD (%)
Docetaxel	5,00	4,82	0,293	-3,65	6,08
	25,0	23,7	1,82	-5,30	7,71
	100	97,6	1,10	-2,40	1,13
Elacridar	5,00	5,31	0,228	6,20	4,29
	25,0	26,3	0,457	5,30	1,74
	100	99,6	0,616	-0,40	0,62
Erlotinib	5,00	5,09	0,102	1,80	2,01
	25,0	24,9	0,693	-0,40	2,78
	100	90,4	1,98	-9,58	2,19
Loperamide	5,00	5,28	0,112	5,60	2,11
	25,0	25,8	0,427	3,30	1,65
	100	96,5	2,14	-3,47	2,22
Riluzole	5,00	5,22	0,099	4,40	1,89
	25,0	24,9	0,238	-0,60	0,96
	100	94,8	1,46	-5,18	1,54
Tariquidar	5,00	5,29	0,271	5,80	5,11
	25,0	25,4	1,16	1,50	4,57
	100	96,4	2,97	-3,63	3,08
Vemurafenib	5,00	4,97	0,119	-0,60	2,40
	25,0	23,6	0,915	-5,80	3,88
	100	92,7	2,53	-7,30	2,73
Verapamil	5,00	5,29	0,060	5,80	1,13
	25,0	25,8	0,419	3,30	1,62
	100	96,3	1,16	-3,75	1,20

### Bijlage Xb. Resultaten van de bepaling van de stabiliteit van Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil na een aantal vries-en-dooi cycli

Analiet	Aantal cycli	GM (nM)	Stdev.	DEV (%)	RSD (%)
Docetaxel	1,00	5,09	0,297	1,70	5,84
	2,00	5,13	0,183	2,50	3,56
	3,00	5,11	0,324	2,10	6,34
	4,00	4,87	0,323	-2,65	6,63
Elacridar	1,00	5,95	0,143	19,0	2,40
	2,00	5,88	0,099	17,5	1,68
	3,00	5,81	0,125	16,2	2,15
	4,00	5,96	0,120	19,1	2,01
Erlotinib	1,00	5,30	0,139	5,90	2,62
	2,00	5,47	0,059	9,35	1,08
	3,00	5,31	0,120	6,15	2,27
	4,00	5,34	0,100	6,80	1,88
Loperamide	1,00	5,67	0,104	13,3	1,84
	2,00	5,59	0,081	11,8	1,45
	3,00	5,50	0,022	10,1	0,40
	4,00	5,63	0,021	12,5	0,37
Riluzole	1,00	5,51	0,140	10,1	2,55
	2,00	5,64	0,096	12,8	1,70
	3,00	5,57	0,213	11,3	3,83
	4,00	5,63	0,136	12,5	2,42
Tariquidar	1,00	5,51	0,132	10,2	2,39
	2,00	5,40	0,115	7,95	2,13
	3,00	5,39	0,165	7,70	3,06
	4,00	5,17	0,063	3,45	1,22
Vemurafenib	1,00	5,28	0,222	5,50	4,22
	2,00	5,41	0,113	8,15	2,09
	3,00	5,44	0,168	8,75	3,08
	4,00	5,24	0,103	4,85	1,97
Verapamil	1,00	5,38	0,104	7,65	1,93
	2,00	5,35	0,031	6,90	0,58
	3,00	5,38	0,074	7,65	1,38
	4,00	5,31	0,142	6,10	2,67

Analiet	Aantal cycli	GM (nM)	Stdev.	DEV (%)	RSD (%)
Docetaxel	1,00	25,1	1,19	0,40	4,74
	2,00	24,8	1,44	-1,00	5,80
	3,00	25,6	1,07	2,30	4,19
	4,00	24,8	0,797	-0,90	3,22
Elacridar	1,00	28,6	0,497	14,4	1,74
	2,00	27,5	0,171	10,1	0,620
	3,00	27,5	0,772	10,1	2,80
	4,00	28,1	0,299	12,3	1,06
Erlotinib	1,00	25,6	0,568	2,50	2,22
	2,00	25,3	0,435	1,30	1,72
	3,00	25,2	0,359	0,70	1,43
	4,00	25,3	0,440	1,20	1,74
Loperamide	1,00	27,3	0,443	9,00	1,63
	2,00	26,3	0,299	5,30	1,13
	3,00	26,6	0,222	6,50	0,833
	4,00	26,7	0,392	6,80	1,47
Riluzole	1,00	27,4	0,568	9,70	2,07
	2,00	26,4	0,096	5,70	0,362
	3,00	26,8	0,436	7,00	1,63
	4,00	26,7	0,862	6,70	3,23
Tariquidar	1,00	26,3	1,06	5,20	4,01
	2,00	26,2	1,38	4,70	5,26
	3,00	25,2	0,572	0,80	2,27
	4,00	25,9	0,299	3,50	1,15
Vemurafenib	1,00	26,3	0,698	5,20	2,65
	2,00	25,0	0,420	-0,20	1,68
	3,00	25,5	0,271	2,00	1,06
	4,00	25,3	0,216	1,20	0,854
Verapamil	1,00	26,2	0,877	4,90	3,34
	2,00	25,7	0,222	2,70	0,864
	3,00	26,1	0,370	4,20	1,42
	4,00	26,0	0,275	4,10	1,06

 Tabel 48b|
 Resultaten van de bepaling van de stabiliteit na een aantal vries-en-dooi cycli voor QC 25 nM.

Analiet	Aantal cycli	GM (nM)	Stdev.	DEV (%)	RSD (%)
Docetaxel	1,00	93,5	3,18	-6,55	3,40
	2,00	96,7	2,91	-3,27	3,01
	3,00	100	2,92	-0,025	2,92
	4,00	98,1	4,63	-1,90	4,72
Elacridar	1,00	105	1,29	4,50	1,24
	2,00	105	0,957	4,75	0,914
	3,00	108	4,51	7,50	4,19
	4,00	108	0,957	8,25	0,884
Erlotinib	1,00	95,3	0,532	-4,75	0,559
	2,00	95,3	1,93	-4,75	2,03
	3,00	99,0	1,42	-0,975	1,44
	4,00	97,3	1,84	-2,70	1,89
Loperamide	1,00	96,5	0,503	-3,50	0,522
	2,00	98,3	2,30	-1,72	2,34
	3,00	103	1,00	2,50	0,976
	4,00	101	2,41	1,30	2,38
Riluzole	1,00	97,4	0,403	-2,63	0,414
	2,00	99,5	1,72	-0,475	1,72
	3,00	104	1,00	3,50	0,966
	4,00	100	3,03	0,175	3,03
Tariquidar	1,00	92,6	2,44	-7,45	2,64
	2,00	93,8	0,660	-6,18	0,704
	3,00	100	3,07	-0,375	3,08
	4,00	99,5	6,62	-0,550	6,65
Vemurafenib	1,00	94,8	0,403	-5,23	0,43
	2,00	94,6	2,63	-5,43	2,78
	3,00	96,8	1,68	-3,18	1,74
	4,00	98,0	0,640	-1,98	0,653
Verapamil	1,00	98,7	1,12	-1,30	1,14
	2,00	97,4	1,89	-2,58	1,94
	3,00	102	1,86	1,97	1,83
	4,00	101	2,14	0,800	2,12

 Tabel 48c|
 Resultaten van de bepaling van de stabiliteit na een aantal vries-en-dooi cycli voor QC 100 nM.

#### Bijlage Xc. Grafieken van de stabiliteit in de opgewerkte monsters van Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil



**Figuur 56a** Stabiliteit van Docetaxel met een concentratie van 5 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.







**Figuur 56c** Stabiliteit van Docetaxel met een concentratie van 100 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden



**Figuur 57a** Stabiliteit van Erlotinib met een concentratie van 5 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



1 4 Aantal dagen 7 29 **Figuur 57b|** *Stabiliteit van Erlotinib met een concentratie van 25 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.* 



**Figuur 57c** Stabiliteit van Erlotinib met een concentratie van 100 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 58a** Stabiliteit van Loperamide met een concentratie van 5 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 58b** Stabiliteit van Loperamide met een concentratie van 25 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden



**Figuur 58c** *Stabiliteit van Loperamide met een concentratie van 100 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.* 



**Figuur 59a** Stabiliteit van Riluzole met een concentratie van 5 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 59b** Stabiliteit van Riluzole met een concentratie van 25 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 59c|** *Stabiliteit van Riluzole met een concentratie van 100 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.* 



**Figuur 60a** Stabiliteit van Tariquidar met een concentratie van 5 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 60b** Stabiliteit van Tariquidar met een concentratie van 25 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 60c** Stabiliteit van Tariquidar met een concentratie van 100 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 61a** Stabiliteit van Vemurafenib met een concentratie van 5 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 61b** Stabiliteit van Vemurafenib met een concentratie van 25 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 61c** Stabiliteit van Vemurafenib met een concentratie van 100 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 62a** Stabiliteit van Verapamil met een concentratie van 5 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 62b** Stabiliteit van Verapamil met een concentratie van 25 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.



**Figuur 62c** Stabiliteit van Verapamil met een concentratie van 100 nM in de opgewerkte monsters bewaard onder verschillende omstandigheden.

