

Razvoj kapilarnoelektroforetske metode za analizu ribocikliba

Klarić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:534077>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivana Klarić

**Razvoj kapilarnoelektroforetske metode za
analizu ribocikliba**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Mirandi Sertić na stručnom vodstvu, prenesenom znanju, susretljivosti i nesebičnoj pomoći u svakom trenutku.

Srdačno zahvaljujem doktorandici Lu Turković na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada te na svakodnevnom osmijehu i ugodnom društvu.

Najveće hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i ljubavi tijekom studiranja.

Rad je financiran sredstvima projekta UIP-2019-04-8461 Hrvatske zaklade za znanost.



SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. RIBOCIKLIB	1
1.1.1. Mehanizam djelovanja ribocikliba	1
1.1.2. Farmakokinetika ribocikliba.....	2
1.2. KAPILARNA ELEKTROFOREZA	3
1.2.1. Načelo kapilarne elektroforeze	3
1.2.2. Uređaj za kapilarnu elektroforezu	5
1.2.3. Elektroosmotski tok.....	6
1.2.4. Vrste kapilarne elektroforeze.....	9
1.2.5. Primjena kapilarne elektroforeze u farmaciji	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. Kemikalije	16
3.1.2. Standardi.....	16
3.1.3. Radni instrumenti	16
3.2. METODE	17
3.2.1. Priprema kapilare.....	17
3.2.2. Priprema otopina radnog pufera	18
3.2.3. Priprema standardne otopine	18
3.2.4. Uvjeti analize.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Odabir vrste i pH pufera	20
4.2. Odabir koncentracije pufera	24
4.3. Odabir napona	26
4.4. Odabir temperature.....	31
5. ZAKLJUČAK	34
6. LITERATURA	35
7. SAŽETAK/SUMMARY	37
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD ...39	

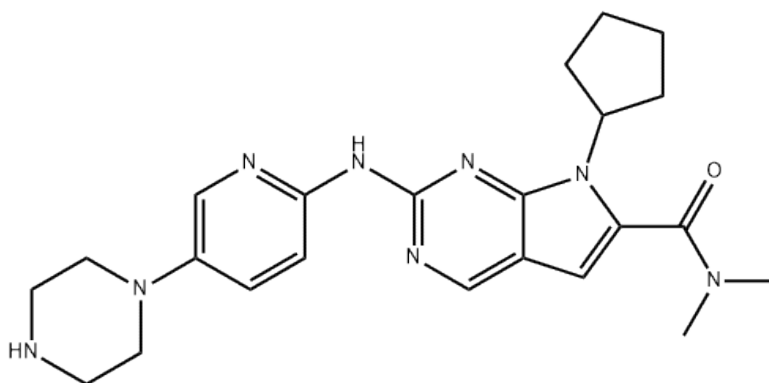
1. UVOD

1.1. RIBOCIKLIB

Ribociklib je antineoplastik koji spada u skupinu inhibitora protein kinaza. Koristi se u liječenju lokalno uznapredovalog ili metastaziranog raka dojke. Primjenjuje se samo kada stanice raka na površini imaju eksprimiran hormonski receptor (HR), a nemaju velike količine eksprimiranog receptora za humani epidermalni faktor rasta (HER2). Uvijek se koristi u kombinaciji s hormonskom terapijom koja će smanjiti djelovanje estrogena; ili s fulvestrantom koji je kompetitivni inhibitor estrogenskih receptora ili sa inhibitorom aromataze koji će smanjiti razine estrogena (ema.europa.eu).

1.1.1. Mehanizam djelovanja ribocikliba

Ribociklib (Slika 1) je selektivni inhibitor kinaza ovisnih o ciklinima (eng. cyclin-dependant kinase, CDK) 4 i 6. Kinaze ovisne o ciklinima su grupa protein kinaza koje u kompleksu sa ciklinima imaju važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. Ključna regulacijska točka staničnog ciklusa, prijelaz iz G1 faze (stanica metabolički aktivna i raste) u S fazu (udvostručenje DNA) regulirana je signalnim putem koji uključuje kompleks ciklin D-CDK4/6 te fosforilaciju retinoblastoma proteina (pRb) (Tripathy i sur., 2017). Promjene u ovom signalnom putu jasno su povezane s patogeneozom raka dojke, a pojačana ekspresija ciklina D1 izražena je u 50% svih stanica raka dojke.



Slika 1. Struktura ribocikliba

Aktivni kompleks ciklina D i CDK 4/6 ima aktivnost protein kinaze te fosforilira nizvodne proteine. Važan supstrat je protein retinoblastoma (pRb) koji se u nefosforiliranom obliku veže za transkripcijski faktor E2F i tako zaustavlja transkripciju gena odgovornih za napredovanje staničnog ciklusa. Kompleks CDK 4/6-ciklin D fosforilira protein retinoblastoma, a transkripcijski faktor E2F se otpušta od Rb-proteina te potiče transkripciju gena nužnih za prijelaz u S fazu staničnog ciklusa. (Ban i sur., 2019).

Kompleks CDK 4/6-ciklin D ne predstavlja aktivnu konformaciju enzima sve dok se na kompleks ne vežu molekula ATP-a i peptidni supstrat. Ribociklib je mala molekula koja se selektivno veže na aktivno mjesto CDK 4 i 6, na veznom mjestu ATP-a te tako sprječava nastanak katalitički aktivne konformacije enzima čime se sprječava fosforilacija pRb i prijelaz iz G1 u S fazu staničnog ciklusa (Martin i sur., 2017).

1.1.2. Farmakokinetika ribocikliba

Apsolutna bioraspoloživost ribocikliba nije poznata dok su farmakokinetička ispitivanja pokazala kako se maksimalna koncentracija lijeka u plazmi postiže 1-4 h nakon peroralne primjene lijeka. Vezanje za proteine ljudske plazme (ispitivano *in vitro*) iznosilo je oko 70 % i bilo je neovisno o koncentraciji, dok je u *in vivo* uvjetima ribociklib bio jednako distribuiran između crvenih krvnih stanica i plazme uz srednji omjer krv-plazma od 1,04. Prividni volumen distribucije u stanju dinamičke ravnoteže iznosio je 1090 l (ema.europa.eu). Eliminacija ribocikliba odvija se prvenstveno putem hepatičkog metabolizma (CYP 3A4). Nakon peroralne primjene lijeka, primarni metabolički putevi uključivali su oksidaciju, dealkilaciju, C i N-oksigenaciju i njihove kombinacije. Faza II biotransformacije uključivala je N-acetilaciju, sulfataciju, konjugaciju cisteinom, glukozilaciju i glukuronidaciju, a glavni cirkulirajući metaboliti uključivali su metabolit M13 (CCI284, N-hidroksilacija), M4 (LEQ803, N-demetilacija) i M1 (sekundarni glukuronid), a njihova farmakološka aktivnost bila je zanemariva u usporedbi s ishodišnom molekulom.

Metabolizam ribocikliba je ekstenzivan pri čemu nepromijenjeni lijek predstavlja 17,3 % primjenjene doze u fecesu te 12,1 % u urinu. N-demetilirani metabolit predstavljao je 13,9 % primijenjene doze u fecesu, odnosno 3,74 % u urinu. Brojni drugi metaboliti prisutni su u fecesu i urinu, ali u količinama manjim od 2,78 %.

Srednja vrijednost poluvijeka u plazmi iznosila je 32 sata, a ribociklib i njegovi metaboliti eliminirali su se uglavnom putem fecesa te manji dio putem bubrega (ema.europa.eu).

1.2. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Kapilarna elektroforeza je farmakopejska analitička tehnika koja omogućuje brzo i učinkovito analiziranje analita u uzorcima malih volumena. Omogućuje analizu svih vrsta analita (od malih organskih molekula, iona i neutralnih molekula, do velikih biomakromolekula) zbog mogućnosti primjene različitih mehanizama razdvajanja molekula. Prednosti CE kao analitičke tehnike su kratko vrijeme analize, visoka učinkovitost, niski troškovi, potrebne male količine uzorka i otapala, jednostavnost tehnike i ekološka prihvatljivost (Damić i Nigović, 2010; Sertić, 2016).

1.2.1. Načelo kapilarne elektroforeze

Osnovno načelo kapilarne elektroforeze je separacija električki nabijenih čestica koja se temelji na različitoj elektroforetskoj pokretljivosti u elektroforetskom mediju unutar kapilare malog promjera, pri čemu čestice putuju prema jednoj od elektroda (Li, 1992). Brzina gibanja čestice dana je sljedećim izrazom:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E$$

gdje je v_{ep} brzina putovanja iona, μ_{ep} elektroforetska pokretljivost čestice, a E primijenjeno električno polje koje predstavlja omjer primijenjenog napona (10-30 kV) i duljine kapilare:

$$E = \frac{V}{L}$$

gdje je V primijenjeni napon u voltima, a L duljina kapilare u centimetrima. Elektroforetska pokretljivost (μ_{ep}) za neku česticu u određenom mediju konstantna je veličina karakteristična za tu česticu dana izrazom:

$$\mu_{ep} = \frac{\sigma}{6\pi\eta r}$$

gdje je σ naboj čestice, η viskoznost otopine elektrolita, a r polumjer čestice (Stokesov polumjer). Povežu li se sve jednadžbe u jednu, dobije se izraz:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \frac{\sigma}{6\pi\eta r} \cdot \frac{V}{L}$$

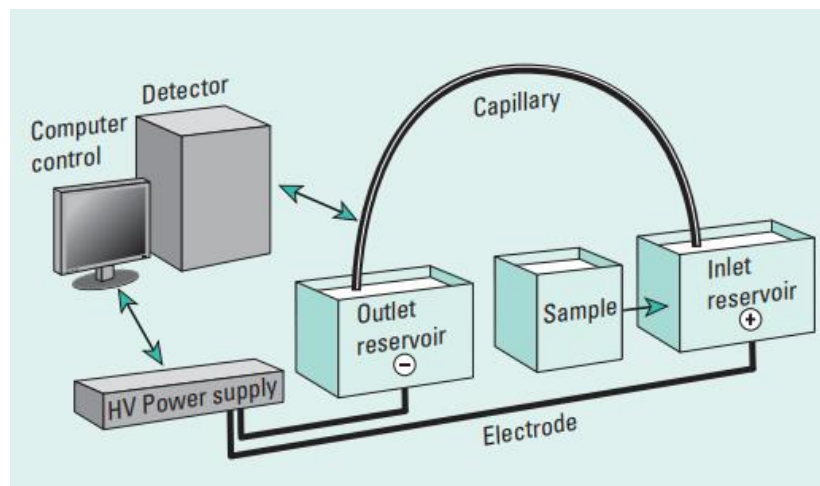
Iz kojeg se jasno vidi da čestice manjeg ionskog radijusa i većeg naboja putuju većom brzinom, dok velike, minimalno nabijene čestice putuju manjim brzinama (Damić i Nigović 2010; Lauer i Rozing, 2014). Brzina je proporcionalna jačini primijenjenog električnog polja, odnosno proporcionalna primijenjenom naponu, a obrnuto proporcionalna duljini kapilare.

Temeljnu ulogu u kapilarnoj elektroforezi ima kapilara ispunjena otopinom pufera te o njoj ovisi učinkovitost razdvajanja, razlučivanja, obilježja signala i odaziv detektora. Otopljeni analit putuje od početka kapilare do mjesta detektora u kapilari te se detekcija odvija u samoj kapilari (engl. *on-line detection*) iako su moguće i drugačije izvedbe. Vrijeme potrebno da analit pređe put od početka kapilare do mjesta detekcije naziva se vrijeme migracije. Rezultirajući slijed pikova dobiven zbog različitog vremena migracije molekula naziva se elektroferogram. Kvalitativna karakteristika tvari je pri tome vrijeme migracije, dok je kvantitativna karakteristika visina ili površina dobivenog pika koja je proporcionalna koncentraciji tvari. S obzirom da se detekcija odvija na mjestu detektora, a ne na kraju same kapilare, potrebno je uvijek navesti i efektivnu duljinu same kapilare, odnosno duljinu od početka kapilare do mjesta gdje se nalazi prozor za detektor, jer je efektivna duljina bitna za opisivanje migracije analita,

dok je ukupna duljina bitna za opisivanje primijenjenog električnog polja ($E = V/L$) (Sertić, 2016).

1.2.2. Uređaj za kapilarnu elektroforezu

Jedna od ključnih značajki tehnike jest jednostavnost samog instrumenta u kojem se provodi kapilarna elektroforeza. Uređaj (Slika 2) se sastoji od termostatisane kapilare, dvije elektrode, visokonaponskog izvora istosmjerne struje, ulaznog/izlaznog spremnika za pufer, sustava za unošenje uzorka i izmjenu pufera te detektora.



