

# Validacija LC-MS/MS bioanalitičke metode za analizu ribocikliba i anastrozola uz primjenu ekstrakcije na čvrstoj fazi

---

Moškun, Mihovil

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:163:640636>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

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



**Mihovil Moškun**

**Validacija LC-MS/MS bioanalitičke metode za  
analizu ribocikliba i anastrozola uz primjenu  
ekstrakcije na čvrstoj fazi**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

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

Rad je financiran sredstvima projekata UIP-2019-04-8461 i DOK-2021-02-4995 Hrvatske zaklade za znanost te sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj projektom FarmInova (EK-EFRR-KK.01.1.1.02.0021).

*Hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Mirandi Sertić, na uloženom trudu, pruženoj podršci, iskazanoj dobroti te razumijevanju i strpljenju koje je imala za moj proces pisanja diplomskog rada. Iznimno sam zahvalan i mag. pharm. Lu Turković na njenom izdvojenom vremenu, angažmanu i prijeko potrebnoj pomoći.*

*Najveća zahvala ide mojim roditeljima i braći koji su mi glavni oslonac i motivacija u životu. Oni su me naučili što je ljubav i kako je širiti svijetom!*

*Hvala i svim mojim prijateljima bez kojih širenje ljubavi svijetom nebi bilo tako zabavno i ispunjavajuće. Uvijek tu jedni za druge! U izradi diplomskog rada (kao i s još mnogim stvarima u životu) pomogao mi je moj student-mentor, danas magistar farmacije Denis Pleše, posebna zahvala ide i njemu.*

## KRATICE

AI – inhibitori aromataze (eng. *aromatase inhibitors*)

ALT – alanin transaminaza

ANA – anastrozol

AST – aspartat transaminaza

AUC – površina ispod krivulje koncentracije i vremena (eng. *area under the curve*)

CDK – ciklin ovisne kinaze (eng. *cyclin-dependent kinases*)

CYP – citokrom P450 (eng. *cytochrome P450*)

EDTA – Etilendiamintetraoctena kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ER – estrogenski receptor

HER-2 – humani epidermalni faktor rasta, receptor 2 (eng. *human epidermal growth factor receptor 2*)

HR – hormonski receptor

ICH – Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva farmaceutskih pripravaka za ljudsku upotrebu (eng. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements of Pharmaceuticals for Human Use*)

IS – unutarnji standard (eng. *internal standard*)

LC – tekućinska kromatografija (eng. *liquid chromatography*)

LLOQ – najniža granica kvantifikacije (eng. *lowest limit of quantification*)

LOD – granica detekcije (eng. *limit of detection*)

LOQ – granica kvantifikacije (eng. *limit of quantification*)

ME – matriks efekt

MS – masena spektrometrija

MS/MS – tandem masena spektrometrija

NST – bez specifičnog tipa (eng. *no special type*)

QC –kontrola kvalitete (eng. *quality control*)

QTcF – korigirani QT interval (eng. *corrected QT interval*)

RBP – retinoblastomski protein

RIB – ribociklib

RSD – relativna standardna devijacija  
SERM – selektivni modulatori estrogenskih receptora  
(eng. *selective estrogen receptor modulators*)

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *solid-phase extraction*)

TNM – Primarni tumor, limfni čvorovi, metastaze (eng. *tumor, lymph nodes, metastasis*)

TOR – meta rapamicina (eng. *target of rapamycin*)

ULOQ – najviša granica kvantifikacije (eng. *upper limit of quantification*)

