

# Validacija kapilarnoelektroforetske metode za određivanje pirfenidona u ljekovitom obliku

---

**Bratelj, Lana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:163:023003>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Lana Bratelj**

**Validacija kapilarnoelektroforetske metode za  
određivanje pirfenidona u ljekovitom obliku**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

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.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Mirandi Sertić na pomoći i stručnom vodstvu prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svim prijateljicama uz koje sam zajedno prolazila studentske dane i koje su mi iste i uljepšale.

Hvala Filipu na ljubavi i podršci koju mi pruža tokom svih ovih godina.

Najveće hvala mojim roditeljima i baki na безусловnoj ljubavi, potpori i razumijevanju. Bez vas ne bih danas bila što jesam.

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. RIJETKE BOLESTI.....	1
1.2. IDIOPATSKA PLUĆNA FIBROZA.....	2
1.3. PIRFENIDON .....	3
1.3.1. Doziranje i nuspojave.....	4
1.3.2. Farmakokinetika.....	4
1.3.6. Mehanizam djelovanja .....	6
1.4. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA .....	8
1.4.1. Validacijski parametri .....	8
1.5. KAPILARNA ELEKTROFOREZA .....	11
1.5.1. Princip .....	11
1.5.2. Elektrosmotski tok.....	12
1.5.3. Micelarna elektrokinetička kromatografija .....	13
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>16</b>
3.1. Materijali .....	16
3.1.1. Kemikalije .....	16
3.1.2. Pribor .....	16
3.1.3. Radni instrumenti .....	17
3.1.4. Programski paketi.....	17
3.2. Metode.....	17
3.2.1. Priprema instrumenta za analizu .....	17
3.2.2. Priprema puferskih otopina .....	18
3.2.3. Priprema standardnih otopina.....	18
3.2.4. Uvjeti analize.....	18
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
4.1. Početna ispitivanja.....	20
4.2. Ispitivanje linearnosti .....	21
4.3. Ispitivanje preciznosti .....	22
4.4. Ispitivanja robustnosti .....	23
4.4.1. Napon .....	23
4.4.2. Temperatura .....	25
4.5. Ispitivanje točnosti .....	27
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>28</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>30</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	<b>33</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1.UVOD

## 1.1. RIJETKE BOLESTI

Rijetke bolesti (engl., *orphan diseases*) su bolesti koje pogađaju mali udio populacije. Da bi se bolest smatrala rijetkom broj oboljelih treba biti manji od 1 na 2000 stanovnika. Takve bolesti su većinom genetske i simptomi jako variraju kako od bolesti do bolesti tako i od pacijenta do pacijenta, što dovodi do problema dijagnosticiranja same bolesti. Rijetkih bolesti je više od 6000 i upravo je točno postavljena dijagnoza ključ povećanja kvalitete života oboljelih. Broj oboljelih u Europi od rijetkih bolesti se procjenjuje na više od 30 milijuna, a oboljeli čine 6-8% populacije ([www.eurordis.org](http://www.eurordis.org)).

Zbog oskudnog znanja o rijetkim bolestima, slabo je organizirana psihosocijalna skrb. Zajednica nije prilagođena potrebama oboljelih te oni rijetko imaju prilike sudjelovati u uobičajenom društvenom životu zajednice. S time se javljaju socijalni i psihološki problemi kako oboljelih tako i njihovih obitelji, čime se dodatno smanjuje ionako već narušena kvaliteta života. Oboljeli i njihove obitelji postaju socijalno, ekonomski, kulturalno i psihološki ranjive te im depresija, anksioznost i izolacija iz društvenog života postaju neizostavan dio svakodnevnice. Zajedničke karakteristike rijetkih bolesti su da su one kronične, teške, često smrtonosne i degenerativne te da se u polovici slučajeva simptomi javljaju već u djetinjstvu. Nadalje, adekvatna terapija za većinu bolesti ne postoji, dok su postojeći lijekovi na tržištu uglavnom preskupi ([www.rijetke-bolesti.hr](http://www.rijetke-bolesti.hr)).

Lijekovi koji se koriste za liječenje rijetkih bolesti se nazivaju *orphan* lijekovi. Farmaceutska industrija nema interesa za pronalazak novih molekula koje bi se mogle koristiti u liječenju ovih bolesti, jer je oboljelih premalo, a troškovi i rizik pretkliničkih i kliničkih istraživanja su preveliki. Iz tog razloga vlade i organizacije poput EURORDIS zagovaraju ekonomske poticaje kako bi potaknuli farmaceutsku industriju na istraživanje ([www.eurordis.org](http://www.eurordis.org)).

Posebno važno za otkrivanje i sprječavanje pogreški u dijagnosticiranju rijetkih bolesti je novorođenački probir (engl., *screening*). Novorođenački probir je proces u kojemu se tek rođena djeca testiraju na određene bolesti (poput fenilketonurije i kongenitalnog hipotiroidizma) najčešće uzimanjem uzorka krvi. ([www.eurordis.org](http://www.eurordis.org)).

## 1.2. IDIOPATSKA PLUĆNA FIBROZA

Idiopatska plućna fibroza (IPF) je rijetka plućna bolest koju karakterizira ireverzibilno stvaranje fibroznog, ožiljkastog tkiva u plućima čime je onemogućena normalna plućna funkcija. Dolazi do odumiranja tkiva oko plućnih alveola, koje se ne mogu rastegnuti, čime dolazi do smanjenog ulaska kisika u krvotok. Svjesnost o toj rijetkoj bolesti je vrlo niska, a smrtnost je vrlo visoka. Polovica bolesnika će umrijeti u roku od 2-5 godina nakon što im je bolest dijagnosticirana, što IPF čini smrtonosnijom od velike većine malignih bolesti, uključujući karcinom prostate, karcinom dojke i neke oblike limfoma i leukemije (jedra.toraks.hr).

Uzrok idiopatske plućne fibroze je još uvijek nepoznat. Neki od rizičnih faktora su genetika, pušenje cigareta, refluks, dob i spol. Oko 20% oboljelih ima u obitelji još jednog člana oboljelog od neke vrste plućne bolesti koja također uzrokuje stvaranje ožiljkastog tkiva. Ako u obitelji postoji više od jednog oboljelog, bolest se naziva obiteljska plućna fibroza. Oko 75% oboljelih od IPF-a su ili bivši ili sadašnji pušači cigareta, kao što i jednaki postotak oboljelih ima simptome žgaravice i refluksa. Većina oboljelih su muškarci, oko 75%, dok gotovo svi oboljeli imaju više od 50 godina (www.lung.ca).

Dva su glavna simptoma idiopatske plućne fibroze: kratkoća daha i kronični kašalj. Kratkoća daha se u početku uobičajeno javlja tijekom fizičke aktivnosti. Kako bolest napreduje, kratkoća daha može onemogućiti sve aktivnosti. Oko 85% oboljelih ima kronični kašalj koji traje duže od 8 tjedana te se uobičajeno radi o suhom kašlju (www.lung.ca). Još neki od simptoma koji mogu biti prisutni jesu: gubitak težine, gubitak apetita, umor i specifične promjene na prstima i noktima (engl., *clubbing*).

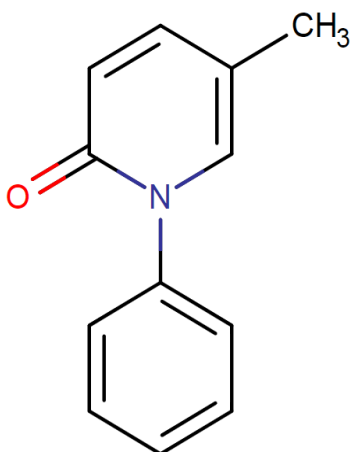
Dijagnoza se temelji na radiološkim pretragama, biopsiji pluća, testu plućne funkcije i laboratorijskim testiranjima, iako ne postoji specifičan dijagnostički marker. U početku se često pogrešno dijagnosticira zbog sličnosti simptoma s bolestima poput astme, bronhitisa i srčanog zatajenja (Nathan i sur., 2016).

Idiopatska plućna fibroza je bolest kojoj nema lijeka. Lijekovi koji se koriste služe za usporavanje tijeka bolesti, pri čemu nekada i ne smanjuju simptome. Pirfenidon i nintedanib su neke od terapijskih opcija koje su pokazale da usporavaju progresiju bolesti. Nažalost, neki pacijenti ne mogu uzimati ove lijekove zbog njihovih nuspojava, uglavnom gastrointestinalnih. U podlozi ove bolesti je upala te se kod akutnih egzacerbacija plućne

fibroze mogu koristiti kortikosteroidi, poput prednizona. Zbog smanjenje apsorpcije kisika preporuča se davanje kisika oboljelima, što smanjuje probleme s disanjem i pomaže obavljanje uobičajenih dnevnih aktivnosti. Jedna od opcija za neke oboljele je i transplantacija pluća, pri čemu je sama operacija riskantna, a lista čekanja duga. Vrlo su bitne i nefarmakološke mjere, odnosno promjena životnih navika. Jedna od najvažnijih promjena u životnim navikama bolesnika koji boluju od plućnih bolesti je prestanak pušenja. Oboljelima se preporuča godišnje cijepljenje protiv gripe, održavanje higijene ruku, zdrava prehrana i izbjegavanje oboljelih od respiratornih infekcija ([www.lung.ca](http://www.lung.ca)).

### 1.3. PIRFENIDON

Pirfenidon (slika 1) je aktivna tvar koja se koristi u liječenju idiopatske plućne fibroze u Japanu (Pirespa®), Europi (Esbriet®) i Indiji (Pirfenex®). Pirfenidon djeluje antifibrotički, protuupalno i antioksidativno (Togami i sur., 2013). Lijek Esbriet, čija je aktivna tvar pirfenidon, indiciran je za liječenje odraslih oboljelih od idiopatske plućne fibroze čiji su simptomi blagi do umjereno teški. Budući da se radi o rijetkoj bolesti, ovaj lijek pripada skupini lijekova sa "orphan" statusom te je na tržištu od 16.11.2004. ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)). Iako je indiciran samo za IPF, pirfenidon je pokazao aktivnost u više fibrotičnih stanja, uključujući i ona u bubrežima i jetri. ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)). IUPAC naziv pirfenidona glasi 5-metil-1-fenil-1,2-dihidropiridin-2-on, a kemijska formula je  $C_{12}H_{11}NO$ . Molekulska masa pirfenidona iznosi 185.22 g/mol. ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).