Slika 2. Osnovne komponente uređaja za kapilarnu elektroforezu (preuzeto iz: Lauer i Rozing 2014)

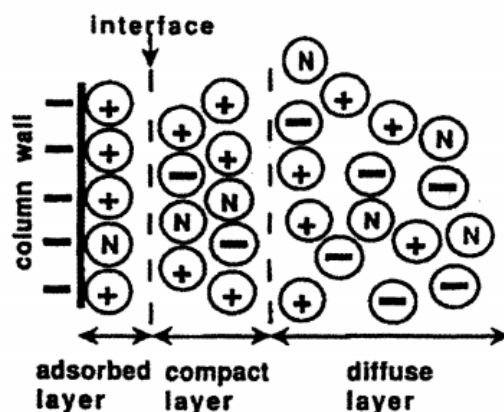
Separacija analita odvija se pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala (10-30 kV) koji se postiže visokonaponskim izvorom istosmjerne struje. Krajevi kapilare uronjeni su u otopinu elektrolita te se preko elektroda iz električnog izvora uspostavlja napon koji uzrokuje električno polje kroz kapilaru, a sama kapilara nalazi se unutar termostatisane kasete (Lauer i Rozing 2014; Lauer i Rozing, 2014). Idealna kapilara je kemijski i električki inertna, transparentna za UV-VIS područje valnih duljina, a najviše ovih uvjeta zadovoljavaju kvarcne kapilare tankih stjenki. Kako bi se poboljšala svojstva kapilare, povećala čvrstoća i omogućilo savijanje, kapilara se prekriva tankim slojem poliimida. Na mjestu detektora je sloj poliimida uklonjen s kapilare kako bi optička detekcija bila moguća. Unutarnji promjer kapilare je od 10 do 200 μm , a kako bi analiza bila kraća, koriste se što kraće kapilare, efektivne duljine 10-100

cm (najčešće 25 do 75 cm). Idealno bi bilo kad bi efektivna duljina kapilare bila što bliže stvarnoj duljini kako bi se ostvario maksimalan kapacitet separacije analita. (Weinberger 2000; Lauer i Rozing 2014). Osim optičke detekcije koja se odvija izravno u kapilari, detekcija se može odvijati i izvan kapilare, primjerice kod detektora spektrometrije masa, amperometrijskog i konduktometrijskog detektora (Sertić, 2016).

1.2.3. Elektroosmotski tok

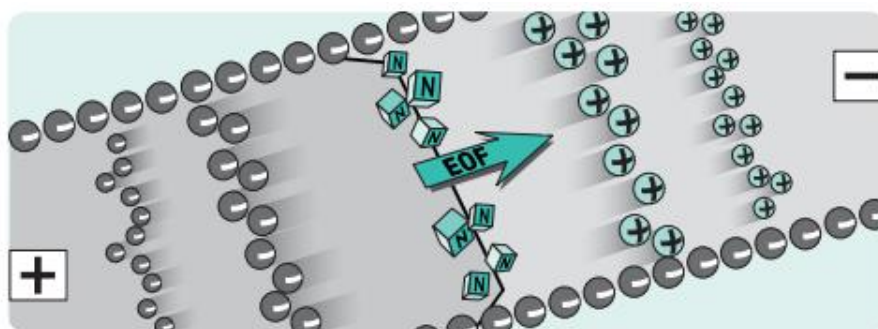
Elektroforezom se mogu odvajati samo nabijene molekule koje će se pod utjecajem električnog polja, ovisno o svom naboju i veličini, kretati određenom brzinom prema katodi ili anodi. Kapilarnom elektroforezom moguće je analizirati i nenabijene analite zahvaljujući elektroosmotskom toku. Neutralni analiti kretat će se unutar kapilare nošeni elektroosmotskim tokom (engl. *Electroosmotic flow*, EOF). Naime, unutrašnja stjenka kapilare (koja je najčešće od izvučenog kvarca sadrži brojne silanolne skupine (SiOH) koje ovisno o pH-vrijednosti korištenog elektrolita mogu biti više ili manje ionizirane. Silanolne skupine mogu biti u ioniziranom (SiO⁻) ili u neioniziranom obliku (SiOH). Elektroosmotski tok predstavlja tok čistog pufera unutar kapilare koji je upravo posljedica površinskog naboja koji se stvara na unutrašnjoj stjenci kapilare (deprotonirane silanolne skupine) te se smatra glavnom pokretačkom silom u kapilarnoj elektroforezi. Iako je pKa vrijednost silanolnih grupa teško odrediti i najčešće je nepoznata veličina, zna se da elektroosmotski tok postaje značajan tek pri pH vrijednostima većima od 4. Elektroosmotski tok se također javlja i kod korištenja drugih nenabijenih materijala, npr. teflona, što je vjerojatno rezultat adsorpcije aniona.

Kad je kapilara ispunjena otopinom elektrolita koji će deprotonirati silanolne skupine, kapilara ima negativno nabijenu površinu te su pozitivno nabijeni ioni iz elektrolitske otopine privučeni elektrostatskim silama. Nastaje električni dvosloj prikazan na Slici 3 u kojem su kationi iz elektrolita raspoređeni u tzv. čvrstom ili nepomičnom i difuzijskom sloju u kojem su raspoređeni i kationi i anioni.



Slika 3. Prikaz električnog dvosloja koji nastaje na negativno nabijenoj površini kvarcne kapilare (Preuzeto iz Weinberger 2000)

Raspored iona u električnom dvosloju stvara potencijal koji ima linearan pad u čvrstom sloju i eksponencijalni pad u difuznom sloju, te je upravo eksponencijalan pad potencijala odgovoran za nastanak elektroosmoze, a naziva se zeta potencijal (ζ). Kad se na krajevima kapilare primijeni napon, kationi bivaju privučeni prema katodi (negativno nabijena elektroda), a kako su otopljeni, svojim kretanjem povlače za sobom okolnu tekućinu, uzrokujući ukupni protok tekućine prema katodi, što se naziva elektroosmotским tokom (Slika 4). Sve neutralne čestice bit će nošene elektroosmotским tokom te koeluirati iz kapilare.



Slika 4. Elektroosmotский tok (preuzeto iz Lauer i Rozing 2014)

Sila koja pokreće elektroosmotский tok jednako je raspoređena duž stijenke kapilare, pa je i tok gotovo uniforman cijelom dužinom kapilare (za razliku od tekućinske kromatografije gdje je tok laminaran). EOF tako ima ravan rok profila kroz cijelu kapilaru zbog čega je disperzija analita značajno manja te je moguće dobiti uske i oštre pikove, bolje razlučivanje i bolju učinkovitost same tehnike. Nadalje, prednost elektroosmotского toka jest da uzrokuje gibanje svih analita u istom smjeru, ovisno o naboju. U uvjetima gdje je kapilara negativno

nabijena, a anoda (pozitivno nabijena elektroda) na injektorskom kraju, EOF će imati smjer od anode prema katodi. Kako je veličina elektroosmotskog toka za nekoliko redova veličina veća od elektroforetske pokretljivosti aniona, oni će se također kretati u smjeru prema katodi (iako bi se u normalnim uvjetima kretali prema anodi). Zahvaljujući tome, kationi, anioni i neutralne molekule mogu se istovremeno analizirati jer sve putuju u istom smjeru (Sertić, 2016).

Brzina elektroosmotskog toka definirana je izrazom:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E$$

gdje je v_{EOF} brzina elektroosmotskog toka, μ_{ep} je elektroosmotska pokretljivost, a E je jakost primijenjenoga električnog polja koja ovisi o primijenjenom naponu i duljini kapilare:

$$E = \frac{V}{L}$$

gdje je V primijenjeni napon u voltima, a L duljina kapilare u cm. Elektroosmotska pokretljivost (μ_{EOF}) definirana je izrazom:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta}$$

gdje je ε dielektrična konstanta, ζ zeta potencijal, a η viskoznost otopine elektrolita. Iz navedenih izraza vidi se da elektroosmotski tok ovisi o primijenjenom električnom polju, jačini i viskoznosti elektrolita te o zeta potencijalu. Uzimajući u obzir parametre o kojima ovisi EOF, jasno je da je mijenjanjem pojedinih uvjeta moguće utjecati na jačinu EOF, pri čemu je potrebno obratiti pozornost i na elektroforetsko ponašanje samog analita. Zeta potencijal snažno ovisi o naboju unutarnje stijenke kapilare koji pak ovisi o pH elektrolita, iz čega slijedi da će i sam EOF ovisiti o pH elektrolita. Kod kvarcne kapilare su silanolne skupine deprotonirane pri višim pH vrijednostima, a protonirane pri nižim pH vrijednostima pa će i sam EOF biti puno veći ukoliko je pH viši. Iako jači EOF znači kraće vrijeme analize, potrebno je obratiti pozornost da ne bude prebrz kako analiti ne bi eluirali prije separacije. S druge strane, pri niskim vrijednostima pH može doći do adsorpcije kationa na unutrašnju stijenku kapilare uslijed Coulombovih elektrostatskih interakcija. Zeta potencijal također ovisi i o ionskoj jakosti elektrolita na način da veća ionska jakost uzrokuje kompresiju električnog sloja, smanjenje zeta potencijala i smanjenje EOF. Kao što je vidljivo iz ranije navedenih izraza, jačina EOF se najlakše kontrolira promjenom električnog polja, odnosno primijenjenog napona na krajevima

kapilare te je proporcionalna primijenjenom naponu. Osim navedenog, ostali načini kontrole EOF navedeni su u Tablici 1. (Lauer i Rozing 2014; Sertić 2016).

Tablica 1. Utjecaj promjene različitih parametara na EOF

Varijabla	Rezultat	Komentar
Električno polje	Povećanjem električnog polja proporcionalno se povećava EOF	Smanjenjem el. polja može doći do smanjenja učinkovitosti i razlučivanja; povećanjem el. polja može doći do Joule-ovog zagrijavanja unutar kapilare
pH pufera	Pri većem pH su silanolne skupine kvarcne kapilare deprotonirane te je EOF veći	Najučinkovitiji način promjene EOF-a; utječe i na naboj i strukturu analita
Ionska jakost ili koncentracija pufera	Povećanjem se smanjuje zeta potencijal i EOF	Visoka ionska jakost uzrokuje visoku struju unutar kapilare i moguće Jouleovo zagrijavanje; niska ionska jakost može dovesti do adsorpcije uzorka
Temperatura	Mijenja viskoznost pufera (2-3% za svaki °C)	Temperaturu je potrebno kontrolirati programski
Organsko otapalo	Mijenja zeta potencijal ili viskoznost (najčešće smanjuje EOF)	Utjecaj je složen, učinci se najčešće određuju eksperimentalno; mogu promijeniti selektivnost metode
Surfaktant	Adsorbira na stijenku kapilare hidrofobnim ili ionskim interakcijama	Anionski povećavaju EOF; kationski mogu promijeniti smjer EOF-a
Neutralni hidrofilni polimeri	Adsorbiraju na stijenku kapilare hidrofobnim interakcijama	Smanjenje EOF promjenom površinskog naboja ili povećanjem viskoznosti
Kovalentne modifikacije	Kemijsko vezanje na stijenku kapilare	Trajne su; stabilnost upitna

1.2.4. Vrste kapilarne elektroforeze

Standardni uređaj za kapilarnu elektroforezu nudi mogućnost izvođenja različitih elektroforetskih tehnika. One se razlikuju prema mehanizmu razdvajanja analita što je moguće zbog različitih modifikacija uvjeta analize, kapilare, radnog pufera te načina detekcije analita.

Kapilarnoelektroforetske tehnike te vrsta analita koje je moguće analizirati pojedinom tehnikom prikazani su u Tablici 2. Upravo zbog različitih mogućnosti izvođenja tehnike, kapilarna elektroforeza ima širok spektar primjene i brojne prednosti. (Sertić, 2013).

Tablica 2. Vrste kapilarne elektroforeze (Preuzeto iz: Damić i Nigović, 2010)

Vrsta kapilarne elektroforeze	Vrsta analita
Kapilarna zonska elektroforeza (CZE)	Nabijeni analiti
Kapilarna gel elektroforeza (CGE)	DNA, RNA, proteini
Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC)	Neutralni i nabijeni analiti
Kapilarno izoelektrično fokusiranje (CIEF)	Proteini i peptidi
Kapilarna izotahoforeza (CITP)	Ioni
Kiralna kapilarna elektroforeza (CCE)	Kiralne molekule
Kapilarna elektrokromatografija (CEC)	Male molekule
Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (MEEKC)	Analiti slabo topljivi u vodi
Nevodena kapilarna elektroforeza (NACE)	Analiti netopljivi u vodi

Kapilarna zonska elektroforeza (engl. Capillary Zone Electrophoresis, CZE) ili kapilarna elektroforeza slobodne otopine najčešće je korištena kapilarnoelektroforetska tehnika kojom je moguće brzo i efikasno analizirati brojne analite. Separacija se temelji na razlici između veličine i naboja različitih analita pri određenom pH, analiti se razlikuju u elektroforetskoj pokretljivosti u danom puferu pri čemu dolazi do njihove separacije. Ovom tehnikom moguće je istodobno analizirati katione i anione koji će se zbog elektroosmotskog toka gibati u smjeru iste elektrode, dok nije moguće izvesti separaciju neutralnih spojeva jer koeluiraju s elektroosmotskim tokom (Li, 1992).

Kapilarna gel elektroforeza (engl. *Capillary Gel Electrophoresis*, CGE) temelji se na razlici u veličini analita koji putuju kroz pore gelom napunjene kapilare. Gel djeluje kao molekularno sito pri čemu manje molekule ulaze u pore gela i sporije putuju kroz kapilaru, dok se veće molekule brže gibaju jer neće ući u pore gela. Najčešće se koriste linearno povezani gelovi (poliakrilamid i metilceluloza), kovalentno unakrsno povezani (bis-poliakrilamid) ili gelovi vezani vodikovim vezama (agaroza). Tehnika se najčešće rabi za analize DNA, RNA, peptida i proteina (Damić i Nigović, 2010).

Micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, MEKC) predstavlja kombinaciju elektroforeze i kromatografije. U otopinu radnog pufera dodaju se površinski aktivne tvari (surfaktanti) koje iznad kritične micelarne koncentracije (CMC) formiraju sferične micide čije su polarne glave u kontaktu s puferom, a hidrofobni repovi okrenuti prema unutrašnjosti micide. Tehnikom je osim nabijenih moguće analizirati i neutralne analite koji stupaju u različite interakcije s micelama, te zbog njihovog naboja putuju kroz kapilaru. Micide mogu biti pozitivno ili negativno nabijene ovisno o vrsti korištenog surfaktanta. Najčešće se koristi natrijev dodecilsulfat (engl. *Sodium dodecyl sulfate*, SDS) koji tvori negativno nabijene micide. One se zbog svog naboja kreću prema anodi, no nošene elektroosmotskim tokom ipak putuju prema katodi. Interakcija analita s micelama putem elektrostatskih i hidrofobnih interakcija je načelo s kojim se susrećemo u kromatografiji te se kaže da micide tvore pseudostacionarnu fazu. Brzina kretanja analita ovisit će o konstanti raspodjele između micela i vodene otopine (za neutralne analite), a za nabijene analite i o njihovom naboju i veličini (Damić i Nigović, 2010).

Kapilarno izoelektrično fokusiranje (engl. *Capillary Isoelectric Focusing*, CIEF) je gel elektroforetska tehnika u kojoj se kapilara puni mješavinom analita i amfolita pri čemu se u kapilari stvori pH-gradijent. Na anodi se nalazi kisela otopina (pH 3), a na katodi bazična otopina (pH 9) te primjenom električnog polja peptidi i proteini putuju kroz medij do područja na kojem gube naboj, tj. do područja gdje pH vrijednost odgovara njihovoj izoelektričnoj točki. Zbog gubitka naboja se više ne gibaju u mediju već se na tom mjestu zaustavljaju. Kad je postignuto stabilno stanje, struja više ne teče, a odijeljene uske vrpce analita se pokreću prema detektoru primjenom tlaka ili dodatkom soli. Tehnika je visokog razlučivanja te je moguće razdvojiti proteine koji se u izoelektričnoj točki razlikuju svega 0,005 pI jedinica (Sertić 2016).

Kapilarna izotahoforeza (engl. *Capillary Isotachopheresis*, CITP) je tehnika koja se provodi u diskontinuiranom mediju, tj. rabe se dva elektrolita različite pokretljivosti. Vodeći

elektrolit ima veću pokretljivost no ioni analita, a terminalni elektrolit manju pokretljivost. Molekule analita se kondenziraju u odijeljene zone između vodećeg i terminalnog elektrolita, a svi analiti unutar određene zone putuju istom brzinom koja je definirana brzinom vodećeg elektrolita. Kako bi se održala ravnotežna brzina, unutar svake zone se mijenja električno polje te je ono najslabije u zoni s najvećom pokretljivošću. Taj fenomen održava oštre granice među zonama. Za razliku od CZE gdje je količina analita proporcionalna površini pika, u CITP je količina analita proporcionalna duljini zone, a CITP se koristi kao standardna metoda u analizi seruma, plazme, urina i cerebrospinalne tekućine, a kombinira se i s drugim tehnikama za ukoncentriravanje uzorka (Li 1992; Damić i Nigović 2010).

Kiralna kapilarna elektroforeza (engl. *Chiral Capillary Electrophoresis*, CCE) je tehnika koja se koristi za analizu kiralnih molekula. U otopinu radnog pufera se doda kiralni sektor (ciklodekstrini, krunski eteri, žučne soli, kompleksi bakar(II)-aspartata itd.), a selektivnost se postiže uporabom odgovarajuće vrste i koncentracije kiralnog selektora te dodatkom modifikatora poput alkohola, površinskih tvari i metalnih iona. Tehnika je puno jeftinija od uobičajeno korištene plinske ili tekućinske kromatografije, a za razliku od kiralne kromatografije, visoka učinkovitost se postiže korištenjem relativno malog broja kiralnih sektora. Tehnika se koristi za analizu i razdvajanje aminokiselina i kiralnih lijekova. (Sertić 2016).

Kapilarna elektrokromatografija (engl. *Capillary electrochromatography*, CEC) je nova tehnika visoke učinkovitosti koja objedinjuje kapilarnu elektroforezu i klasičnu kromatografiju, a primjenjuje se za analizu malih molekula. Koristi se kapilara ispunjena kromatografskom stacionarnom fazom napunjena *in situ* polimerizacijom ili silanizacijom, a postoje i komercijalno dostupne napunjene kapilare. Analiti se tako razdvajaju zbog različite elektroforetske pokretljivosti te razlike u koeficijentu razdijeljenja između stacionarne i mobilne faze (Damić i Nigović, 2010).

Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (engl. *Microemulsion Electrokinetic Chromatography*, MEEKC) je tehnika koja kao medij za separaciju analita koristi mikroemulziju. Mikroemulzije su stabilne bistre otopine koje se sastoje od uljne (najčešće heptan ili oktan) i vodene faze stabilizirane surfaktantom i kosurfaktantom, a može se sastojati od kapljica vode raspršenih u uljnoj fazi ili kapljica ulja raspršenih u vodenoj fazi. Do separacije analita dolazi zbog razdijeljenja između vodene i uljne faze mikroemulzije. Selektivnost i razlučivanje između analita se postižu odabirom otapala i mijenjanjem koncentracije

surfaktanta. Tehnika se prvenstveno koristi za analizu molekula teško topljivih ili netopljivih u vodi (Terabe 2009., Damić i Nigović 2010).

Nevodena kapilarna elektroforeza (engl. *Nonaqueous Capillary Electrophoresis*, NACE) je kapilarnoelektroforetska tehnika koja koristi samo organska otapala, a koristi se u svrhu analize analita netopljivih u vodi. Kako viskoznost i dielektrična konstanta izravno utječu na EOF, zbog dodatne selektivnosti i mogućnosti razdvajanja analita primjenom određenih organskih otapala pri razvoju metode, koristi se i za analite topljive u vodi (Damić i Nigović 2010).

1.2.5. Primjena kapilarne elektroforeze u farmaciji

Kapilarna elektroforeza kao moćna separacijska metoda ima široku primjenu u farmaciji, primjenjuje se u istraživanju, razvoju, kontroli kvalitete, čistoće i u stabilitetnim studijama lijekova. Razvoj različitih tehnika kapilarne elektroforeze omogućio je analizu širokog spektra analita, od malih organskih molekula, iona i neutralnih molekula, do velikih molekula poput DNA i proteina. Svaka od razvijenih tehnika ima prednosti i nedostatke u analizi pojedine vrste analita. Kapilarna elektroforeza svakako nudi brojne prednosti, ne zahtijeva znatnu predobradu uzorka, jednostavna je, brza, automatizirana, podrazumijeva različite mehanizme separacije i niske troškove analize te veliko razlučivanje i efikasnost čak i s malim volumenima analita. Koristi se u analizi ljekovitih oblika, kapsula, tableta, krema, injekcijskih otopina te složenih uzoraka poput bioloških tekućina i tkiva gdje se uspješno primjenjuje za analizu lijekova i njihovih metabolita. CE se pokazala kao korisna analitička tehnika u analizi lijekova gdje se koristi kao brza i jednostavna metoda za precizno određivanje sadržaja lijeka u svim vrstama ljekovitih oblika. Zbog velike moći razlučivanja se koristi za određivanje čistoće lijekova, a najveću prednost pokazuje u analizi peptidnih lijekova i proteina. Osim navedenog, primjenjuje se za analizu kiralnih molekula i enantiomerne čistoće zbog razvoja tehnike kao što je kiralna kapilarna elektroforeza. Također, kapilarna elektroforeza omogućuje i određivanje biomolekularnih interakcija i stupanj vezanja lijeka na proteine plazme što se koristi u proučavanjima farmakokinetike lijekova.

Najjednostavnija i ujedno najčešće korištena tehnika je kapilarna zonska elektroforeza, a sve više se koristi i micelarna elektrokinetička kromatografija. CZE je našla primjenu u određivanju djelatne tvari u ljekovitom obliku, provjeri čistoće, određivanju onečišćenja,

studijama farmakokinetike, identifikaciji i određivanju metabolita lijekova u biološkim uzorcima, a značajan uspjeh postignut je u peptidnom mapiranju. CZE je zamijenila i tradicionalno korištenu ionsku kromatografiju u separaciji anorganskih i organskih kiselina. MEKC za razliku od CZE omogućuje analizu i nenabijenih analita te se tako koristi za njihovu te analizu nabijenih analita i širok raspon tvari hidrofilnog i hidrofobnog karaktera (aminokiseline, nukleotidi, vitamini, velik broj lijekova...). Pojedine tehnike kapilarne elektroforeze i vrsta analita za čiju se analizu koriste ranije su prikazane u Tablici 2 (Ahuja 2008; Damić i Nigović 2010).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Karcinom dojke globalni je zdravstveni problem i najčešće dijagnosticirana zloćudna bolest u svijetu. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) za 2020. godinu, 11,7 % svih dijagnosticiranih karcinoma činio je upravo karcinom dojke, a bio je poguban za 684 996 žena te je kao takav jedan od primarnih uzroka smrti žena u svijetu. (<https://www.who.int/>). Najčešći podtip karcinoma dojke jest HR+/HER2-, ili hormonski ovisan karcinom, koji čini 68% svih dijagnosticiranih karcinoma dojke. No unatoč velikoj učestalosti, 90% pacijenata preživi barem 5 godina nakon dijagnoze jer HR pozitivni karcinomi najčešće reagiraju na endokrinu terapiju (<https://seer.cancer.gov>, Beus i Rajić, 2019).

Bolje poznavanje mehanizama nastanka i razvoja karcinoma dojke dovodi do razvoja novih inovativnih lijekova koji u kombinaciji s već postojećom endokrinom terapijom dovode do napretka u liječenju.

Ribociklib je novoodobren antineoplastik, registriran 2017. godine, a koristi se u politerapiji s hormonskom terapijom, inhibitorom aromataze ili fulvestrantom kod uznapredovalog ili metastatskog karcinoma pozitivnog na hormonski receptor (<https://ema.europa.eu>).

Velik problem pri liječenju raka dojke jesu brojne nuspojave. Kako bi se postigao željeni terapijski učinak i maksimalna moguća sigurnost, smanjila toksičnost i incidencija nuspojava, važno je osigurati adekvatnu izloženost lijeku odnosno odabrati optimalnu dozu lijeka za pojedinog pacijenta. Značajan doprinos u tome ima razvoj pouzdanih i točnih analitičkih metoda za terapijsko praćenje lijeka (engl. *Therapeutic Drug Monitoring*, TDM) Stoga je cilj ovog istraživanja bio razviti jednostavnu kapilarnoelektroforetsku metodu za analizu antineoplastika ribocikliba.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Otopina fosfatnog pufera 50mM, pH=2,5 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Izopropanol 99,9% (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Metanol (J.T. Baker, Nizozemska)
- Acetonitril (J.T. Baker, SAD)
- Otopina boratnog pufera 50mM, pH=9,3 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Natrijev dodecil sulfat (Poch, Poljska)
- Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labonco, SAD)

3.1.2. Standardi

- Ribociklib (BioVision)
- Diazepam (JGL, Rijeka, Hrvatska)

3.1.3. Radni instrumenti

- Analitička vaga AG245 (Mettler, Toledo, Grieffensee, Švicarska)
- Sustav za kapilarnu elektroforezu s integriranim detektorom niza dioda (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Sustav za pročišćavanje vode WaterPro (Labonco, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)
- Vortex mješalica (Ika, Njemačka)

3.1.4. Pribor

- Bočice za uzorkovanje za kapilarnu elektroforezu od 1ml (Agilent Technologies, SAD)
- Poliuretanski čepovi za bočice za uzorkovanje za kapilarnu elektroforezu (Agilent Technologies, SAD)
- Kapilara od izvučenog kvarca unutrašnjeg promjera 50 μm , ukupne duljine 38 cm, efektivne duljine 30 cm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Pipete model Pipet-Lite XLS (Rainin instrument LLC, Oakland, CA, SAD)
- Nastavci za pipete (Rainin instrument LLC, Oakland, CA, SAD)
- Staklene tikvice s ravnim dnom 5 ml (Iso Lab)
- Staklene tikvice s ravnim dnom 10 ml (Iso Lab)

3.1.5. Programski paketi

- CS, OpenLab CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema kapilare

Prije prvog korištenja instrumenta kapilara od izvučenog kvarca aktivirana je ispiranjem 5 minuta s metanolom, 10 min 1M NaOH, potom 10 minuta ultračistom vodom te 20 minuta otopinom radnog pufera.