### Bijlage XI. Resultaten van de juistheid voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in muizenplasma

Analiet	QC (nM)	GM (nM)	Juistheid (%)	Stdev. (%)
Docetaxel	5,00	5,29	106	8,22
	25,0	29,5	118	2,85
	100	109	109	3,33
Elacridar	5,00	4,83	96,5	3,36
	25,0	23,0	92,0	0,72
	100	88,3	88,3	1,82
Erlotinib	5,00	4,68	93,6	0,96
	25,0	24,4	97,5	1,26
	100	92,6	92,6	1,20
Loperamide	5,00	4,99	99,8	1,13
	25,0	26,5	106	1,15
	100	99,3	99,3	1,92
Riluzole	5,00	4,38	87,7	3,08
	25,0	24,5	97,9	2,34
	100	92,6	92,6	1,97
Tariquidar	5,00	6,51	130	5,69
	25,0	34,9	139	3,54
	100	132	132	3,08
Vemurafenib	5,00	4,95	99,0	1,43
	25,0	26,0	104	2,17
	100	91,1	91,1	1,98
Verapamil	5,00	4,36	87,2	5,16
	25,0	24,2	96,8	3,21
	100	98,7	98,7	1,11

Tabel 49 | Resultaten van de juistheid in muizenplasma.

### Bijlage XII. Resultaten van de precisie voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in muizenplasma

Tabel 50 Resultaten van de bepaling van de precisie voor QC 5 nM, QC 25 nM en QC 100 nM met een BI van 95%						
Analiet	QC (nM)	Gemiddelde (nM)	95% BI (nM)	DEV (%)	RSD (%)	
Docetaxel	5,00	5,29	4,86 – 5,72	5,77	7,77	
	25,0	29,5	28,8 - 30,3	18,1	2,41	
	100	109	106 - 113	9,33	3,04	
Elacridar	5,00	4,83	4,65 – 5,00	-3,47	3,47	
	25,0	23,0	22,8 – 23,2	-8,00	0,788	
	100	88,3	86,4 - 90,2	-11,7	2,06	
Erlotinib	5,00	4,68	4,63 – 4,73	-6,43	1,02	
	25,0	24,4	24,0 - 24,7	-2,53	1,29	
	100	92,6	91,4 – 93,9	-7,38	1,29	
Loperamide	5,00	4,99	4,93 – 5,05	-0,167	1,13	
	25,0	26,5	26,2 – 26,8	5,80	1,09	
	100	99,3	97,3 – 101	-0,733	1,93	
Riluzole	5,00	4,38	4,22 – 4,55	-12,3	3,51	
	25,0	24,5	23,9 – 25,1	-2,07	2,39	
	100	92,6	90,5 – 94,6	-7,45	2,13	
Tariquidar	5,00	6,51	6,21 – 6,80	30,1	4,37	
	25,0	34,9	33,9 – 35,8	39,5	2,54	
	100	132	129 – 136	32,3	2,33	
Vemurafenib	5,00	4,36	4,09 - 4,63	-12,8	5,91	
	25,0	24,2	23,4 - 25,0	-3,20	2,24	
	100	91,1	89,1 - 93,2	-8,87	2,18	
Verapamil	5,00	4,95	4,87 – 5,02	-1,03	1,45	
	25,0	26,0	25,4 – 26,5	3,87	3,09	
	100	98,7	97,5 – 99,8	-1,32	1,12	

### Bijlage XIII. Kalibratielijnen van Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil in hersenhomogenaat



**Figuur 63** | Kalibratielijn in hersenhomogenaat van Docetaxel geanalyseerd op één dag.

 $y=2,79\cdot10^{-2}x (\pm 5,74\cdot10^{-4}) + 1,95\cdot10^{-3} (\pm 1,42\cdot10^{-3}), R^2=0,994.$ 



Figuur 65 | Kalibratielijn in hersenhomogenaat van Loperamide geanalyseerd op één dag.

 $y=1,87\cdot10^{-2}x(\pm 2,71\cdot10^{-4})+1,55\cdot10^{-3}(\pm 6,72\cdot10^{-4}), R^2=0,997.$ 



**Figuur 67** *Kalibratielijn in hersenhomogenaat van Tariquidar* geanalyseerd op één dag.

 $y=1,03\cdot10^{-2}x(\pm 2,42\cdot10^{-4})+5,73\cdot10^{-3}(\pm 3,48\cdot10^{-3}), R^{2}=0,992.$ 



**Figuur 64** *Kalibratielijn in hersenhomogenaat van Erlotinib* geanalyseerd op één dag.

 $y = 2,91 \cdot 10^{-2} x \ (\pm 3,58 \cdot 10^{-4}) + 3,58 \cdot 10^{-3} \ (\pm 8,87 \cdot 10^{-4}), \ R^2 = 0,998.$ 



**Figuur 66** *Kalibratielijn in hersenhomogenaat van Riluzole geanalyseerd op één dag.* 

 $y{=}{-}1{,}14{\cdot}10^{-5}x^2$  (±8,66 ${\cdot}10^{-6})$  + 2,20 ${\cdot}10^{-2}$  x (±1,39 ${\cdot}10^{-3})$  + 4,92 ${\cdot}10^{-2}$  (±9,07 ${\cdot}10^{-3}),$   $R^2{=}0{,}990.$ 



**Figuur 68** *Kalibratielijn in hersenhomogenaat van Vemurafenib geanalyseerd op één dag. y=-1,05·10<sup>-5</sup>x<sup>2</sup> (±1,13·10<sup>-5</sup>) + 1,79·10<sup>-2</sup> x (±1,13·10<sup>-3</sup>) + 2,25·10<sup>-3</sup> (±2,25·10<sup>-3</sup>), R<sup>2</sup>=0,973.* 



 Figuur 69|
 Kalibratielijn in hersenhomogenaat van Verapamil

 geanalyseerd op één dag.
  $y=2,47\cdot10^{-2}x (\pm 3,63\cdot10^{-4}) + 2,52\cdot10^{-3} (\pm 8,99\cdot10^{-4}), R^2=0,997.$ 

## *Bijlage XIV. Resultaten uit SPSS voor de bepaling van de LOF-toets en de t-toets voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil*

 Tabel 51 | Resultaten uit SPSS voor de bepaling van de LOF in hersenhomogenaat voor alle analieten.

Analiet	1/x <sup>pv</sup>	SSr	dfr	SS <sub>pe</sub>	$Df_{pe}$	Factor	FLOF	F <sub>(α=0,05)</sub> (6,8) /(5,6)
Docetaxel	2,00	4,86·10 <sup>-5</sup>	14,0	2,46·10 <sup>-5</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	1,30	3,58
Elacridar	1,00	49,9	14,0	18,1	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	2,34	3,58
Erlotinib	2,00	1,99·10 <sup>-5</sup>	14,0	5 <i>,</i> 68·10⁻ <sup>6</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	3,33	3,58
Loperamide	2,00	1,22·10 <sup>-5</sup>	14,0	4,50·10 <sup>-6</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	2,30	3,58
Riluzole	1,00	14,7	11,0	3,50	6,00	1,00·10 <sup>4</sup>	3,84	4,39
Tariquidar	1,00	5,83	14,0	2,29	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	2,06	3,58
Vemurafenib	2,00	9,10·10 <sup>-6</sup>	11,0	3,44·10 <sup>-6</sup>	6,00	1,00·10 <sup>4</sup>	1,97	4,39
Verapamil	2,00	1,94·10 <sup>-5</sup>	14,0	7,57·10 <sup>-6</sup>	8,00	1,00·10 <sup>4</sup>	2,09	3,58

 Tabel 52 | Resultaten van de T-toets van de kalibratielijnen in hersenhomogenaat voor alle analieten.

Analiet	Intercept (α)	BI (	95%)	Helling (β)	BI	(95%)
Docetaxel	-4,63·10 <sup>-4</sup>	-0,111	0,110	1,00	0,956	1,05
Elacridar	-1,96·10 <sup>-3</sup>	-0,556	0,552	1,00	0,962	1,04
Erlotinib	1,50·10 <sup>-3</sup>	-0,065	6,78·10 <sup>-2</sup>	1,00	0,974	1,03
Loperamide	-1,01·10 <sup>-3</sup>	-8,01·10 <sup>-2</sup>	7,80·10 <sup>-2</sup>	0,999	0,968	1,03
Riluzole	-3,00·10 <sup>-3</sup>	-1,22	1,21	1,00	0,951	1,05
Tariquidar	4,70·10 <sup>-4</sup>	-0,720	0,721	1,00	0,950	1,05
Vemurafenib	-2,19·10 <sup>-3</sup>	-0,254	0,249	0,999	0,958	1,04
Verapamil	-1,01·10 <sup>-3</sup>	-8,20·10 <sup>-2</sup>	8,00·10 <sup>-2</sup>	1,00	0,968	1,03

### Bijlage XV. Resultaten van de juistheid voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in hersenhomogenaat

Analiet	QC (nM)	GM (nM)	Juistheid (%)	Stdev. (%)
Docetaxel	5,00	5,10	102	10,9
	25,0	25,4	102	11,0
	100	96,0	96,0	4,41
Elacridar	5,00	5,64	113	15,9
	25,0	25,0	100	11,4
	100	94,9	94,9	3,07
Erlotinib	5,00	4,80	96,0	9,86
	25,0	23,9	95,4	11,8
	100	90,9	90,9	3,54
Loperamide	5,00	5,01	100	10,4
	25,0	24,5	98,1	11,5
	100	92,5	92,5	3,39
Riluzole	5,00	5,53	111	20,7
	25,0	25,2	101	15,9
	100	95,0	95,0	3,10
Tariquidar	5,00	5,59	112	22,1
	25,0	27,4	110	14,3
	100	101	101	3,72
Vemurafenib	5,00	4,95	99,0	15,4
	25,0	24,2	96,7	14,4
	100	92,7	92,7	4,83
Verapamil	5,00	5,13	103	10,9
	25,0	24,7	98,7	13,5
	100	94,5	94,5	3,79

