

Razvoj kapilarnoelektroforetske metode za analizu anastrozola

Bajto, Larena

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:163:557891>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

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



Larena Bajto

**Razvoj kapilarnoelektroforetske metode za
analizu anastrozola**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

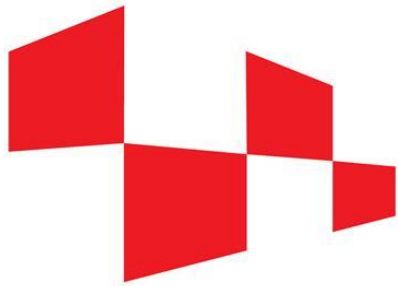
Zagreb, 2021.

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

Koristim prigodu zahvaliti se iznimno angažiranoj i uvijek dostupnoj mentorici doc.dr. sc. Mirandi Sertić koja je vrijedno nadzirala moj rad te doktorandima Lu, Edvinu i Mariu na nesebičnoj pomoći.

Velika hvala prijateljicama, zagrebačkim i osječkim, koje su uvijek bile tu za mene te obitelji za pomoć i potporu u svemu.

Ovaj rad financirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom *Nova bioanalitička rješenja za personalizaciju terapije raka dojke* (HRZZ-UIP-2019-04-8461)



HRZZ

Hrvatska zaklada
za znanost

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rak dojke	1
1.2. Podjela raka dojke	2
1.3. Terapija raka dojke	3
1.3.1. Kemoterapija	4
1.3.2. Endokrina terapija	5
1.3.3. Ciljana terapija.....	6
1.4. Anastrozol	7
1.4.1. Mehanizam djelovanja i farmakodinamički učinci anastrozola.....	7
1.4.2. Farmakokinetička svojstva anastrozola.....	9
1.5. Načelo tehnike kapilarne elektroforeze	9
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
3.1.4. Pribor	16
3.1.5. Programski paketi.....	17
3.2. Metode	17
3.2.1. Priprema matičnih i radnih standardnih otopina.....	17
3.2.2. Priprema otopine radnog pufera.....	17
3.2.3. Kapilarnoelektroforetski uvjeti analize.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Optimizacija sastava radnog pufera	19
4.2. Optimizacija koncentracije boratnog pufera i SDS-a	21
4.3. Utjecaj temperature kapilare	25
4.4. Utjecaj primijenjenog napona	27
5. ZAKLJUČAK	30
6. LITERATURA	31
7. SAŽETAK / SUMMARY	33

1. UVOD

1.1. Rak dojke

Rak dojke jedan je od najvećih svjetskih javnozdravstvenih problema. Životna je ugroza i vodeći uzrok smrtnosti među ženskom populacijom, posebice kada je riječ o osobama u menopauzi. Treba istaknuti da upravo od raka dojke umire 23 % žena kojima je dijagnosticiran bilo kakav oblik karcinoma u postmenopauzi. Naučiti prepoznati simptome samopregledom, pristupiti mamografiji kao dijagnostičkoj metodi koja bilježi izniman tehnološki napredak te pravovremeno potražiti pomoć stručnjaka i početi liječenje, senzibilizirati javnost za ovu problematiku – najučinkovitiji je način za nositi se s ovom teškom bolešću. Tijekom posljednja dva desetljeća, studije povezane s rakom dojke dovele su do velikog napretka u razumijevanju ove zloćudne bolesti te njezinu liječenju. Najveći je problem i dalje dijagnosticiranje tumora u kasnoj fazi zbog neredovitih samopregleda i kliničkih pretraga dojke (Akram i sur., 2017). Kako bi se upozorilo na taj problem i potaknulo žene na pravovremene preglede, mjesec listopada posvećen je borbi protiv raka dojke i podizanju svijesti javnosti o toj bolesti. Prva subota listopada Dan je ružičaste vrpce, humanitarne akcije kojom se svake godine upozorava na mogućnosti izlječenja ako se bolest otkrije u ranoj fazi (<https://www.hzjz.hr/>).

Rak se javlja kao rezultat mutacija ili abnormalnih promjena u genima odgovornima za regulaciju rasta stanica i njihovo održavanje. Obično se stanice u tijelu međusobno zamjenjuju urednim postupkom rasta i smrti stanica: zdrave nove stanice preuzimaju ulogu starih koje odumiru. Međutim, mutacije u genima mogu narušiti ovu ravnotežu te stanica dobiva sposobnost da se nekontrolirano dijeli i formira tumor. Važno je istaknuti da rak ne nastaje zbog samo jednog poremećaja unutar stanice, već zbog kompleksne patogeneze koja uključuje međudjelovanje raznih genetskih i okolišnih čimbenika. Pojam "rak dojke" odnosi se na zloćudni tumor koji se razvio iz stanica u dojka (<https://www.breastcancer.org/>).

Osim spola, rizični čimbenici za razvoj raka dojke uključuju dob, rasu, povijest menarhe, karakteristike dojki, reproduktivne obrasce, upotrebu hormonske nadomjesne terapije, konzumaciju alkohola i pušenje, visokokaloričnu prehranu te manjak tjelesne aktivnosti. Također, mutacije u BRCA1 i BRCA2 genima (*Breast cancer associated gene 1 and 2*) za supresiju tumora značajno su povezane s razvojem raka dojke i jajnika do

sedamdesete godine života. Preživljavanje ovisi o stadiju i molekularnom podtipu. Spomenuti su geni uključeni u kontrolu staničnog ciklusa, regulaciju transkripcije gena, popravak oštećenja DNA, apoptozu i druge važne stanične procese. Kumulativni rizik za razvoj raka dojke kretao se od 49% do 57% u žena s BRCA1 ili BRCA2 mutacijama u dobi do 70 godina, a prosječna starost nositelja BRCA1 mutacije bila je 43 godine (Winters i sur., 2017; Zhu i sur.,2016).

1.2. Podjela raka dojke

Rak dojke dijeli se prema proširenosti na invazivni i neinvazivni. Neinvazivni *in situ* rak nije se proširio dalje od mjesta nastanka, dok se kod invazivnog raka abnormalne stanice unutar žlijezda ili mliječnih kanala podijele u neposrednoj blizini tkiva dojke te mogu proći kroz dojku do različitih dijelova tijela putem imunološkog sustava ili sustavne cirkulacije.

Najčešći oblici su duktalni i lobularni karcinom *in situ*. Duktalni karcinom *in situ* započinje u stijenci mliječnih kanalića. Ova se vrsta raka ponekad može napipati kao kvržica, a na mamogramu se može vidjeti kao sitne točkice odlaganja kalcija. Često se otkriva mamografijom prije nego što je dovoljno velik da bi se napipao. Obično je ograničen na određeni dio dojke i može se kirurški u potpunosti odstraniti. Ako je uklonjen samo karcinom *in situ*, u oko 25% do 35% žena razvija se invazivni rak, obično unutar iste dojke. Lobularni karcinom *in situ* koji započinje unutar mliječnih žlijezda, obično se razvija prije menopauze. Ova vrsta raka, koja se ne može napipati niti vidjeti na mamogramima, obično se pronalazi slučajno, na mamografiji napravljenoj zbog kvržice ili neke druge nenormalnosti koja nije lobularni karcinom *in situ*. Između 25% i 30% žena koje ga imaju, konačno razvijaju invazivni rak dojke - ponekad čak i nakon 40 godina - u istoj ili suprotnoj dojci ili u obje dojke. Osim ova dva oblika, mogući su i medularni, tubularni, mucinozni i papilarni karcinom te Pagetova bolest (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/>; Akram i sur., 2017).

1.3. Terapija raka dojke

Plan liječenja temelji se na vrsti karcinoma dojke, njegovom stadiju te ostalim specifičnim čimbenicima kao što je opće zdravstveno stanje i osobna želja pacijentice. Terapija raka dojke uključuje kombinaciju neoadjuvantne kemoterapije, kirurškog liječenja operabilnih tumora, radioterapije i adjuvantne kemoterapije i / ili endokrine terapije.

Neoadjuvantna terapija primjenjuje se kao početni način liječenja sa osnovnom svrhom smanjenja tumora (engl. *downstaging*) i prevođenja inicijalno neoperabilnog tumora u operabilno stanje, ali i u svrhu provođenja poštenijih operacija jer ovakva terapija pruža bolje izgleda za operaciju očuvanja dojke i poboljšava odgovor tumora na daljnje korake liječenja.

Operacija raka dojke provodi se prvenstveno lumpektomijom nakon čega slijedi zračenje cijele dojke ili mastektomija. Lumpektomija je poštedna operacija dojke kojom se uklanja tumor tj. kvržica na dojci, kao i dio zdravog tkiva koji ga okružuje (takozvane margine). Ponekad postoji potreba za ponovljenom operacijom kada su na mjestu s kojeg je uklonjena prva kvržica ostale tumorske stanice na rubnom području (takozvane pozitivne margine) ili vrlo blizu ruba (bliske margine). Ova je opcija prikladna za žene koje žele zadržati dojku. Mastektomija je operacija uklanjanja cijele dojke. Uklanja se i bradavica i područje oko bradavice (areola). Postoje tri vrste mastektomije: jednostavna ili potpuna mastektomija kojom se uklanja samo dojka, modificirana radikalna mastektomija kojom se osim dojke uklanjaju i limfni čvorovi ispod pazuha te radikalna mastektomija kojom se uklanjaju dojka, pazušni limfni čvorovi i prsni mišić ispod dojke.

Adjuvantna se terapija primjenjuje nakon kirurškog odstranjivanja tumora s ciljem liječenja mikrometastatskih žarišta i sprječavanja povrata bolesti uslijed eventualno zaostalih malignih stanica koje nisu operativno uklonjene. Može uključivati lokalno zračenje, sistemske terapije citostaticima, biološkim i endokrinim lijekovima ili kombinaciju ovih pristupa. Indikacija za primjenu adjuvantnog načina liječenja ovisi o stadiju bolesti i procjeni rizika povrata bolesti ovisnoj o biološkim karakteristikama tumora kao i o dobi pacijentice. Važno je napomenuti da je proučavanje ranog stadija raka dojke kao sistemske bolesti bilo velika prekretnica u napretku istraživanja te donošenju odluka o primjerenosti terapiji. Zbog toga je adjuvantna sistemska terapija danas temeljni pristup u liječenju ranog stadija karcinoma, usmjeren uglavnom na kontrolu preostalih naslaga tumorskih stanica, smanjenje stope

recidiva i produljenje životnog vijeka pacijentica. U metastatskom uznapredovalom raku dojke kirurški se zahvat koristi u svrhu olakšavanja simptoma, boli i komplikacija, a ne preživljavanja. Sustavna kemoterapija citotoksičnim agensima ili endokrina terapija ključna je strategija liječenja metastaziranog karcinoma dojke već nekoliko desetljeća. Nadalje, ne postoji općenito prihvaćen protokol ili pristup kemoterapiji prve crte za liječenje metastatskog karcinoma dojke. Za razliku od ranog stadija, metastatski rak dojke smatra se uglavnom neizlječivim uz pomoć trenutno raspoloživih terapija, iako postoji nekoliko dugotrajno preživjelih pacijentica koje nakon početnog liječenja nastavljaju biti u potpunoj remisiji (Fisusi i Akala, 2019; Chew, 2001; <https://www.onkologija.hr/>).