Slika 1. Struktura pirfenidona (preuzeto s [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca))

### 1.3.1. Doziranje i nuspojave

Lijek Esbriet je dostupan isključivo na recept. Tijekom cijelog liječenja nužno je da bolesnika nadzire iskusan liječnik, dobro upoznat s ovom smrtonosnom bolešću. Ovaj lijek se može naći u obliku tableta ili kapsula. Doza pirfenidona u obliku kapsule je 267 mg, a na tržištu su tri doze pirfenidona u obliku tablete: 267 mg, 534 mg i najveća doza od 801 mg. Uvijek se liječenje započinje s najnižom dozom od 267 mg koja se uzima tijekom prvog tjedna liječenja te se doza postepeno povećava. Drugi tjedan se uzima srednja doza od 534 mg, a treći tjedan se kreće s najvećom dozom od 801 mg koja se kontinuirano nastavlja uzimati. Doziranje je tri puta na dan. Najčešće prijavljene nuspojave ovog lijeka u kliničkim ispitivanjima su one gastrointestinalne (mučnina, proljev, dispepsija, gubitak apetita), umor, glavobolja, osip i fotoosjetljivost. Fotoosjetljivost predstavlja kožne reakcije slične opekotinama nakon izlaganja sunčevoj svjetlosti ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)).

### 1.3.2. Farmakokinetika

Primjećena je razlika maksimalne koncentracije, AUC (engl., *area under curve*) i brzine apsorpcije kod bolesnika koji su primjenjivali pirfenidon u obliku Esbriet kapsula ili tableta. Primjena lijeka u stanju sitosti rezultirala je značajnim smanjenjem (40-50%) maksimalne koncentracije, smanjenjem brzine apsorpcije, dok je AUC vrijednost iznosila 80-85% AUC vrijednosti zabilježene u bolesnika koji su lijek uzimali na prazan želudac. Ipak, u slučaju nuspojava poput omaglice i mučnine, preporuča se lijek uzimati s hranom pošto je opažena manja vjerojatnost pojavljivanja nuspojava u bolesnika koji lijek uzimaju na pun želudac ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)). Vrijeme u kojemu se postiže maksimalna koncentracija je 0,5 h nakon uzimanja pojedinačne doze, masna hrana smanjuje maksimalnu koncentraciju za gotovo 50%, produljuje vrijeme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije na 3.5 h i smanjuje AUC za oko 16% ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)).

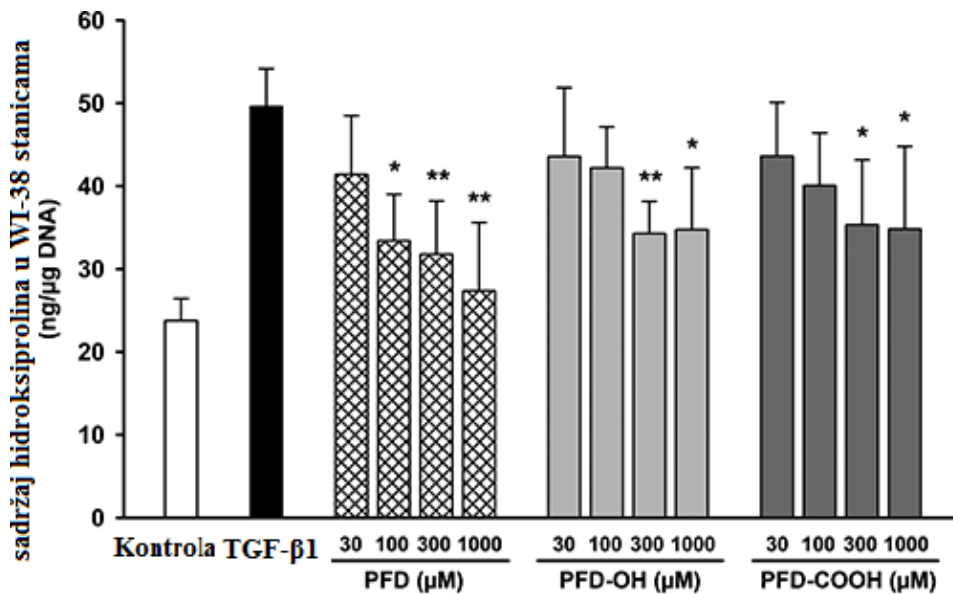
Pirfenidon se veže za proteine ljudske plazme, pri čemu je srednja vrijednost vezanja između 50 i 58%. Primarno se veže za serumski albumin. Tkivna distribucija pirfenidona je umjerena, na što ukazuje srednja vrijednost prividnog volumena distribucije od 70 L u stanju dinamičke ravnoteže ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)).

Pirfenidon se metabolizira primarno pomoću CYP1A2 (70-80%), a nešto manje pomoću ostalih CYP izoenzima, uključujući CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP2E1. Iz tog razloga ne preporuča se istodobna primjena antidepresiva fluvoksamina i ostalih snažnih inhibitora CYP1A2, jer bi oni značajno utjecali na povišenje koncentracije pirfenidona u



plazmi. Nadalje, pušenje cigareta inducira CYP1A2, pa je koncentracija pirfenidona kod pušača smanjena za oko 50% (www.fda.gov).

Dva su metabolita pirfenidona: 5-hidroksipirfenidon i primarni metabolit 5-karboksipirfenidon. U nekim studijama je pokazano da i metaboliti pirfenidona smanjuju koncentraciju hidroksiprolina u plućima, koji je jedna od vodećih komponenti proteina kolagena (Slika 2). Ovi rezultati ukazuju na to da i metaboliti imaju antifibrotičko djelovanje, inhibirajući sintezu kolagena u plućnim fibroblastima (Huang i sur., 2013).

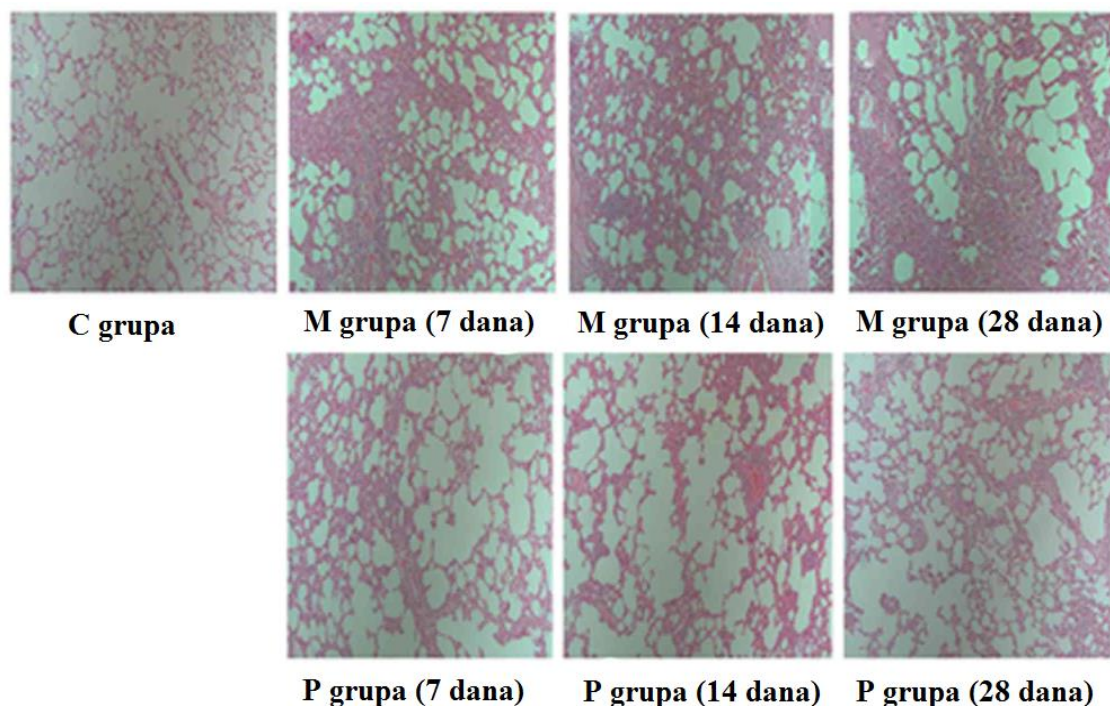


Slika 2. Učinci različitih koncentracija pirfenidona i njegovih metabolita na smanjenje sadržaja hidroksiprolina stimuliranog transformirajućim faktorom rasta β1 (TGF-β1) (preuzeto i prilagođeno iz Togami i sur., 2013)

Najveći dio doze pirfenidona, oko 80%, se izlučuje mokraćom; najvećim dijelom se izlučuje u obliku 5-karboksi metabolita, a najmanjim dijelom (manje od 1%) se izlučuje nepromjenjen. Poluvrijeme eliminacije iznosi oko 3 h (www.fda.gov).

### 1.3.6. Mehanizam djelovanja

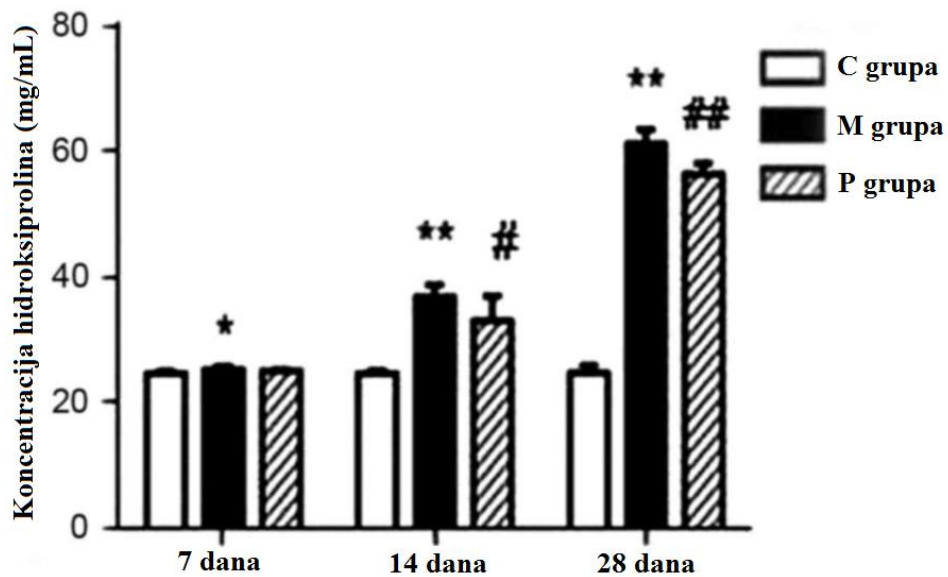
Točan mehanizam djelovanja pirfenidona nije u potpunosti poznat. Pirfenidon pokazuje i protuupalno i antifibrotičko djelovanje, a fokus istraživanja je na antifibrotičkom djelovanju. Važan aspekt antifibrotičkog djelovanja pirfenidona je povezan s inhibicijom stvaranja i aktivnosti transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). U bleomicin-inducirajućoj plućnoj ozljedi na modelu hrčka, liječenje pirfenidonom je pokazalo značajnu supresiju (od 33%) transkripcije TGF- $\beta$  gena (Iyer i sur., 1999a) i supresiju bleomicin-inducirane hiperekspresije prokolagena I i III (Iyer i sur., 1999b). Slično ispitivanje je provedeno i na modelu štakora. Na plućima štakora uslijed indukcije bleomicinom došlo je do zadebljanja alveola, izobličenja strukture pluća i fibroze. Sve je uspoređivano s kontrolnom grupom. Dobiveni rezultati pokazuju smanjenje alveolitisa i fibroze kod grupe koja je primala pirfenidon u vremenskom periodu od 7, 14 i 28 dana, uspoređujući s modelnom grupom koja nije primala pirfenidon (Slika 3).