 Tabel 531 Resultaten van de juistheid in hersenhomogenaat

# Bijlage XVI. Resultaten van de precisie voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Tariquidar, Vemurafenib en Verapamil in hersenhomogenaat

Tabel 54   Resultaten van de bepaling van de precisie voor QC 5 nM, QC 25 nM en QC 100 nM met een BI van 95%.						
Analiet	QC (nM)	Gemiddelde (nM)	95% BI (nM)	DEV (%)	RSD (%)	
Docetaxel	5,00	5,10	4,53 – 5,68	2,07	10,7	
	25,0	25,4	22,6 – 28,3	1,73	10,8	
	100	96,0	91,3 – 101	-4,05	4,59	
Elacridar	5,00	5,64	4,80 – 6,47	12,7	14,1	
	25,0	25,0	22,0 – 28,0	0,133	11,4	
	100	94,9	91,7 - 98,1	-5,08	3,24	
Erlotinib	5,00	4,80	4,28 – 5,32	-4,03	10,3	
	25,0	23,9	20,8 – 26,9	-4,60	12,3	
	100	90,9	87,2 – 94,6	-9,10	3,90	
Loperamide	5,00	5,01	4,46 – 5,55	0,133	10,4	
	25,0	24,5	21,5 – 27,5	-1,93	11,7	
	100	92,5	88,9 – 96,1	-7,50	3,67	
Riluzole	5,00	5,53	4,45 – 6,62	10,7	18,7	
	25,0	25,2	21,1 – 29,4	0,933	15,7	
	100	95,0	91,7 – 98,2	-5,05	3,26	
Tariquidar	5,00	5,59	4,43 – 6,75	11,8	19,7	
	25,0	27,4	23,7 – 31,2	9,60	13,1	
	100	101	97,1 – 105	1,02	3,68	
Vemurafenib	5,00	4,95	4,14 – 5,76	-1,00	15,6	
	25,0	24,2	20,4 – 28,0	-3,27	14,9	
	100	92,7	87,6 – 97,7	-7,35	5,22	
Verapamil	5,00	5,13	4,56 - 5,70	2,53	10,6	
	25,0	24,7	21,1 - 28,2	-1,27	13,7	
	100	94,5	90,5 - 98,5	-5,50	4,01	

# *Bijlage XVII. Resultaten van het in vivo experiment met KO muizen voor Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil*

Tabel 55   Gemiddelde	plasma- en hersencon	centratie met de berekende	gemiddelde hersenen-plasm	a ratio per substraat.
Analiet	Inhibitor	Gemiddelde plasma	Gemiddelde	Gemiddelde
		concentratie (nM)	hersenconcentratie	hersenen-plasma
			(pmol/g)	ratio
Docetaxel	Elacridar	33,1	6,29	0,190
	Tariquidar	30,7	10,2	0,333
	Geen	29,6	6,79	0,228
Erlotinib	Elacridar	119	31,1	0,262
	Tariquidar	109	35,7	0,329
	Geen	78,4	22,2	0,283
Loperamide	Elacridar	93,4	367	3,93
	Tariquidar	106	415	3,92
	Geen	60,1	340	5,66
Riluzole	Elacridar	108	168	1,56
	Tariquidar	77,0	159	2,07
	Geen	66,2	115	1,73
Vemurafenib	Elacridar	84,3	12,4	0,147
	Tariquidar	119	16,9	0,142
	Geen	113	18,3	0,162
Verapamil	Elacridar	98,6	490	4,97
	Tariquidar	116	547	4,72
	Geen	83,0	433	5,22
### Bijlage XVIII. Resultaten van het in vivo experiment met WT muizen voor Docetaxel, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil

•	•		5	
Analiet	Inhibitor	Gemiddelde plasma concentratie (nM)	Gemiddelde hersenconcentratie (pmol/g)	Gemiddelde hersenen-plasma ratio
Docetaxel	Elacridar	80,3	59,0	0,735
	Tariquidar	54,8	16,8	0,306
	Geen	77,0	28,7	0,373
Erlotinib	Elacridar	102	28,8	0,281
	Tariquidar	81,5	12,8	0,157
	Geen	72,6	4,95	6,82·10 <sup>-2</sup>
Loperamide	Elacridar	69,0	311	4,50
	Tariquidar	57,3	186	3,25
	Geen	76,4	16,8	0,220
Riluzole	Elacridar	158	270	1,70
	Tariquidar	59,1	108	1,83
	Geen	89,1	128	1,43
Vemurafenib	Elacridar	113	11,0	9,79·10 <sup>-2</sup>
	Tariquidar	111	5,16	4,46·10 <sup>-2</sup>
	Geen	117	4,58	3,90·10 <sup>-2</sup>
Verapamil	Elacridar	53,8	373	6,93
	Tariquidar	52,1	292	5,50
	Geen	53,9	18,6	0,345

 Tabel 56 | Gemiddelde plasma- en hersenconcentratie met de berekende gemiddelde hersenen-plasma ratio per substraat.

# *Bijlage XIX. Resultaten van het in vivo experiment met KO muizen en WT muizen voor Docetaxel, Elacridar, Erlotinib, Loperamide, Riluzole, Vemurafenib en Verapamil*

Tabel 57   Gemiddelde plasma- en hersenconcentratie met de berekende gemiddelde hersenen-plasma ratio per substraat.				
Analiet	Type muis	Gemiddelde plasma concentratie (nM)	Gemiddelde hersenconcentratie (pmol/g)	Gemiddelde hersenen-plasma ratio
Docetaxel	КО	93,6	7,25	7,75·10 <sup>-2</sup>
	WT	202	8,32	4,12·10 <sup>-2</sup>
Elacridar	КО	1,26·10 <sup>3</sup>	1,03·10 <sup>4</sup>	8,11
	WT	2,47·10 <sup>3</sup>	1,76·10 <sup>4</sup>	7,13
Erlotinib	КО	47,3	18,2	0,384
	WT	60,3	17,1	0,284
Loperamide	КО	157	600	3,83
	WT	133	571	4,29
Riluzole	КО	31,1	72,1	2,32
	WT	128	38,1	3,35
Vemurafenib	КО	108	15,0	0,139
	WT	144	7,18	4,98·10 <sup>-2</sup>
Verapamil	КО	199	1,08·10 <sup>3</sup>	5,42
	WT	263	1,40·10 <sup>3</sup>	5,31

Bijlage XX. Werkplan

## Ontwikkeling en validatie van een LC-MS/MS methode voor Tariquidar, Elacridar en een mengsel van substraten voor P-gp en Bcrp1.

### Werkplan, afstudeeropdracht

Geschreven door:	Nikkie Venekamp
Studentnummer:	s1075352
Module:	Afstudeeropdracht analietische chemie (H16AAC)
Aantal studiepunten:	42
Datum:	29 februari 2016
Gegevens instituut:	Nederlands Kanker Instituut (Antoni van Leeuwenhoek)
Afdeling:	Algemeen Klinisch Laboratorium – Bio-Farmacologie
Adres:	Plesmanlaan 121, 1066 CX Amsterdam
Stagebegeleider:	Olaf van Tellingen, PhD.
Stageperiode:	16 februari 2016 tot 16 augustus 2016
Paraaf:	

Gegevens opleidingsinstituut:
Adres:
Afdeling:
Opleiding:
Specialisatie:
Afstudeerbegeleider:

Hogeschool Leiden Zernikedreef 11, 2333 CK Leiden Applied Science Chemie Chemische Analyse Bert Mast





# Inhoudsopgave

1.	Inleiding	113
	1.1 Het onderzoek	113
	1.1.1. Probleemstelling en hypothese	113
	1.1.2. Doelstelling	114
	1.2 Theoretische achtergrond	114
	1.2.1. Farmacologie	107
	1.2.2. Structuren en verbindingen	115
	1.2.3. Analyse van de inhibitoren en substraten	116
	1.2.4. High-Performance Liquid Chromatography	117
	1.2.5. Massaspectrometrie	118
	1.2.6. Validatie	120
2.	Tijdschema	123
3.	Risico-inventarisatie	124
4.	Referenties	126
5.	Bijlagen	128
	Bijlage I. Stuctuurformules substraten	128
	Bijlage II. Quantitative analysis of the P-glycoprotein inhibitor Elacridar (GF120918) in human and c	log
	plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection	129
	Bijlage III. Brain accumulation of Dasatinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and Breast Cance	er
	Resistance Protein (ABCG2) and can be enhanced by Elacridar Treatment	129

## 1. Inleiding

Voor u ligt het werkplan van de afstudeeropdracht voor de specialisatie analietische chemie. De afstudeeropdracht is uitgevoerd op de afdeling Bio-Farmacologie van het Nederlands Kanker Instituut (NKI). In dit document zal beschreven worden wat en met welke methode deze afstudeeropdracht is uitgevoerd. In de inleiding zal kort het onderzoek geïntroduceerd worden. Vervolgens zal de theoretische achtergrond van verschillende onderwerpen met betrekking tot het onderzoek, probleemstelling en doelstelling besproken worden.

Het NKI is een oncologisch onderzoekscentrum waar wetenschappelijk onderzoek gedaan wordt naar verschillende soorten kanker. Op de afdeling Bio-Farmacologie wordt er voornamelijk onderzoek gedaan naar geneesmiddelen of een combinatie van geneesmiddelen die hersentumoren bestrijden. Er worden *in vitro* en *in vivo* studies uitgevoerd om de farmacokinetiek en toxicologie te bestuderen van geneesmiddelen. Door de aanwezigheid van de Bloed-Hersen Barriere (BHB) om de hersenen is de bereikbaarheid van een hersentumor sterk verlaagd. Het grootste aandachtspunt ligt bij de rol van transporteiwitten die het geneesmiddel voornamelijk uit de cel transporteren.