1.3.1. Kemoterapija

Kemoterapija se može primijeniti prije ili nakon operacije te je, u većini slučajeva, najučinkovitija kada se rabi kombinacija lijekova. Danas liječnici koriste različite kombinacije i ne postoji najbolja za sve pacijente, već je pristup individualan te ovisi o odgovoru organizma na terapiju. Kemoterapijski lijekovi nazivaju se citostatici jer uništavaju stanice tumora, onemogućavajući njihov rast i razmnožavanje. Citostatici djeluju isključivo na stanice koje se dijele, a ne na one u fazi mirovanja. Ta je činjenica dobro iskorištena u terapiji karcinoma citostaticima jer se među normalnim zdravim stanicama svega 10% nalazi u fazi diobe, dok se 90% tumorskih stanica nekontrolirano dijeli, a samo je 10% u fazi mirovanja. Svaki citostatik djeluje na pojedinu fazu (ili više njih) u staničnom ciklusu. Uporabom se različitog slijeda citostatika djeluje na više faza staničnog ciklusa i tako poboljšava protutumorski učinak. Citostatici se primjenjuju u određenim vremenskim razmacima (u takozvanim ciklusima) kako bi se omogućio oporavak zdravih stanica i smanjila učestalost nuspojava kao što su gubitak kose, proljevi, mučnina i povraćanje, osipi, poremećaji krvi, umor i slabost. Skupine lijekova koje se primjenjuju u liječenju raka dojke su antraciklini (doksorubicin, epirubicin), taksani (paklitaksel, docetaksel), alkilirajući agensi (ciklofosamid, tiotepa), antimetaboliti (5-fluorouracil, kapecitabin, gemcitabin, metotreksat), vinka-alkaloidi (vinkristin, vinblastin, vinorelbin), preparati platine (cisplatin, karboplatin) i drugi kao što je mitomicin C. Iako se kombinacije lijekova često koriste za liječenje ranog stadija raka dojke, uznapredovali rak dojke češće se liječi jednim citostatikom. Međutim, moguće su i neke kombinacije, poput paklitaksela i gemcitabina (<https://www.cancer.org/>, <https://www.onkologija.hr/>).

1.3.2. Endokrina terapija

Otprilike dva od tri karcinoma dojke pozitivna su na hormonske receptore. To znači da njihove stanice imaju receptore za estrogen (ER pozitivni karcinomi) i / ili progesteron (PR pozitivni karcinomi) koji pomažu tumorskim stanicama da rastu i šire se. Endokrinom terapijom može se djelovati na sve tumorske stanice u organizmu, a ne samo u dojki. Cilj je ove terapije ili sniziti razinu estrogena ili zaustaviti djelovanje estrogena na stanice raka dojke. Postoje različite vrste endokrine terapije ovisno o mehanizmu djelovanja.

Selektivni modulatori estrogenskih receptora, od kojih se najčešće rabi tamoksifen, djeluju antagonistički na estrogenske receptore u tkivu dojke i na taj način sprječavaju rast i umnožavanje stanica raka dojke. Suprotan učinak imaju na ostale receptore estrogena u kostima, maternici i jetri te tako pridonose očuvanju gustoće kostiju žena u menopauzi. Primjenjuju se kao standardna endokrina terapija u predmenopauzalnih žena u trajanju od 5 do 10 godina s tim da se koristi terapija tamoksifenom nastavlja i do 5 godina nakon prekida liječenja (<https://www.cancer.org/>, Drăgănescu i Carmocan, 2017).

Kod žena u postmenopauzi stvaranje estrogena se ne događa u jajnicima, već se estrogeni stvaraju samo ekstragonadalno biosintezom iz muškog spolnog hormona androstendiona koji se izlučuje u nadbubrežnoj žlijezdi. Aromatazni inhibitori inhibiraju enzim aromatazu koji sudjeluje u ovoj pretvorbi i smanjuju stvaranje estrogena u perifernim tkivima. Dije se na nesteroidne, reverzibilne inhibitore kao što su anastrozol i letrozol te steroidni, ireverzibilni inhibitor eksemestan. Uzimajući u obzir prirodu raka dojke pozitivnog na hormonske receptore, gdje se često pojavljuju recidivi između 6. i 15. godine, postoje kliničke studije koje su pokazale koristan učinak terapije inhibitorom aromataze tijekom 5 godina nakon petogodišnjeg liječenja tamoksifenom. Također, u terapiju se može uvesti i fulvestrant kao potpuni antagonist estrogenskih receptora. Koristi se za liječenje uznapredovalog ili metastatskog raka dojke kod žena nakon menopauze ukoliko je liječenje tamoksifenom i inhibitorima aromataze bilo neuspješno (Šamija i sur., 2012; Simpson, 2003).

Ukoliko je rak dojke dijagnosticiran u ranom stadiju prije nego što je pacijentica prošla kroz menopauzu, liječnik će možda preporučiti uzimanje tamoksifena, a zatim uzimanje inhibitora aromataze kasnije ako tijekom liječenja pacijentica postane postmenopauzalna. Druga mogućnost jest uzimanje analoga LHRH kao što je goserelin koji suzbija funkciju jajnika, zajedno s inhibitorima aromataze. Inhibitori aromataze se ne smiju

uzimati sami za liječenje karcinoma dojke kod predmenopauzalnih žena jer nisu sigurni i mogu povećati razinu hormona (Drăgănescu i Carmocan, 2017).

1.3.3. Ciljana terapija

Svako liječenje, a posebice onkološko, nastoji biti što učinkovitije, selektivnije i manje toksično. Naime, neke tumorske stanice na svojoj površini ispoljavaju biljege koji se ponašaju kao antigeni i na koje se može ciljano djelovati lijekovima. Dobro poznavanje biologije i funkcioniranja tumorskih stanica omogućuje djelovanje terapije na određena mjesta u procesu rasta, razvoja i širenja tumora te tako ciljano uništava tumorsku stanicu bez negativnog učinka na zdrave stanice. Stoga, ovakav pristup nije povezan s nuspojavama karakterističnima za primjenu kemoterapije kao što su gubitak kose, mučnina i povraćanje te smanjenje broja bijelih krvnih stanica (<https://www.onkologija.hr/>).

Kod jedne do pet pacijentica s rakom dojke tumorske stanice na svojoj površini ekspimiraju previše proteina koji potiče rast, poznatijeg kao HER2. Ovi karcinomi, poznati kao HER2 - pozitivni karcinomi dojke, rastu i šire se agresivnije. Razvijene su različite vrste lijekova koji ciljaju protein HER2. Monoklonska protutijela kao što su trastuzumab, bevacizumab i pertuzumab vežu se za HER2 receptor te tako blokiraju signalizaciju i smanjuju proliferaciju stanica kod HER2 pozitivnog raka dojke. Također, mogu se primjenjivati i male molekule kao što je lapatinib koji djeluje kao inhibitor tirozin kinaznih domena i receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) i HER2 receptora (Šeparović i sur. , 2014).

Palbociklib, ribociklib i abemaciclib djeluju kao blokatori ciklin-ovisne kinaze (CDK), posebice CDK4 i CDK6. Blokiranje ovih proteina u hormonski ovisnom metastatskom raku dojke negativnom na HER2 zaustavlja se dijeljenje tumorskih stanica. To može usporiti rast karcinoma. U prvoj liniji liječenja kombinirani su s aromataznim inhibitorima, a u drugoj s fulvestrantom. Zbog svega navedenoga ovi lijekovi u kombinaciji s endokrinom terapijom nova su, visokovrijedna terapijska opcija u liječenju metastatskog raka dojke (Ban i sur., 2019).

Everolimus je lijek poznat kao inhibitor ciljane molekule rapamicina (mTOR). Blokira mTOR, protein u stanicama koji im obično pomaže u rastu i dijeljenju. Everolimus također

može zaustaviti tumore u razvoju novih krvnih žila, što može pomoći u ograničavanju njihovog rasta.

Olaparib i talazoparib djeluju kao inhibitori enzima poli ADP-riboza polimeraze (PARP). PARP obično pomažu u popravljanju oštećene DNA unutar stanica. BRCA geni (BRCA1 i BRCA2) također pomažu popraviti DNA (na malo drugačiji način), ali mutacije jednog od tih gena mogu to spriječiti. Budući da tumorske stanice s mutiranim BRCA genom već imaju problema s popravljanjem oštećene DNA, blokiranje PARP proteina često dovodi do smrti tih stanica.

Kod težih slučajeva moguća je i primjena konjugata monoklonskog protutijela i kemoterapijskog lijeka, primjerice trastuzumab-emtansine (<https://www.cancer.org/>; Podolski i sur.,2015).

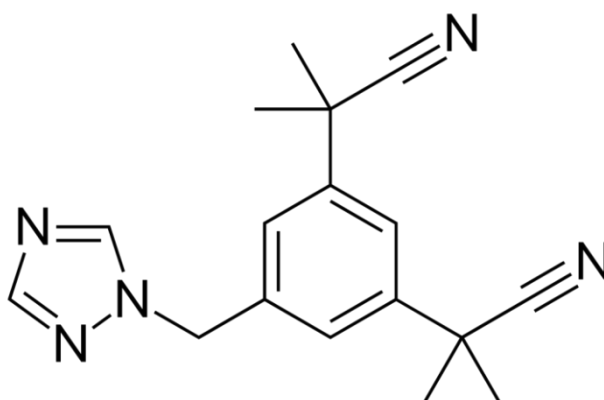
1.4. Anastrozol

Anastrozol je nesteroidni inhibitor sinteze estrogena strukture slične letrozolu. Indiciran je za liječenje uznapredovalog raka dojke pozitivnog na hormonski receptor u postmenopauzalnih pacijentica, adjuvantno liječenje postmenopauzalnih bolesnica s ranim stadijem invazivnog raka dojke pozitivnog na hormonski receptor te adjuvantno liječenje ranog raka dojke postmenopauzalnih bolesnica s pozitivnim hormonskim receptorima koje su prethodno tijekom 2 do 3 godine adjuvantno liječene tamoksifenom. Preporučena doza lijeka za odrasle, uključujući i starije, je peroralno jedna tableta od 1 mg jednom dnevno. Za rani stadij bolesti preporučeno trajanje adjuvantnog endokrinog liječenja jest pet godina (<http://www.halmed.hr/>).