Na početku svakog radnog dana kapilara se ispire 10 minuta 10% (v/v) fosfornom kiselinom, 10 minuta ultračistom vodom te 10 minuta otopinom radnog pufera. Prije nego je utvrđeno da je za analizu pogodan pufer niskog pH, analiza je provedena u bazičnim

uvjetima te je za ispiranje kapilare umjesto 10% (v/v) fosforne kiseline korišten 0,1 M natrijev hidroksid.

Nakon svake analize kapilara je ispirana 1 minutu 10% (v/v) fosfornom kiselinom te 1 minutu otopinom radnog pufera, a prije svake analize je ispirana 2 minute otopinom radnog pufera.

Prilikom mijenjanja koncentracije radnog pufera, kapilara je ispirana 5 minuta puferom nove koncentracije.

Na kraju svakog radnog dana kapilara je ispirana ultračistom vodom 20 minuta, a krajevi kapilare uronjeni su u vijale s ultračistom vodom.

3.2.2. Priprema otopina radnog pufera

Otopina surfaktanta SDS-a koncentracije 100 mM pripremljena je otapanjem 2,8837 g SDS-a u manjoj količini vode u odmjernoj tikvici od 100 mL na ultrazvučnoj kupelji radi boljeg otapanja. Tikvica je potom nadopunjena vodom do oznake.

Korištena je gotova otopina boratnog pufera, koncentracije 50 mM, pH 9,3 proizvođača Agilent Technologies (Waldbronn, Njemačka) te gotova otopina fosfatnog pufera, pH 2,5, koncentracije 50 mM istog proizvođača.

Gotove matične otopine surfaktanta, fosfatnog i boratnog pufera čuvane su na sobnoj temperaturi, a neposredno prije analize, otopine radnih pufera pripremljene su miješanjem odgovarajućih volumena otopine boratnog ili fosfatnog pufera te otopina SDS-a, organskog otapala i ultračiste vode.

3.2.3. Priprema standardne otopine

Standardna otopina ribocikliba pripremljena je vaganjem određene količine standarda ribocikliba, prenošenjem u staklenu tikvicu volumena 5 ml, a otapanje u 50% (v/v) metanolu pospješeno je korištenjem ultrazvučne kupelji tijekom 10 minuta. Otopina je razrijeđena dodatkom 50% (v/v) metanola te je dobivena konačna koncentracija 1,06 mg/ml. Tijekom rada korištena je zaštitna oprema.

Standardna otopina unutarnjeg standarda diazepama pripremljena je vaganjem određene količine diazepama, prenošenjem u staklenu tikvicu volumena 10 ml te otapanjem u acetonitrilu do konačne koncentracije 1,04 mg/ml.

3.2.4. Uvjeti analize

Analiza je provedena na uređaju za kapilarnu elektroforezu proizvođača Agilent Technologies (Waldbronn, Njemačka) s integriranim detektorom niza dioda s kapilarom od izvučenog kvarca duljine 38 cm, efektivne duljine 30 cm, unutrašnjeg promjera 50 μm , također proizvođača Agilent Technologies (Waldbronn, Njemačka).

Uzorci su injektirani 4 s, pod tlakom 50 mbar, pri temperaturi 20 °C. Analize su provedene na valnoj duljini detektora 270 nm gdje ribociklib ima apsorpcijski maksimum.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Odabir vrste i pH pufera

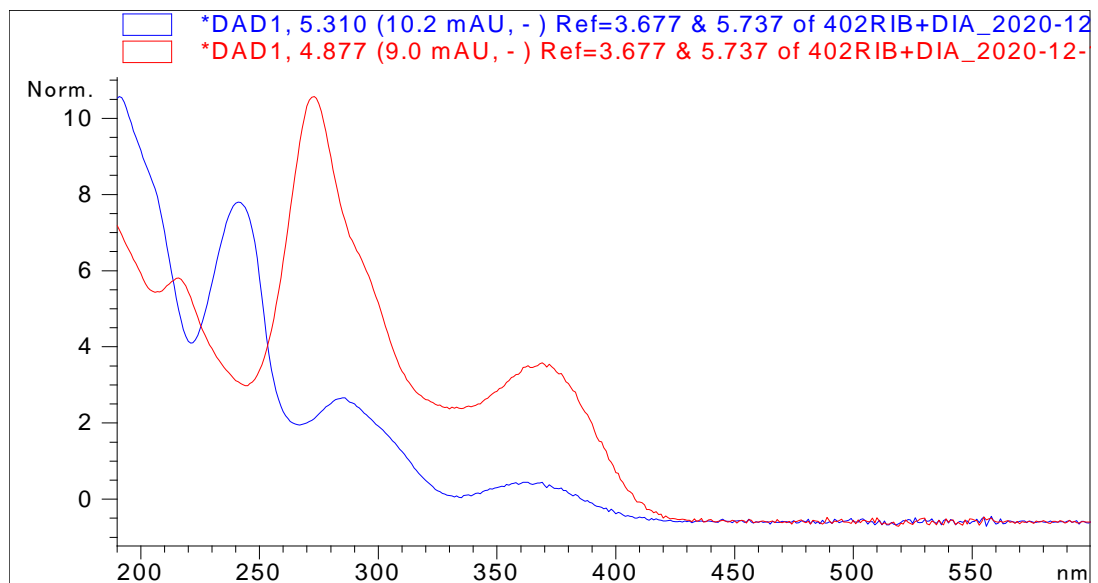
Prvi ispitivani parametar pri razvoju nove kapilarnoelektroforetske metode je vrsta i pH pufera. O pH pufera ovisit će naboj analita te elektroosmotski tok koji predstavlja tok čistog pufera u kapilari. Silanolne skupine (SiOH) na unutrašnjoj stijenci kapilare više su ili manje ionizirane ovisno o pH pufera. Pri pH većem od 4, silanolne skupine će biti deprotonirane (SiO⁻), a kationi iz otopine bit će im privučeni jakim elektrostatskim silama te će EOF biti jači, a vrijeme analize kraće, dok će pri nižim vrijednostima pH vrijeme analize biti dulje.

Promjenom pH pufera mijenja se i ionizacija analita, što utječe na njegovu elektroforetsku pokretljivost. Budući da su pKa vrijednosti ribocikliba 5,5 i 8,6, molekula će biti nenabijena pri pH većem od 8,6, ionizirana pri pH vrijednostima između 5,5 i 8,6, a dvostruko ionizirana pri pH manjem od 5,5. Može se zaključiti da će analizi odgovarati pufer niskog pH pri kojem će molekula biti nabijena i kretati se pod utjecajem električnog polja u smjeru katode. Niske vrijednosti pH, s druge strane, ne pogoduju EOF koji neće biti značajan, no molekula ribocikliba bi se zbog svog pozitivnog naboja kretala ispred EOF.

Druga mogućnost jest osigurati značajan EOF primjenom pufera višeg pH pri kojem će EOF biti jači i vrijeme analize kraće. Pri većem pH (>8,6) molekula ribocikliba će biti nenabijena te ju je kao takvu moguće analizirati primjenom micelarne elektrokinetičke kromatografije. Zbog svoje dostupnosti i niske cijene, najčešće korišten je anionski surfaktant SDS koji stvara micidele pri koncentraciji većoj od 8-9 mM. Micidele čine pseudostacionarnu fazu koja stupa u interakcije s analitom, a same putuju prema anodi te je potreban jak EOF kako bi putovale u smjeru negativno nabijene katode. Pri izradi ovog diplomskog rada, u preliminarnim eksperimentima korišten je SDS u koncentracijama od 25-100 mM te boratni pufer pH= 9,18, što nije dalo željeni rezultat, logičan izbor bio je nastaviti analizu pri nižem pH na kojem će analit biti nabijen i kao takav biti pogodniji za analizu kapilarnom zonskom elektroforezom. Korišten je fosfatni pufer pH vrijednosti 2,5 pri kojem je molekula ribocikliba pod utjecajem istosmjerne električne struje zbog svog pozitivnog naboja putovala prema katodi te je dobiven pik vremena migracije oko 4 minute. Nizak pH je imao negativan učinak na EOF koji je posljedično bio spor i nestalan što je

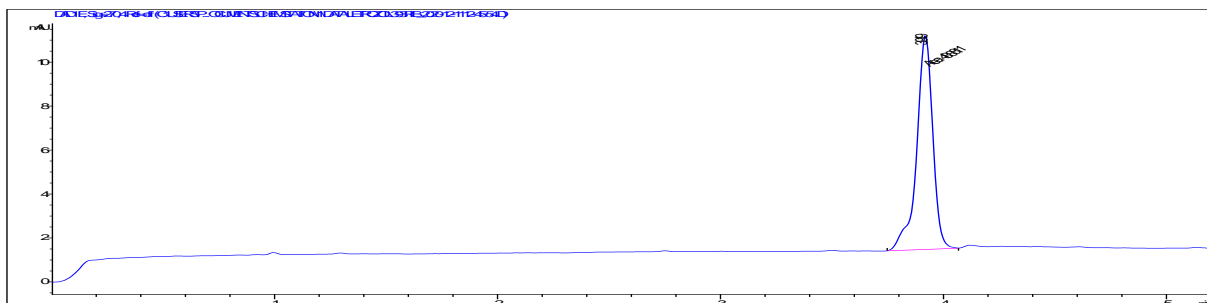
uzrokovalo odstupanja u vremenu migracije i površini pikova. Kako bi se osigurao što stabilniji EOF i time smanjila odstupanja i osigurala ponovljivost metode, kapilara je ispirana 1 minutu 10% (v/v) fosfornom kiselinom te 1 minutu otopinom radnog pufera, a prije svake analize je ispirana 2 minute otopinom radnog pufera. Također, u istu svrhu su puferi zamijenjeni nakon svake treće provedene analize.

Kao unutarnji standard dodan je diazepam, molekula sličnih svojstava koja će eluirati u sličnom vremenu kao i analit ali neće utjecati na analizu analita i smanjit će vjerojatnost pogrešaka. Diazepam je u fosfatnom puferu pH=2,5 pozitivno nabijen jer ima pKa vrijednost 3,4 i manja je molekula od ribocikliba, no eluira nakon njega jer je ribociklib pri istim uvjetima dvostruko pozitivno nabijen. Ribociklib ima tri apsorpcijska maksimuma od kojih je najveći onaj na 270 nm. Diazepam kao i ribociklib ima tri apsorpcijska maksimuma, a najveći je na 240 nm što se može vidjeti na Slici 5 gdje su prikazani preklopljeni karakteristični UV-Vis spektri ribocikliba i diazepama. Za daljnje analize odabrana je valna duljina detekcije 270 nm, a korištena je od početnih analiza sa samim ribociklibom kao i nakon dodatka unutarnjeg standarda.



Slika 5. Karakteristični UV-Vis spektri ribocikliba (crveno) i diazepama (plavo),

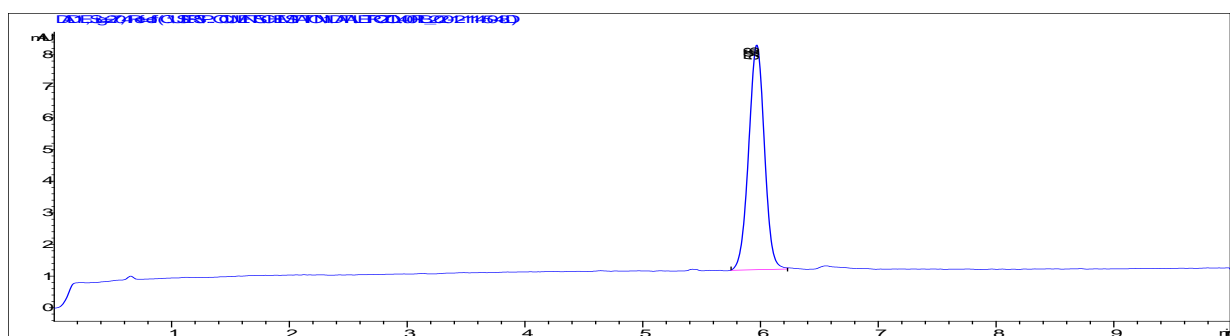
Tijekom odabira optimalnog pufera za analizu ribocikliba te ribocikliba i unutarnjeg standarda diazepama isproban je fosfatni pufer pH = 2,5 te kombinacije fosfatnog pufera i SDS-a kako bi se vidjele razlike u elektroferogramima. U ispitivanjima s dodatkom SDS-a korišten je negativan polaritet, tj. „obrnuti napon“ dobiven zamjenom mjesta anode i katode. Katoda se nalazila na injekcijskom kraju, a anoda na kraju detektora. Isprobane su koncentracije 40 mM fosfatnog pufera sa 20 mM SDS-om te 30 mM fosfatni pufer sa 30 mM i 15 mM SDS-om. Dodatkom SDS-a dobiven je jasan, ali asimetričan pik ribocikliba koji se može vidjeti na Slici 6. Vrijeme analize je produljeno u odnosu na analizu sa samim fosfatnim puferom, a smanjenjem koncentracije SDS-a poboljšan je izgled pika.