## Sadržaj

<b>Mihovil Moškun</b> .....	1
<b>DIPLOMSKI RAD</b> .....	1
1. <b>UVOD</b> .....	1
1.1. <b>RAK DOJKE</b> .....	1
1.1.1. Karakterizacija .....	1
1.1.2. Liječenje.....	2
1.2. <b>TERAPIJSKE OPCIJE: RIBOCIKLIB I ANASTROZOL</b> .....	3
1.2.1. Ribociklib.....	3
1.2.2. Anastrozol .....	6
1.3. <b>BIOLOŠKI UZORCI</b> .....	8
1.3.1. Vrste bioloških uzoraka .....	8
1.3.2. Karakteristike bioloških uzoraka .....	9
1.3.3. Razvoj metode analize biološkog uzorka.....	10
1.4. <b>USPOREDBA VALIDACIJSKIH PARAMETARA ZA ANALITIČKE I KROMATOGRAFSKE BIOANALITIČKE METODE</b> .....	11
1.4.1. Linearnost, raspon, kalibracijska krivulja i kalibracijski standardi .....	12
1.4.2. Točnost .....	12
1.4.3. Preciznost .....	13
1.4.4. Granica detekcije i kvantifikacije .....	13
1.4.5. Parametri specifični za bioanalitičke metode .....	14
1.4.6. Ostali parametri .....	15
2. <b>OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	16
3. <b>MATERIJALI I METODE</b> .....	17
3.1. <b>MATERIJALI</b> .....	17
3.1.1. Kemikalije.....	17
3.1.2. Radni instrumenti .....	17
3.1.3. Pribor .....	18
3.1.4. Programi.....	18
3.2. <b>METODE</b> .....	19
3.2.1. Priprema otopina standarda.....	19
3.2.2. Dobivanje plazme iz pune krvi.....	20
3.2.3. Uklanjanje matriksa iz plazme .....	20
3.2.4. Kromatografski uvjeti .....	20
3.2.5. Uvjeti za masenu spektrometriju .....	22
4. <b>REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	23

4.1.	VALIDACIJSKI PARAMETRI .....	23
4.1.1.	Linearnost .....	23
4.1.2.	Preciznost .....	24
4.1.3.	Točnost .....	25
4.1.4.	Injekcijska reproducibilnost .....	25
4.1.5.	<i>Carry-over</i> .....	26
4.1.6.	Efekt matriksa .....	26
4.2.	UZORAK PACIJENTA .....	28
5.	ZAKLJUČCI .....	29
6.	LITERATURA .....	31
7.	SAŽETAK.....	38

|

## 1. UVOD

### 1.1. RAK DOJKE

Do pojave tumora, odnosno karcinogeneze, može doći u svakoj stanici, tkivu i organu. Karakterizirana je sa šest glavnih obilježja koja uzrokuju različite patološke promjene: izbjegavanje apoptoze, neograničenu sposobnost dijeljenja, pojačanu angiogenezu, otpornost na signale za zaustavljanje rasta, indukciju vlastitih signala rasta te sposobnost za metastaziranje (Hanahan i Weinberg, 2000).

Rak dojke najčešći je zloćudni tumor kod žena u svijetu. Pacijentice oboljele od raka dojke čine čak 36% onkoloških pacijenata (Nardin i sur., 2020). Incidencija ovog zloćudnog tumora raste u svim regijama svijeta, ali najviša incidencija javlja se u industrijaliziranim zemljama. Broj smrtnih slučajeva povezanih s rakom dojke također raste svake godine te je prema brojkama peti najčešći uzrok smrti povezanih s rakom. Iako značajan broj karcinoma ne rezultira smrtnim ishodom, oni značajno smanjuju kvalitetu života te povećavaju zdravstvene i privatne troškove (Sung i sur., 2021; <https://gco.iarc.fr/en>). Ovaj je trend uglavnom posljedica takozvanog zapadnjačkog načina života, asociranog s nezdravom prehranom, pušenjem, prekomjernim stresom i nedovoljnom tjelesnom aktivnošću. Mamografija je najčešća metoda otkrivanja tumora dojke te se njena važnost posebno ističe kod žena s genetskim predispozicijama za razvoj bolesti u dobi od 50 do 69 godina. Za potvrdu dijagnoze provodi se još i pregled ultrazvukom te radi preciznije tipizacije, biopsija tkiva (Bellanger i sur., 2018; Nardin i sur., 2020).