1.4.1. Mehanizam djelovanja i farmakodinamički učinci anastrozola

Estrogen pospešuje rast i preživljavanje normalnih i malignih epitelnih stanica dojke vezanjem i aktiviranjem estrogenskog receptora (ER). Nadalje, aktivirani receptor se veže za promotore gena u jezgri i aktivira mnoge druge gene odgovorne za staničnu diobu, inhibiciju stanične smrti te angiogenezu i aktivnost proteaze. Povećanje udjela stanica koje eksprimiraju

ER nalazi se i u najranijim fazama karcinoma i općenito u približno 70% pacijentica s rakom dojke. Anastrozol je snažan i visoko selektivan nesteroidni inhibitor aromataze treće generacije. Inhibitori aromataze ometaju sposobnost tijela da proizvodi estrogen iz androgena potiskujući aktivnost enzima. U postmenopauzalnih žena estradiol se stvara ponajprije u perifernim tkivima pretvorbom androstendiona u estron djelovanjem aromataznog enzimskog kompleksa. Iz estrona potom nastaje estradiol. Prije menopauze, aromataza jajnika odgovorna je za većinu cirkulirajućeg estrogena i izuzetno je osjetljiva na promjene razina luteinizirajućeg hormona (LH). Nakon menopauze, aromataza u masnom tkivu i mišićima može biti odgovorna za velik dio estrogena u cirkulaciji. Aromataza u tkivima koja su vrlo osjetljiva na estrogen, poput dojke, maternice, rodnice, kostiju, mozga, srca i krvnih žila, daje lokalni estrogen na autokrini način. Promotor gena aromataze u tkivu dojke manje je osjetljiv od promotora gena u jajniku na fluktuacije LH, ali je puno osjetljiviji na povećanje upalnih citokina. Upalni citokini u cirkulaciji povećavaju se s godinama starosti, a u tkivu dojke rastu s proliferativnom bolešću i rakom dojke. Stoga je aktivnost aromataze dojke povećana kod proliferativne bolesti i mnogih slučajeva raka dojke te su baš zbog toga inhibitori aromataze „zlatni standard“ u terapiji žena u postmenopauzalnoj dobi. Pokazalo se da smanjivanje koncentracije estradiola u serumu ima povoljan učinak u pacijentica. Vrlo osjetljivom metodom mjerenja pokazalo se da anastrozol u dozi od 1 mg na dan smanjuje koncentraciju estradiola za više od 80% u žena u postmenopauzi. Anastrozol nema nikakvo progestageno, androgeno, niti estrogeno djelovanje. U dozama do 10 mg na dan ne utječe na lučenje kortizola ili aldosterona, čije su koncentracije mjerene prije i nakon uobičajenog pokusa provokacije adrenokortikotropnog hormona (ACTH). Stoga ne treba dodatno uzimati nadomjestke kortikosteroida. (<http://www.halmed.hr/>; Fabian, 2007). Struktura anastrozola prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Struktura anastrozola.

1.4.2. Farmakokinetička svojstva anastrozola

Anastrozol se nakon primjene brzo apsorbira i vršna se koncentracija u plazmi obično postiže unutar dva sata od uzimanja lijeka natašte. Hrana može u maloj mjeri utjecati na smanjenje brzine, ali ne i stupanj apsorpcije. Ne očekuje se da male promjene u brzini apsorpcije klinički značajno utječu na stanje dinamičke ravnoteže koncentracija u plazmi tijekom uzimanja anastrozola jednom na dan. Oko 90% do 95% ravnotežne koncentracije anastrozola u plazmi postiže se nakon primjene sedam dnevnih doza, uz 3 - 4 puta veće nakupljanje. Nema dokaza o ovisnosti farmakokinetičkih parametara anastrozola o vremenu ili o dozi. Važno je i napomenuti da farmakokinetika anastrozola u žena u postmenopauzi ne ovisi o dobi. Nadalje, samo se 40% anastrozola veže na proteine plazme. Anastrozol se iz organizma uklanja sporo s poluvremenom eliminacije iz plazme od 40 do 50 sati. Kod žena postmenopauzalne dobi opsežno se metabolizira te tijekom 72 sata nakon uzimanja manje od 10% primijenjene doze izlučuje se putem mokraće u nepromijenjenom obliku. Anastrozol se metabolizira N - dealkilacijom, hidroksilacijom i glukuronidacijom. Metaboliti se izlučuju primarno mokraćom. Triazol, glavni metabolit u plazmi, inaktivan je i ne inhibira aromatazu (<http://www.halmed.hr/>).

1.5. Načelo tehnike kapilarne elektroforeze

Kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary electrophoresis*, CE) je farmakopejska separacijska metoda u kojoj nabijene čestice u otopini elektrolita pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala u uskoj kapilari putuju različitim brzinama prema jednoj od elektroda. Analiti se razdvajaju na temelju brzine putovanja kroz kapilaru opisane izrazom:

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

gdje je v_{ep} brzina putovanja iona, μ_{ep} je elektroforetska pokretljivost čestice, a E je jakost primijenjenoga električnog polja. Elektroforetska pokretljivost čestice (μ_{ep}) opisana je izrazom:

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

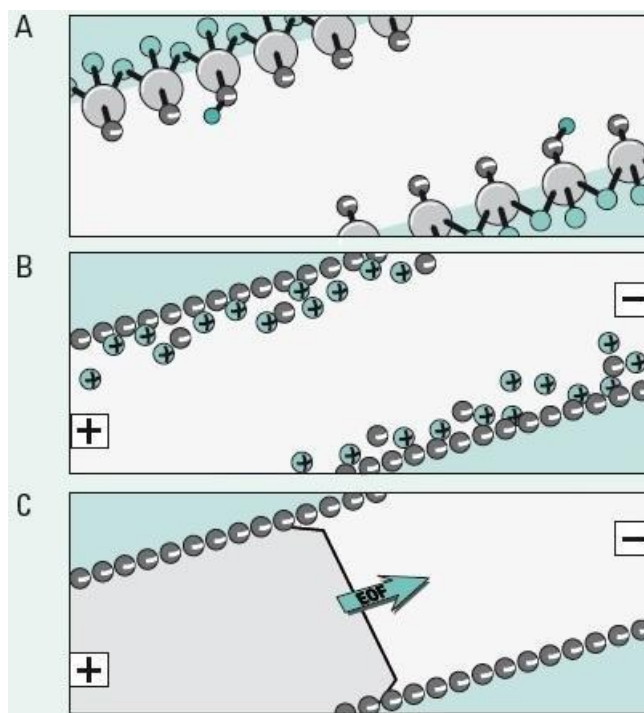
gdje je q naboj čestice, r polumjer čestice (Stokesov polumjer), a η viskoznost otopine

elektrolita. Jakost primijenjenoga električnog polja (E) ovisi o primijenjenom naponu i dužini kapilare te se izražava u V/cm prema izrazu:

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

gdje je V primijenjeni napon, a L dužina kapilare. Iz navedenih se izraza može zaključiti da djelovanjem električnog polja analiti putuju različitom brzinom ovisno o svom naboju i ionskom radijusu, odnosno da će najbrže putovati čestice najmanjeg radijusa i najvećeg naboja (Sertić, 2013).

Važno je napomenuti da kod ove metode postoji mogućnost analiziranja neutralnih analita koji će također putovati kapilaram zbog djelovanja elektroosmotskog toka (engl. *Electroosmotic flow*, EOF) . EOF je tok čistog pufera u kapilari, a nastaje kao posljedica površinskog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare. Unutrašnja površina stijenske je najčešće od izvučenog kvarca i sadrži silanolne skupine (SiOH) čiji stupanj ionizacije ovisi o pH. Kako se u kapilari nalazi otopina elektrolita, negativno nabijene silanolne skupine (SiO⁻) privlače katione te nastaje električni dvosloj koji se sastoji od čvrstog dijela s jednim redom iona suprotnog naboja od onog na površini kapilare, u ovom slučaju kationa i difuzijskog dijela u kojem su i kationi i anioni. Pod djelovanjem napona na krajevima kapilare kationi u difuznom sloju električnog dvosloja putuju prema negativno nabijenoj katodi. Jačina EOF ovisna je o pH budući da je pKa vrijednost kiselih silanolnih skupina u rasponu od 4.0 do 9.0 i kako raste pH, raste i količina negativnog naboja na stijenci jer disocira veći broj silanolnih skupina. Elektroosmotski tok u kapilari je ravnog profila jer je sila koja pokreće tok jednoliko raspoređena uzduž kapilare, odnosno njezine stijenske. Za razliku od laminarnog toka otapala u tekućinskoj kromatografiji, elektroferogram daje uske i oštre pikove (Damić i Nigović, 2010; Watson, 2012). Elektroosmotski tok pufera prikazan je na Slici 2, a razlika između profila toka kapilarnoelektroforetske metode i HPLC-a na Slici 3.



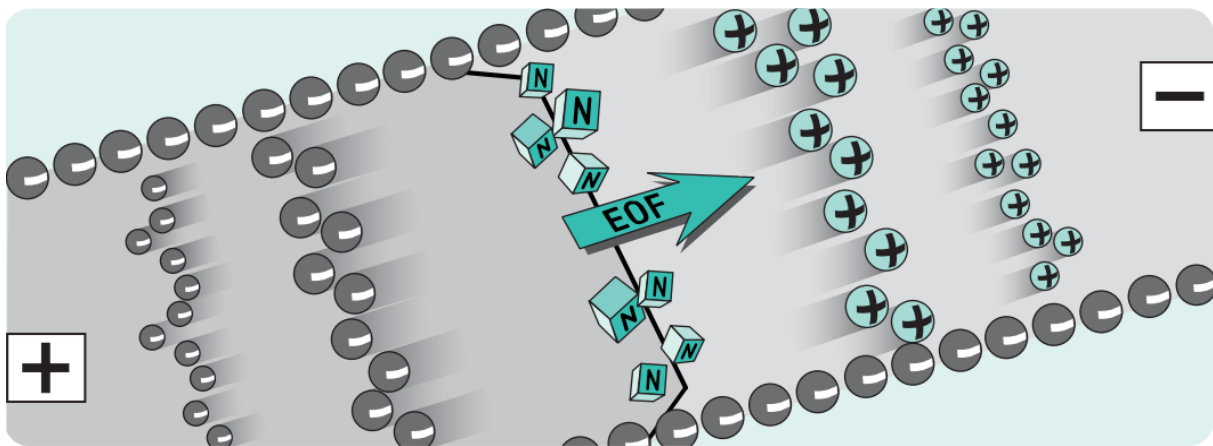
Slika 2. Elektroosmotski tok pufera (Preuzeto iz: Lauer i Rozing, 2014).



Slika 3. Laminarni tok tekućinske kromatografije i elektroosmotski tok kapilarne elektroforeze (Prilagođeno iz: Watson, 2012).

Elektroosmotski tok uzrokuje kretanje svih analita u istom smjeru, neovisno o njihovom naboju. U većini slučajeva, elektroosmotski tok je usmjeren od pozitivno nabijene anode prema negativno nabijenoj katodi. Međutim, anioni će također putovati prema katodi, jer je veličina elektroosmotskog toka za više od jednog reda veličine veća od njihove elektroforetske pokretljivosti. Zahvaljujući tome, kationi, neutralne molekule i anioni mogu se

analizirati istovremeno, jer se svi kreću u istom smjeru do detektora (Damić i Nigović, 2010). Djelovanjem električnog polja analiti putuju različitom brzinom ovisno o njihovom naboju i ionskom radijusu. Kao što je vidljivo na Slici 4, kationi najbrže migriraju jer su u tom slučaju elektroforetska pokretljivost prema katodi i EOF u istom smjeru. Mali kationi kreću se brže od većih. Svi neutralni analiti se prenose brzinom EOF-a, ali nisu međusobno odvojeni. Anioni najsporije migriraju budući da ih privlači anoda, ali su još uvijek nošeni EOF-om prema katodi s tim da veći anioni putuju brže od manjih (Lauer i Rozing, 2014; Watson, 2012).



Slika 4. Putovanje neutralnih i nabijenih analita u kapilarnoj elektroforezi (Preuzeto iz: Lauer i Rozing, 2014).

Prilikom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode potrebno je uzeti u obzir važne čimbenike koji utječu na elektroosmotski tok i elektroforetsku pokretljivost analita koji su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Čimbenici koji utječu na elektroosmotski tok (Lauer i Rozing, 2014; Watson, 2012).