Slika 6. Elektroferogram otopine standarda ribocikliba (66 µg/ml)

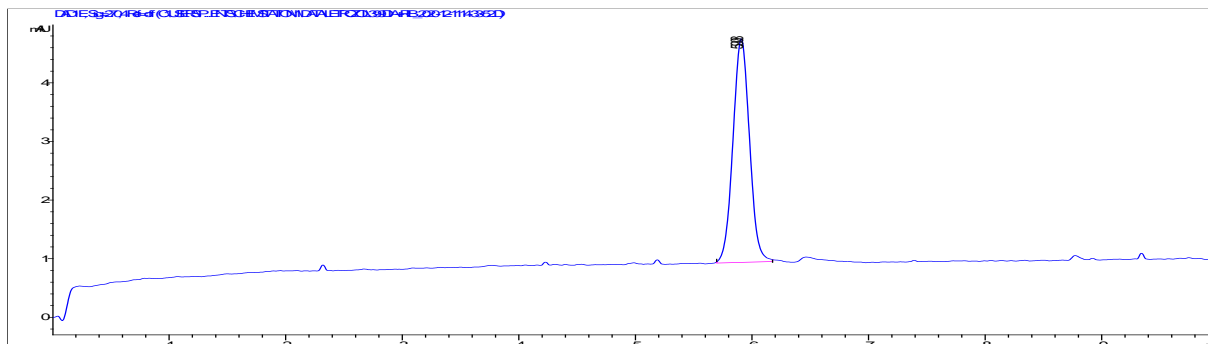
UVJETI ANALIZE: 40 mM fosfatni pufer pH 2,5, 20 mM SDS, valna duljina detekcije 270 nm, primijenjeni napon -25 kV, temperatura kapilare 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar

Pri istim uvjetima (30 mM fosfatni pufer i 15 mM SDS) analizirani su sam ribociklib i smjesa ribocikliba i diazepama. Kako je ranije napomenuto, smanjenjem koncentracije SDS-a poboljšan je izgled pika (Slika 7). Analizom smjese ribocikliba sa diazepamom dobiven je jedan pik (Slika 8), a provjerom UV-Vis spektra (Slika 9) zaključeno je da su ribociklib i diazepam koelulirali. Smanjenjem napona i dodatkom 10 % (v/v) izopropanola nije bilo moguće razdvojiti pikove ribocikliba i unutarnjeg standarda.



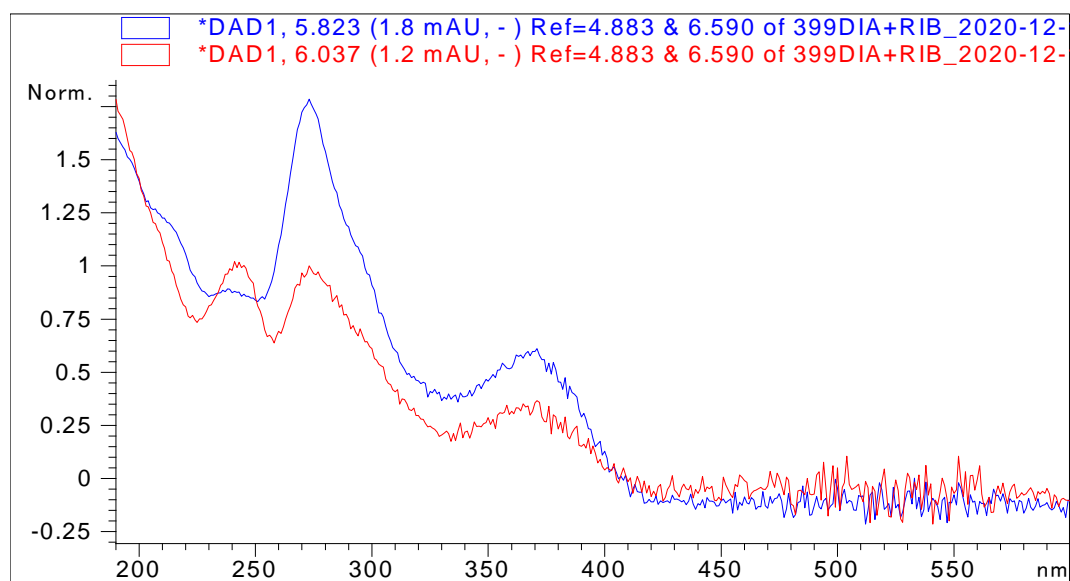
Slika 7. Elektroferogram standardne otopine ribocikliba (66 µg/ml)

UVJETI ANALIZE: 30 mM fosfatni pufer pH 2,5, 15 mM SDS, valna duljina detekcije 270 nm, primijenjeni napon -25 kV, temperatura kapilare 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar



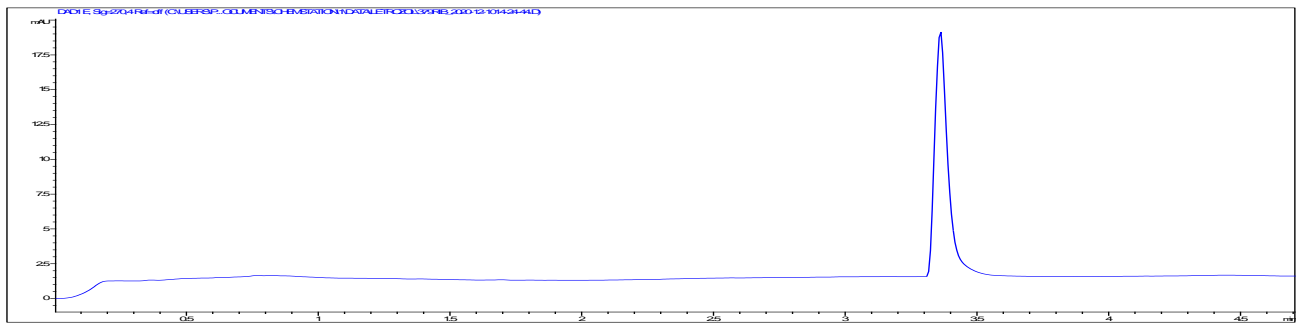
Slika 8. Elektroferogram standardnih otopina ribocikliba (50 $\mu\text{g/ml}$) i unutarnjeg standarda diazepama (50 $\mu\text{g/ml}$)

UVJETI ANALIZE: 30 mM fosfatni pufer pH 2,5, 15 mM SDS, valna duljina detekcije 270 nm, primijenjeni napon -25 kV, temperatura kapilare 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar



Slika 9. UV-Vis spektar pika u kojem su koeluirali ribociklib i diazepam

U preliminarnim ispitivanjima se pokazalo da su simetrija i oblik pika u ispitivanjima sa samim fosfatnim puferom (pH 2,5) (Slika 10) bili bolji nego s dodatkom SDS-a, a vrijeme analize kraće, nakon čega je slijedila optimizacija tih uvjeta.



Slika 10. Elektroferogram standardne otopine ribocikliba (100 µg/ml)

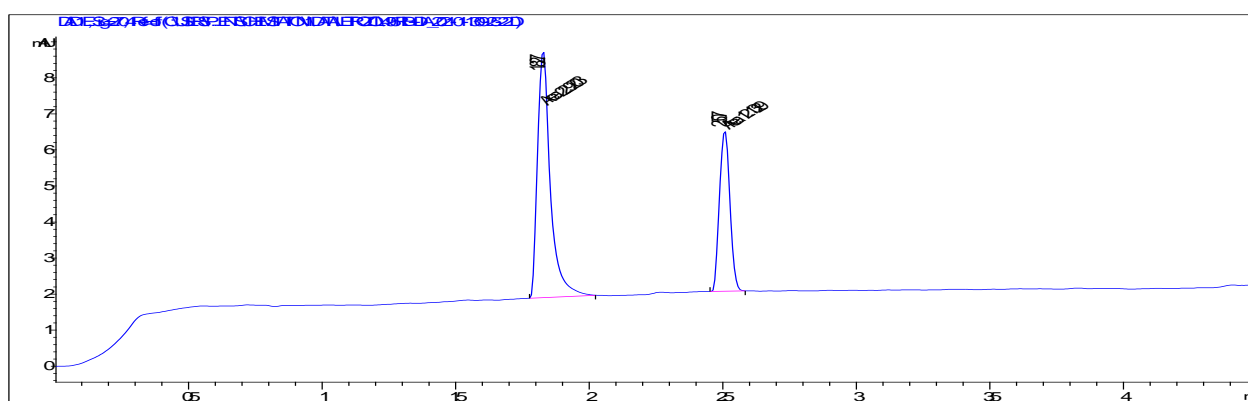
UVJETI ANALIZE: 50 mM fosfatni pufer pH 2,5, valna duljina detekcije 270 nm, primijenjeni napon 30 kV, temperatura kapilare 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar

4.2. Odabir koncentracije pufera

Koncentracija pufera čimbenik je koji utječe na EOF. Povećanjem koncentracije, tj. ionske jakosti pufera dolazi do kompresije električnog dvosloja što dovodi do smanjenja zeta potencijala, a samim time i smanjenja EOF čime se vrijeme analize produljuje. Također, povećanjem koncentracije pufera, povećava se provodljivost same mobilne faze i veća je jakost električne struje što dovodi do zagrijavanja elektrolita. Toplina koja se razvije protjecanjem električne struje naziva se Jouleovo zagrijavanje i potrebno ga je izbjegavati kako ne bi došlo do degradacije analita zbog termolabilnosti te kako ne bi nastao temperaturni gradijent unutar kapilare koji bi smanjio učinkovitost i razlučivanje. Niska ionska jakost pak može dovesti do adsorpcije analita za stjenke kapilare pa je jako bitno odabrati optimalnu koncentraciju pufera. Najčešće se koriste koncentracije u rasponu od 30 do 50 mM.

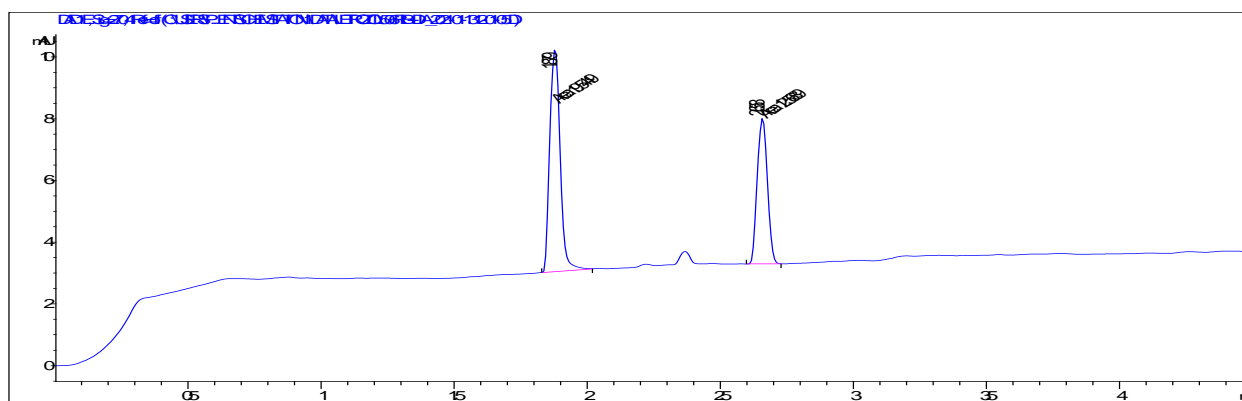
Tijekom izrade diplomskog rada isprobane su koncentracije fosfatnog pufera u rasponu od 15 mM do 50 mM pri dva različita napona. Povećanjem koncentracije pufera produljivalo se vrijeme analize, no i dalje je pri najvećoj koncentraciji bilo relativno kratko (2,4 min pri koncentraciji pufera 50 mM) te nije bilo odlučujući faktor. Pri koncentracijama većim od 40 mM analize su bile neponovljive zbog utjecaja Jouleovog zagrijavanja. Pri manjim koncentracijama simetrija i broj teorijskih tavana nisu bili zadovoljavajući, dolazilo je do tzv. *tailinga* pika ribocikliba zbog adsorpcije na stjenke kapilare. Na Slici 11 vidi se *tailing* pika pri niskoj koncentraciji pufera, a na Slici 12 se vidi poboljšanje simetrije pika povećanjem

koncentracije pufera. Površina pika (30,71) i broj teorijskih tavana (15274,67) bili su najveći pri koncentraciji 40 mM što upućuje na najveću učinkovitost pri toj koncentraciji. Također, najbolja simetrija pikova postignuta je korištenjem pufera koncentracije 40 mM, a RSD vremena migracije analita i njegove površine bile su najmanje što upućuje.