De twee transporteiwitten die in deze studie toegepast gaan worden zijn P-glycoproteine (P-gp/ABCB1/Abcb1) en *Breast Cancer Resistant Protein* (BCRP/Bcrp1/Abcg2). Deze twee transporteiwitten kunnen geblokkeerd worden door remmers (inhibitoren). Door de remmers ontstaat er blokkade en kunnen de transporteiwitten niet meer het geneesmiddel uit de cel transporteren. Dit zal vervolgens invloed hebben op de concentratie van het geneesmiddel in de hersenen. Twee inhibitoren die in deze studie onderzocht gaan worden met behulp van *in vivo* experimenten zijn Elacridar en Tariquidar. Dit wordt gedaan met behulp van experimenten met muizen. Om de aanwezigheid van het geneesmiddel te bepalen uit biologische matrices is er een gevoelige en selectieve analyse methode nodig. Ook is het van belang dat het geneesmiddel op de juiste manier geïsoleerd wordt uit de biologische matrix met een optimale monstervoorbewerkingsmethode. Kwantitatieve bepalingen van het geneesmiddel worden uitgevoerd met behulp van vloeistofchromatografie gekoppeld met een massaspectrometer (LC-MS/MS). De methode zal volledig gevalideerd worden in humaan plasma en beperkt gevalideerd worden in muizenplasma en hersenhomogenaat. De gevalideerde methode zal vervolgens gebruikt worden om de monsters uit de experimenten met muizen te analyseren. Met behulp van de analysemethode en de experimenten kan bepaald worden hoe goed de inhibitoren werken onder verschillende omstandigheden.

### 1.1 Het onderzoek

### 1.1.1 Probleemstelling en hypothese

Door de aanwezigheid van ABC transporters op de BHB is het voor een drug lastig om de hersen te penetreren. In dit onderzoek worden er twee ABC transporters onderzocht namelijk, P-glycoproteïne (P-gp) en *Breast Cancer Resistent Protein* (Bcrp1). Door gebruik te maken van twee inhibitoren, Elacridar en Tariquidar, worden deze twee transporters geblokkeerd. Deze twee inhibitoren zullen vergeleken worden op hun vermogen om Pgp en Bcrp1 te remmen in de BHB. Er worden zes substraten die variëren in affiniteit voor deze twee transporters toegediend. Bij gelijke spiegels van Elacridar en Tariquidar zal de concentratie van deze substraten in de hersenen bepaald worden. De zes substraten die gebruikt gaan worden zijn: Verapamil, Loperamide, Docetaxel, Riluzole, Erlotinib en Vemurafenib. Er wordt verwacht dat de substraten met een lagere affiniteit gemakkelijker de hersenen in zullen komen dan de substraten met een hogere affiniteit. Elacridar en Tariquidar remmen zowel P-gp als Bcrp1, maar met verschillende potentie. De potentie om P-gp te remmen is echter aanzienlijk groter. Beide inhibitoren zijn ontwikkelt om P-gp te remmen, later bleek dat het ook inhibitoren zijn voor Bcrp1.

Deze studie wordt *in vivo* uitgevoerd in muismodellen. Er worden vier typen muizen gebruikt: één soort waarvan beide transporters aanwezig zijn (wild type, P-gp/Bcrp1<sup>+/+</sup>), één soort waarvan beide transporters niet aanwezig zijn (knock out type, P-gp/Bcrp1<sup>-/-</sup>), één soort waarvan alleen de P-gp transporter (Bcrp1 enkelvoudige knock out, P-gp/Bcrp1<sup>+/+</sup>) aanwezig is en één soort waarvan alleen de Bcrp1 transporter (P-gp enkelvoudige knock out, P-gp/Bcrp1<sup>-/+</sup>) aanwezig is. De enkelvoudige knock out muizen worden gebruikt om vast te stellen hoe goed de remming van elke transporter individueel is. In de P-gp enkelvoudige knock out muizen bloot gesteld worden aan Elacridar of Tariquidar, kan bepaald worden hoe goed deze inhibitoren werken voor alleen Bcrp1 in

de BHB. Dit kan ook gedaan worden voor P-gp in Bcrp1 enkelvoudige knock out muizen. Verder worden er ook volledige knock out muizen gebruikt, hier wordt geen effect verwacht van Elacridar of Tariquidar. Als er wel effect waar te nemen is, duidt dit op een niet-specifiek effect. Dit kan dan komen omdat Elacridar of Tariquidar nog iets anders remt. Verder worden deze muizen gebruikt als referentie voor de maximale remming van de transporters door de inhibitoren.

De muizen zitten aan een continue infuus voor gedurende vijf uur via een toediening in de buikholte. Door deze toedieningsvorm worden er plasmaspiegels verwacht die voldoende hoog en stabiel zijn. De plasmaspiegels die bereik willen worden voor de inhibitoren zijn 500, 1000 en 2000 nM. De plasmaspiegels die bereikt willen worden voor de substraten zullen tussen de 50-100 nM liggen. Plasmamonsters, hersen, lever, nier, hart, long en milt weefsels worden verzameld en optimaal voorbewerkt om geanalyseerd te worden. Om nauwkeurige en gevoelige bepalingen uit te voeren is er een LC-MS/MS analysemethode nodig om de concentraties te kwantificeren. De methode gaat opgesteld worden en gevalideerd worden volgens opgestelde richtlijnen van het Amerikaanse *Food and Drug Administration*. Deze methode moet voldoen aan een aantal eisen die beschreven worden in paragraaf 1.2.6. Alle aanwezige componenten, de inhibitor en de zes substraten met een bijbehorende interne standaard dienen in één analietische run geanalyseerd te worden uit verschillende matrices. Er wordt verwacht dat de aanwezigheid van de inhibitoren een positief effect zullen hebben op de concentraties van de substraten in de weefsels. Uiteindelijk zal het effect van Elacridar vergeleken worden met het effect van Tariquidar.

#### 1.1.2 Doelstelling

Het doel van deze studie is het ontwikkelen, optimaliseren en valideren van één LC-MS/MS methode voor een kwantitatieve bepaling van de concentraties Elacridar, Tariquidar, Verapamil, Loperamide, Docetaxel, Riluzole, Erlotinib en Vemurafenib uit verschillende biologische matrices. Om vervolgens het effect van de twee inhibitoren met elkaar te kunnen vergelijken.

### **1.2 Theoretische achtergrond**

#### 1.2.1 Farmacologie

#### **Bloed-Hersen Barrière**

De hersenen worden beschermd voor endogene- en xenobiotische stoffen door de BHB. Naast bescherming van de hersenen zorgt de BHB ook voor de juiste regulatie van zouten en voedingstoffen die nodig zijn om de neuronale netwerkingen optimaal te laten functioneren.<sup>[1]</sup> Stoffen kunnen op verschillende manieren de BHB passeren. Stoffen die lipofiel zijn kunnen via transcellulair transport de hersen in komen, dit betekend dat ze door het lipofiele karakter door de cel heen kunnen. Stoffen die hydrofiel zijn kunnen dit niet, deze kunnen alleen via paracellulair transport in de hersenen komen. Door de *tight junctions* die de cellen met elkaar verbindt ontstaat er een barrière tussen de cellen hierdoor kunnen alleen kleine hydrofiele stoffen tussen de cellen door. Verder zijn er op de BHB transporteiwitten aanwezig die door actief transport stoffen in en uit de hersenen transporteren, zie transporteiwitten op blz. 6. Receptor gemedieerde transcytose is ook een vorm van actief transport door de cel m.b.v. receptoren. Adsorptie transcytose is een weg voor proteïnen om door de cel te transporteren, zie afbeelding 1.<sup>[2]</sup>



Afbeelding 1| Schematische weergave van het transportmechanisme op de BHB.<sup>[2]</sup>

#### Transporteiwitten

Op het membraan van cellen zitten transporteiwitten, ook wel effluxpompen genoemd, deze transporteren endogene- en xenobiotische stoffen uit de cel. Vrijwel alle geneesmiddelen behoren tot deze xenobiotische stoffen en zijn substraten voor transporteiwitten. Hierdoor worden de substraten de cel uit getransporteerd, dit gebeurd via actief transport. Wanneer er sprake is van actief transport is er adenosinetrifosfaat nodig om de xenobiotische terug in de bloedbaan te transporteren. Transporteiwitten kunnen onderverdeeld worden in families, één van deze families is de ABC transporters (adenosinetrifosfaat binding cassette).<sup>[3]</sup> Deze verbruiken adenosinetrifosfaat, in aanwezigheid van adenosinetrifosfaat enzym wordt dit gehydroliseert naar adenosinedifosfaat, zie afbeelding 2.

P-glycoproteïne (P-gp) behoort tot ABC transporters en deze zijn ook weer onderverdeeld in subgroepen. P-gp behoord tot subgroep B en is onderdeel 1, verkort wordt het dan ABCB1. Een andere naam die voor ABCB1 gebruikt wordt is MDR1.<sup>[3]</sup> De benaming ABCB1 wordt gebruikt wanneer men het heeft over P-gp in het menselijk lichaam, wanneer het over een dierlijk organisme gaat wordt Abcb1 toegepast. Abcb1a/b is de benaming voor een isoform van de transporter verder wordt de benaming gebruikt om de lokalisatie in het organisme aan te duiden. Dit geldt ook voor andere ABC transporters. P-gp bevindt zich het meeste in de lever, maag-darm kanaal, nieren en bloed hersen barrière en is intracellulair en extracellulair aanwezig.<sup>[3]</sup> P-gp bevindt zich ook op kankercellen die de geneesmiddelen uit de kankercel transporteren. Om dit te voorkomen kan P-gp geblokkeerd worden door een inhibitor, deze bindt aan de P-gp waardoor deze niet meer in staat is om geneesmiddelen uit de cel te transporteren, zie paragraaf 1.2.2.