Parametar	Učinak na EOF	Komentar
Električno polje	Raste s porastom napona	Velika jakost električnog polja uzrokuje generiranje topline u kapilari i opasnost od Jouleovog zagrijavanja.
pH pufera	Raste s porastom pH	Pri visokom pH silanolne su skupine pretežno deprotonirane i EOF je znatno veći nego pri niskom pH kada su silanolne skupine većinom protonirane.
Ionska jakost pufera	Smanjuje se porastom ionske jakosti	Visoka ionska jakost generira visoku struju i Jouleovo zagrijavanje.
Temperatura	Raste s porastom temperature	Temperatura se lako može kontrolirati. Njenim povećanjem dolazi do smanjenja viskoznosti i samim tim povećanja EOF.
Organski modifikatori	Najčešće smanjuju	Organski modifikatori imaju kompleksan učinak na EOF, najbolje ga je odrediti eksperimentalno. Mijenjaju dielektričnu konstantu pufera i viskoznost.
Površinski aktivne tvari	Anionske povećavaju, kationske smanjuju	Kationski surfaktanti imaju visok afinitet za silanolne skupine i na taj način blokiraju pristup manjim kationima u otopini smanjujući EOF. Pri visokim koncentracijama mogu formirati pozitivan sloj na stijenci kapilare i tako obrnuti elektroosmotski tok prema anodi. Anionski surfaktanti povećavaju zeta potencijal na unutrašnjoj površini kapilare i samim time povećavaju EOF.
Modificiranje unutrašnje stijenske kapilare	Neutralni sloj smanjuje, ionski povećava	Neutralni sloj smanjuje negativni naboj stijenske kapilare pa se smanjuje i EOF.

Kapilarna elektroforeza je točna i precizna tehnika za kvantitativnu analizu lijekova u svim vrstama ljekovitih oblika. Zbog visoke moći razlučivanja može se koristiti i u određivanju profila čistoće lijekova. Nadalje, moguće ju je primijeniti u analizi peptidnih lijekova, odjeljivanju enantiomera, te analizi lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama. Kao tehnika ima visoku moć odjeljivanja, kraće vrijeme analize, jeftiniju kolonu i manju potrošnju otapala u odnosu na HPLC. Prednost je i minimalan volumen uzorka potreban za analizu, kao i stvaranje manje količina organskog otpada. Međutim, manje je izdržljiva i precizna nego HPLC te je manje osjetljivosti (Nigović, 2018; Lauer i Rozing, 2014). Kao dodatan nedostatak u odnosu na HPLC ističe se veća kompleksnost parametara koje je potrebno optimizirati kako bi se postiglo razdvajanje i slabija reproducibilnost zbog čega se nerijetko koristi unutarnji standard (Watson, 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Karcinom dojke vodeća je zloćudna bolest žena u svijetu. Istraživanja pokazuju da će se kod jedne od 8 ili 9 žena razviti zloćudni tumor dojke u nekoj životnoj dobi. Novi je dodatni izazov pandemija bolesti COVID-19 koja je produbila problem dijagnosticiranja karcinoma u kasnoj fazi bolesti i otežala pravovremenu i primjerenu liječničku intervenciju i liječenje.

Anastrozol, inhibitor aromataze slične strukture letrozolu, može se primjenjivati u monoterapiji ili u kombinaciji s inhibitorima CDK4/6 kod hormonski ovisnog tumora dojke negativnog na HER2. Preporučena doza lijeka za odrasle, uključujući i starije pacijentice, je peroralno jedna tableta od 1 mg jednom dnevno. Za rani stadij bolesti preporučeno trajanje adjuvantnog endokrinog liječenja jest pet godina. Postizanje željenih ishoda liječenja te praćenje adherentnosti pacijentica kod ovako dugog adjuvantnog liječenja je iznimno važno.

Stoga je svrha ovog istraživanja razviti novu kapilarnoelektroforetsku metodu za analizu anastrozola koja će na brz, jednostavan i ekološki prihvatljiv način detektirati anastrozol u biološkom uzorku. Predložena metoda može pridonijeti terapijskom praćenju lijekova (engl. *Therapeutic Drug Monitoring*) kod pacijentica na monoterapiji anastrozolum i/ili politerapiji s anastrozolum i palbociklibom, odnosno drugim inhibitorima CDK4/6. Kao primjerena tehnika odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Izopropanol (Bisolve Chimie SARL, Dieuze, Francuska)
- Metanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Natrijev dodecil sulfat, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev tetraborat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Otopina natrijeva hidroksida, 0,1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Otopina natrijeva hidroksida, 1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

3.1.2. Standardi

- Anastrozol (Tokyo Chemical Industry, Japan)

3.1.3. Radni instrumenti

- Analitička vaga AG245 na četiri decimale (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Digitalni pH-metar (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Sustav za kapilarnu elektroforezu (G1600A) s integriranim detektorom niza dioda (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)

3.1.4. Pribor

- Bočice za uzorkovanje sustavom za kapilarnu elektroforezu, 1,5 ml (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

- Injekcijski membranski filtri, Acrodisc GHP, veličina pora 0,22 μm (Gelman, Ann Arbor, SAD)
- Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 35 cm, unutrašnjeg promjera 50 μm , duljine do detektora 27 cm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Pipete, model Pipet-Lite XLS (Rainin Instrument LLC, Oakland, CA, SAD)

3.1.5. Programski paketi

- Program 3D-CE/MSD ChemStation, ver A 10.02 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft, Seattle, SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema matičnih i radnih standardnih otopina

Matična standardna otopina anastrozola pripravljena je otapanjem odgovarajuće količine standarda anastrozola sa smjesom otapala metanol : voda = 50:50 (v/v) u odmjernoj tikvici od 10 ml u koncentraciji 1 mg/ml. Tako pripravljena otopina čuvala se u hladnjaku na +4 °C omotana parafilmom.

Radne standardne otopine uporabljene za razvoj metode pripremane su svježe svaki dan neposredno prije mjerenja dodatkom odgovarajuće količine matične standardne otopine anastrozola te razrjeđenjem do odgovarajuće koncentracije smjesom otapala metanol : voda = 50:50 (v/v).

3.2.2. Priprema otopine radnog pufera

Otopina boratnog pufera koncentracije 100 mM pripravljena je otapanjem 3,8137 g natrijevog tetraborata u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL. Budući da se

tetraborat teže otapa u vodi, otapanje je pospješeno korištenjem ultrazvučne kupelji. Na kraju se pH-metrom izmjerila pH vrijednost dobivene otopine.

Otopina surfaktanta SDS-a pripravljena je otapanjem 2,8838 g u ultračistoj vodi nadopunjenoj do oznake u odmjerne tikvici od 100 mL. Također se koristila ultrazvučna kupelj radi boljeg otapanja.

Prije primjene otopine su profiltrirane kroz membranski filter Acrodisc GHP filters 0,22 μm . Matične otopine surfaktanta i boratnog pufera čuvane su na sobnoj temperaturi. Neposredno prije analize otopine radnih pufera pripravljene su miješanjem odgovarajućih volumena otopine boratnog pufera, otopine SDS-a, organskog otapala i ultračiste vode.

3.2.3. Kapilarnoelektroforetski uvjeti analize

Prije prvog korištenja kapilara je kondicionirana 5 minuta metanolom, 10 minuta s 1M NaOH, 10 minuta s ultračistom vodom te na kraju 20 minuta otopinom radnog pufera.

Na početku svakog radnog dana, prije same analize, kapilara je ispirana 10 minuta s 0,1M NaOH, 10 minuta ultračistom vodom i 10 minuta otopinom radnog pufera, a na kraju radnog dana 5 minuta s ultračistom vodom, 5 minuta s 1M NaOH i na kraju još 10 minuta s ultračistom vodom. Krajevi kapilare su na kraju radnog dana uronjeni u bočice za uzorkovanje sa ultračistom vodom.

Prije svakog injektiranja kapilara je prekondicionirana otopinom radnog pufera u trajanju od 2 minute, a nakon svake analize ispirana je s 0,1M NaOH 1 minutu, a potom ultračistom vodom 1 minutu. Prilikom promjene pH radnog pufera, kapilara je ispirana u trajanju od 10 minuta.

Analiza je provedena na uređaju za kapilarnu elektroforezu s kapilarom od izvučenog kvarca duljine 35 cm, duljine do detektora 27 cm i unutrašnjeg promjera od 50 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Uzorci su hidrodinamički injektirani u kapilaru pod tlakom od 50 mbara tijekom 4 sekunde. Analize su provođene pri naponu od 30 kV i temperaturi od 20°C, a valna duljina detektora podešena je na 210 nm.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimizacija sastava radnog pufera

U razvoju nove kapilarnoelektroforetske metode prvi ispitivani parametar je vrsta i pH radnog pufera. Pri različitom pH radnog pufera naboj na površini unutrašnje stijenke kapilare je različit, što direktno utječe na zeta-potencijal. Naime, elektroosmotski se tok znatno povećava povećanjem pH vrijednosti pufera jer su tada silanolne skupine na unutrašnjoj stijenci kapilare deprotonirane, odnosno nalaze se u ioniziranoj formi (SiO^-). Također, važno je razmotriti pKa vrijednost analita jer pH pufera, osim što utječe na elektroosmotski tok, određuje i stupanj ionizacije analita te samim tim i njegovu elektroforetsku pokretljivost. Promatrajući strukturu i pKa anastrozola, može se očekivati da će pri bazičnim uvjetima radnog pufera biti neutralan. Stoga se analiza mora provoditi micelarnom elektrokinetičkom kromatografijom jer ona omogućava analizu neutralnih i nabijenih čestica.

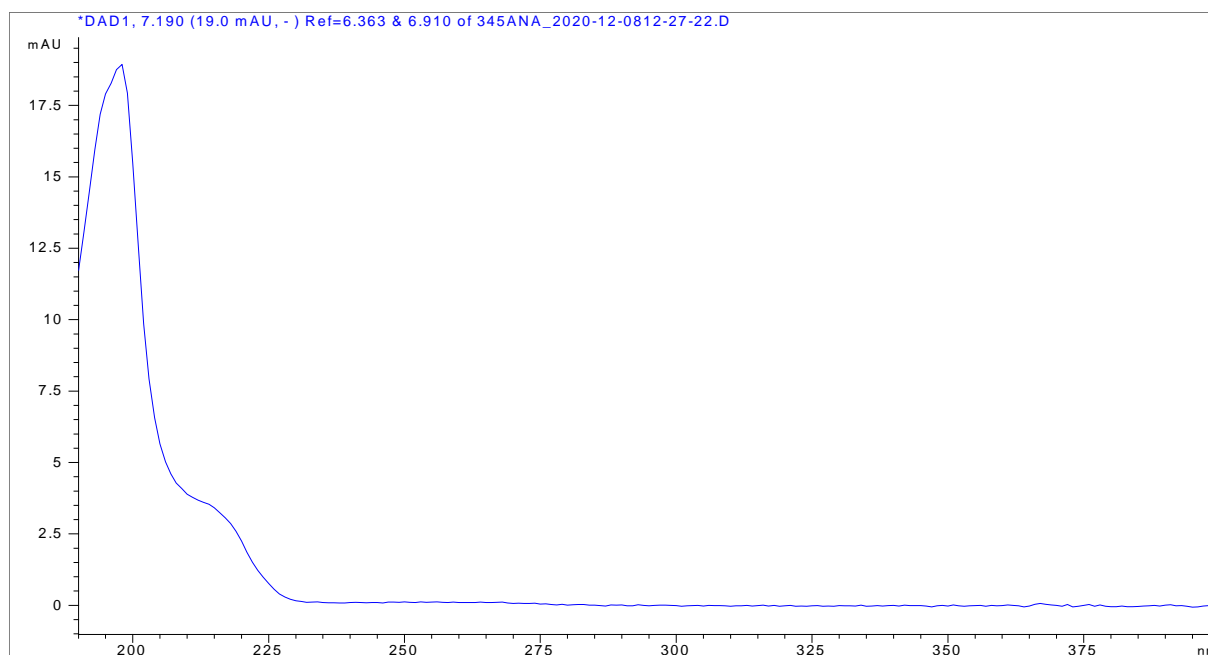
Kao radni pufer koristio se boratni pH 9,18. To je najčešće korišteni pufer u kapilarnoj elektroforezi jer su pri tim uvjetima pH silanolne skupine na unutrašnjoj stijenci kapilare potpuno ionizirane što je praćeno snažnim elektroosmotskim tokom koji uvjetuje brzinu analize.