#### 1.1.1. Karakterizacija

Za precizno određivanje svojstva i načina liječenja tumora dojke potrebno je znati: histološki tip tumora, njegov stupanj zloćudnosti, stupanj napredovanja prema klasifikaciji primarnog tumora, stanja limfnih čvorova te metastazama u udaljenim tkivima (engl. *tumor, lymph nodes, metastasis*, TNM), izraženost hormonskih receptora (HR) za estrogen i progesteron, izraženost receptora 2 humanog epidermalnog faktora rasta (eng. *human epidermal growth factor receptor 2, HER-2*) te indeks stanične proliferacije Ki67 (Makki, 2015). Najčešći invazivni oblik je rak bez posebnog tipa (eng. *no special type*, NST) prisutan u 70-80% slučajeva). Karakterizira ga velika raznolikost u pogledu morfologije stanica te prisutnosti tubularnih ili žljezdanih struktura. Drugi najčešći rak dojke je lobularni karcinom



(10%). Ovaj oblik raka karakterizira mala raznolikost stanica raka, vrlo česta ekspresija hormonskih receptora te iznimno rijetka prekomjerna ekspresija HER-2 receptora (Nardin i sur., 2020).

### 1.1.2. Liječenje

U liječenju raka dojke, pored kirurške intervencije, koristi se adjuvantna terapija koja se sastoji od hormonske terapije, imunoterapije, kemoterapije i radioterapije ili kombinacije neke od ovih metoda (Łukasiewicz i sur., 2021; Smolarz, i sur., 2022).

Hormonska terapija koristi se kod raka dojke s izraženim estrogenskim receptorima, bez obzira na dob i menopauzalno stanje. Dodatni benefit korištenja hormonske terapije smanjenje je lučenja hormona te ublažavanje tegoba i simptoma povezanih s rakom (Smolarz, i sur., 2022). Estrogenski receptor (ER) ključan je dijagnostički faktor jer se otprilike 70–75% invazivnih karcinoma dojke karakterizira značajno pojačanom ekspresijom ER-a (Colomer i sur., 2018; Li i sur., 2020). Rakovi dojke koji su pozitivni na hormonske receptore ili oni čija proliferacija ovisi o hormonima poput estrogena i progesterona liječe se hormonskom terapijom. Najčešće korišteni lijekovi u ovoj skupini su selektivni modulatori estrogenskih receptora (eng. *selective estrogen receptor modulators*, SERM), na primjer tamoksifen, te inhibitori aromataze (eng. *aromatase inhibitors*, AI) letrozol, anastrozol i eksemestan. AI smanjuju endogenu sintezu estrogena inhibicijom ključnog enzima u njihovoj sintezi, a SERM lijekovi funkcioniraju tako da blokiraju učinke estrogena na stanice raka dojke vežući se na njihova mjesta na receptorima (Goldhirsch i sur., 2009; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2011; Regan i sur., 2011).

Za uspješno liječenje također je bitno procijeniti ekspresiju HER-2 receptora ili amplifikaciju HER-2 gena u stanicama tumora. Uloga HER-2 receptora je pojačati prijenos signala za rast. Prisutnost prekomjerne ekspresije HER-2 receptora ili amplifikacije njegovog gena nepovoljan je prognostički faktor, a uvođenje lijekova koji blokiraju HER-2 receptor, kao što su trastuzumab, pertuzumab i lapatinib, značajno je poboljšalo prognozu pacijenata (Moja i sur., 2012)