Een andere belangrijke ABC transporter is *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP of ABCG2). Men heeft deze ABC transporter zo genoemd omdat deze voor het eerste gekloond is in een borstkankercellijn. Bcrp1 (dierlijke benaming) wordt ook wel een half-transporter genoemd, deze heeft namelijk een ander eiwit nodig om een complex te vormen.<sup>[4]</sup> Uiteindelijk is dit complex de functionele transporter en kan het xenobiotische stoffen uit de cel transporteren. De functionele transporter heeft een massa van 145 kDa<sup>[4]</sup> en is daarmee kleiner dan P-gp, die een massa van 170 kDa heeft.<sup>[3]</sup> Net als P-gp bevindt Bcrp1 zich meer in organen waar de klaring van xenobiotische stoffen plaatsvindt. Dit zijn organen zoals de lever, nieren, maag-darm kanaal en de BHB.



Afbeelding 2 | Schematische weergave van de werking van ABC transporters.<sup>[5]</sup>

### 1.2.2 Structuren en verbindingen

#### Elacridar

Elacridar (GF120918) is een krachtige en selectieve inhibitor van de transporteiwitten P-gp en Bcrp1. De meeste P-gp inhibitoren zijn zwakke inhibitoren of zijn krachtige inhibitoren voor het cytochroom CYP3A4, wat kan leiden tot ongewenste farmacokinetische interacties. Elacridar heeft daarentegen een lage affiniteit voor CYP3A4 en is 100 maal krachtiger dan de veel gebruikte inhibitor cyclosporine A.<sup>[6]</sup> Daarnaast is Elacridar een krachtige inhibitor voor Bcrp1, substraten voor Bcrp1 krijgen hierdoor een hogere biologische beschikbaarheid wanneer ze in combinatie met Elacridar worden toegediend.<sup>[6]</sup>

De IUPAC naam van Elacridar is *N*-(4-[2-(1,2,3,4-tertrahydro-6,7-dimethoxy-2-isoquinolyl)ethyl]phenyl)-9,10dihydro-5-methoxy-9-oxo-4-acridinecarboxamide,  $C_{34}H_{33}N_3O_5$  is de molecuulformule en de moleculaire massa is 563,64 g/mol. Zie afbeelding 3 voor de chemische structuur van Elacridar. De oplosbaarheid van Elacridar in water is 0,0123 µg/mL<sup>[27]</sup> (<1 mM) en de oplosbaarheid in dimethylsulfoxide (DMSO) is 41 mg/mL (72,7 mM).<sup>[7]</sup>



Afbeelding 3 Chemische structuren van Elacridar (A) en Tariquidar (B).<sup>[7]</sup>

#### Tariquidar

Tariquidar (XR9576) is, net als Elacridar een sterke inhibitor voor P-gp, deze is selectief en heeft een nietcompetitieve interactie met substraten voor P-gp. Tariquidar gedraagt zich als een substraat voor Bcrp1 bij lage concentraties. Wanneer de concentratie hoger is dan 100 nM gedraagt Tariquidar zich als een inhibitor.<sup>[28]</sup> Beide inhibitoren zijn Multi drug resistentie inhibitoren. Dit wil zeggen dat tumorcellen resistent geworden zijn tegen antikankermedicijnen. Door behandeling met deze inhibitoren worden deze cellen weer gevoeliger voor de medicijnen.<sup>[8]</sup>

De IUPAC naam van Tariquidar is 3-Quinolinecarboxamide,N-[2-[[[4-[2-(3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-2(1H)-isoquinolinyl)ethyl]phenyl]amino]carbonyl]-4,5-dimethoxyphenyl]-,  $C_{38}H_{38}N_4O_6$  is de moleculaformule en de moleculaire masse is 646,73 g/mol. Zie afbeelding 3 voor de chemische structuur van Tariquidar. De oplosbaarheid van Tariquidar in water is in de literatuur niet bekend maar zal in de zelfde orde liggen als Elacridar (<<<1 mg/mL)(<1 mM). De oplosbaarheid in DMSO is 52 mg/mL (80,4 mM). Door de slechte oplosbaarheid in water, worden beide inhibitoren opgelost in DMSO.<sup>[7]</sup>

De volgende substraten voor de twee ABC transporters gaan in deze studie gebruikt worden, zie tabel 1. Zie bijlage I voor de structuurformules van de substraten.<sup>[9]</sup>

Naam	Moleculaire	Molecuulformule	Substraat voor:	Affiniteit voor	Affiniteit voor
	massa (g/mol)			P-gp	Bcrp1
Verapamil	454,60	C27H38N2O4	P-gp	+	-
Loperamide	477,04	$C_{29}H_{33}CIN_2O_2$	P-gp	++	-
Docetaxel	807,88	C43H53NO14	P-gp	+++	-
Riluzole	234,20	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> OS	P-gp/Bcrp1	+	+
Erlotinib	393,44	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	P-gp/Bcrp1	++	++
Vemurafenib	489,92	C23H18CIF2N3O3S	P-gp/Bcrp1	++	+++

Tabel 1| Substraten voor P-gp en Bcrp1 met de bijbehorende moleculaire massa en structuurformule.<sup>[9]</sup>

#### 1.2.3 Analyse van de inhibitoren en substraten

Een aantal verschillende monstervoorbewerkingsmethoden worden toegepast in de literatuur. Er kan een proteïne precipitatie uitgevoerd worden met acetonitril of een vloeistof-vloeistof extractie.<sup>[10]</sup> In de literatuur is er variatie tussen de extractieoplossingen die gebruikt worden voor de vloeistof-vloeistof extractie, *tert*-butylmethylether of diethylether worden voornamelijk gebruikt.<sup>[11;6]</sup>

De componenten die toegepast worden in deze studie kunnen op een aantal manieren geanalyseerd worden, de meest voorkomende analyse methode in de literatuur is een LC-MS/MS analyse. In de literatuur wordt er een  $C_{18}$  kolom gebruikt en wordt de mobile fase, ACN met 10 mM ammonia (70:30, v/v), met een flow van 0,2 mL/min door het systeem gepompt.<sup>[10;6]</sup> Verder is er variatie in de samenstelling van de mobile fase, verschillende organische modifers en verschillende zuren worden gebruikt om de mobile fase relatief meer apolair te maken of om aan te zuren.

Verder kan er isocratisch of in een gradiënt methode gemeten worden, dit hangt af van de polariteit van de componenten en het aantal componenten die geanalyseerd worden in één analietische run. De interne standaarden die gebruikt worden in de literatuur zijn stabiele isotoop gemerkte componenten.<sup>[10,6]</sup> Dit is hetzelfde molecuul alleen bevat dit molecuul bijvoorbeeld een <sup>13</sup>C-atoom in plaats van een <sup>12</sup>C-atoom. Door dit molecuul te gebruiken als interne standaard kan er juist gecorrigeerd worden, het molecuul verlaat onder

dezelfde retentietijd de analietische kolom en zal ook hetzelfde geïoniseerd worden als het oorspronkelijke molecuul.

De ionisatiebron die in de literatuur gebruikt wordt voor de ionisatie van deze componenten is een electro spray ionisation source (ESI). Deze bron is een geschikte interface voor deze componenten en er wordt in de positieve modus geanalyseerd.<sup>[10;6]</sup>

In deze studie gaat er een gradiënt methode gebruikt worden omdat er veel componenten in één analietische run bepaald gaan worden. De gradiënt methode zal verlopen van 20:80% MeOH:H<sub>2</sub>O tot 95:5% MeOH:H<sub>2</sub>O, onder een flow van 0,2 ml/min. Verder zal er gebruik gemaakt worden van een reversed phase analyse met een C<sub>18</sub> kolom. Dit zijn de startwaarden en zullen tijdens de optimalisatie gevarieerd worden. Verder zullen de verschillende monstervoorbewerkingsmethoden en extractieoplossingen getest worden en zal de optimale voorbewerkingsmethode gebruikt worden.

#### **1.2.4 High-Performance Liquid Chromatography**

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) is een analyse techniek die veel gebruikt wordt in de analietische chemie om componenten in oplossing van elkaar te scheiden. Componenten kunnen op basis van verschillende eigenschappen van elkaar gescheiden worden. Dit kan op basis van polariteit ("Normal Phase Liquid Chromatography" (NPLC), "Reversed Phase Liquid Chromatography" (RPLC) en "Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography" (HILIC)), molecuulgrootte ("Size Exclusion Chromatography"), affiniteit van moleculen ("Affinity Chromatography"), elektrische lading "Ion-Exchange Chromatography") en chiraliteit van de moleculen ("Chiral Chromatography"). Voor elke scheidingsmethode wordt een andere kolom gebruikt en is de kolom de basis voor het scheidingsmechanisme. In het algemeen is de kolom een roestvrij stalen buis met een kolomlengte van 10 - 30 cm en een interne diameter van  $1 - 5 \text{ mm.}^{[12]}$  De vaste stationaire fase (SF) zit in de kolom en bestaat uit zeer kleine poreuze deeltjes van ongeveer  $2 - 10 \mu m$  groot. De SF kan polair of apolair zijn, afhankelijk van de moleculen waar de SF uit opgebouwd is. Door de kolom stroomt een vloeibare mobiele fase (MF), ook wel eluens genoemd. Binnen in de kolom is er een evenwicht aanwezig tussen de MF en de SF.