U otopinu radnog pufera dodan je natrijev dodecil-sulfat (SDS) kao najčešće korišteni i cijenom prihvatljiv surfaktant u micelarnoj elektokinetičkoj kromatografiji. Radi se o anionskom surfaktantu koji djeluje kao pseudostacionarna faza i tako omogućuje analizu neutralnih spojeva. Molekule SDS-a imaju dugačke hidrofobne repove koji se u vodenom mediju okreću jedni prema drugima, dok su hidrofilne negativno nabijene glave sa sulfatnom skupinom usmjerene prema van. Na taj način SDS iznad kritične micelarne koncentracije (oko 9 mM) stvara anionske micide koje čine pseudostacionarnu fazu. Elektroforetsko kretanje anionske micide je prema anodi, suprotno od smjera elektroosmotskog toka, te je nužno osigurati uvjete pri kojima će brzina elektroosmotskog toka biti veća od brzine putovanja micela kako bi i one bile nošene prema katodi, odnosno detektorskom kraju kapilare. U micelarnoj elektrokinetičkoj kromatografskoj metodi brzina kretanja nabijenih čestica ovisi o koeficijentu distribucije između micide i vodene otopine te elektroforetskoj pokretljivosti bez micide, dok brzina kretanja neutralnog analita ovisi samo o koeficijentu distribucije između

micele i vodene otopine. Ovi su uvjeti postignuti pri bazičnom pH (9,18) radnog pufera koji se koristio.

Na temelju prijašnjih ispitivanja uočeno je da dodatak organskog otapala u radni pufer smanjuje elektroosmotski tok, ali poboljšava selektivnost i razlučivanje mijenjajući zeta-potencijal, viskoznost i dielektričnu konstantu. Odabran je izopropanol u koncentraciji 10% (v/v).

U razvoju metode za analizu anastrozola potrebno je i odabrati valnu duljinu detekcije. Apsorpcijski maksimum anastrozola pronađen je na 210 nm, a metoda je optimizirana i potvrđena koristeći ovu valnu duljinu. Na Slici 5 prikazan je UV-Vis spektar anastrozola dobiven iz vrha pika od značaja.



Slika 5. UV-Vis spektar anastrozola.

4.2. Optimizacija koncentracije boratnog pufera i SDS-a

Prilikom razvoja nove metode potrebno je optimizirati koncentraciju pufera jer direktno utječe na elektroosmotski tok. Ispitan je utjecaj koncentracije borata u rasponu od 15 do 45 mM, dok se koncentracija SDS-a i izopropanola držala stalnom na 20 mM SDS-a i 10% v/v izopropanola. Povećanjem koncentracije boratnog pufera povećava se ionska jakost te poboljšava razlučivanje, ali dolazi i do smanjenja elektroosmotskog toka i samim time produljenja vremena analize.

Nadalje, korisno je provjeriti ovisnost broja teorijskih tavana, N , o različitim parametrima. Broj teorijskih tavana je matematički koncept koji opisuje učinkovitost kapilare ili kromatografske kolone. To je hipotetska zona, odnosno stanje u kojem se uspostavlja ravnoteža između stacionarne faze, kapilare i mobilne faze, radnog pufera. Što je ovaj broj veći, kapilara se smatra djelotvornijom. U kapilarnoj elektroforezi se broj teorijskih tavana može izračunati kao:

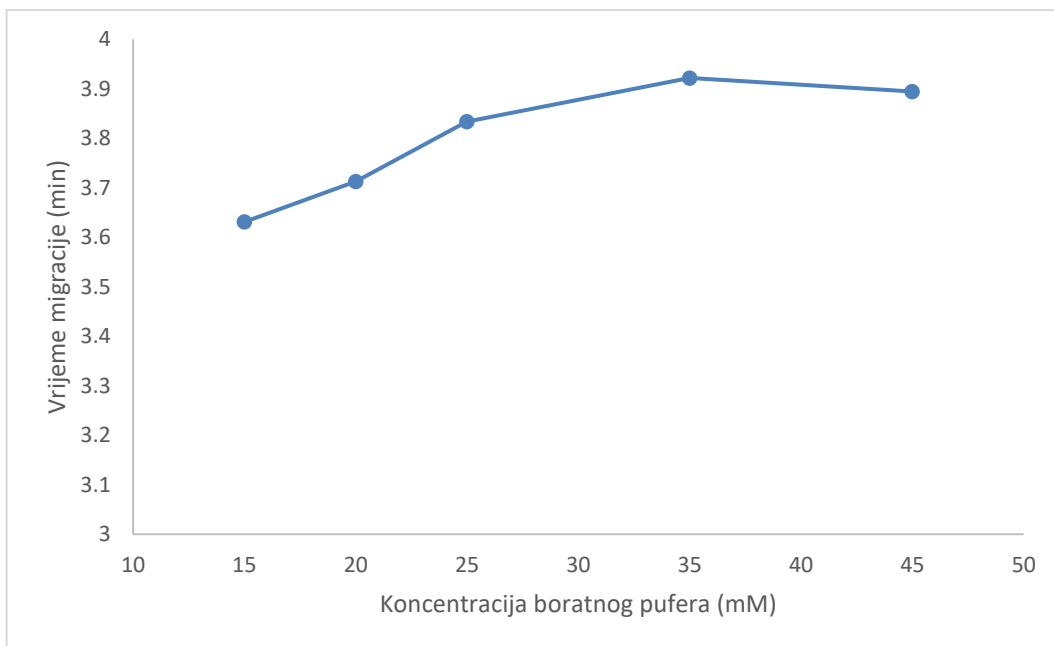
$$N = \frac{\mu_e E l}{2D}$$

gdje je μ_e elektroforetska pokretljivost analita, E električno polje, l efektivna duljina kapilare (duljina kapilare do detektora), D difuzijski koeficijent. Broj teorijskih tavana može se jednostavnije odrediti izravno iz elektroferograma, koristeći jednadžbu:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$$

gdje je t_r vrijeme zadržavanja tvari na kapilari, a $w_{1/2}$ širina kromatografskog pika pri polovici maksimalne visine (Sertić, 2013).

Kao što je prikazano na Slikama 6 i 7, pri koncentraciji 20 mM boratnog pufera broj teorijskih tavana je visok ($N = 21182,67$), a vrijeme analize kratko ($t = 3,713\text{min}$).



Slika 6. Ovisnost vremena migracije anastrozola o koncentraciji boratnog pufera.

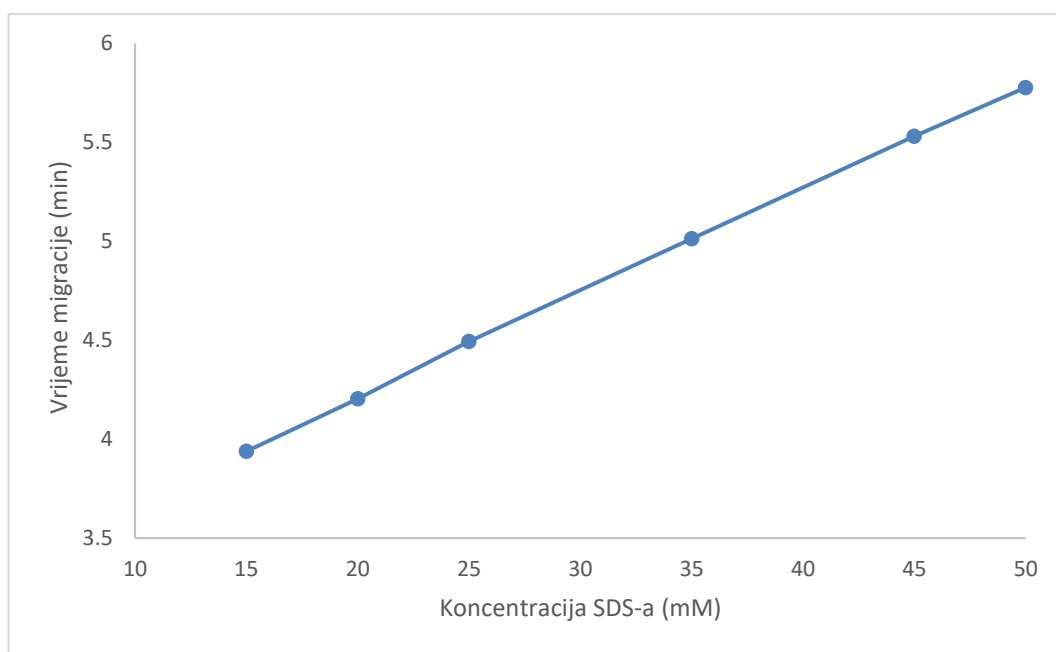
Uvjeti analize: 20 mM SDS, 10% (v/v) izopropanol, 30 kV, 20 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: anastrozol 100 µg/ml



Slika 7. Ovisnost broja teorijskih tavana o koncentraciji boratnog pufera.

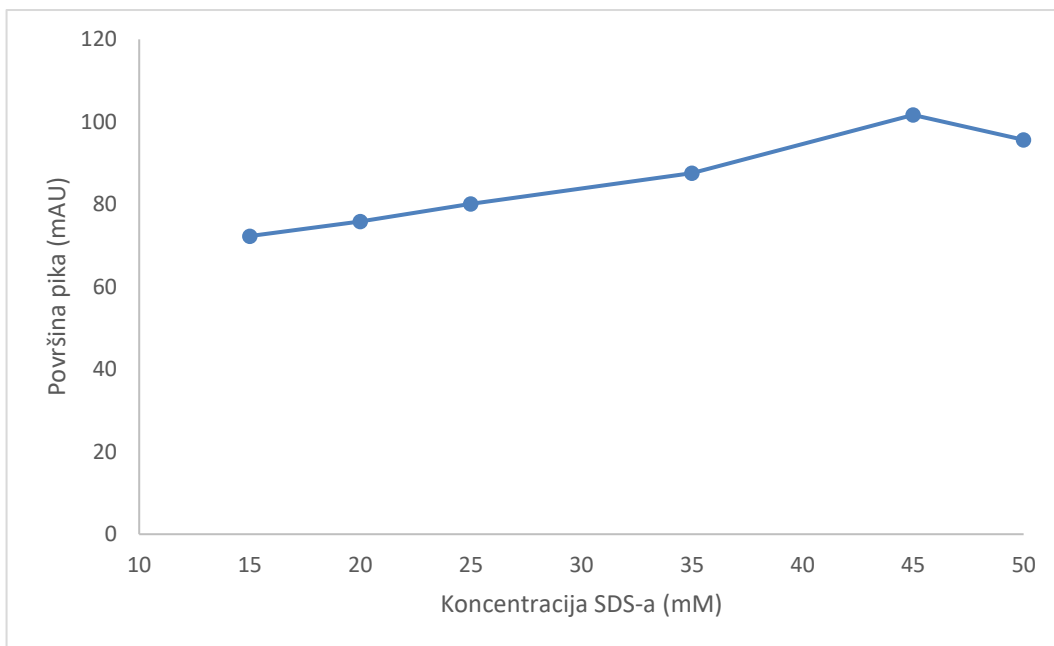
Uvjeti analize: 20 mM SDS, 10% (v/v) izopropanol, 30 kV, 20 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: anastrozol 100 µg/ml

Osim koncentracije pufera, važno je optimizirati i koncentraciju dodanog surfaktanta jer može značajno utjecati na razlučivanje i selektivnost. Ispitana je koncentracija SDS-a u rasponu od 15 do 50 mM dok se koncentracija boratnog pufera držala stalnom na optimiziranih 20 mM i 10% (v/v) izopropanola. Koncentracije ispod 15 mM nisu ispitivane jer su blizu kritične micelarne koncentracije, a koncentracije iznad 50 mM izbjegnute su kako nebi došlo do Jouleova zagrijavanja kapilare uslijed porasta jakosti struje. Na Slikama 8 i 9 vidljivo je da povećanjem koncentracije SDS-a dolazi do produljenja vremena migracije analita, ali i povećanja površine pika jer se analit dulje zadržava u micelama. Također, prilikom određivanja koncentracije SDS-a korisno je provjeriti i oblik te simetriju pika. Kao optimalna koncentracija SDS-a odabrana je 45 mM jer je pri toj vrijednosti vrijeme analize prihvatljivo, pik anastrozola simetričan i oštar te broj teorijskih tavana visok (Slika 10).