Slika 3. Histološko ispitivanje antifibrotičkog učinka pirfenidona na bleomicin-induciranoj ozljedi pluća štakora. C- kontrolna grupa, M- modelna grupa, P- grupa koja je primala pirfenidon (preuzeto i prilagođeno iz Song i sur., 2018)

Pirfenidon također smanjuje sadržaj hidroksiprolina u bleomicin-inducirajućoj plućnoj ozljedi štakora. U vremenskom periodu od 7, 14 i 28 dana uočeno je značajno povećanje sadržaja hidroksiprolina u modelnoj grupi uspoređujući s grupom koja je primala pirfenidon

(Slika 4). Do značajnijeg smanjenja hidroksiprolina u grupi koja je primala pirfenidon došlo je nakon 14. dana (Song i sur., 2018).



Slika 4. Kvantitativno ispitivanje sadržaja hidroksiprolina u plućnom tkivu. C- kontrolna grupa, M- modelna grupa, P- grupa koja je primala pirfenidon (preuzeto i prilagođeno iz Song i sur., 2018)

Dodatno, pirfenidon inhibira ekspresiju heat shock proteina 47 u plućnim fibroblastima. Heat shock protein 47 je specifični kolagenski molekularni chaperon, čija je važna uloga u sintezi i remodeliranju izvanstaničnog matriksa (Nakayama i sur., 2008). U uzgojenim fibroblastima kore bubrega izoliranih iz štakora, pirfenidon je pokazao da inhibira mitogenezu i ekspresiju faktora rasta vezivnog tkiva fibroblasta (Hewitson i sur., 2001).

Na različitim fibrotičkim životinjskim modelima pirfenidon je pokazao i protuupalni učinak. Pokazao je supresiju bleomicin-inducirane plućne vaskularne permeabilnosti i supresiju povećanog infliksa proupalnih stanica, poput neutrofila, makrofaga i limfocita (Iyer i sur., 2000).

## 1.4. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

Validacija bioanalitičkih metoda predstavlja važan zahtjev analitičko-kemijske prakse i označava postupak kojim se određuje i dokumentira da je analitička metoda prikladna za određenu primjenu. Za validaciju je potrebno da je popraćena iscrpnom dokumentacijom i potrebno ju je provesti ukoliko je došlo do promjene uvjeta pri kojima je validirana metoda (npr. promjena instrumenta ili matrice uzorka) ili pri razvoju i uvođenju nove metode. Postoji mnogo publikacija i međunarodnih institucija koje daju smjernice za validaciju, a različiti su zahtjevi validacije koje propisuju različita regulatorna tijela. ICH (engl., *International Council for Harmonisation*) smjernicama učinjen je pokušaj harmonizacije za primjene u praksi. Zahtjev za sve analitičke kontrole je da su provedene metodama koje su validirane (Luterotti i Bičanić, 2013).

U dijelu ICH smjernica: *Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* ICH nalaze se smjernice za validaciju analitičkih metoda, čiji je cilj premostiti razlike koje postoje između različitih regulatornih tijela Europske komisije, Japana i Sjedinjenih Američkih Država. Uobičajeni validacijski parametri koji se ispituju jesu: točnost, preciznost, specifičnost, granica dokazivanja, granica određivanja, linearnost i radno područje. Iako se izdržljivost ne spominje kao uobičajen parametar, trebalo bi se uzeti u obzir i ispitivanje izdržljivosti u odgovarajućem trenutku razvoja analitičkog postupka ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)).

### 1.4.1. Validacijski parametri

Specifičnost je sposobnost metode da nedvojbeno razlikuje jedan analit od ostalih komponenata koje mogu biti prisutne u uzorku. Ostale komponente mogu biti onečišćenja, produkti razgradnje, matriks i slično. Nedostatak specifičnosti pojedinog analitičkog postupka može se nadoknaditi nekim drugim pratećim analitičkim postupcima. Nije uvijek moguće pokazati da je određeni analitički postupak specifičan za samo jedan analit. U ovom slučaju preporučena je kombinacija dvaju ili više analitičkih postupaka kako bi se postigla odgovarajuća razina specifičnosti ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)).

Točnost nekog analitičkog postupka pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Potrebno je provesti najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode. Točnost se iskazuje kao analitički prinos (engl., *recovery*) ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)).

Preciznost analitičkog postupka predstavlja slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Uobičajeno se preciznost izražava kao standardno odstupanje, relativno standardno odstupanje (RSD) ili raspon pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Preciznost se može iskazati na tri različita načina: ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost predstavlja preciznost dobivenu uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima unutar kraćeg vremenskog perioda. Srednja preciznost predstavlja odstupanje rezultata preciznosti zbog različitih uvjeta u laboratoriju; razlike mogu biti u danima, analitičaru, opremi i slično. Obnovljivost predstavlja preciznost dobivenu u različitim laboratorijima. Uobičajeno se provodi najmanje tri mjerenja uzorka za najmanje tri koncentracije u radnom području metode ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)).

Granica dokazivanja (engl., *detection limit* - DL) nekog analitičkog postupka predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koja može biti dokazana, ali ne i određena. Granica dokazivanja se može odrediti na temelju vizualne procjene, na temelju omjera signala i šuma ili na temelju standardne devijacije signala i nagiba kalibracijskog pravca. Vizualna procjena se može kombinirati s instrumentalnim metodama. Omjer signala i šuma dobiva se uspoređivanjem signala uzorka poznatih niskih koncentracija analita sa signalom slijepog pokusa i uspostavljanjem minimalne koncentracije na kojoj se analit može sa sigurnošću detektirati. Prihvatljiv omjer signala i šuma je između 3 ili 2:1. Granica dokazivanja se može iskazati i kao:

$$DL = 3.3 \frac{\sigma}{S}$$

pri čemu je  $\sigma$  standardna devijacija, a S nagib pravca. Nagib pravca se može odrediti iz kalibracijske krivulje analita. Standardna devijacija se može odrediti na više različitih načina, npr. uz pomoć slijepog uzorka ili kalibracijske krivulje. Kod odgovarajućeg broja slijepih uzoraka je potrebno izmjeriti jačinu analitičkog odgovora i izračunati njihovu standardnu devijaciju. Kalibracijska krivulja se dobiva korištenjem uzoraka koji sadrže analit čiji je raspon koncentracija unutar granice dokazivanja, pri čemu se kao standardna devijacija može koristiti standardna devijacija odsječka na y- osi ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)).

Granica određivanja (engl., *quantitation limit* - QL) nekog analitičkog postupka predstavlja najnižu koncentraciju analita u uzorku koju je moguće odrediti s prihvatljivom preciznošću i točnošću. Granica određivanja je kvantitativni parametar koji se uglavnom koristi za određivanje nečistoća i/ili razgradnih produkata. Može se odrediti na iste načine kao

i granica dokazivanja, pri čemu je prihvatljiv omjer signala i šuma 10:1, a način određivanja na temelju standardne devijacije signala i nagiba kalibracijskog pravca:

$$QL = 10 \frac{\sigma}{S}$$

pri čemu je  $\sigma$  standardna devijacija, a  $S$  nagib pravca te se mogu odrediti na iste načine kao za granicu dokazivanja ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)).

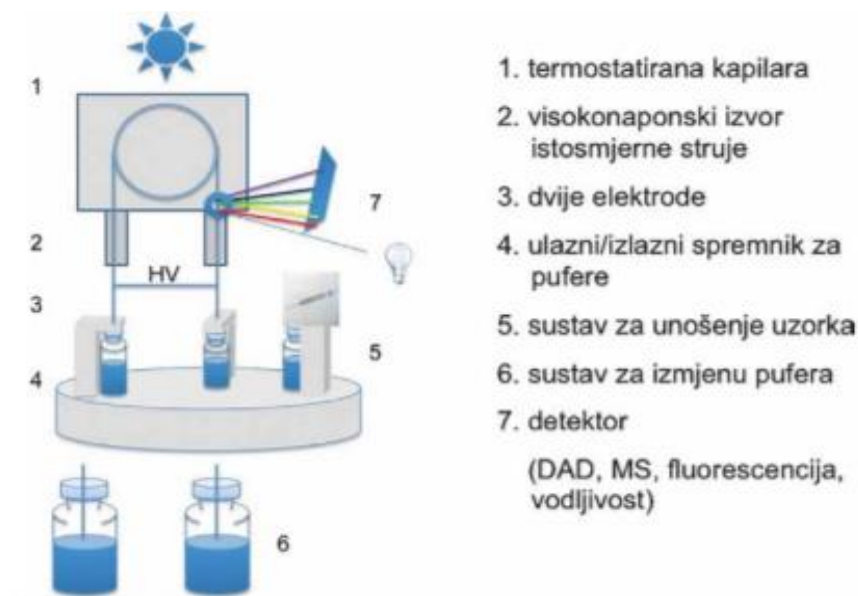
Linearnost analitičkog postupka predstavlja sposobnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Potrebno je provesti ispitivanja na minimalno 5 različitih koncentracija. Ispitivanja se mogu provesti izravno na aktivnoj tvari (razrjeđivanjem standardne otopine) i/ili zasebnim vaganjem komponenata smjese ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)). Linearnost se prikazuje grafički kao kalibracijska krivulja, pri čemu je na x osi koncentracija analita, a na y osi izmjereni analitički signal te se iskazuje koeficijentom korelacije regresijskog pravca ( $k$ ), pri čemu je  $k > 0,999$  (Nigović i sur., 2014).

Radno područje analitičkog postupka predstavlja raspon između gornje i donje koncentracije analita u uzorku unutar kojega analitička metoda ima prihvatljivu točnost, preciznost i linearnost te se uobičajeno izvodi iz linearnosti. Za određivanje aktivne tvari ili gotovog produkta, preporučeno radno područje iznosi 80-120% sadržaja ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)).