Slika 11. Elektroferogram standardnih otopina ribocikliba (50 µg/ml) i unutarnjeg standarda diazepam (50 µg/ml)

UVJETI ANALIZE: 25 mM fosfatni pufer pH 2,5, valna duljina detekcije 270 nm, primijenjeni napon 30 kV, temperatura kapilare 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar



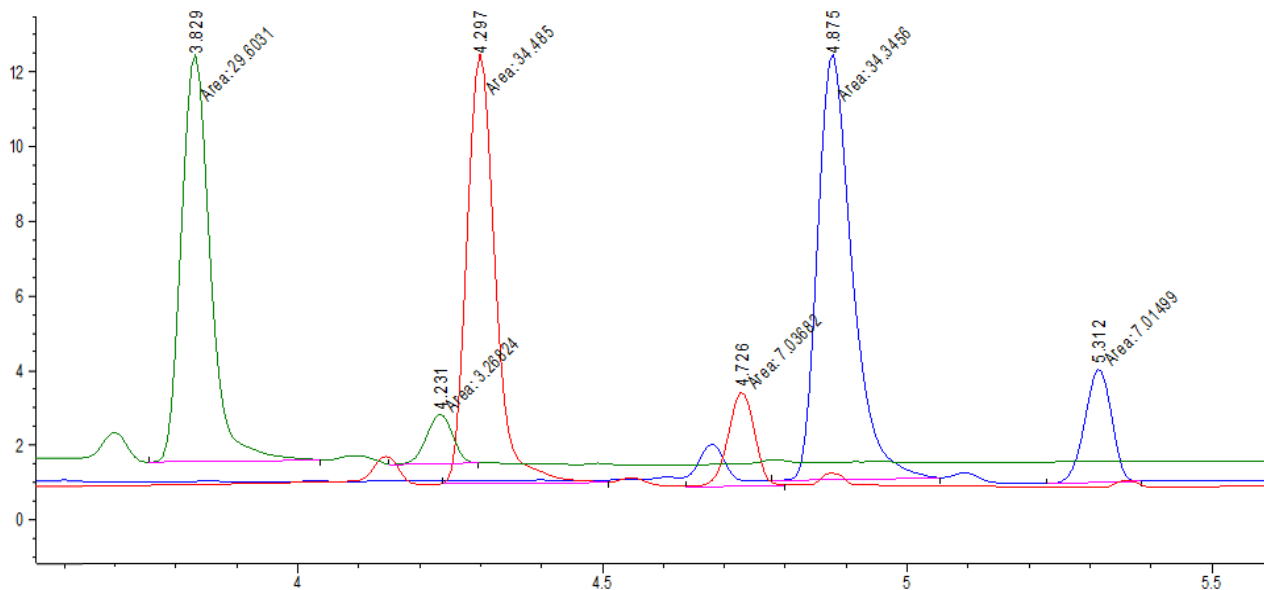
Slika 12. Elektroferogram standardnih otopina ribocikliba (50 µg/ml) i unutarnjeg standarda diazepam (50 µg/ml)

UVJETI ANALIZE: 45 mM fosfatni pufer pH 2,5, valna duljina detekcije 270 nm, primijenjeni napon 30 kV, temperatura kapilare 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar

4.3. Odabir napona

Napon je bitan čimbenik pri razvoju nove kapilarnoelektroforetske metode jer utječe na brzinu i kvalitetu separacije. Najjednostavniji način promjene EOF je upravo promjena napona na krajevima kapilara. Ovisnost EOF o naponu je proporcionalna pa će se smanjenjem napona smanjiti i EOF. Povećanje napona skraćuje vrijeme analize, ali može dovesti do gubitka razlučivanja i učinkovitosti ako dođe do pretjeranog zagrijavanja kapilare zbog jače struje što se moglo i vidjeti u analizama pri izradi ovog diplomskog rada. Dakle, pri nižim naponima će razlučivanje biti bolje, ali će se produljiti vrijeme analize. Separacije se normalno provode pri naponima 10-30 kV, a optimalan napon se određuje u kombinaciji s odabirom koncentracije elektrolita, dimenzijama kapilare i temperature kako bi se dobile zadovoljavajuće vrijednosti struje (10-100 μm), vremena analize i površine pika te ponovljive separacije analita i dobro razlučivanje među pikovima.

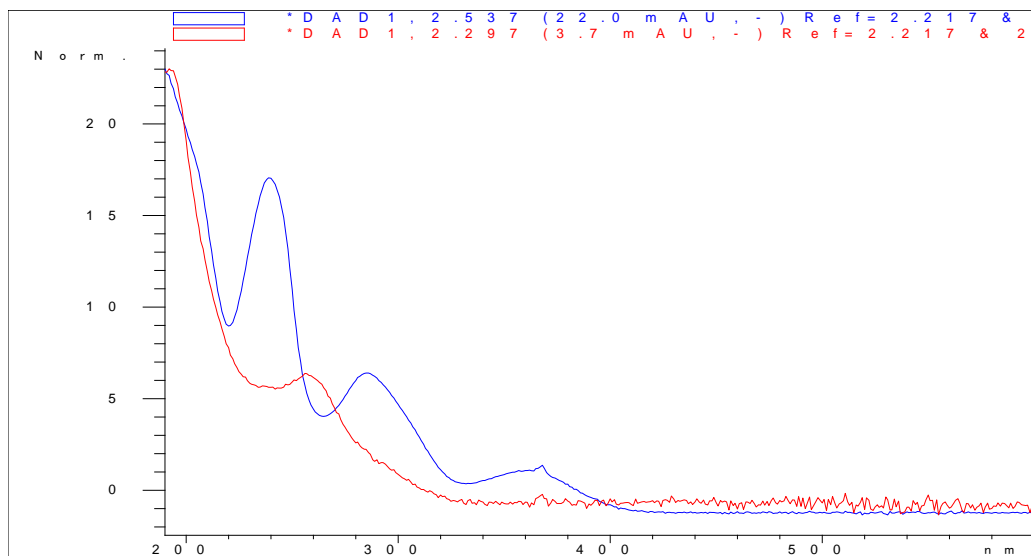
Prilikom odabira optimalnog napona za analizu ribocikliba, provedene su analize s rasponom napona od 10 do 30 kV. Analiza istog uzorka pri tri različita napona prikazana je na Slici 12.



Slika 13. Elektroferogram standardnih otopina ribocikliba (50 $\mu\text{g/ml}$) i unutarnjeg standarda diazepama (50 $\mu\text{g/ml}$)

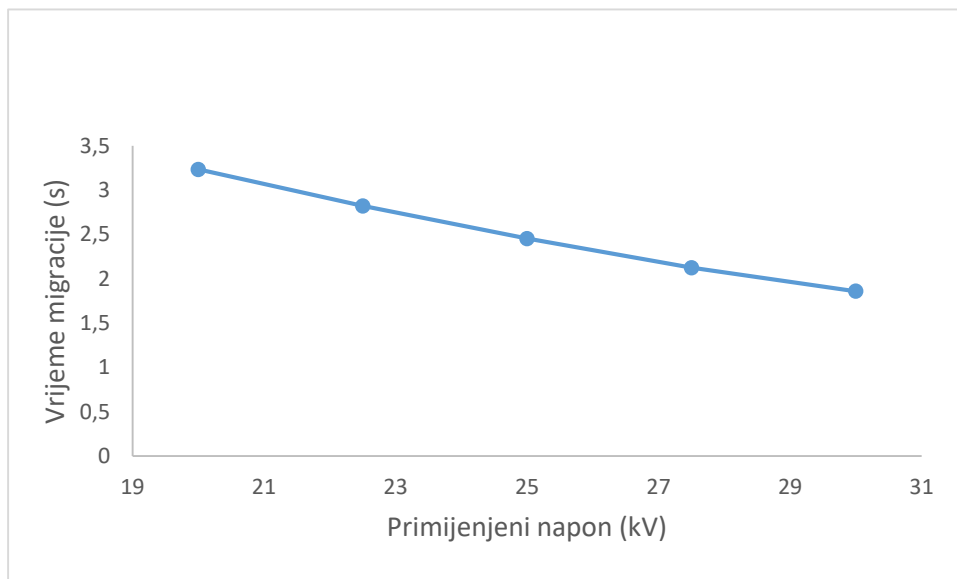
UVJETI ANALIZE: 40 mM fosfatni pufer pH 2,5, valna duljina detekcije 270 nm, primijenjeni napon 20 kV (•), 25 kV (•), 30 kV (•) temperatura kapilare 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar

Na Slici 13 vidi se da se povećanjem napona smanjivala površina pikova, vrijeme analize, ali i učinkovitost separacije pikova. Pri najvišem naponu (30 kV) struja unutar kapilare nije prelazila 90 μA što znači da je izbjegnuto Jouleovo zagrijavanje. Također, prilikom optimizacije napona, pojavio se pik onečišćenja čija je površina bila veća što je napon bio manji, tako je pri nižem naponu separacija analita bila bolja, ali je pik onečišćenja bio najveći. Za onečišćenje je pretpostavljeno da je nastao razgradnjom unutarnjeg standarda diazepama jer se nije pojavljivalo u uzorcima koji su sadržavali samo ribociklib bez unutarnjeg standarda. Na Slici 14 vide se preklopljeni UV-Vis spektri unutarnjeg standarda diazepama i onečišćenja.



Slika 14. UV-Vis spektri unutarnjeg standarda diazepama (plavo) i onečišćenja (crveno)

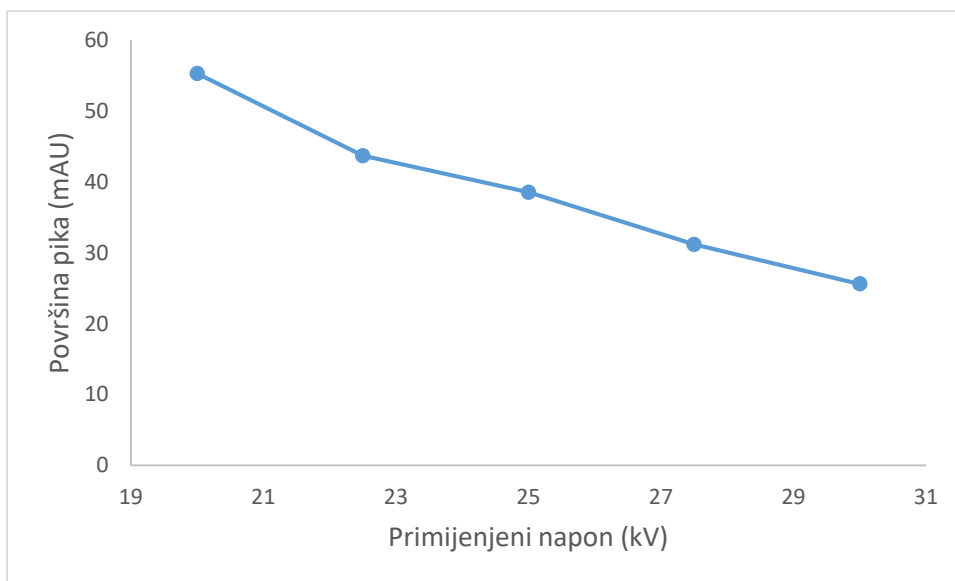
U skladu s prethodno spomenutom teorijom kapilarne elektroforeze, povećavanjem napona skraćivano je vrijeme analize (Slika 15). Vrijeme migracije za ribociklib pri 20 kV iznosilo je 3,2 min, dok je pri 30 kV iznosilo 1,86 min.



Slika 15. Graf ovisnosti vremena migracije ribocikliba o primijenjenom naponu

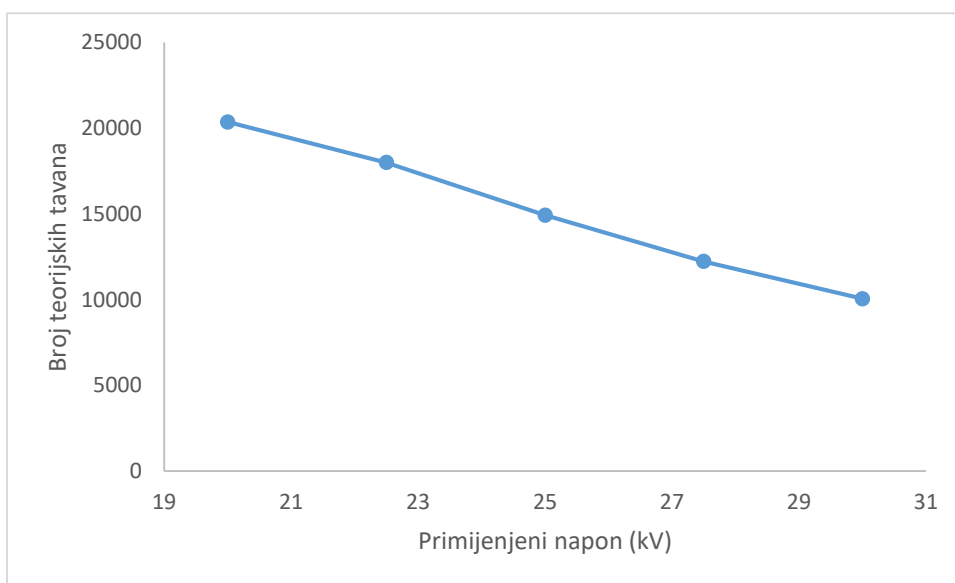
UVJETI ANALIZE: 40 mM fosfatni pufer pH 2,5, valna duljina detekcije 270 nm, temperatura kapilare 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar

Poželjno je imati što kraće vrijeme analize, no bitno je da se povećavanjem napona ne utječe negativno na ostale parametre i da oni budu u željenim okvirima, a da vrijeme analize ostane optimalno. Promjena primijenjenog napona utječe na površinu pika (Slika 16), broj teorijskih tavana (Slika 17) i oblik pika (Slika 18). Smanjenjem napona dolazi do širenja pika i povećava se površina pika što znači da će osjetljivost metode biti veća i *vice versa*. Broj teorijskih tavana, površina pika te učinkovitost metode i sposobnost da odvoji dva analita postaju manje povećanjem napona, dok simetrija pika raste.