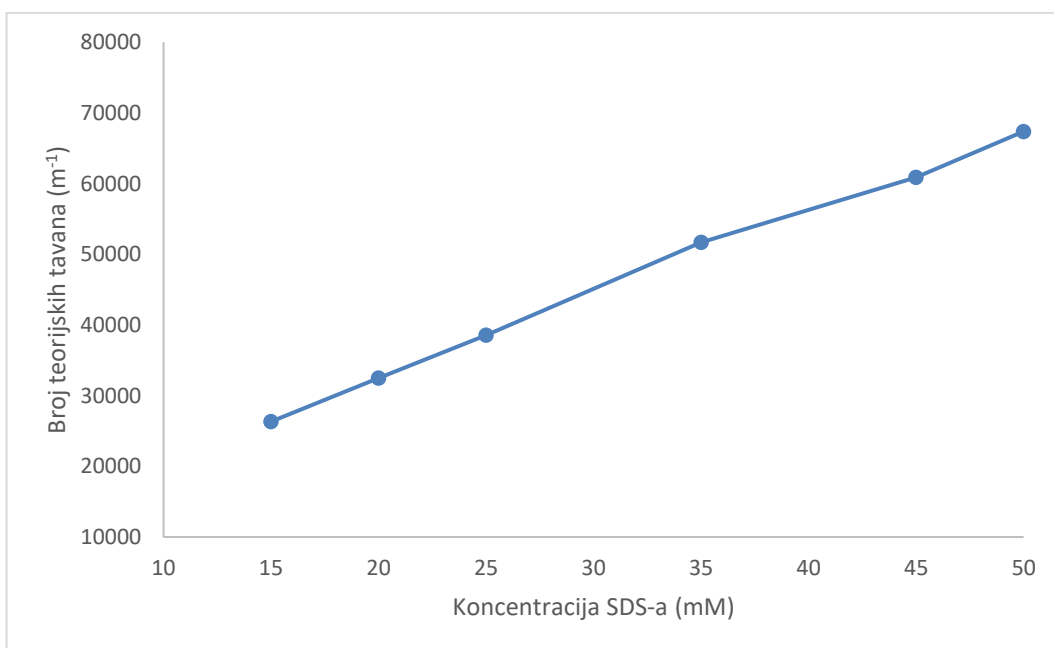
Slika 8. Ovisnost vremena migracije anastrozola o koncentraciji SDS-a.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH=9,18, 10% (v/v) izopropanol, 30 kV, 20 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: anastrozol 100 µg/ml



Slika 9. Ovisnost površine pika anastrozola o koncentraciji SDS-a.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH=9,18, 10% (v/v) izopropanol, 30 kV, 20 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: anastrozol 100 µg/ml

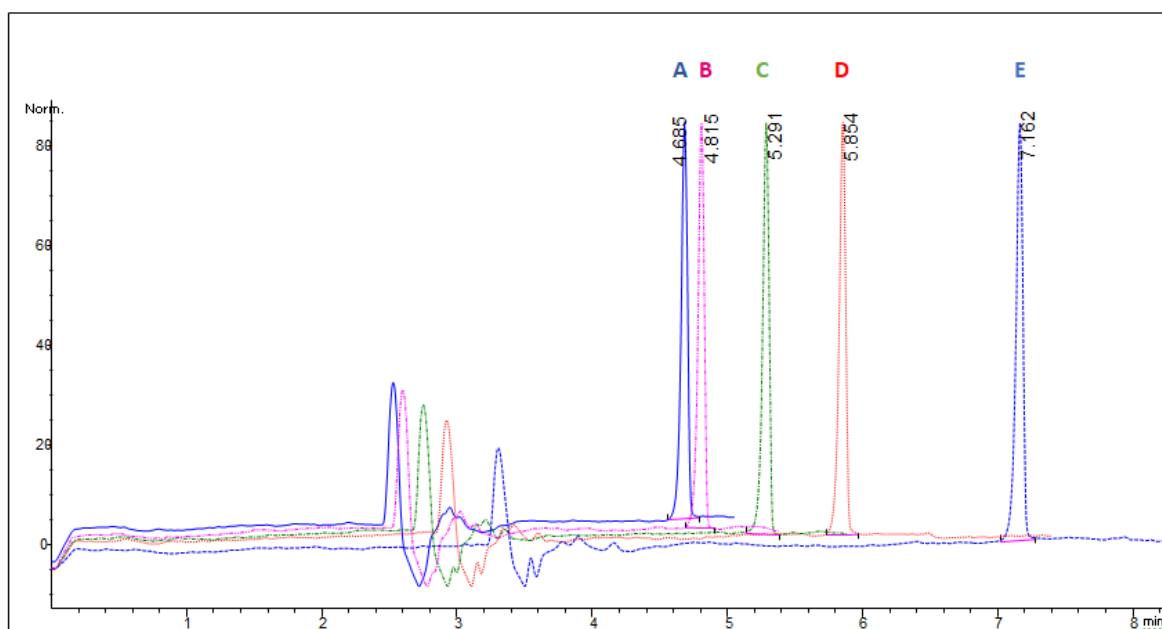


Slika 10. Ovisnost broja teorijskih tavana o koncentraciji SDS-a.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH=9,18, 10% (v/v) izopropanol, 30 kV, 20 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: anastrozol 100 µg/ml

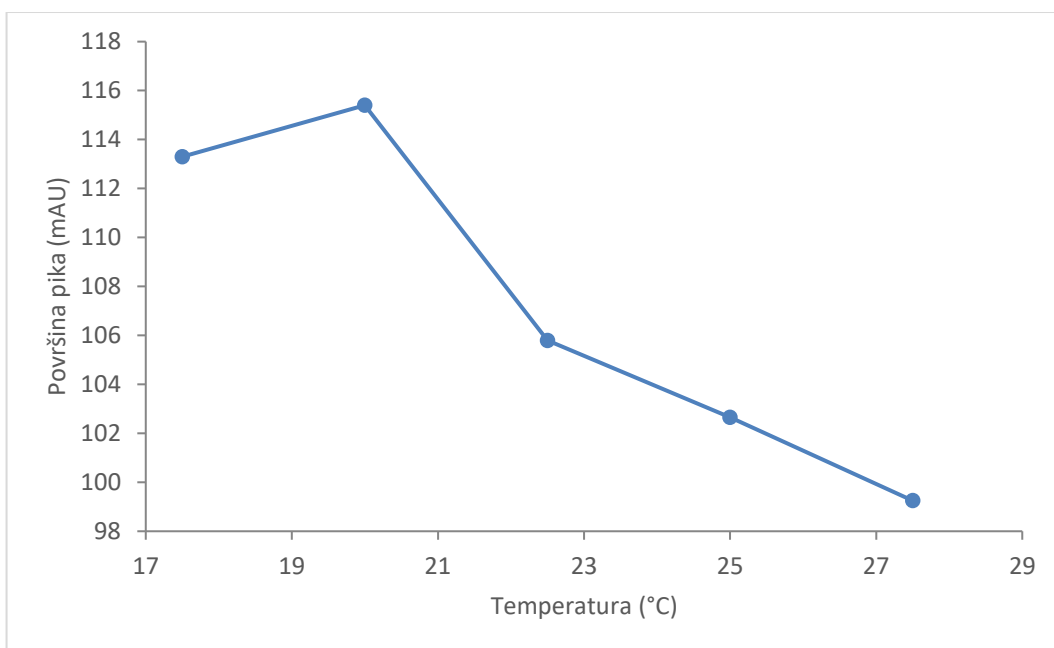
4.3. Utjecaj temperature kapilare

Temperatura kapilare je također jedan od parametara koji se mogu optimizirati jer utječe na viskoznost pufera, električnu provodnost i brzinu kretanja analita. Temperatura mijenja viskoznost elektrolita 2-3% za svaki Celzijev stupanj, a time mijenja i brzinu elektroosmotskog toka i elektroforetsku pokretljivost analita (Sertić, 2013). Nadalje, topljivost surfaktanta pokazuje brzi porast iznad određene temperature, poznatije kao Krafftova točka koja za SDS iznosi 15,7 °C (Chundru, 2007). Ako je temperatura kapilare ispod Krafftove točke, topljivost surfaktanta je niža od kritične micelarne koncentracije. No, glavna svrha termostatiranja kapilare je izbjegavanje već prije spomenutog Jouleovog zagrijavanja do kojeg dolazi uslijed povećanja jakosti struje. U ovom istraživanju ispitan je utjecaj temperature na vrijeme migracije i površinu pika analita u rasponu od 17,5 do 27,5 °C. Kao što je prikazano na Slici 11, povećanjem temperature skraćuje se vrijeme migracije analita uslijed smanjenja viskoznosti otopine elektrolita. Pri 20 °C vrijeme je migracije analita prihvatljivo, veća je površina pika od površine pri ostalim promatranim temperaturama (Slika 12) uz zadovoljavajući broj tavana (Slika 13) te je zato ova temperatura odabrana kao optimalna vrijednost.