Een Reversed Phase (RP) kolom is apolair en de inhoud van de kolom bestaat meestal uit silica moleculen die gemodificeerd zijn met octadecyl-moleculen ( $C_{18}$ ).<sup>[13]</sup> Door de aanwezigheid van de  $C_{18}$  moleculen is de inhoud van de kolom relatief apolair. De silica moleculen kunnen ook gemodificeerd zijn met andere moleculen, bijvoorbeeld octyl-moleculen ( $C_8$ ), hierdoor kan de kolom bijvoorbeeld relatief minder apolair worden.<sup>[13]</sup> De MF die gebruikt wordt bij RP is polair, bijvoorbeeld water. Een RP kolom wordt gebruikt om relatief apolaire verbindingen van elkaar te scheiden.

Bij een Normal Phase (NP) kolom is juist het tegenovergestelde het geval. De SF is bij NP relatief polair (silica) en er wordt gebruik gemaakt van een apolaire MF, bijvoorbeeld hexaan.

De MF wordt door een pomp door het HPLC systeem gepompt en dit gebeurt onder een bepaalde volumestroom, genoemd de flow. De flow wordt uitgedrukt in het aantal milliliters mobile fase wat per minuut door de kolom gepompt wordt. De pomp moet een reproduceerbaar, constant en een instelbare flow kunnen geven. In afbeelding 4 is een systematische weergave van een HPLC systeem weergegeven.<sup>[14]</sup>



Afbeelding 4 | Systematische weergave van een HPLC systeem.<sup>[15]</sup>

Om storingen in de analyse te voorkomen moet de zuiverheid van de MF hoog zijn, dit wordt bereikt door gebruik te maken van HPLCquality vloeistoffen en Milli-Q water. Wanneer de samenstelling van de MF gedurende de analietische run constant blijft spreekt men van een isocratische elutie. Als de polariteit van de componenten ver uit elkaar liggen, de complexiteit van het mengsel hoog of de analysetijd te lang is kan er een gradiënt methode gebruikt worden. Tijdens een gradiënt methode veranderd de samenstelling

van het eluens gedurende de analyse. Bij een RP methode begint men dan met een hogere concentratie water in het eluens en wordt het



Afbeelding 5 | Voorbeeld van een chromatogram van Elacridar bepaalt met een LC-MS/MS.<sup>[6]</sup>

eluens tijdens de run relatief meer apolair gemaakt. Dit wordt gedaan door organische modifers toe te voegen. De meest gebruikte organische modifers zijn: methanol (MeOH), acetonitril en tetrahydrofuran.

In het HPLC systeem zit een ontgasser, deze verwijdert onopgeloste gassen uit de MF. Om lage druk gradiënt mengpompen goed te laten werken is de ontgasser noodzakelijk. Zonder de ontgasser ontstaan er luchtbellen bij de kleppen (check valves). Hierdoor sluiten de kleppen niet goed meer en zal de MF in de tegengestelde richting terug lopen. Dit veroorzaakt druk fluctuaties in het systeem wat leidt tot verhoogde of verlaagde retentietijden op willekeurige tijdstippen.

Het monster wordt op de kolom gebracht, dit kan handmatig d.m.v. een injectiespuit of automatisch met een auto-injector. De auto-injector zorgt ervoor dat het monster automatisch en steeds op dezelfde systematische manier geïnjecteerd wordt op de voorkolom. De voorkolom is ter bescherming en het bestaat uit hetzelfde pakkingsmateriaal als de kolom. De voorkolom zorgt ervoor dat componenten, die niet tot het scheidingsmechanisme behoren, al (deels) opgevangen worden door de voorkolom zodat de kolom langer mee gaat en minder snel vervuild is. Vervolgens gaat het door naar de kolom en daar bindt het analiet aan de SF. Naarmate de MF door de kolom stroomt, onder een hoge druk, elueert het analiet met de MF mee. Het analiet verlaat de kolom en wordt door een detector gedetecteerd.

Een detector reageert op de aanwezigheid van een component en geeft vervolgens een elektrisch signaal. Het signaal wordt vervolgens gebruikt bij een kwantitatieve analyse om de concentratie van de aanwezige analieten te bepalen.<sup>[14]</sup> Dit signaal wordt door een gegevensverwerker geregistreerd en omgezet naar een chromatogram, zie afbeelding 5. Veel verschillende soorten detectoren kunnen gekoppeld worden aan een LC-systeem. Enkele voorbeelden van verschillende meetprincipes zijn: massaspectrometer (m/z ratio), UV/VIS (lichtabsorptie) en de fluorometer (fluorescentie).

#### 1.2.5 Massaspectrometrie

Massaspectrometrie (MS) is een veel gebruikte en veelzijdige analyse techniek die vele toepassingen heeft in de chemie. MS is een zeer gevoelige techniek en wordt gebruikt om componenten te detecteren, identificeren en kwantificeren op zeer laag niveau (nanomolair). Verder kan MS gebruikt worden voor kwantificatie en profilering van isotopen (meerdere vormen van een element die verschillen in het aantal neuronen, met als gevolg variatie in het atoomgewicht<sup>[16]</sup>), het analyseren van simpele en complexe chemische en biologische mengsels en het bestuderen van de structuur van moleculen. De massaspectrometer meet de intensiteit van een ion als functie van de massa/lading-verhouding (m/z). Voor elk ion is deze meetwaarde specifiek en zo kunnen moleculen van elkaar onderscheiden en geïdentificeerd worden.<sup>[17]</sup>

MS wordt voornamelijk gebruikt in combinatie met gaschromatografie (GC-MS) en vloeistofchromatografie (LC-MS), zie afbeelding 6. Het GC of HPLC systeem zit aan de massaspectrometer aangesloten via een geschikt interface. Het voordeel van LC-MS ten opzichte van GC-MS is dat er een groter scala aan componenten geanalyseerd kunnen worden. Componenten met een grote moleculaire massa of die polair of thermo instabiel zijn kunnen wel met een LC-MS geanalyseerd worden maar niet met een GC-MS analyse. Een LC-MS systeem is hierdoor ook geschikt voor analyse van biologische componenten zoals: peptiden, proteïnen, geneesmiddelen

en metabolieten, biomarkers, oligonucleotiden en samenstellingen van olie en voedingsmiddelen.<sup>[17]</sup> De techniek die voor deze studie gebruikt gaat worden is een LC-MS/MS systeem, ook wel LC-Tandem MS genoemd. Het verschil met een LC-MS systeem is dat een LC-MS/MS systeem meerdere mass analyzers bevat.



Afbeelding 6| Schematische weergave van een LC-MS systeem.<sup>[18]</sup>

Nadat de componenten de analietische kolom verlaten moeten ze ionen vormen voordat het geanalyseerd kan worden. Dit gebeurt in de ionisatie kamer en de componenten kunnen d.m.v. verschillende ionisatiebronnen geïoniseerd worden. Enkele voorbeelden van veel gebruikte ionisatietechnieken zijn: Electrospray Ionization (ESI), Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI), Chemical Ionization (CI) en Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI). ESI, MALDI en APCI vallen onder de zachte ionisatie technieken, de componenten worden minder gefragmenteerd t.o.v. andere ionisatietechnieken. Door deze zachte techniek kunnen eiwitten en andere biologische matrices geanalyseerd worden.<sup>[19]</sup> De ionisatiebron die in deze studie gebruikt gaat worden is de ESI. In de ionisatiekamer zit een capillaire naald waar het analiet uit sprayt, hierdoor ontstaan er druppels. Het einde van de naald staat onder hoge spanning, hierdoor raken de moleculen in de druppels positief of negatief geladen.<sup>[20]</sup> Door toevoer van een warme stikstof tegenstroom (drying gas) worden de geladen druppels steeds kleiner, zie afbeelding 7. Uiteindelijk ontstaan er vrije ionen in de gasfase die m.b.v. een "nebulsing gas" en een elektrisch veld naar de mass analyzer geleid worden.



Afbeelding 7 | Schematische weergave het ioniseren van de vloeistof met behulp van een ESI.<sup>[20]</sup>

De gevormde ionen komen in de mass analyzer, deze scheidt de ionen op basis van hun m/z-verhouding. Voorbeelden van mass analyzers zijn: Quadrupole, Time-Of-Flight (TOF), Magnetic sectors, Fourier Transform en lon traps. De analyzers staan onder hoog vacuüm om de snelheid van de ionen door de mass analyzers te verhogen. In deze studie wordt een triple quadrupole gebruikt. Een bepaalde m/z-verhouding kan ingesteld worden en alleen ionen met die verhouding kunnen dan in een magnetisch veld oscilleren, om vervolgens de detector bereiken. Alle andere m/z-verhoudingen komen niet in resonantie, raken uit de golfbaan en bereiken de detector niet. De triple quadrupole bestaat uit drie analyzers: Q1, hier worden de ionen met de juiste m/z-verhouding geselecteerd. De Q2, ook wel de 'collision cell' genoemd, hier worden de geselecteerde ionen gefragmenteerd. De Q3 is identiek aan de Q1 alleen deze heeft als functie om de fragmenten selecteren en naar de detector te leiden, zie afbeelding 8.<sup>[21]</sup> Vervolgens wordt het signaal omgezet in tot een grafisch massaspectrum.