Izdržljivost predstavlja mjeru sposobnosti analitičkog postupka da ostane nepromijenjen pod utjecajem malih, ali namjernih promjena parametara metode i uobičajeno se ispituje tijekom razvojne faze. Cilj je utvrditi parametre koji utječu na metodu. Neke od uobičajenih varijacija jesu: stabilnost analitičke otopine i vrijeme ekstrakcije, dok su uobičajene varijacije u tekućinskoj kromatografiji: pH, temperatura, sastav mobilne faze i slično ([www.ema.europa.eu/en](http://www.ema.europa.eu/en)).

## 1.5. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Kapilarna elektroforeza separacijska je tehnika koja se pojavila krajem osamdesetih godina prošlog stoljeća kao alternativa kromatografskim tehnikama ([www.wynsep.com](http://www.wynsep.com)). Kapilarna elektroforeza je točna i precizna tehnika za kvantifikaciju analita u svim tipovima uzoraka. Koristi se u kontroli kvalitete peptidnih lijekova, visoko je selektivna i učinkovita u separaciji enantiomera te pokazuje učinkovitost u analizi onečišćenja, kao i u analizi lijekova i metabolita u biološkim tekućinama. Prednosti kapilarne elektroforeze u odnosu na HPLC (engl., *high performance liquid chromatography*) jesu: veća moć separacije, kraće vrijeme analize, jeftinije kolone i zanemariva potrošnja otapala. Nedostaci kapilarne elektroforeze u odnosu na HPLC jesu: manja izdržljivost i osjetljivost te potreba za optimizacijom više parametara (Watson, 2012). Na slici 5 prikazana je shema instrumenta.



Slika 5. Shema instrumenta za kapilarnu elektroforezu (preuzeto iz Damić i Nigović, 2010)

### 1.5.1. Princip

Separacija je omogućena primjenom visokog potencijala (10-30 kV) u uskoj (25-75  $\mu\text{m}$ ) kapilari fuzioniranoj sa silikom, punjenoj mobilnom fazom. Mobilna faza sadrži vodenu komponentu i mora sadržavati elektrolit. Analiti migriraju u primjenjenom električnom polju brzinom ovisnom o njihovom naboju i ionskom radijusu. Čak i neutralni analiti migriraju kroz kolonu zbog elektroosmotskog toka (engl., *electroosmotic flow* - EOF), pri čemu je kretanje uobičajeno u smjeru katode. Brzinu putovanja iona opisuje jednačina:

$$v = \mu_e \times E$$

pri čemu je  $\mu_e$  elektroforetska pokretljivost, a E primijenjeno električno polje. Mjerna jedinica električnog polja je V/cm i ono ovisi o duljini korištene kapilare i jakosti potencijala.

Elektroforetska pokretljivost je opisana jednadžbom:

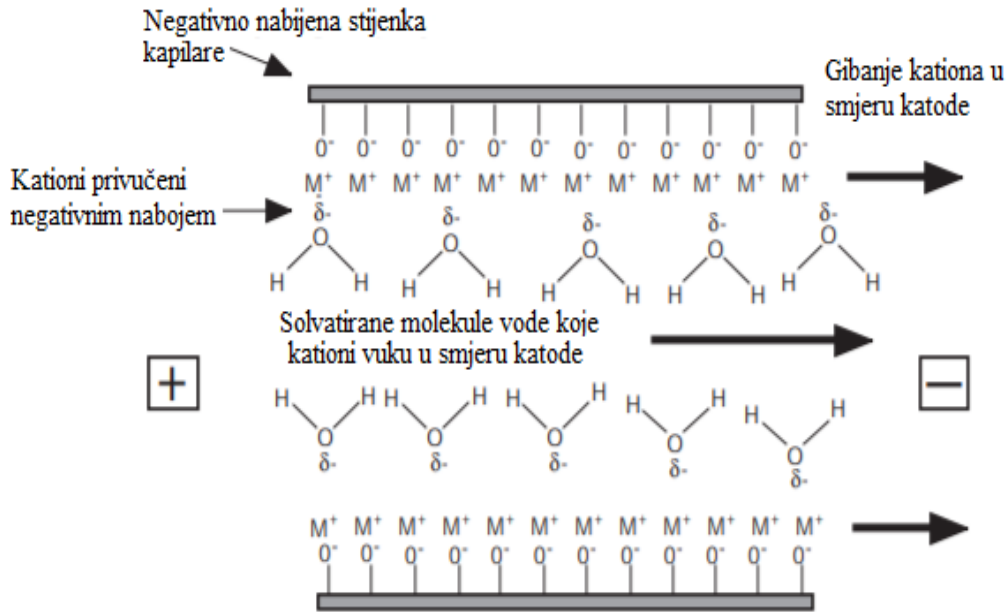
$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Pri čemu je q naboj iona,  $\eta$  viskoznost medija, a r ionski radijus. Iz ove jednadžbe se može zaključiti da će se brže kretati manji ioni većeg naboja. Na brzinu putovanja iona može utjecati i njegova pKa vrijednost; što je ion više ioniziran veća je i njegova mobilnost (Watson, 2012).

### **1.5.2. Elektroosmotski tok**

Silanolne grupe stijenke kapilare nose negativni naboj. pKa kiselih silanolnih grupa je između 4,0 i 9,0 i negativni naboj raste porastom pH. Kationi pufera su privučeni negativnim nabojem, što rezultira porastom pozitivnog potencijala u smjeru stijenke kapilare. Usljed porasta pozitivnog potencijala, molekule vode su privučene u područje blizu stijenke. Primjenom potencijala kationi u otopini migriraju u smjeru katode i njihova mobilnost je relativno visoka uspoređujući s brzinom ostatka komponenti pufera. Kationi sa sobom počinju povlačiti molekule vode prema katodi, stvarajući EOF (Slika 6). EOF raste s porastom pH, budući da porastom pH raste negativan naboj silanolnih grupa. EOF se smanjuje porastom ionske jakosti pufera, budući da veća koncentracija aniona u puferu smanjuje pozitivni potencijal kapilarne stijenke, što smanjuje interakciju molekula vode s kationima. EOF se najčešće smanjuje dodatkom organskih modifikatora i kationskih površinsko aktivnih tvari te modificiranjem unutrašnje stijenke kapilare neutralnim slojem, a raste porastom napona i temperature, dodatkom anionskih površinsko aktivnih tvari te modificiranjem unutrašnje stijenke kapilare ionskim slojem. Postojanje EOF znači da će se sve komponente, neovisno o naboju, kretati u smjeru katode. Kationi se kreću brzinom njihove ionske mobilnosti zbrojenom s brzinom EOF, neutralne komponente se kreću jednakom brzinom kao EOF, a anioni se kreću brzinom EOF iz koje se oduzima njihova ionska mobilnost (Watson, 2012).

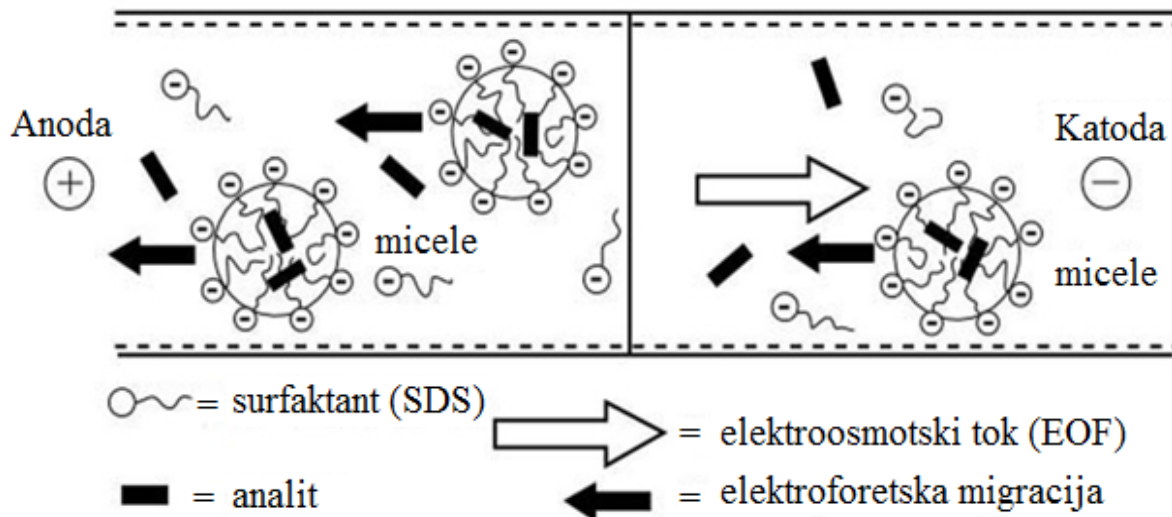




Slika 6. Elektroosmotski tok (preuzeto i prilagođeno iz Watson, 2012)

### 1.5.3. Micelarna elektrokinetička kromatografija

Postoje različite vrste kapilarne elektroforeze, poput kapilarne zonske elektroforeze (CZE), kapilarne gel elektroforeze, micelarne elektrokinetičke kromatografije (MEKC)... (www.news-medical.net). U micelarnoj elektrokinetičkoj kromatografiji koriste se ionske micelarne otopine umjesto jednostavne puferske otopine korištene u kapilarnoj zonskoj elektroforezi. MEKC se može koristiti za separaciju ionskih i neutralnih komponenti, dok CZE uglavnom razdvaja samo ionske komponente. Princip razdvajanja se temelji na razdjeljenju analita između micela i vode, pri čemu se surfaktant dodaje u otopinu pufera u koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije, čineći pseudostacionarnu fazu. U ovakvoj izvedbi micela se ponašaju kao kromatografska mobilna faza. Najčešće korišten anionski surfaktant je natrijev dodecil sulfat (SDS). Anionske micela su elektrostatički privučene prema anodi, no EOF je jači od elektroforetske migracije micela pa se micela također gibaju prema katodi (Slika 7).