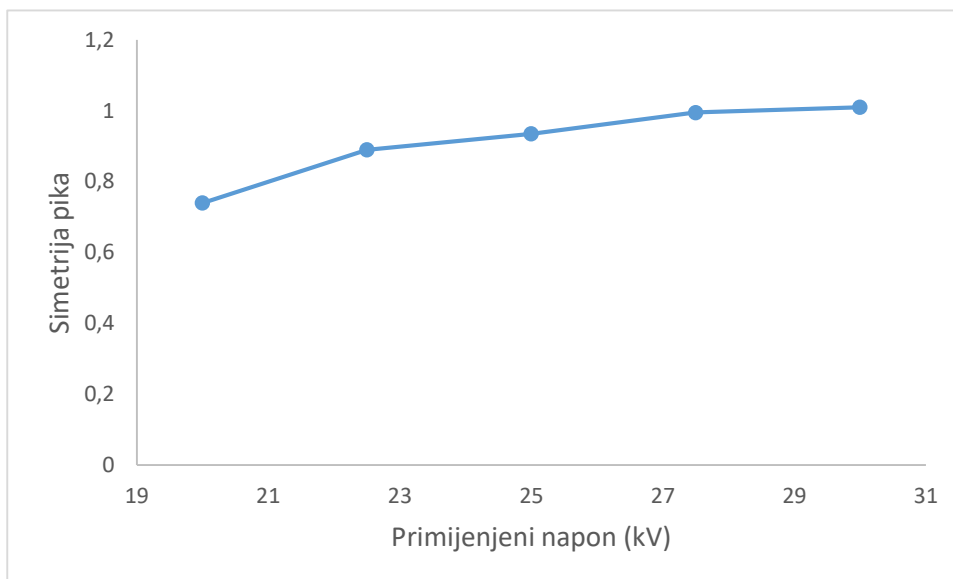
Slika 16. Graf ovisnosti površine pika ribocikliba o primijenjenom naponu

UVJETI ANALIZE: 40 mM fosfatni pufer pH 2,5, valna duljina detekcije 270 nm, temperatura kapilare 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar



Slika 17. Grafički prikaz ovisnosti broja teorijskih tavana o naponu

UVJETI ANALIZE: 40 mM fosfatni pufer pH 2,5, valna duljina detekcije 270 nm, 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar



Slika 18. Grafički prikaz ovisnosti simetrije pika ribocikliba o naponu

UVJETI ANALIZE: 40 mM fosfatni pufer pH 2,5 , valna duljina detekcije 270 nm, temperatura kapilare 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar

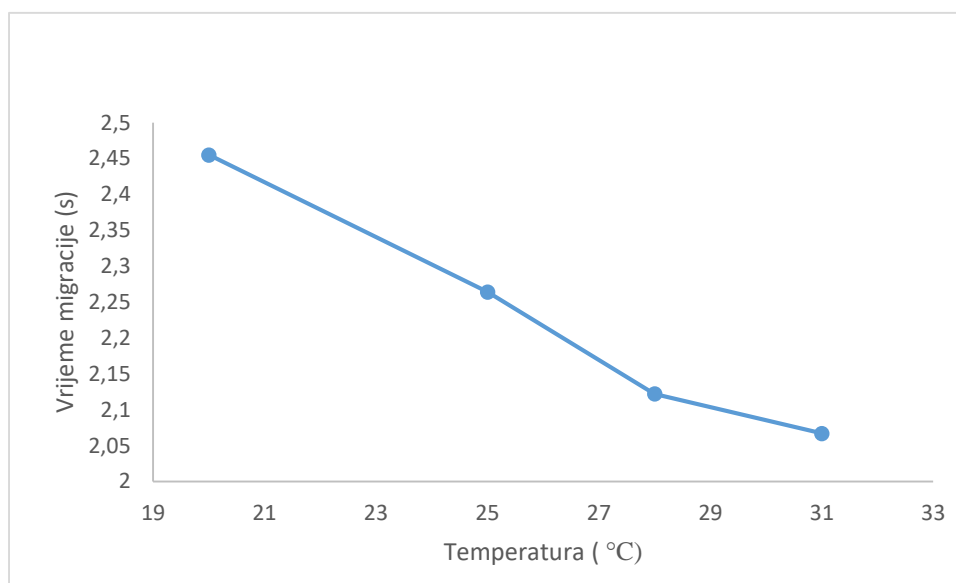
Na temelju grafičkih prikaza i elektroferograma može se zaključiti da napon 25 kV daje doru simetriju pika (simetrija 0,935), površinu, odgovarajuće razlučivanje i osjetljivost uz optimalno vrijeme analize te stabilnu vrijednost struje ispod 100 μ A koja osigurava ponovljive analize što se vidjelo iz RSD vrijednosti vremena migracije i površine pikova primjenom napona 25 kV tijekom izrade diplomskog rada.

4.4. Odabir temperature

Kontrola temperature bitna je u kapilarnoj elektroforezi jer temperatura utječe na viskoznost pozadinskog pufera (2-3 % za svaki °C), a o viskoznosti pozadinskog pufera ovisi volumen injektiranog analita te vremena migracije analita. Održavanje konstantne temperature bitno je i kako bi se izbjeglo Jouleovo zagrijavanje i temperaturni gradijent koji dovodi do promjena EOF i širenja zona analita. Kapilara se stoga nalazi u termostatiranoj kaseti, a temperatura se jednostavno kontrolira programski. Iako ju je potrebno održavati konstantnom zbog ponovljivosti analiza, temperatura može biti parametar koji se optimizira pri razvoju nove metode jer utječe na viskoznost, EOF i vrijeme analize.

Tijekom izrade diplomskog rada, ispitan je utjecaj temperature na vrijeme analize te ostale parametre, u rasponu od 20 °C do 31 °C. Kako bi se jasnije vidio utjecaj temperature na ponovljivost analize te izbjegle interferencije moguće nastalih onečišćenja i odabrala optimalna temperatura, s novo pripremljenom otopinom odabranog unutarnjeg standarda diazepama, ispitane su i temperature u rasponu od 17 °C do 30 °C.

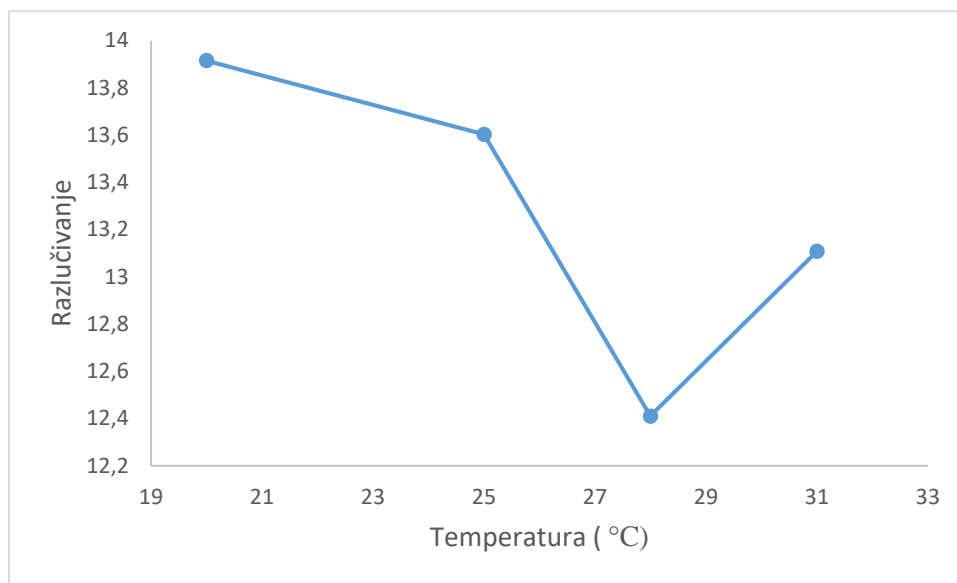
Povećanjem temperature vrijeme analize, je u skladu s teorijom, bilo kraće, tako je pri temperaturi 20 °C vrijeme migracije bilo 2,46 min dok je pri 31 °C bilo 2,07 °C što se može vidjeti na Slici 19.



Slika 19. Grafički prikaz ovisnosti vremena migracije o temperaturi

UVJETI ANALIZE: 40 mM fosfatni pufer pH 2,5, valna duljina detekcije 270 nm, primijenjeni napon 25 kV, injektiranje 4 s, 50 mbar

Razlučivanje je bilo dobro pri svim temperaturama jer je imalo puno veće vrijednosti od 1,5 što se smatra graničnim razlučivanjem pikova na baznoj liniji (ako je manje, smatra se da pikovi nisu razdvojeni, tj. da koeluiraju). Najbolje razlučivanje postignuto je na temperaturi 20 °C i iznosilo je 13,9 dok je na ostalim temperaturama bilo nešto niže, ali i dalje dostatno za uspješno razdvajanje pikova (Slika 20).

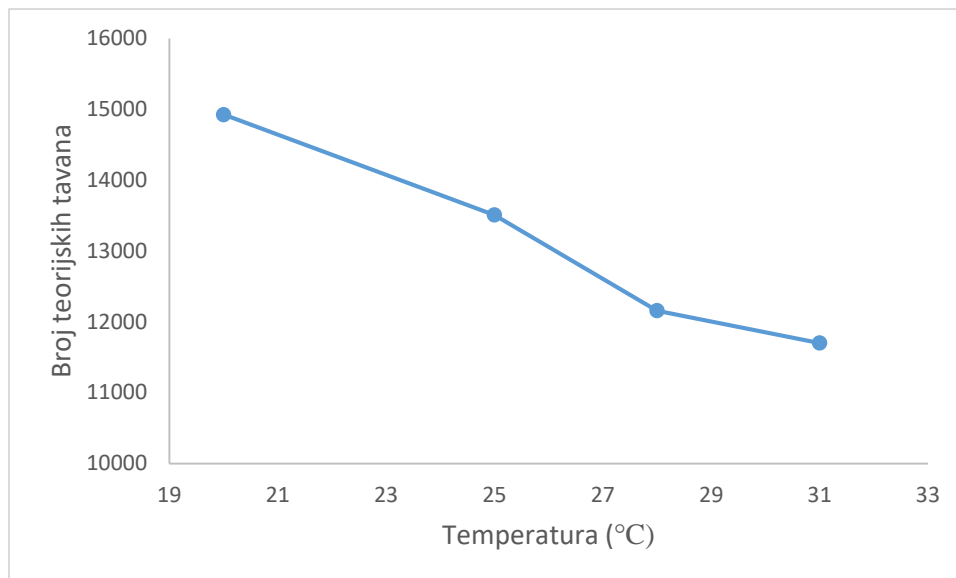


Slika 20. Grafički prikaz ovisnosti razlučivanja o temperaturi

UVJETI ANALIZE: 40 mM fosfatni pufer pH 2,5, valna duljina detekcije 270 nm, primijenjeni napon 25 kV, injektiranje 4 s, 50 mbar

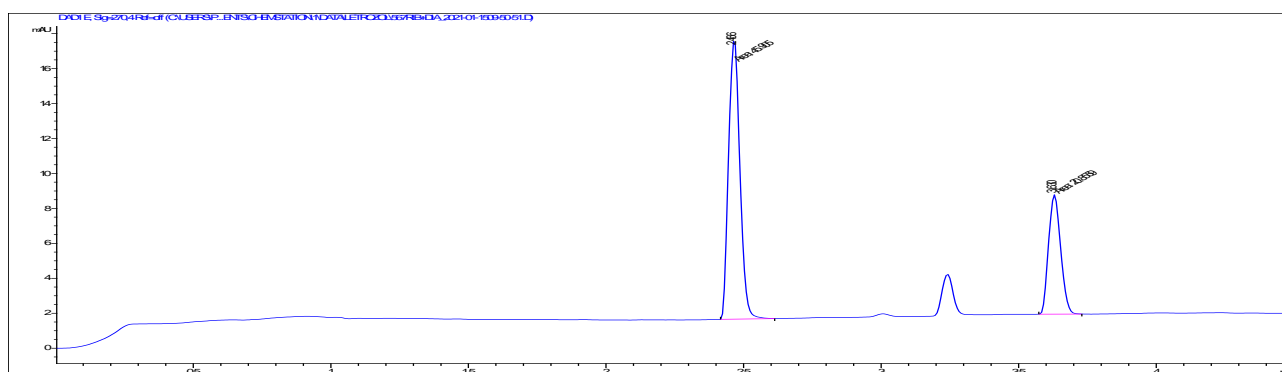
O temperaturi ovisi također i broj teorijskih tavana, N , koji je kvantitativni pokazatelj učinkovitosti kromatografske kolone u kapilarnoj elektroforezi. Matematički je koncept i predstavlja hipotetske zone ili stanja u kojima se uspostavlja ravnoteža između dviju faza, u ovom slučaju između pokretne faze, odnosno radnog pufera i stacionarne faze, odnosno kapilare. Što je broj tavana veći, kolona, u ovom slučaju kapilara, se smatra učinkovitijom. Za ribociklib je analiza bila učinkovitija pri nižim temperaturama, a povećanjem temperature je učinkovitost padala što se može vidjeti na Slici 21.

Elektroferogram standardne otopine ribocikliba i unutarnjeg standarda diazepama pri optimalnim uvjetima koncentracije i vrste pufera, napona i temperature vidi se na Slici 22.