Afbeelding 8 | Schematische weergave van een triple quadrupole.<sup>[22]</sup>

#### 1.2.6 Validatie

De geoptimaliseerde LC-MS/MS methode zal volgens het NKI opgestelde richtlijnen gevalideerd worden m.b.v. het statistiek programma IBM SPSS Statistics 22. Het is belangrijk dat de validatie voldoet aan alle opgestelde voorwaarden om aan te tonen dat de bioanalietische methode geschikt is voor een kwantitatieve bepaling van het geneesmiddel in een biologische matrix. Elke analietische methode dient gevalideerd te worden voor elke biologische matrix waar het geneesmiddel in bepaald gaat worden. Een methode wordt gevalideerd wanneer er een nieuwe methode ontwikkeld is of als de methode voor het eerst in het laboratorium wordt toegepast. Tijdens deze studie zullen de volgende parameters onderzocht worden:

#### Specificiteit en selectiviteit

Een analyse methode is specifiek als het alleen de component van interesse kan bepalen. Als de te bepalen component te onderscheiden is van andere aanwezige verbindingen waar men niet in geïnteresseerd is, is de methode selectief. Er worden minimaal zes blanco monsters van verschillende reeksen per matrix gemaakt en geanalyseerd om zo te controleren of endogene verbindingen interfereren met de analietische methode.<sup>[23]</sup>

#### Lineariteit

Binnen de bepalingsgrenzen is een rechtlijnig verband aanwezig tussen het respons en de concentratie van de te bepalen component. Standaarden worden, voor zover dat mogelijk is, in dezelfde matrix gemaakt als de te meten monsters. De kalibratielijn bestaat uit vijf tot acht punten en wordt in duplo gemaakt. De laagste- en hoogste standaarden zijn ook de laagste- en hoogste bepalingsgrens. De lineariteit zal getest worden op drie normen: weegfactor, lineariteits toets (F-toets of de "Lack of Fit"-toets) en constante systematische- en proportionele fout.<sup>[23]</sup>

Voor het bepalen van de lineariteits toets wordt de weegfactor bepaald. De weegfactor is de respons functie die beschrijft welke kalibratielijn het beste model weergeeft  $(1/x^{pv})$ . De weegfactor wordt bepaald met behulp van SPSS en wordt gebruikt bij het bepalen van de lineariteits toets.

De "Lack of Fit" wordt bepaald met formule 1. De kwadratensom van residuen (SS<sub>r</sub>) wordt opgesplitst in een kwadratensom ten gevolge van de spreiding in de meting (SS<sub>pe</sub>). SS<sub>r</sub> zal berekend worden met regressie analyse, SS<sub>pe</sub> zal berekend worden met ANOVA-analyse in SPSS en df<sub>r</sub> en df<sub>pe</sub> zijn de bijbehorende vrijheidsgraden.

$$F_{LOF} = \frac{(SS_r - SS_{pe})/(df_r - df_{pe})}{SS_{pe/df_{pe}}}$$
(1)

De grenswaarde voor F wordt opgezocht in de literatuur met een betrouwbaarheid van 95% (dfr-dfpe; dfpe)<sup>[24]</sup>. Wanneer FLof < F0.05 dan is er geen "Lack of Fit" en kan de kalibratielijn als lineair beschouwd worden.

De t-toets wordt uitgevoerd om te testen of de analietische methode een constante systematische- en/of proportionele fout bevat. Ook deze toets wordt uitgevoerd met SPSS en gaat uit van formule 2. Waarbij  $\alpha$  gelijk is aan het intercept,  $\beta$  is de helling en  $\epsilon$  de toevallige fout.<sup>[23]</sup>

#### Gemeten concentratie = $\alpha + \beta \cdot de$ nominale concentratie + $\epsilon$ (2)

 $\alpha \neq 0$ , de methode bevat een constante systematische fout.

 $\beta \neq 1$ , de methode bevat een proportionele fout.

#### Detectiegrens (LOD) en laagste bepalingsgrens (LLQ)

Voor het bepalen van de LOD en de LLQ worden er drie verschillende concentraties in een biologische matrix gemaakt en opgewerkt. Deze concentraties liggen rond de laagste bepalingsgrens en worden op drie verschillende dagen gemeten. Vervolgens kan de relatieve standaard deviatie (%RSD) en de afwijking tussen de gemeten concentratie en de nominale concentratie (%DEV) bepaald worden met formule 3 en 4. Om de LLQ te bepalen moeten deze waarden kleiner zijn dan 20%.<sup>[23]</sup>

 $\% RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \qquad (3)^{[25]}$  $\% DEV = \frac{gemiddelde \ gemeten \ concentratie - nominale \ concentratie}{nominale \ concentratie} \cdot 100\% \quad (4)$ 

Voor het bepalen van de detectiegrens (LOD) worden er een aantal blanco en dubbele monsters opgewerkt en geanalyseerd. Vervolgens wordt de signaal/ruis verhouding vermenigvuldigd met drie en wordt deze waarde vergeleken met de laagste standaard.<sup>[23]</sup> Op deze manier wordt bepaald of de laagste standaard ook de detectiegrens is.

#### Juistheid

Voor het bepalen van de juistheid worden er zes kwaliteitscontroles (QC) in een biologische matrix opgewerkt en geanalyseerd op drie verschillende dagen. De concentraties liggen in het lage, midden en hoge concentratiegebied. Elke QC wordt gelijktijdig met een kalibratielijn gemeten en vervolgens wordt het gemiddelde voor elke concentratie berekend. De juistheid wordt bepaald met formule 5 en moet tussen de 85% en 115% liggen.<sup>[23]</sup>

$$Iuistheid = \frac{gemiddelde \ gemeten \ concentratie}{nominale \ concentratie} \cdot 100\%$$
(5)

#### Precisie

De precisie is onderverdeeld in de herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid. Voor de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid kunnen dezelfde metingen gebruikt worden als bij de juistheid. De herhaalbaarheid is de variatie van resultaten binnen één analietische run onder gelijke omstandigheden. De herhaalbaarheid, uitgedrukt als de %RSD, wordt voor elke QC bepaald met formule 6.<sup>[23]</sup> De MS<sub>WG</sub> staat voor de "mean square within groups" en de GM staat voor het totaal gemiddelde van de gemeten concentraties over alle series.

$$Herhaalbaarheid = \frac{(MS_{WG})^{0,5}}{GM} \cdot 100\%$$
 (6)

De reproduceerbaarheid is de variatie van resultaten tussen verschillende analietische runs onder verschillende omstandigheden. De reproduceerbaarheid wordt bepaald met formule  $7.^{[23]}$  De MS<sub>BG</sub> staat voor de "mean square between groups" en n is het aantal herhaalde analyses van de gemeten concentratie in één run.

$$Reproduce erbaarheid = \frac{\frac{(MS_{BG} - MS_{WG})^{0.5}}{n} \cdot 100\%$$
(7)

Zowel de herhaalbaarheid als de reproduceerbaarheid worden bepaald met een ANOVA-analyse. Voor de concentratie met de laagste bepalingsgrens moet de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid kleiner zijn dan 20% en voor de overige concentraties kleiner zijn dan 15%.

#### Stabiliteit

De stabiliteit van de verbinding kan afhankelijk zijn van de concentratie. Er worden minimaal twee concentraties, net boven de LLQ en rond de ULQ, meerdere malen opgewerkt. De verschillende concentraties

worden onder verschillende omstandigheden opgeslagen. Op KT in het donker, op KT in het licht en in de koude kamer in het licht onder een temperatuur van 4°C.

#### Recovery (monstervoorbewerking) en ion supressie

De recovery van de monstervoorbewerking wordt bepaald door elke dag, drie dagen achtervolgend, twee kalibratielijnen te maken. Een aantal blanco monster worden voorbewerkt en aan het einde van de monstervoorbewerking worden er verschillende concentraties in AS toegevoegd. Dit is de gespikte kalibratielijn en er is een kalibratielijn in de biologische matrix. Beide kalibratielijnen worden bereid uit dezelfde stockoplossingen en gemeten in dezelfde serie. De recovery wordt berekend volgens formule 8.

$$Recovery = \frac{helling \ kalibratie \ in \ biologische \ matrix}{helling \ gespikte \ kalibratie} \cdot 100\%$$

Ion supressie is een vorm van matrixeffect wat veel negatieve invloed heeft op gevoelige analyse methodes zoals vloeistofchromatografie-massa spectrometrie (LC-MS) en tadem massa spectrometrie (LC-MS/MS). Andere aanwezige componenten in de oplossing, uit de biologische matrix, kunnen tegelijk uit de kolom elueren als het analiet. Hierdoor komen ze ook tegelijk de ionisatiekamer binnen en dat heeft een negatieve invloed op de ionisatie van het analiet, de precisie en de gevoeligheid van de metingen.<sup>[26]</sup> Voor het bepalen van de ion supressie wordt er een kalibratielijn in een AS gemaakt, dit kan MeOH:H<sub>2</sub>O (20:80%) zijn. Door een kalibratielijn direct in een AS te maken kan alleen de ion suppressie bepaald worden en heeft men geen last volgens het voorschrift en aan het einde van de monstervoorbewerking worden er verschillende concentraties in AS toegevoegd. Hierdoor heeft men één kalibratielijn in bijvoorbeeld MeOH:H<sub>2</sub>O en één gespikte kalibratielijn. Deze worden beide gemeten in één serie met de LC-MS/MS. Vervolgens wordt de ion supressie berekend door volgens formule 9.

$$Ion \ supressie = \frac{(helling \ kalibratie \ in \ AS - helling \ gespikte \ kalibratie}{helling \ kalibratie \ in \ AS} \cdot 100\%$$
(9)

Periode	Werkzaamheden
Januari	Start werkplan, literatuuronderzoek;
	Definitief vaststellen van het afstudeerproject;
	Ervaring opdoen: monstervoorbewerking, LC-MS/MS methode ontwikkelen,
	optimalisatie en validatie.
Februari	Afronden en inleveren van het werkplan;
	Beoordeling en eventuele verbetering van het werkplan;
	Start praktisch werk afstudeeropdracht.
Maart	Het ontwikkelen van de LC-MS/MS analyse;
	Het juiste extractie oplosmiddel bepalen;
	Het optimaliseren van de chromatografie;
	Starten met het schrijven van het afstudeerverslag.
April	Het bepalen van de recovery en de ion supressie;
	Het bepalen van de selectiviteit en de specificiteit van de analyse methode;
	Stabiliteit testen uitvoeren;
	Starten met de muizenstudie;
	Dataverwerking en schrijven afstudeerverslag.
Mei	Het bepalen van de lineariteit en de detectiegrenzen van de kalibratielijn;
	Het bepalen van de juistheid en precisie;
	Dataverwerking en schrijven afstudeerverslag.
Juni	Uitloop validatie van de methode;
	De gevalideerde LC-MS/MS methode gebruiken voor analyse van de
	muizenmonsters;
	Dataverwerking en schrijven afstudeerverslag.
Juli	Uitloop van experimenten;
	Dataverwerking en schrijven afstudeerverslag.
Augustus	Afronden van praktisch werk;
	Het afronden en inleveren van het afstudeerverslag.