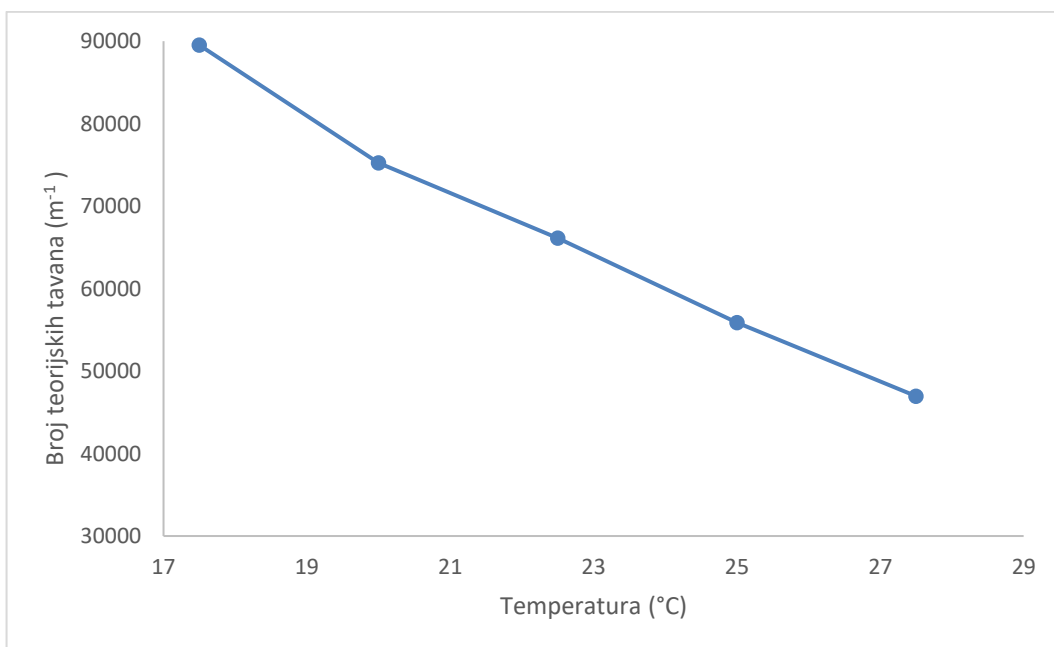
Slika 11. Elektroferogrami standardne otopine anastrozola, na valnoj duljini 210 nm u ovisnosti o temperaturi: (A) 27,5 °C, (B) 25 °C, (C) 22,5 °C, (D) 20 °C, (E) 17,5 °C.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH=9,18, 45 mM SDS, 10% (v/v) izopropanol, 30 kV, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: anastrozol 100 µg/ml



Slika 12. Ovisnost površine pika anastrozola o temperaturi kapilare.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH=9,18, 45 mM SDS, 10% (v/v) izopropanol, 30 kV, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: anastrozol 100 µg/ml

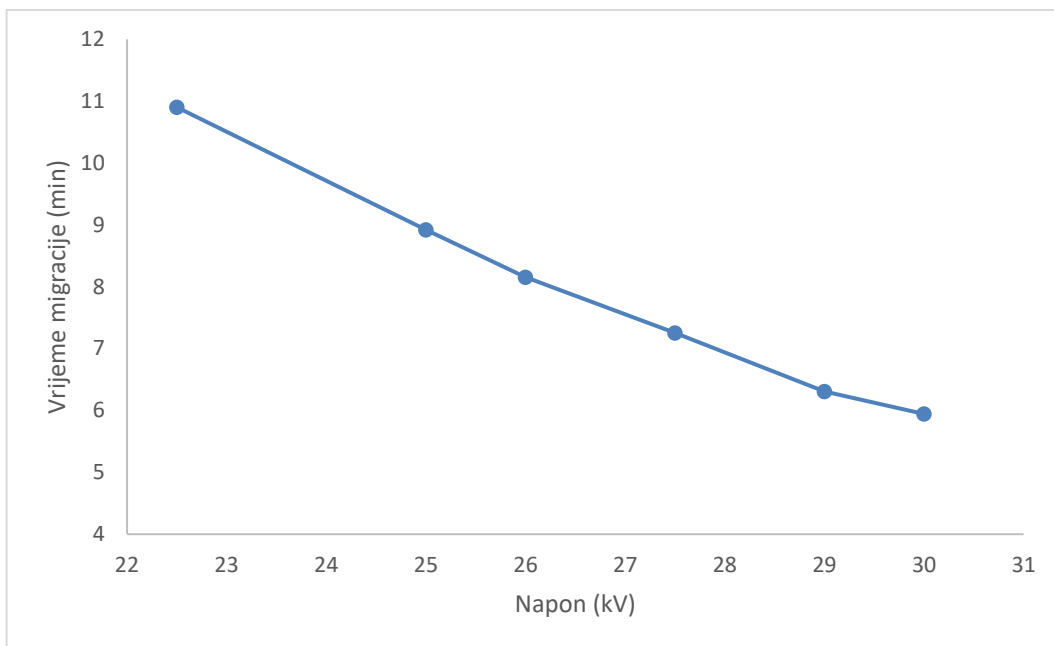


Slika 13. Ovisnost broja teorijskih tavana o temperaturi kapilare.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH=9,18, 45 mM SDS, 10% (v/v) izopropanol, 30 kV, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: anastrozol 100 µg/ml

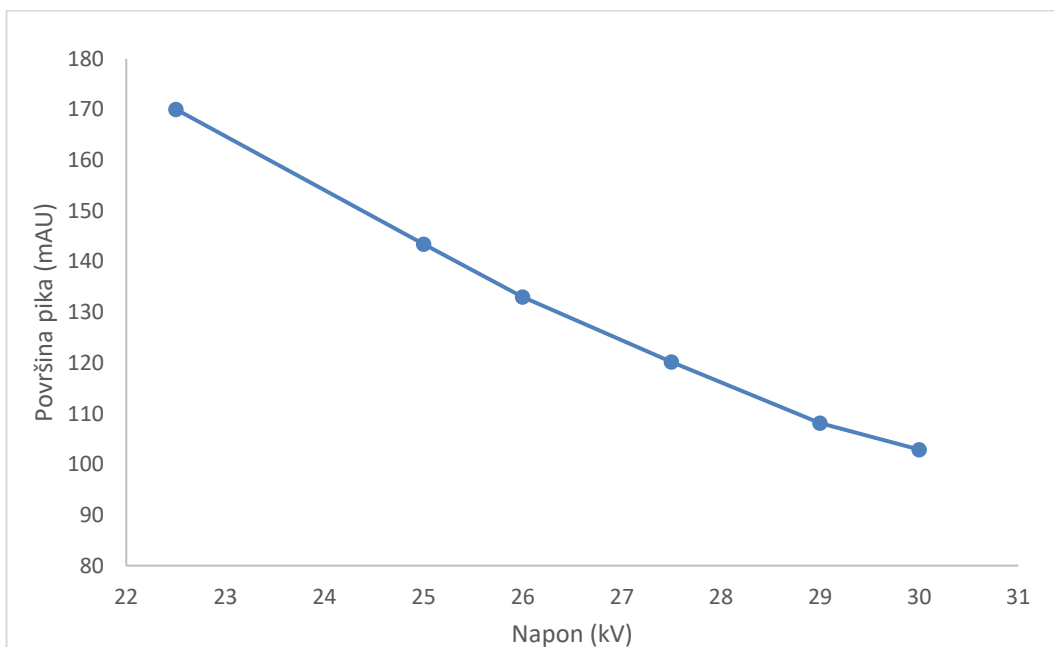
4.4. Utjecaj primijenjenog napona

Na kraju razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode optimizira se napon kao važan čimbenik s velikim utjecajem na elektroosmotski tok te brzinu migracije analita. Povećanjem napona dolazi do povećanja jakosti električnog polja, a samim time i brzine elektroosmotskog toka. Dakle, vrijeme migracije analita obrnuto je proporcionalno primijenjenom naponu. Osim na trajanje analize, promjenom napona može se utjecati i na osjetljivost metode, odnosno površinu pika analita. Što je napon veći, to je površina pika manja i smanjuje se osjetljivost metode. Ispitan je utjecaj napona u rasponu od 22,5 do 30 kV. Vrijednosti ispod 22,5 kV nisu se uzimale u obzir jer je vrijeme analize duže od 10 minuta, a vrijednosti iznad 30 kV na korištenom uređaju za kapilarnu elektroforezu nisu moguće. Na Slikama 14 i 15 je jasno vidljiv prethodno spomenut snažni utjecaj napona na vrijeme migracije i površinu pika analita. Također, odnos vremena migracije i površine pika prema naponu gotovo je linearan. Na Slici 16 može se primijetiti da povećanjem napona opada broj teorijskih tavana. Ukoliko će se metoda koristiti za analizu biološkog uzorka, u daljnjim ispitivanjima svakako će biti korisno odabrati niži napon pri kojem je površina pika analita veća, odnosno metoda osjetljivija. Nadalje, ukoliko će se u budućim istraživanjima analiza proširiti na više od jednog analita, onda će i razlučivanje među analitima od interesa biti ključni parametar pri odabiru optimalnog napona analize.



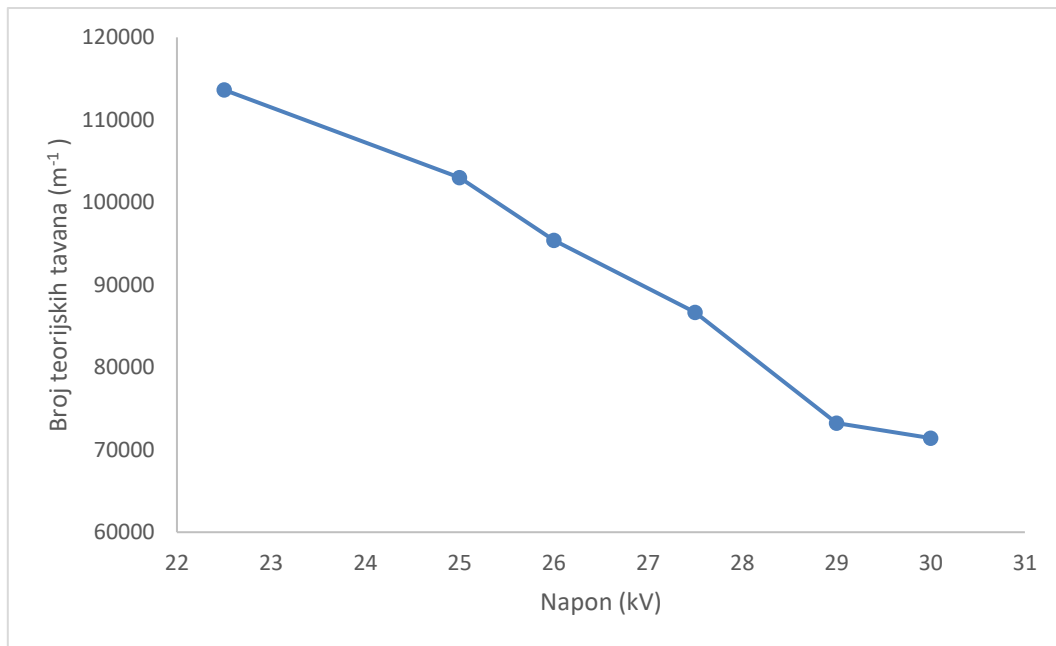
Slika 14. Ovisnost vremena migracije anastrozola o primijenjenom naponu.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH=9,18, 45 mM SDS, 10% (v/v) izopropanol, 20 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: anastrozol 100 µg/ml



Slika 15. Ovisnost površine pika anastrozola o primijenjenom naponu.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH=9,18, 45 mM SDS, 10% (v/v) izopropanol, 20 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: anastrozol 100 µg/ml



Slika 16. Ovisnost broja teorijskih tavana o primijenjenom naponu.

Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH=9,18, 45 mM SDS, 10% (v/v) izopropanol, 20 °C, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 4 s. Uzorak: anastrozol 100 µg/ml

Predmet daljnjeg istraživanja bit će optimizacija uvjeta istovremene analize anastrozola i lijekova s kojima se on koristi u kombiniranoj terapiji za liječenje uznapredovalog hormonski ovisnog tumora dojke negativnog na HER2: palbocikliba, ribocikliba ili abemacicliba. Nadalje, kako je riječ o metodi koja će biti primjenjena na biološkom uzorku za praćenje terapijskih koncentracija ovih lijekova, predmet daljnjih istraživanja će biti osiguravanje dovoljne osjetljivosti metode.