Slika 21. Ovisnost broja teorijskih tavana o temperaturi

UVJETI ANALIZE: 40 mM fosfatni pufer pH 2,5, valna duljina detekcije 270 nm, primijenjeni napon 25 kV, injektiranje 4 s, 50 mbar



Slika 22. Elektroferogram standardnih otopina ribocikliba (50 µg/ml) i unutarnjeg standarda diazepama (50 µg/ml)

UVJETI ANALIZE: 40 mM fosfatni pufer pH 2,5, valna duljina detekcije 270 nm, primijenjeni napon 25 kV, temperatura kapilare 20 °C, injektiranje 4 s, 50 mbar

5. ZAKLJUČAK

Ribociklib je novoodobreni lijek koji se koristi u liječenju HR+/HER2- lokalno uznapređovalog ili metastatskog karcinoma dojke. Za nove lijekove potrebno je razviti brze, jednostavne i pouzdane analitičke metode za detekciju i kvantitativnu analizu, a koje će pomoći u individualizaciji terapije. Tijekom izrade ovog diplomskog rada ispitani su parametri za analizu ribocikliba metodom kapilarne elektroforeze.

Analize su provedene na uređaju sa integriranim detektorom niza dioda, na valnoj duljini 270 nm, u kapilari od izvučenog kvarca duljine 38 cm, efektivne duljine 30 cm, unutrašnjeg promjera 50 μm .

Ispitan je SDS u kombinaciji s boratnim puferom (pH 9,18) i sa fosfatnim puferom (pH 2,5) te čisti fosfatni pufer. Uz boratni pufer bez dodatka SDS-a nije bilo moguće dobiti pik ribocikliba jer molekula ribocikliba pri takvom pH nije nabijena te je koeluirala s EOF. Smanjenjem koncentracije SDS-a u kombinaciji s fosfatnim puferom poboljšavao se oblik i simetrija pika. Optimalnim za analizu pokazao se fosfatni pufer pH 2,5 koncentracije 40 mM, bez dodatka SDS-a pri kojoj je postignuta najveća učinkovitost analize i dobivena najveća površina pikova, a postignuto zadovoljavajuće vrijeme analize i izbjegnuto Jouleovo zagrijavanje.

Smanjenjem napona povećavala se učinkovitost metode na račun vremena analize, no kako je pri svim naponima (20-30 kV) analiza bila kraća od 3,5 min, odlučujući parametri bili su oblik i površina pika. Korištenjem napona 25 kV dobivena je dobra simetrija, površina i razlučivanje uz kratko vrijeme analize, a optimalnom temperaturom za analizu pokazala se temperatura od 20 °C.

6. LITERATURA

Ban M, Strikić A, Petrić Miše B, Vrdoljak E. Uloga inhibitora CDK4/6 u liječenju hormonski ovisnoga metastatskog raka dojke negativnog na HER-2. *Liječ vjes*, 2019, 141(1-2), 33-39.

Beus M, Rajić Z. Endokrina terapija hormonski ovisnog karcinoma dojke. *Farm glas*, 2019, 75, 6, 445-464.

Breast cancer, <https://www.who.int/>, pristupljeno 15.2.2021.

Cancer statistics facts, 2021., <https://seer.cancer.gov/>, pristupljeno 15.2.2021.

Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farm glas*, 2010, 66(4), 195-207.

Lauer HH, Rozing GP. High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer. Germany, Agilent Technologies, 2014.

Li, SFY. Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications. Amsterdam, Elsevier, 1992, str. 1-30.

Martin MP, Endicott JA, Noble MEM. Structure-based discovery of cyclin-dependent protein kinase inhibitors. *Essays Biochem*, 2017, 61(5), 439-452.

Weinberger R. Capillary Zone Electrophoresis: Basic Concepts. U: Practical Capillary Electrophoresis (Second Edition), Academic Press. Weinberger R, urednik, 2000, str. 25-71.

Sažetak opisa svojstava lijeka Kisqali (ribociklibsukcinat), 2020., <https://www.ema.europa.eu/>, pristupljeno 4.2.2021.

Ahuja S, Jimidar MI. Separation Science and Technology. U: Separation Science and Technology. Ahuja S, Jimidar MI, urednici, Elsevier, 9, 2008, str. 1-8.

Sertić M. Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom, Završni specijalistički, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.

Sertić M. Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina, Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2013.

Terabe S. Capillary separation: micellar electrokinetic chromatography. *Annu Rev Anal Chem*, 2009, 2, 99-120.

Tripathy D, Bardia A, Sellers WR. Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, 2017, 1;23(13), 3251-3262.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Ribociklib je relativno novi antineoplastični lijek registriran 2017. godine koji se koristi u politerapiji u liječenju HR+/HER2- lokalno uznapredovalog ili metastatskog karcinoma dojke u kombinaciji s hormonskom terapijom, inhibitorom aromataze ili fulvestrantom.

Cilj ovog istraživanja bio je razviti novu, brzu, jednostavnu i ekološki prihvatljivu elektroforetsku metodu za analizu novog citostatika ribocikliba. S obzirom na bazični karakter ribocikliba, kao prikladna tehnika odabrana je zonska kapilarna elektroforeza uz dodatak unutarnjeg standarda diazepama. Analiza je provedena u kapilari efektivne duljine 30 cm, unutarnjeg promjera 50 μm , pri 20 °C.

Ispitan je SDS u kombinaciji s boratnim puferom (pH 9,18) i sa fosfatnim puferom (pH 2,5) te čisti fosfatni pufer. Uz boratni pufer bez dodatka SDS-a nije bilo moguće dobiti pik ribocikliba jer molekula ribocikliba pri takvom pH nije nabijena te je koeluirala s EOF. Smanjenjem koncentracije SDS-a u kombinaciji s fosfatnim puferom poboljšavao se oblik i simetrija pika. Optimalnim za analizu pokazao se fosfatni pufer pH 2,5 koncentracije 40 mM, bez dodatka SDS-a pri kojoj je postignuta najveća učinkovitost analize i dobivena najveća površina pikova, a postignuto zadovoljavajuće vrijeme analize i izbjegnuto Jouleovo zagrijavanje. Korištenjem napona 25 kV dobivena je dobra simetrija, površina i razlučivanje uz kratko vrijeme analize, a optimalnom temperaturom za analizu pokazala se temperatura od 20 °C.

Kapilarna elektroforeza nova je analitička tehnika koja zbog mnogih prednosti (kratko vrijeme analize, mogućnost analize različitih vrsta analita, ekološka prihvatljivost, niski troškovi, jednostavnost i automatiziranost) ima veliki potencijal za primjenu u kliničkoj praksi te bi ju kao takvu metodu trebalo više koristiti kao alternativu ostalim skupljim i ekološki manje prihvatljivim analitičkim tehnikama.

Ribociclib is a relatively new antineoplastic drug that is used in polytherapy in the treatment of HR + / HER2- locally advanced or metastatic breast cancer in combination with hormone therapy, aromatase inhibitor or fulvestrant.

The main goal of this study was to develop a new, fast, simple, sensitive and ecologically acceptable electrophoretic method for the analysis of a new cytostatic drug ribociclib. Given the basic character of ribociclib, capillary zone electrophoresis has proven to be the most appropriate method. The analysis was carried out in a capillary with an effective length of 30 cm, an inner diameter of 50 μm , at 20 ° C.

In this study, different buffer combinations were tested: SDS in combination with borate buffer (pH 9.18), SDS with phosphate buffer (pH 2.5) and pure phosphate buffer. While using the pure phosphate buffer without addition of SDS, it was not possible to obtain a ribociclib peak because the ribociclib molecule was not charged at such pH and it eluted at the same time as EOF. Decreasing the SDS concentration in combination with phosphate buffer improved peak shape and symmetry. Phosphate buffer (pH 2.5) without addition of SDS, with a concentration of 40 mM has proven to be optimal for analysis, at which the highest analysis efficiency was achieved and the highest peak area was obtained, while satisfactory analysis time was achieved and Joule heating was avoided. Using a voltage of 25 kV, good symmetry, surface area and resolution were obtained with a short analysis time, and the optimal temperature for the analysis was 20 °C.

Capillary electrophoresis is a new analytical technique which due to many advantages (short analysis time, possibility of analysis of different types of analytes, environmental acceptability, low costs, simplicity and automation) has great potential for application in clinical practice. Because of that, it should be used more in drug analysis, as an alternative to other, more expensive and less environmentally friendly analytical techniques.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija/Medicinska biokemija
Zavod za Analitiku lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

RAZVOJ KAPILARNOELEKTROFORETSKE METODE ZA ANALIZU RIBOCIKLIBA

Ivana Klarić

SAŽETAK

Ribociklib je relativno novi antineoplastični lijek registriran 2017. godine koji se koristi u politerapiji u liječenju HR+/HER2- lokalno uznapredovalog ili metastatskog karcinoma dojke u kombinaciji s hormonskom terapijom, inhibitorom aromataze ili fulvestrantom.

Cilj ovog istraživanja bio je razviti novu, brzu, jednostavnu i ekološki prihvatljivu elektroforetsku metodu za analizu novog citostatika ribocikliba. S obzirom na bazični karakter ribocikliba, kao prikladna tehnika odabrana je zonska kapilarna elektroforeza uz dodatak unutarnjeg standarda diazepama. Analiza je provedena u kapilari efektivne duljine 30 cm, unutarnjeg promjera 50 μm , pri 20 $^{\circ}\text{C}$.

Ispitan je SDS u kombinaciji s boratnim puferom (pH 9,18) i sa fosfatnim puferom (pH 2,5) te čisti fosfatni pufer. Uz boratni pufer bez dodatka SDS-a nije bilo moguće dobiti pik ribocikliba jer molekula ribocikliba pri takvom pH nije nabijena te je koeluirala s EOF. Smanjenjem koncentracije SDS-a u kombinaciji s fosfatnim puferom poboljšavao se oblik i simetrija pika. Optimalnim za analizu pokazao se fosfatni pufer pH 2,5 koncentracije 40 mM, bez dodatka SDS-a pri kojoj je postignuta najveća učinkovitost analize i dobivena najveća površina pikova, a postignuto zadovoljavajuće vrijeme analize i izbjegnuto Jouleovo zagrijavanje. Korištenjem napona 25 kV dobivena je dobra simetrija, površina i razlučivanje uz kratko vrijeme analize, a optimalnom temperaturom za analizu pokazala se temperatura od 20 $^{\circ}\text{C}$.

Kapilarna elektroforeza nova je analitička tehnika koja zbog mnogih prednosti (kratko vrijeme analize, mogućnost analize različitih vrsta analita, ekološka prihvatljivost, niski troškovi, jednostavnost i automatiziranost) ima veliki potencijal za primjenu u kliničkoj praksi te bi ju kao takvu metodu trebalo više koristiti kao alternativu ostalim skupljim i ekološki manje prihvatljivim analitičkim tehnikama.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 22 grafičkih prikaza, 2 tablice i 15 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ribociklib, kapilarna elektroforeza, kapilarna zonska elektroforeza

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr.sc. Daniela Amidžić Klarić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr.sc. Hrvoje Rimac, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad je prihvaćen: srpanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DEVELOPMENT OF CAPILLARY ELECTROPHORETIC METHOD FOR ANALYSIS OF RIBOCICLIB

Ivana Klarić

SUMMARY

Ribociclib is a relatively new antineoplastic drug that is used in polytherapy in the treatment of HR + / HER2-locally advanced or metastatic breast cancer in combination with hormone therapy, aromatase inhibitor or fulvestrant.

The main goal of this study was to develop a new, fast, simple, sensitive and ecologically acceptable electrophoretic method for the analysis of a new cytostatic drug ribociclib. Given the basic character of ribociclib, capillary zone electrophoresis has proven to be the most appropriate method. The analysis was carried out in a capillary with an effective length of 30 cm, an inner diameter of 50 μm , at 20 ° C.

In this study, different buffer combinations were tested: SDS in combination with borate buffer (pH 9.18), SDS with phosphate buffer (pH 2.5) and pure phosphate buffer. While using the pure phosphate buffer without addition of SDS, it was not possible to obtain a ribociclib peak because the ribociclib molecule was not charged at such pH and it eluted at the same time as EOF. Decreasing the SDS concentration in combination with phosphate buffer improved peak shape and symmetry. Phosphate buffer (pH 2.5) without addition of SDS, with a concentration of 40 mM has proven to be optimal for analysis, at which the highest analysis efficiency was achieved and the highest peak area was obtained, while satisfactory analysis time was achieved and Joule heating was avoided. Using a voltage of 25 kV, good symmetry, surface area and resolution were obtained with a short analysis time, and the optimal temperature for the analysis was 20 °C.

Capillary electrophoresis is a new analytical technique which due to many advantages (short analysis time, possibility of analysis of different types of analytes, environmental acceptability, low costs, simplicity and automation) has great potential for application in clinical practice. Because of that, it should be used more in drug analysis, as an alternative to other, more expensive and less environmentally friendly analytical techniques.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 38 pages, 22 figures, 2 tables and 15 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Ribociclib, capillary electrophoresis, capillary zone electrophoresis

Mentor: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Amidžić Klarić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Hrvoje Rimac, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.