Slika 7. Shematski prikaz separacije u micelarnoj elektrokinetičkoj kromatografiji (preuzeto i prilagođeno iz Hancu i sur., 2013)

Kada se neutralni analit injektira u micelarnu otopinu, dio se ugradi u micelle, a ostatak analita se giba elektroosmotskom brzinom. Micelle smanjuju migraciju neutralnih komponenti s kojima stupaju u interakciju, koje bi inače imale jednaku brzinu kao EOF. Razdvajanje ovisi o koeficijentu distribucije između micela i vodene faze, dok za nabijene čestice ovisi i o elektroforetskoj pokretljivosti samog analita. Što je veći postotak analita ugrađenog u micelle, gibanje je sporije. Ukoliko se kao surfaktant koristi SDS redoslijed migracije će biti takav da će prvo izaći anioni, zatim neutralne specije, a posljednji kationi zbog njihove jake elektostatičke privlačnosti sa negativno nabijenim micelama (Hancu i sur., 2013).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Idiopatska plućna fibroza smrtonosna je bolest od koje će većina bolesnika umrijeti u roku od 5 godina nakon postavljanja dijagnoze. Budući da se radi o rijetkoj bolesti (u Hrvatskoj je broj oboljelih oko 100) terapijskih opcija je iznimno malo. Jedna od mogućih terapija za liječenje ove bolesti je lijek pirfenidon, koji usporava progresiju bolesti. Pirfenidon ima "*orphan drug*" status i njegova jedina indikacija je liječenje idiopatske plućne fibroze te se ne koristi za liječenje ostalih intersticijskih plućnih bolesti.

Kapilarna elektroforeza separacijska je metoda analize u kojoj analiti migriraju u primjenjenom električnom polju brzinom ovisnom o njihovom naboju i ionskom radijusu. Postoji više različitih izvedbi ove metode, a u ovom radu je korištena micelarna elektrokinetička kromatografija u kojoj se koriste ionske micelarne otopine kako bi se omogućilo razdvajanje i analiza i neutralnih komponenti.

Cilj ovog diplomskog rada je validirati metodu, odnosno ispitati prikladnost primjene novorazvijene metode za određivanje pirfenidona u Esbriet kapsuli tehnikom kapilarne elektroforeze. Validacija analitičkih metoda predstavlja važan zahtjev analitičko-kemijske prakse i označava postupak kojim se određuje i dokumentira da je analitička metoda prikladna za određenu primjenu. Validacijski parametri ispitani u ovom radu jesu: linearnost, preciznost, robustnost i točnost.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Materijali**

#### **3.1.1. Kemikalije**

Acetonitril (Biosolve Chimie SARL, Dieuze, Francuska)

Esbriet (Roche, Švicarska)

Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Natrijev tetraborat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Natrijev dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

Otopina natrijeva hidroksida, 1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Otopina natrijeva hidroksida, 0,1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanjem vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

Pirfenidon (Toronto Research Chemicals, Kanada)

Salicilna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

#### **3.1.2. Pribor**

Bočice za uzorkovanje 2,0 ml sustavom za kapilarnu elektroforezu (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Eppendorf tubica 1,5 ml (Eppendorf, Hauppauge, SAD)

Injekcijski membranski Acrodisc GHP filteri, veličina pora 0,2  $\mu\text{m}$ , promjer 26 mm (Gelman, Ann Arbor, SAD)

Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 36 cm, duljine do detektora 27cm, unutrašnjeg promjera 50  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Pipete, model Pipet-Lite XLS (Rainin Instrument LLC, Oakland, CA, SAD)

### **3.1.3. Radni instrumenti**

Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

Centrifugirka (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

Koncentrator plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

Mini-Centrifuga 6000 rpm (IKA-Werke, Staufen, Njemačka)

Mini-Vortex (IKA-Werke, Staufen, Njemačka)

Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)

Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)

Uređaj za kapilarnu elektroforezu (G1600A) s integriranim detektorom niza dioda (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

### **3.1.4. Programski paketi**

ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft, Seattle, SAD)

Microsoft® Office Word 2003 (Microsoft, Seattle, SAD)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Priprema instrumenta za analizu**

Prije prvog korištenja kapilara je kondicionirana prvo 20 minuta s 1 M NaOH, zatim 20 minuta s 0,1 M NaOH, pa 10 minuta s ultračistom vodom te na kraju 20 minuta s otopinom radnog pufera. Na početku svakog radnog dana kapilara je ispirana 10 minuta s 0,1M NaOH, zatim 10 minuta s ultračistom vodom te 15 minuta s otopinom radnog pufera. Na kraju radnog dana, kapilara je ispirana 10 minuta s vodom i 20 minuta s 0,1 M NaOH. Preko noći su krajevi kapilare bili uronjeni u vijale s vodom.

### **3.2.2. Priprema puferских otopina**

Otopina boratnog pufera koncentracije 100 mM pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine natrijeva tetraborata dekahidrata u ultračistoj vodi u odmjerne tikvici od 50,0 mL. U svrhu pospješivanja otapanja krutog tetraborata, tikvica je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta.

Otopina surfaktanta natrij dodecil sulfata (SDS) koncentracije 100 mM pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine natrij dodecil sulfata u ultračistoj vodi u odmjerne tikvici od 50,0 mL.

Pripremljene matične otopine boratnog pufera i surfaktanta su čuvane na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi. Iz matičnih otopina je neposredno prije analize pripravljena otopina radnog pufera. Kao radni pufer koristila se smjesa 20 mM borata pH 9,1, 70 mM SDS-a i ultračiste vode. Prije svake pripreme radnog pufera matične otopine su profiltrirane kroz membranski filter širine pora 0,22  $\mu\text{m}$ .

### **3.2.3. Priprema standardnih otopina**

Standardna otopina pirfenidona pripremljena je otapanjem standarda pirfenidona u smjesi otapala  $\text{H}_2\text{O}$ :acetonitril (ACN) = 50:50 (v/v). Odgovarajuća količina pirfenidona otopljen je u 5 mL 50% acetonitrila do konačne koncentraciju 1,5 mg/mL. Nakon miješanja 1 minutu na Vortexu, otopina je stavljena na ultrazvučnu kupelj 10 minuta.

Otopina pirfenidona iz Esbriet kapsule (pri čemu jedna kapsula sadrži 267 mg pirfenidona) pripremljena je otapanjem odgovarajuće mase kapsule u 5 mL smjese otapala  $\text{H}_2\text{O}$ :acetonitril = 50:50 (v/v) do konačne koncentracije 1 mg/mL. Nakon otapanja je otopina miješana 1 minutu na Vortexu, stavljena na ultrazvučnu kupelj 10 minuta, kako bi se poboljšala ekstrakcija, i na kraju centrifugirana 10 minuta.

Sve pripremljene otopine su čuvane u frižideru na +4 °C, a iz njih su neposredno prije analize pripremane radne otopine razrjeđivanjem s ultračistom vodom.

### **3.2.4. Uvjeti analize**

Analiza je provedena na uređaju za kapilarnu elektroforezu s kapilarom od izvučenog kvarca unutrašnjeg promjera 50  $\mu\text{m}$ , proizvođača Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka. Uzorci su injektirani u kapilaru pod tlakom od 50 mbar. Analize su provedene pri valnoj duljini detektora od 210 nm i 310 nm. Kao radni pufer koristila se smjesa 20 mM

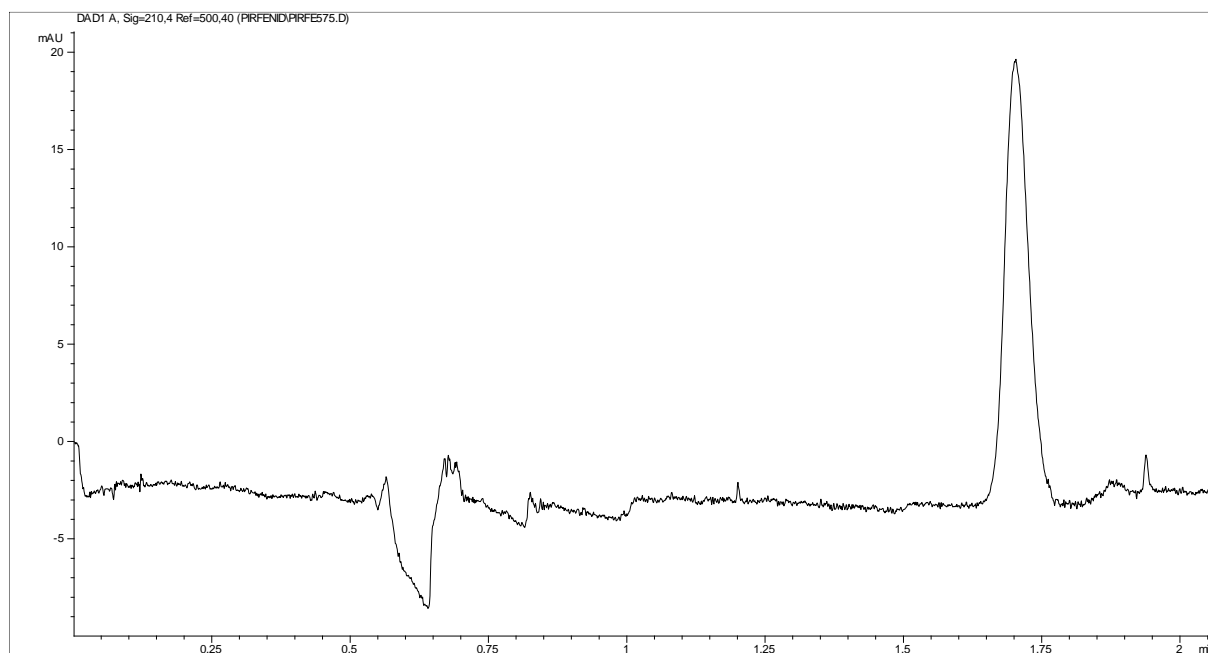
borata pH 9,1 i 70 mM SDS-a. Analize su provedene na temperaturi od 25 °C i na naponu od 25 kV.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Početna ispitivanja

Obzirom da je molekula pirfenidona neutralna, za njegovu analizu je korištena micelarna elektrokromatografija. Kako bi postigli nastanak micela u otopini radnog pufera, potrebno je bilo dodati natrijev dodecil sulfat u koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije u otopinu radnog pufera. Micele stupaju u interakciju s pirfenidonom te omogućuju njegovu analizu.