## 2. Tijdschema

## 3. Risico-inventarisatie

Tijdens deze studie gaat er gewerkt worden met humaan plasma, muizenplasma en hersenhomogenaat van muizen. Het humaan plasma komt bij de bloedbank Sanquin vandaan, daar wordt het bloed gezuiverd en het komt van gezonden mensen. Dit zal geen groot risico geven, muizenplasma of hersenhomogenaat daar in tegen wel. Het plasma en de hersenen van de muizen worden verzameld en het is niet bekend of de muizen mogelijk een zieke of iets dergelijks dragen. Om de risico's te verkleinen worden er altijd latex handschoenen gedragen wanneer men met organisch materiaal werkt.

Verder worden er een aantal oplosmiddelen gebruikt dat zijn: methanol, ethylacetaat, diethylether en *tert*butylmethylether. Om problemen te voorkomen met de oplosbaarheid van de analieten, worden deze opgelost in dimethylsulfoxide in plaats van water. Om de mobiele fase aan te zuren wordt er in deze studie mierenzuur gebruikt. Verder bestaat de mobiele fase uit methanol en water. Hieronder zal kort besproken worden wat de risico's zijn van het gebruikt van de hierboven genoemde vloeistoffen.

#### Diethylether, C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sup>[29]</sup>

Vlampunt: -40 °C Signaalwoord: gevaar. GHS02: zeer vlambaar. GHS07: acute toxiciteit, veroorzaakt huid en oog irritatie, gevoelig voor de huid en specifieke doelorgaan toxiciteit.



Dimethylsulfoxide, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO<sup>[29]</sup> Vlampunt: 87 °C Signaalwoord: -

### Ethylacetaat, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub><sup>[29]</sup>

Vlampunt: -2 °C Signaalwoord: gevaar. GHS02: zeer vlambaar. GHS07: acute toxiciteit, veroorzaakt huid en oog irritatie, gevoelig voor de huid en specifieke doelorgaan toxiciteit.



Methanol, CH<sub>3</sub>OH<sup>[29]</sup> Vlampunt: 9 °C Signaalwoord: gevaar. GHS02: zeer vlambaar. GHS06: acute toxiciteit.

GHS08: gevoelig voor de luchtwegen, veroorzaakt mutageniteit in cellen, kankerverwekkend, giftigheid voor voorplanting en specifieke doelorgaan toxiciteit.



### Mierenzuur, CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[29]</sup>

Vlampunt: 49 °C Signaalwoord: gevaar. GHS02: zeer vlambaar. GHS05: corrosief voor metalen en huid en veroorzaakt ernstige oogschade. GHS06: acute toxiciteit.



*tert*-butylmethylether,  $C_5H_{12}O^{[29]}$ 

Vlampunt: -32 °C

Signaalwoord: gevaar.

GHS02: zeer vlambaar.

GHS07: acute toxiciteit, veroorzaakt huid en oog irritatie, gevoelig voor de huid en specifieke doelorgaan toxiciteit.



## 4. Referenties

- 1 https://www.hersenstichting.nl/alles-over-hersenen/de-hersenen/bloed-hersenbarriere/bloedhersenbarriere; *Geraadpleegd op 16-02-2016*
- 2 https://pubs.acs.org/cen/science/85/8523sci1.html; Geraadpleegd op 16-02-2016.
- 3 Srivalli K.M.R.; Lakshimi P.K.; "Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook." *Brailian Journal* of *Pharmaceutical Sciences* **2012**. vol. 48, no. 3, 353-367. *Geraadpleegd op 9-02-2016*.
- Haimeur A.; Conseil G.; Deeley R.G.; Cole S.P.C.; "The MRP-Related and BRCP/ABCG2 Multidrug Resistance Proteins: Biology, Substrate Specificity and Regulation." *Current Drug Metabolism* 2004. no. 5, 21-53. *Geraadpleegd op 10-02-2016*.
- 5 http://physiologyonline.physiology.org/content/22/2/122; *Geraadpleegd op 10-02-2016.*
- 6 Stokvis E.; Rosing H.; Causon R.C.; Schellens J.H.M.; Beijnen J.H.; "Quantitative analysis of the Pglycoprotein inhibitor Elacridar (GF120918) in human and dog plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection." *J Mass Spectrom.* **2004**. no. 39, 1122-1130. *Geraadpleegd op 29-01-2016*.
- 7 http://www.selleckchem.com/; Geraadpleegd op 29-01-2016.
- 8 http://www.cancer.gov/; Geraadpleegd op 10-02-2016.
- 9 https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/; *Geraadpleegd op 10-02-2016*.
- 10 Lagas J.S.; van Waterschoot R.A.B.; van Tilburg V.A.C.J.; Hillebrand M.J.; Lankheet N.; Rosing H. Beijnen J.H.; Schinkel A.H.; "Brain Accumulation of Dasatinib Is Restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) and Can Be Enhanced by Elacridar Treatment." *Clin Cancer Res* 2009. vol. 15, no. 7, 2344-2351. *Geraadpleegd op 10-02-2016.*
- 11 Hunbensack M.; Müller C.; Höcherl P.; Fellner S.; Spruss T.; Bernhardt G.; Buschauer A.; "Effect of the ABCB1 modulators elacridar and tariquidar on the distribution of paclitaxel in nude mice." *J Cancer Res Clin Oncol* **2007**. no. 134, 597-607. *Geraadpleegd op 10-02-2016*.
- 12 https://nl.wikipedia.org/wiki/Chromatografie; Geraadpleegd 29-01-2016.
- 13 http://www.sigmaaldrich.com/analietical-chromatography/analieticalproducts.html?TablePage=9657304; *Geraadpleegd op 29-01-2016.*
- 14 http://www.waters.com/waters/en\_NL/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\_NL; *Geraadpleegd 29-01-2016.*
- 15 https://www.idex-hs.com/education-and-tools/educational-materials/hplc-center; *Geraadpleegd op 29-01-2016.*
- 16 http://www.encyclo.nl/begrip/isotopen; Geraadpleegd 16-02-2016.
- 17 https://www.thermofisher.com/nl/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learningcenter/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-mass-spectrometry.html; *Geraadpleegd op 16-02-2016.*
- 18 https://www.merckmillipore.com/NL/en/water-purification/learning-centers/applications/lcms/lWib.qB.vb4AAAFA5flBvVBh,nav; *Geraadpleegd op 16-02-2016.*
- 19 http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analietical\_Chemistry/Instrumental\_Analysis/Mass\_Spectrometry/M ass\_Spectrometers\_(Instrumentation)/Electrospray\_Ionization\_Mass\_Spectrometry; *Geraadpleegd 16-02-2016.*
- 20 http://www.hindawi.com/journals/ijac/2012/282574/fig6/; Geraadpleegd 16-02-2016.
- 21 https://en.wikipedia.org/wiki/Quadrupole\_mass\_analyzer; Geraadpleegd op 16-02-2016.
- 22 https://en.wikipedia.org/wiki/Triple\_quadrupole\_mass\_spectrometer; Geraadpleegd op 16-02-2016.
- 23 Ouwehand. M; van Tellingen O.; Nooijen W.J.; Jansen E.; "De validatie voor bioanalietische methoden Farmacokinetiek" NKI/AvL, **2002**. *Geraadpleegd op 15-01-2016*.
- 24 http://www.socr.ucla.edu/applets.dir/f\_table.html; *Geraadpleegd op 15-01-2016*.
- 25 http://www.miniwebtool.com/relative-standard-deviation-calculator/; Geraadpleegd op 19-01-2016.
- 26 http://www.chromatographyonline.com/ion-suppression-major-concern-massspectrometry?id=&sk=&date=&pageID=2; Geraadpleegd op 20-01-2016.

- 27 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334925; Geraadpleegd op 29-02-2016.
- 28 http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cn100078a; Geraadpleegd op 29-02-2016.
- 29 http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/322415?lang=en&region=NL; *Geraadpleegd op 08-04-2016.*

## 5. Bijlagen

### Bijlage I. Stuctuurformules substraten











Erlotinib







Riluzole



Vemurafenib

Bijlage II. Quantitative analysis of the P-glycoprotein inhibitor Elacridar (GF120918) in human and dog plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection.

Bijlage III. Brain accumulation of Dasatinib is restricted by P-glycoprotein (ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) and can be enhanced by Elacridar Treatment.