5. ZAKLJUČAK

Budući da se anastrozol široko primjenjuje u liječenju karcinoma dojke, ne samo u monoterapiji, već i u kombinaciji s drugim lijekovima, iznimno je važno razviti metodu koja će ovaj lijek na brz i pouzdan način jednoznačno odrediti. U ovom istraživanju ispitani su različiti parametri za analizu anastrozola kapilarnom elektroforezom.

Analiza je provedena na kapilari od izvučenog kvarca duljine 35 cm, duljine puta do detektora od 27 cm i unutrašnjeg promjera 50 μm . Uzorci su hidrodinamički injektirani u kapilaru pod tlakom od 50 mbar, pri temperaturi od 20°C u vremenu od 4 sekunde. Valna duljina od 210 nm korištena je za detekciju anastrozola.

Tijekom rada, izvršena je optimizacija koncentracije boratnog pufera pH 9,18 i SDS-a te su kao optimalne odabrane 20 mM boratni pufer i 45 mM SDS. Pri navedenim optimalnim koncentracijama vrijeme analize bilo je kratko (5,530 min), a broj teorijskih tavana visok (60878,33).

Istražen je i utjecaj temperature na analizu gdje je primijećeno da je pri 20 °C vrijeme analize dovoljno kratko uz veliki broj teorijskih tavana.

Nadalje, promatran je utjecaj napona (22,5 – 30 kV). U skladu s izrazom za jakost električnog polja u kapilarnoj elektroforezi, smanjenjem primijenjenog napona površina pika analita se povećavala (102,90 – 170,05 mAU), ali se vrijeme analize produljivalo (5,944 – 10,902 min).

6. LITERATURA

Agencija za lijekove i medicinske proizvode - Anastrozol Pliva 1mg, 2007-2021, <http://halmed.hr/>, pristupljeno 13. 2. 2021.

Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res*, 2017, 50, 33.

American Cancer Society, 2021, <https://www.cancer.org/>, pristupljeno 30. 1. 2021.

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

Breast cancer , 2021, <http://www.breastcancer.org/>, pristupljeno 30. 1. 2021.

Chew HK. Adjuvant therapy for breast cancer: who should get what? *West J Med*, 2001, 174(4), 284-287.

Chundru, SKC. Effect of Counter Ion Concentration Added with Mixture of Water and Ethylene Glycol on Krafft Temperature of Sodium Dodecyl Sulfate. Eastern Michigan University, SAD, 2007, 17, 29.

Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farmaceutski glasnik*, 2010, 66, 195 – 207.

Drăgănescu M, Carmocan C. Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia*, 2017, 112, 413-417.

Fabian CJ. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *Int J Clin Pract.*, 2007, 61(12), 2051–2063.

Fisusi FA, Akala EO. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharm Nanotechnol*, 2019, 7(3), 3–23.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo – Rak dojke, 2020, <http://www.hzjz.hr/>, pristupljeno 27. 2. 2021.

Lauer HH, Rozing GP. High performance capillary electrophoresis: A Primer. Njemačka, Agilent Technologies, 2014.

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. *Analtika lijekova – praktikum*. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko – biokemijski fakultet, 2014.

Nigović B. *Kapilarna elektroforeza*. U: *Analitika lijekova*. Zagreb, 2018.

Onkologija.hr , 2020, <https://www.onkologija.hr/>, pristupljeno 30. 1. 2021.

Podolski P, Tomek R, Vrbanec D. *Znanjem protiv raka dojke, informacijska knjižica za bolesnice*. treće izdanje, Hrvatska liga protiv raka, 2015.

Rak dojke, 2014, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/>, pristupljeno 30. 1. 2021.

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

Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 86(3-5):225-230.

Šamija M, Juzbašić S, Šeparović V, Vrdoljak VD. *Tumori dojke*. Zagreb: Medicinska naklada; 2012, str. 639-657.

Šeparović R, Zorica R, Silovski T, Pavlović M, Vazdar Lj, Pavlica V. Sustavno antineoplastično liječenje metastatskog raka dojke. *Libri Oncol.*, 2014, 42(1-3), 51 – 60.

Watson DG. *Pharmaceutical Analysis*. Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh, 2012, str. 376-397.

Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Chapter One - Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. U: *Progress in Molecular Biology and Translational Science, Approaches to Understanding Breast Cancer, Volume 151*. Texas Tech University Health Sciences Center, El Paso, Paul L Foster School of Medicine, SAD, 2017, str. 1-32.

World Cancer Research Fund International, <http://www.wcrf.org/>, pristupljeno 27. 2. 2021.

World Health Organization - Breast Cancer, 2021, <https://www.who.int/>, pristupljeno 27. 2. 2021.

Zhu Y, Wu J, Zhang C, Sun S, Zhang J, Liu W, Huang J, Zhang Z. BRCA mutations and survival in breast cancer: an updated systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 2016, 7(43), 70113–70127.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Zbog velike učestalosti raka dojke u populaciji i razvoja različitih terapijskih mogućnosti liječenja ove bolesti, od iznimne je važnosti razvoj novih analitičkih metoda za terapijsko praćenje liječenja odabranim lijekovima.

Cilj je ovog istraživanja bio razviti brzu i jednostavnu kapilarnoelektroforetsku metodu za analizu anastrozola koja će uz to biti ekološki prihvatljivija i jeftinija od već uvažene HPLC metode. Kao prikladna tehnika odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija.

Analiza je provedena na kapilari od izvučenog kvarca duljine 35 cm, duljine puta do detektora od 27 cm i unutrašnjeg promjera 50 μm . Uzorci su hidrodinamički injektirani u kapilaru pod tlakom od 50 mbar, pri temperaturi od 20°C u vremenu od 4 sekunde. Valna duljina od 210 nm korištena je za detekciju anastrozola.

Promatran je utjecaj koncentracije boratnog pufera (15 – 45 mM) i SDS-a (15 – 50 mM) te temperature (17,5 – 27,5 °C) i napona (22,5 – 30 kV) na vrijeme analize, površinu pika te broj teorijskih tavana. Kao optimalne vrijednosti uzete su 20 mM boratni pufer, 45 mM SDS i temperatura od 20 °C.

Predlaže se daljnja optimizacija metode uz nižu koncentraciju anastrozola cijepljenog u plazmi. Predmet daljnjeg istraživanja bit će optimizacija uvjeta istovremene analize anastrozola i lijekova s kojima se on koristi u kombiniranoj terapiji za liječenje uznapredovalog hormonski ovisnog tumora dojke negativnog na HER2: palbocikliba, ribocikliba ili abemacicliba.

Considering the high incidence of breast cancer that is present in our population and the development of various treatment options for this disease, it is of great importance to develop new analytical methods for therapeutic drug monitoring of the drugs of interest.

The aim of this study was to develop a fast and simple capillary electrophoretic method for the analysis of anastrozole, which will also be more environmentally friendly and cheaper than the already respected HPLC method. Micellar electrokinetic chromatography was selected as a suitable technique.

This analysis was performed on a 35 cm long capillary of fused silica, with effective length of 27 cm, and an inner diameter of 50 μm . The samples were hydrodynamically injected into the capillary under 50 mbar pressure, at a 20 °C temperature for 4 seconds. A wavelength of 210 nm was used to detect anastrozole.

The effects of borate buffer (15 – 45 mM) and SDS (15 – 50 mM) concentration, as well as temperature (17.5 – 27.5 °C) and voltage (22.5 – 30 kV) on the migration time, peak area, and theoretical plates were observed. Considering the experimental results, 20 mM borate buffer, 45 mM SDS, and a temperature of 20 °C were taken as optimal values.

It is required to further optimize this method using a lower concentration of anastrozole spiked in plasma. The subject of further research will also be the optimization of conditions in simultaneous analysis of anastrozole and other drugs that are used as a combination therapy for treatment of advanced hormone-dependent HER2 - negative breast cancer: palbocyclib, ribocyclib or abemacyclib.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

RAZVOJ KAPILARNOELEKTROFORETSKE METODE ZA ANALIZU ANASTROZOLA

Larena Bajto

SAŽETAK

Zbog velike učestalosti raka dojke u populaciji i razvoja različitih terapijskih mogućnosti liječenja ove bolesti, od iznimne je važnosti razvoj novih analitičkih metoda za terapijsko praćenje liječenja odabranim lijekovima.

Cilj je ovog istraživanja bio razviti brzu i jednostavnu kapilarnoelektroforetsku metodu za analizu anastrozola koja će uz to biti ekološki prihvatljivija i jeftinija od već uvažene HPLC metode. Kao prikladna tehnika odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija.

Analiza je provedena na kapilari od izvučenog kvarca duljine 35 cm, duljine puta do detektora od 27 cm i unutrašnjeg promjera 50 μm . Uzorci su hidrodinamički injektirani u kapilaru pod tlakom od 50 mbar, pri temperaturi od 20°C u vremenu od 4 sekunde. Valna duljina od 210 nm korištena je za detekciju anastrozola.

Promatran je utjecaj koncentracije boratnog pufera (15 – 45 mM) i SDS-a (15 – 50 mM) te temperature (17,5 – 27,5 °C) i napona (22,5 – 30 kV) na vrijeme analize, površinu pika te broj teorijskih tavana. Kao optimalne vrijednosti uzete su 20 mM boratni pufer, 45 mM SDS i temperatura od 20 °C.

Predlaže se daljnja optimizacija metode uz nižu koncentraciju anastrozola cijepljenog u plazmi. Predmet daljnjeg istraživanja bit će optimizacija uvjeta istovremene analize anastrozola i lijekova s kojima se on koristi u kombiniranoj terapiji za liječenje uznapredovalog hormonski ovisnog tumora dojke negativnog na HER2: palbocikliba, ribocikliba ili abemacicliba.

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

Rad sadrži: 34 stranica, 16 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: anastrozol, kapilarna elektroforeza, rak dojke

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. Tajana Silovski, *KBC Zagreb.*

Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2021.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

DEVELOPMENT OF CAPILLARY ELECTROPHORETIC METHOD FOR ANASTROZOLE ANALYSIS

Larena Bajto

SUMMARY

Considering the high incidence of breast cancer that is present in our population and the development of various treatment options for this disease, it is of great importance to develop new analytical methods for therapeutic drug monitoring of the drugs of interest.

The aim of this study was to develop a fast and simple capillary electrophoretic method for the analysis of anastrozole, which will also be more environmentally friendly and cheaper than the already respected HPLC method. Micellar electrokinetic chromatography was selected as a suitable technique.

This analysis was performed on a 35 cm long capillary of fused silica, with effective length of 27 cm, and an inner diameter of 50 μm . The samples were hydrodynamically injected into the capillary under 50 mbar pressure, at a 20 °C temperature for 4 seconds. A wavelength of 210 nm was used to detect anastrozole.

The effects of borate buffer (15 – 45 mM) and SDS (15 – 50 mM) concentration, as well as temperature (17.5 – 27.5 °C) and voltage (22.5 – 30 kV) on the migration time, peak area, and theoretical plates were observed. Considering the experimental results, 20 mM borate buffer, 45 mM SDS, and a temperature of 20 °C were taken as optimal values.

It is required to further optimize this method using a lower concentration of anastrozole spiked in plasma. The subject of further research will also be the optimization of conditions in simultaneous analysis of anastrozole and other drugs that are used as a combination therapy for treatment of advanced hormone-dependent HER2 - negative breast cancer: palbocyclib, ribocyclib or abemacyclib.

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

Thesis includes: 34 pages, 16 figures, 1 table and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: anastrozole, capillary electrophoresis, breast cancer

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
Tajana Silovski, Ph.D., *University Hospital Center Zagreb*
Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D., *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2021.