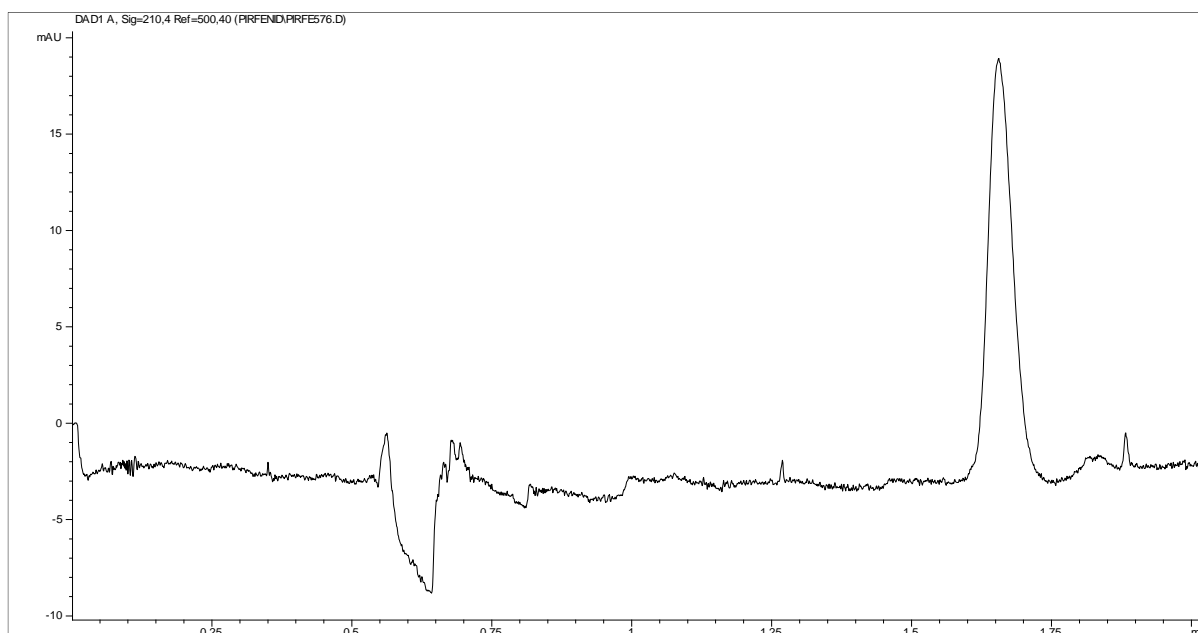
Prvo je snimljen elektroferogram otopine standarda pirfenidona. Koncentracija standarda u otopini bila je 50 µg/mL. Elektroferogram otopine standarda pirfenidona prikazan je na slici 8.



Slika 8. Elektroferogram otopine standarda pirfenidona, koncentracije 50 µg/mL



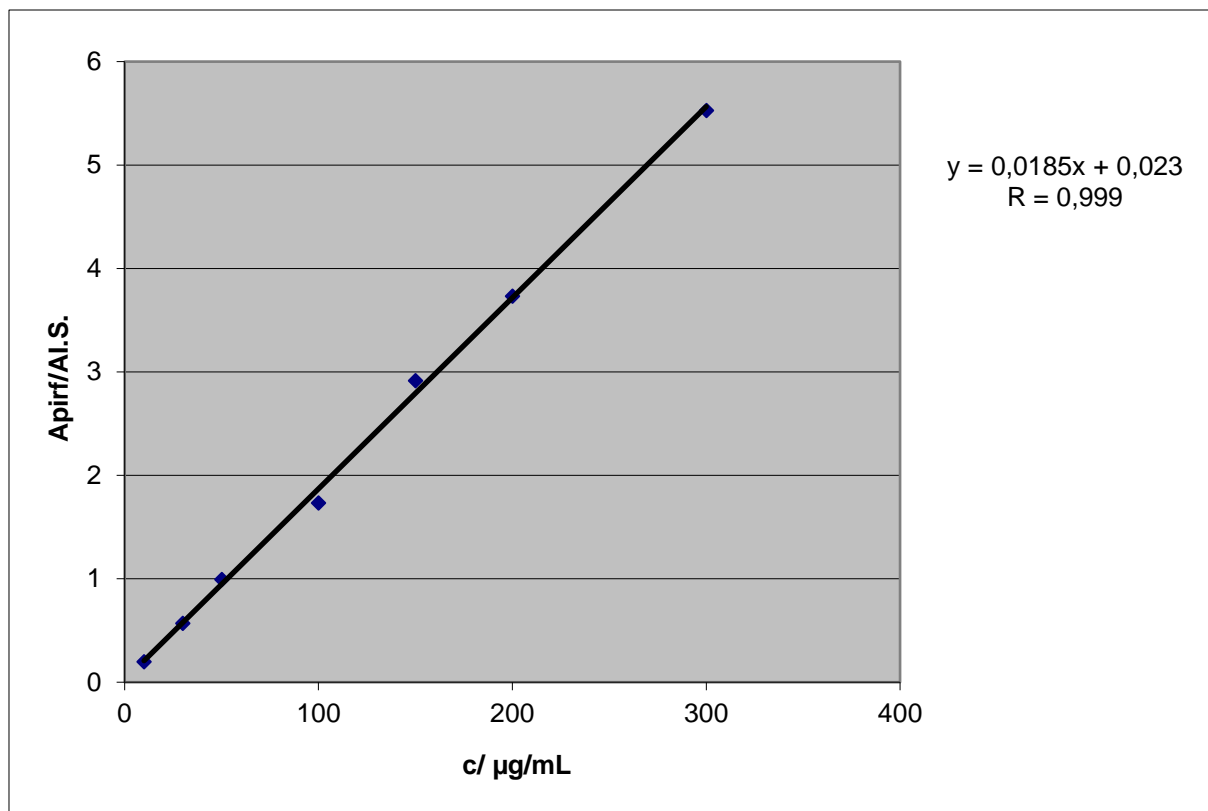
Zatim je snimljen elektroferogram pirfenidona pripremljenog iz Esbriet kapsule. Koncentracija pirfenidona u otopini bila je 50 µg/mL. Elektroferogram otopine pirfenidona pripremljenog iz Esbriet kapsule prikazan je na slici 9.



Slika 9. Elektroferogram otopine pirfenidona pripremljenog iz Esbriet kapsule, koncentracije 50 µg/mL

## 4.2. Ispitivanje linearnosti

Koncentracijski raspon u kojem je ispitivana linearnost otopine pirfenidona je od 10 do 300 µg/mL. U svaku ispitivanu otopinu dodan je jednaki volumen salicilne kiseline, čija je konačna koncentracija 50 µg/mL. Salicilna kiselina služi kao unutarnji standard (I.S.). Ispitivanja su provedena na 7 različitih koncentracija, za svaku koncentraciju napravljena su 3 mjerenja. Ovisnost srednjih vrijednosti omjera korigirane površine pika pirfenidona i salicilne kiseline o koncentraciji pirfenidona prikazana je na Slici 10. Jednadžba dobivenog regresijskog pravca glasi  $y = 0,0185x + 0,023$ , s koeficijentom korelacije  $R = 0,999$ . Dobivena linearnost je zadovoljavajuća za koncentracijski raspon od 10 do 300 µg/mL.



Slika 10. Ovisnost srednjih vrijednosti omjera korigirane površine pika pirfenidona i salicilne kiseline o koncentraciji pirfenidona

### 4.3. Ispitivanje preciznosti

Preciznost, iskazana kao ponovljivost, je određena mjerenjem vremena i površine pikova na tri različite koncentracije. Za svaku koncentraciju su mjerenja ponovljena tri puta i uzeta je srednja vrijednost. Preciznost je izražena kao relativna standardna devijacija (RSD). U Tablicama 1. i 2. prikazane su srednje vrijednosti vremena, odnosno površine pikova dobivenih rezultata za ispitivane otopine pirfenidona i pripadajuće RSD vrijednosti.

Tablica 1. Srednje vrijednosti korigiranih vremena zadržavanja za ispitivane otopine pirfenidona i relativne standardne devijacije

Koncentracija (µg/mL)	$t_{sr}$ (s)	RSD (%)
50	4,23	0,14
100	4,16	0,42
200	4,14	0,06

Najveća relativna standardna devijacija iznosi 0,42% za koncentraciju od 100 µg/mL, a najmanja relativna standardna devijacija iznosi 0,06% za koncentraciju od 200 µg/mL.

Tablica 2. Srednje vrijednosti korigiranih površina pikova za ispitivane otopine pirfenidona i relativne standardne devijacije

Koncentracija (µg/mL)	A <sub>sr</sub>	RSD (%)
50	64,67	1,87
100	163,90	0,82
200	326,97	0,17

Najveća relativna standardna devijacija iznosi 1,87% za koncentraciju od 50 µg/mL, a najmanja relativna standardna devijacija iznosi 0,17% za koncentraciju od 200 µg/mL. Može se zaključiti da je ponovljivost predložene analitičke metode zadovoljavajuća.

#### 4.4. Ispitivanja robustnosti

Za ispitivanje robustnosti provedena su ispitivanja na različitoj temperaturi i naponu. Sva ispitivanja provedena su u triplicatu. Koncentracija pirfenidona u svim analizama bila je 100 µg/mL. U svaku otopinu dodana je i salicilna kiselina, konačne koncentracije 50 µg/mL, kao unutarnji standard. Površine pikova i vremena su izražene u odnosu na unutarnji standard.

##### 4.4.1. Napon

Ispitivanja su provedena na naponu od  $25 \pm 1$  kV. U Tablicama 3. i 4. prikazane su srednje vrijednosti vremena zadržavanja dobivenih rezultata za ispitivane otopine pirfenidona i odstupanje rezultata u odnosu na napon od 25 kV. U Tablicama 5. i 6. prikazane su srednje vrijednosti površina pikova za ispitivane otopine pirfenidona i odstupanje rezultata u odnosu na napon od 25 kV.

Tablica 3. Srednje vrijednosti vremena zadržavanja dobivenih rezultata za ispitivane otopine pirfenidona, izraženo u odnosu na salicilnu kiselinu, i odstupanje vremena zadržavanja pri naponu od 24 kV u odnosu na napon od 25 kV

<b>Napon (kV)</b>	<b><math>t_{sr}</math> (s)</b>	<b>Odstupanje (%)</b>
25	1,28	+ 1,56
24	1,30	

Tablica 4. Srednje vrijednosti vremena zadržavanja dobivenih rezultata za ispitivane otopine pirfenidona, izraženo u odnosu na salicilnu kiselinu, i odstupanje vremena zadržavanja pri naponu od 26 kV u odnosu na napon od 25 kV

<b>Napon (kV)</b>	<b><math>t_{sr}</math> (s)</b>	<b>Odstupanje (%)</b>
25	1,28	- 4,69
26	1,22	

Tablica 5. Srednje vrijednosti površina pikova za ispitivane otopine pirfenidona, izraženo u odnosu na salicilnu kiselinu, i odstupanje površine pikova pri naponu od 24 kV u odnosu na napon od 25 kV

<b>Napon (kV)</b>	<b><math>A_{sr}</math></b>	<b>Odstupanje (%)</b>
25	1,50	+ 3,23
24	1,55	

Tablica 6. Srednje vrijednosti površina pikova za ispitivane otopine pirfenidona, izraženo u odnosu na salicilnu kiselinu, i odstupanje površine pikova pri naponu od 26 kV u odnosu na napon od 25 kV

Napon (kV)	$A_{sr}$	Odstupanje (%)
25	1,50	- 2,67
26	1,46	

Utjecaj napona na vrijeme zadržavanja i površinu pikova nije velik; najveće odstupanje iznosi – 4,69% za vrijeme zadržavanja pri naponu od 26 kV.

#### 4.4.2. Temperatura

Ispitivanja su provedena na temperaturi od  $25 \pm 1$  °C. U Tablicama 7. i 8. prikazane su srednje vrijednosti vremena zadržavanja dobivenih rezultata za ispitivane otopine pirfenidona i odstupanje rezultata u odnosu na temperaturu od 25 °C. U Tablicama 9. i 10. prikazane su srednje vrijednosti površina pikova za ispitivane otopine pirfenidona i odstupanje rezultata u odnosu na temperaturu od 25 °C.

Tablica 7. Srednje vrijednosti vremena zadržavanja dobivenih rezultata za ispitivane otopine pirfenidona, izraženo u odnosu na salicilnu kiselinu, i odstupanje vremena zadržavanja pri temperaturi od 24 °C u odnosu na temperaturu od 25 °C

Temperatura (°C)	$t_{sr}$ (s)	Odstupanje (%)
25	1,22	+ 0,81
24	1,23	

Tablica 8. Srednje vrijednosti vremena zadržavanja dobivenih rezultata za ispitivane otopine pirfenidona, izraženo u odnosu na salicilnu kiselinu, i odstupanje vremena zadržavanja pri temperaturi od 26 °C u odnosu na temperaturu od 25 °C

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>t<sub>sr</sub> (s)</b>	<b>Odstupanje (%)</b>
25	1,22	- 1,64
26	1,20	

Tablica 9. Srednje vrijednosti površina pikova za ispitivane otopine pirfenidona, izraženo u odnosu na salicilnu kiselinu, i odstupanje površine pikova pri temperaturi od 24 °C u odnosu na temperaturu od 25 °C

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>A<sub>sr</sub></b>	<b>Odstupanje (%)</b>
25	1,47	- 0,68
24	1,46	

Tablica 10. Srednje vrijednosti površina pikova za ispitivane otopine pirfenidona, izraženo u odnosu na salicilnu kiselinu, i odstupanje površine pikova pri temperaturi od 26 °C u odnosu na temperaturu od 25 °C

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>A<sub>sr</sub></b>	<b>Odstupanje (%)</b>
25	1,47	- 2,04
26	1,44	

Može se zaključiti da temperatura ne utječe značajno na vrijeme zadržavanja i površinu pikova; najveće odstupanje iznosi – 2,04% za površinu pika pri temperaturi od 26 °C.

## 4.5. Ispitivanje točnosti

Za ispitivanje točnosti provedena su 3 mjerenja uzorka na 3 koncentracije te su uzete srednje vrijednosti. Uzorak poznate koncentracije se analizirao usporedbom izmjerenih i stvarnih vrijednosti te su rezultati iskazani kao analitički prinos (engl., *recovery*). U svaku otopinu dodan je i jednaki volumen salicilne kiseline, konačne koncentracije 50 µg/mL, te su površine pikova izražene u odnosu na unutarnji standard. Koncentracije na kojima su ispitivanja provedena jesu: 300 µg/mL, 130 µg/mL i 90 µg/mL, pri čemu je u svaku otopinu dodana odgovarajuća koncentracija standarda pirfenidona. U Tablici 11. prikazane su srednje vrijednosti površina pikova dobivenih rezultata za ispitivane otopine pirfenidona, koncentracije izračunate iz pravca, čija je jednačba  $y = 0,0185x + 0,023$  i vrijednosti analitičkih prinosa.

Tablica 11. Srednje vrijednosti korigiranih površina pikova za ispitivane otopine pirfenidona u odnosu na salicilnu kiselinu, koncentracije izračunate iz pravca, čija je jednačba  $y = 0,0185x + 0,023$  i vrijednosti analitičkih prinosa

Koncentracija (µg/mL)	A <sub>sr</sub>	Koncentracija iz pravca (µg/mL)	Recovery (%)
90	1,23	68,87	76,52
130	1,98	105,67	81,29
300	5,02	269,82	89,94

Najmanja točnost je na koncentraciji od 90 µg/mL, čija recovery vrijednost iznosi 76,52%, a najveća točnost je na koncentraciji od 300 µg/mL, čija recovery vrijednost iznosi 89,94%. Potrebna su daljnja ispitivanja zašto točnost za sve koncentracije nije veća; primjećeno je da se struja tijekom mjerenja mijenjala i vjerojatno treba češće mijenjati pufere ili promijeniti ekstrakcijski postupak ukoliko nije ekstrahiran sav pirfenidon iz ljekovitog oblika.

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu korištena je metoda micelarne elektrokinetičke kromatografije za validaciju pirfenidona. Ispitani validacijski parametri su: linearnost, preciznost, robustnost i točnost. Kao unutarnji standard korištena je salicilna kiselina. Kao radni pufer koristila se smjesa 20 mM borata pH 9,1 i 70 mM SDS-a.

Linearnost je sposobnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita. Provedena su 3 mjerenja za svaku od 7 različitih koncentracija otopine pirfenidona. Najniža ispitivana koncentracija pirfenidona bila je 10  $\mu\text{g/mL}$ , a najviša 300  $\mu\text{g/mL}$ . Rezultat je pokazao odgovarajuću linearnost za odabrano koncentracijsko područje od 10 do 300  $\mu\text{g/mL}$ . Jednadžba dobivenog pravca glasi:  $y = 0,0185x + 0,023$ , s koeficijentom korelacije 0,999.

Preciznost pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog homogenog uzoraka pri istim propisanim uvjetima. U ovom radu kao način iskazivanja preciznosti odabrana je ponovljivost te je izražena kao relativna standardna devijacija. Provedena su 3 uzastopna ispitivanja za svaku od 3 različite koncentracije otopine pirfenidona: 50, 100 i 200  $\mu\text{g/mL}$ . Najveća relativna standardna devijacija vremena iznosi 0,42% za koncentraciju od 100  $\mu\text{g/mL}$ . Najveća relativna standardna devijacija površine pika iznosi 1,87% za koncentraciju od 50  $\mu\text{g/mL}$ . Može se zaključiti da je ponovljivost predložene analitičke metode zadovoljavajuća.

Robustnost je mjera sposobnosti analitičkog postupka da ostane nepromijenjen pod utjecajem malih, ali namjernih promjena parametara metode. Kao varijabilni faktori u ovom radu uzeti su napon i temperatura. Koncentracija pirfenidona bila je u svim mjerenjima 100  $\mu\text{g/mL}$ , a sva ispitivanja provedena su u triplikatu. Izračunata su odstupanja u odnosu na napon od 25 kV i temperaturu od 25 °C. Utjecaj napona na vrijeme zadržavanja i površinu pikova nije velik; najveće odstupanje iznosi – 4,69% za vrijeme zadržavanja pri naponu od 26 kV. Temperatura ne utječe značajno na vrijeme zadržavanja i površinu pikova; najveće odstupanje iznosi – 2,04% za površinu pika pri temperaturi od 26 °C.

Ispitivanje točnosti nije bilo u potpunosti zadovoljavajuće; vrijednosti analitičkog prinosa za 3 ispitivane koncentracije su nešto niže od 90%. Koncentracije otopine pirfenidona uzete za analizu prilikom ispitivanja točnosti jesu 90, 130 i 300  $\mu\text{g/mL}$  i za svaku od koncentracija provedena su 3 uzastopna mjerenja. Točnost se iskazuje kao analitički prinos



(engl., *recovery*). Na koncentraciji 90  $\mu\text{g/mL}$  točnost je najmanja i *recovery* iznosi 76,52%, a na koncentraciji 300  $\mu\text{g/mL}$  točnost je najveća i *recovery* iznosi 89,94%. Potrebna su daljnja ispitivanja zašto točnost za sve koncentracije nije veća; primjećeno je da se struja tijekom mjerenja mijenjala i vjerojatno treba češće mijenjati pufere ili promijeniti ekstrakcijski postupak ukoliko nije ekstrahirano sav pirfenidon iz ljekovitog oblika.

## 6. LITERATURA

Clinical pharmacology and biopharmaceutics review(s), 2014., [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2014/022535Orig1s000ClinPharmR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/022535Orig1s000ClinPharmR.pdf), pristupljeno 24.03.2020.

Discover the capillary electrophoresis theory, 2019., <http://wynsep.com/capillary-electrophoresis-theory/?lang=en>, pristupljeno 27.03.2020.

Damić M, Nigović B., Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farmaceutski glasnik*, 2010, 4, str. 196.

Esbriet, 2017., [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/208780s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208780s000lbl.pdf), pristupljeno 24.03.2020.

Esbriet, 2017., [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/esbriet-epar-summary-public\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/esbriet-epar-summary-public_hr.pdf), pristupljeno 23.03.2020.

Hancu G, Simon B, Rusu A, Mircia E, Gyéresi A. Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. *Adv Pharm Bull.* 2013, 3, 1–8.

Hewitson TD, Kelynack KJ, Tait MG, Martić M, Jones CL, Margolin SB, Becker GJ. Pirfenidone reduces in vitro rat renal fibroblast activation and mitogenesis. *J Nephrol.* 2001, 14, 453-460.

Huang NY, Ding L, Wang J, Zhang QY, Liu X, Lin HD, Hua WY. Pharmacokinetics, safety and tolerability of pirfenidone and its major metabolite after single and multiple oral doses in healthy Chinese subjects under fed conditions. *Drug Research.* 2013, 63, 388–395.

Idiopathic pulmonary fibrosis causes, 2014., <https://www.lung.ca/lung-health/lung-disease/idiopathic-pulmonary-fibrosis/causes>, pristupljeno 21.03.2020.

Idiopathic pulmonary fibrosis symptoms, 2014., <https://www.lung.ca/lung-health/lung-disease/idiopathic-pulmonary-fibrosis/symptoms>, pristupljeno 21.03.2020.

Idiopathic pulmonary fibrosis treatment, 2015., <https://www.lung.ca/lung-health/lung-disease/idiopathic-pulmonary-fibrosis/treatment>, pristupljeno 21.03.2020.

Idiopatska plućna fibroza, 2017., <http://jedra.toraks.hr/idiopatska-plucna-fibroza/>, pristupljeno 21.03.2020.

Iyer SN, Hyde DM, Giri SN. Anti-inflammatory effect of pirfenidone in the bleomycin-hamster model of lung inflammation. *Inflammation*. 2000, 24, 477-491.

Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on procollagen gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999b, 289, 211-8.

Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999a, 291, 367-73.

Luterotti S. Validacija bioanalitičkih metoda. U: Odabrane teme iz bioanalitike. Luterotti S, Bičanić D, urednici, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2013, str. 1-35.

Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, Kakugawa T, Yoshioka S, Soda H, Oku H, Urata Y, Kondo T, Kubota H, Nagata K, Kohno S. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF-beta1-stimulated human lung fibroblasts. *Life Sci*. 2008, 82, 210-217.

Nathan SD, Brown WA, Christopher S King CS., Guide to Clinical Management of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. U: Clinical Presentation and Diagnosis. Nathan SD, Brown WA, Christopher S King CS, urednici, Virginia, Adis, 2016, str. 15-30.

Newborn screening, 2013., <https://www.eurordis.org/sites/default/files/publications/fact-sheet-new-born-screening.pdf>, pristupljeno 20.03.2020.

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova – praktikum. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zavod za analitiku i kontrolu lijekova, 2014, str. 136.

O bolestima, 2019., <http://www.rijetke-bolesti.hr/o-bolestima/>, pristupljeno 20.03.2020.

Orphan drug, 2014., <https://www.eurordis.org/content/what-orphan-drug>, pristupljeno 20.03.2020.

Pirfenidone, 2020., <https://www.drugbank.ca/drugs/DB04951>, pristupljeno 10.04.2020.

Pirfenidone, 2020., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/40632>, pristupljeno 23.03.2020.

Rare disease, 2019., <https://www.eurordis.org/content/what-rare-disease>, pristupljeno 20.03.2020.

Sažetak opisa svojstava lijeka, 2015., [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/esbriet-epar-product-information\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/esbriet-epar-product-information_hr.pdf), pristupljeno 24.03.2020.

Song X, Yu W, Guo F. Pirfenidone suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis and periostin expression in rats. Spandidos Publications. 2018, 1800-1806

Togami K, Kanehira Y, Tada H. Possible Involvement of Pirfenidone Metabolites in the Antifibrotic Action of a Therapy for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Biol Pharm Bull.* 2013, 36, 1525-1527.

Types of Capillary Electrophoresis, 2019., <https://www.news-medical.net/life-sciences/Types-of-Capillary-Electrophoresis.aspx>, pristupljeno 06.04.2020

Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2006., [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf), pristupljeno 26.03.2020.

Watson DG. Pharmaceutical Analysis. U: High-performance capillary electrophoresis. Watson DG, urednici, Glasgow, Churchill Livingstone, 2012, str. 376-396.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Idiopatska plućna fibroza rijetka je i smrtonosna bolest. Terapijskih opcija u liječenju idiopatske plućne fibroze je malo, a jedna od njih je liječenje pirfenidonom. Pirfenidon djeluje antifibrotički, protuupalno i antioksidativno, a u Europi je registriran u obliku Esbriet kapsule koja sadrži 267 mg pirfenidona.

Cilj ovog diplomskog rada je validirati metodu, odnosno ispitati prikladnost primjene novorazvijene metode za određivanje pirfenidona u Esbriet kapsuli tehnikom kapilarne elektroforeze. Validacijski parametri ispitani u ovom radu jesu: linearnost, preciznost, robustnost i točnost. Kao unutarnji standard koristila se salicilna kiselina.

Analiza je provedena u kapilari od izvučenog kvarca ukupne duljine 36 cm, udaljenosti do detektora 27cm, unutrašnjeg promjera 50  $\mu\text{m}$ , pri temperaturi od 25  $^{\circ}\text{C}$  i naponu od 25 kV. Kao radni pufer koristila se smjesa 20 mM borata pH 9,1 i 70 mM SDS-a. Dobivena linearnost je zadovoljavajuća za koncentracijski raspon od 10 do 300  $\mu\text{g/mL}$ , pri čemu jednadžba dobivenog regresijskog pravca glasi  $y = 0,0185x + 0,023$ , s koeficijentom korelacije  $R = 0,999$ . Ponovljivost predložene analitičke metode je također zadovoljavajuća, pri čemu su sve RSD vrijednosti bile manje od 2%. Za ispitivanje robustnosti provedena su ispitivanja na različitoj temperaturi i naponu. Utjecaj napona na vrijeme zadržavanja i površinu pikova nije velik, a temperatura ne utječe značajno na vrijeme zadržavanja i površinu pikova. Ispitivanje točnosti nije bilo u potpunosti zadovoljavajuće; vrijednosti analitičkog prinosa za 3 ispitivane koncentracije su nešto niže od 90%. Primjećeno je da se struja tijekom mjerenja mijenjala i vjerojatno treba češće mijenjati pufere ili promijeniti ekstrakcijski postupak ukoliko nije ekstrahirano sav pirfenidon iz ljekovitog oblika.

Idiopathic pulmonary fibrosis is a rare and deadly disease. There are not many therapeutic options in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, and one of the options is treatment with pirfenidone. Pirfenidone has antifibrotic, anti-inflammatory and antioxidant effect and it is registered in Europe in the form of an Esbriet capsule which contains 267 mg of pirfenidone.

The aim of this thesis is to validate and examine the suitability of the application of the newly developed method for the determination of pirfenidone in Esbriet capsule with capillary electrophoresis technique. Validation parameters examined in this thesis are: linearity, precision, robustness and accuracy. Salicylic acid was used as an internal standard.

The analysis was performed in an fused silica capillary with a total length of 36 cm, a detector length of 27 cm, an inner diameter of 50  $\mu\text{m}$ , at a temperature of 25  $^{\circ}\text{C}$  and a voltage of 25 kV. A mixture of 20 mM borate pH 9,1 and 70 mM SDS was used as a running buffer. The obtained linearity is satisfactory for the concentration range from 10 to 300  $\mu\text{g/mL}$ , with belonging equation  $y = 0,0185x + 0,023$ , with a correlation coefficient  $R=0,999$ . The repeatability of the analytical method is also satisfactory, with all RSD values being less than 2%. To test robustness, tests were performed at different temperatures and voltages. The influence of voltage on retention time and peak area is not large, and temperature does not have a significant affect on retention time and peak area. The accuracy test were less satisfactory; recovery values for the 3 tested concentrations are little under 90%. It has been observed that the current changed during the measurement and it is likely that the buffer should be changed more frequently or that the extraction procedure should be changed if not all pirfenidone has been extracted from the capsule.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### Validacija kapilarnoelektroforetske metode za određivanje pirfenidona u ljekovitom obliku

Lana Bratelj

#### SAŽETAK

Idiopatska plućna fibroza rijetka je i smrtonosna bolest. Terapijskih opcija u liječenju idiopatske plućne fibroze je malo, a jedna od njih je liječenje pirfenidonom. Pirfenidon djeluje antifibrotički, protuupalno i antioksidativno, a u Europi je registriran u obliku Esbriet kapsule koja sadrži 267 mg pirfenidona.

Cilj ovog diplomskog rada je validirati metodu, odnosno ispitati prikladnost primjene novorazvijene metode za određivanje pirfenidona u Esbriet kapsuli tehnikom kapilarne elektroforeze. Validacijski parametri ispitani u ovom radu jesu: linearnost, preciznost, robustnost i točnost. Kao unutarnji standard koristila se salicilna kiselina.

Analiza je provedena u kapilari od izvučenog kvarca ukupne duljine 36 cm, udaljenosti do detektora 27cm, unutrašnjeg promjera 50  $\mu\text{m}$ , pri temperaturi od 25 °C i naponu od 25 kV. Kao radni pufer koristila se smjesa 20 mM borata pH 9,1 i 70 mM SDS-a. Dobivena linearnost je zadovoljavajuća za koncentracijski raspon od 10 do 300  $\mu\text{g/mL}$ , pri čemu jednadžba dobivenog regresijskog pravca glasi  $y = 0,0185x + 0,023$ , s koeficijentom korelacije  $R = 0,999$ . Ponovljivost predložene analitičke metode je također zadovoljavajuća, pri čemu su sve RSD vrijednosti bile manje od 2%. Za ispitivanje robustnosti provedena su ispitivanja na različitoj temperaturi i naponu. Utjecaj napona na vrijeme zadržavanja i površinu pikova nije velik, a temperatura ne utječe značajno na vrijeme zadržavanja i površinu pikova. Ispitivanje točnosti nije bilo u potpunosti zadovoljavajuće; recovery vrijednosti za 3 ispitivane koncentracije su nešto niže od 90%. Primjećeno je da se struja tijekom mjerenja mijenjala i vjerojatno treba češće mijenjati pufere ili promijeniti ekstrakcijski postupak ukoliko nije ekstrahirano sav pirfenidon iz ljekovitog oblika.

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

Rad sadrži: 34 stranice, 10 grafičkih prikaza, 11 tablica i 31 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: pirfenidon, kapilarna elektroforeza, validacija, idiopatska plućna fibroza

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. Ivana Perković**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**dr. sc. Kristina Pavić**, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: srpanj 2020.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### Validation of capillary electrophoretic method for determination of pirfenidone in dosage form Lana Bratelj

#### SUMMARY

Idiopathic pulmonary fibrosis is a rare and deadly disease. There are not many therapeutic options in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, and one of the options is treatment with pirfenidone. Pirfenidone has antifibrotic, anti-inflammatory and antioxidant effect and it is registered in Europe in the form of an Esbriet capsule which contains 267 mg of pirfenidone.

The aim of this thesis is to validate and examine the suitability of the application of the newly developed method for the determination of pirfenidone in Esbriet capsule with capillary electrophoresis technique. Validation parameters examined in this thesis are: linearity, precision, robustness and accuracy. Salicylic acid was used as an internal standard.

The analysis was performed in an fused silica capillary with a total length of 36 cm, a detector length of 27 cm, an inner diameter of 50  $\mu\text{m}$ , at a temperature of 25  $^{\circ}\text{C}$  and a voltage of 25 kV. A mixture of 20 mM borate pH 9,1 and 70 mM SDS was used as a running buffer. The obtained linearity is satisfactory for the concentration range from 10 to 300  $\mu\text{g/mL}$ , with belonging equation  $y = 0,0185x + 0,023$ , with a correlation coefficient  $R=0,999$ . The repeatability of the analytical method is also satisfactory, with all RSD values being less than 2%. To test robustness, tests were performed at different temperatures and voltages. The influence of voltage on retention time and peak area is not large, and temperature does not have a significant effect on retention time and peak area. The accuracy test were less satisfactory; recovery values for the 3 tested concentrations are little under than 90%. It has been observed that the current changed during the measurement and it is likely that the buffer should be changed more frequently or that the extraction procedure should be changed if not all pirfenidone has been extracted from the capsule.

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

Thesis includes: 34 pages, 10 figures, 11 tables and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pirfenidone, capillary electroforesis, bioanalytics, validation, idiopathic pulmonary fibrosis

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  
**Ivana Perković, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Kristina Pavić, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2020.