U slučaju luminalnog, HER-2-negativnog raka dojke, žene u premenopauzi češće primaju everolimus - inhibitor kinaza meta rapamicina (eng. *target of rapamycin*, TOR) u kombinaciji s eksemestanom (ireverzibiln AI), dok je za žene u postmenopauzi terapija izbora

inhibitor ciklin ovisnih kinaza (eng. *cyclin-dependent kinases*, CDK) 4–6, palbociklib ili ribociklib kombiniran s hormonskom terapijom (Steger i sur., 2016; Riccardi i sur., 2018; Shah i sur., 2018). Ovi su se lijekovi, zajedno s abemaciclibom i everolimusom, pokazali vrlo učinkovitim u liječenju HER-2-negativnog i ER-pozitivnog raka dojke (Royce i Osman, 2015; Kwapisz, 2017). Izbor kemoterapijskog režima individualizira se na temelju faktora kao što su rizik od ponovne pojave bolesti, korist od kemoterapije te faktora specifičnih za pacijenta poput dobi, komorbiditeta i tolerancije na rizik. Za HR-pozitivan uznapredovali rak dojke, endokrina terapija je poželjna početna opcija sistemskog liječenja. Ako je kemoterapija indicirana zbog visceralne ugroženosti, otpornosti na endokrinu terapiju i/ili HR-negativne bolesti, preferira se uporaba kemoterapije s jednim lijekom u sekventnom režimu umjesto kombinirane kemoterapije. Ovaj režim može se nastaviti dok ne dođe do napredovanja bolesti ili neprihvatljive toksičnosti. Optimalni slijed režima preferira uključivanje lijekova s niskom toksičnošću u ranim fazama liječenja prije upotrebe agresivnijih (Hassan, 2010; Sparano i sur., 2018; Burstein i sur., 2019; Claessens i sur., 2020).

Radioterapija se koristi kod svih pacijenata s očuvanom mliječnom žlijezdom kako bi se smanjio rizik od ponovnog pojavljivanja bolesti. Zračenju se izlaže područje prsa i nodalna polja. Može se kombinirati s kemoterapijom, primjerice u slučaju amputacije dojki s indikacijama za dopunsku radioterapiju, prvo se primjenjuje adjuvantna kemoterapija.

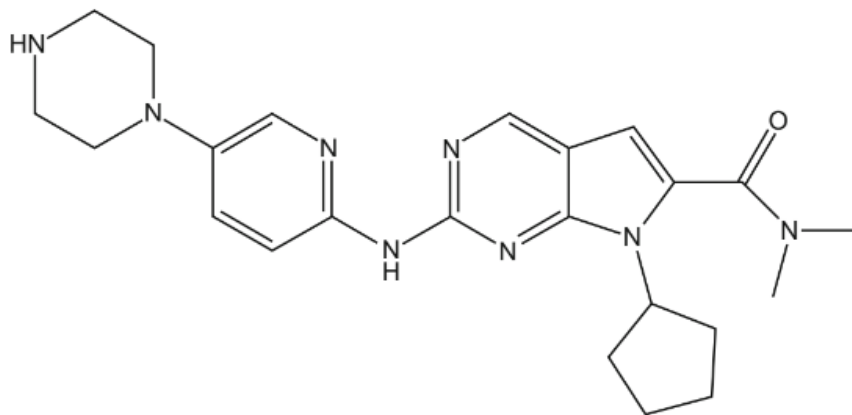
Osnovne vrste kirurških zahvata koje se koriste kod liječenja raka dojke su: ekscizija tumora, mastektomija, ekscizija sentinel limfnog čvora i ekscizija limfnog sustava pazuha. Amputacija dojke izvodi se u težim slučajevima kada nije moguće očuvanje tkiva ili ako se pacijentica sama odluči za tu opciju (Łukasiewicz i sur., 2021; Smolarz i sur., 2022). U posljednje se vrijeme sve više prakticiraju zahvati kod kojih dojka ostaje djelomično sačuvana. Oni su mogući ako je rak otkriven u ranoj fazi te su jednako učinkoviti kao i mastektomija. Glavni cilj kirurškog liječenja raka dojke je onkološka potpunost, ali svakako ne smijemo zanemariti ni estetski učinak uklanjanja dojke na psihološko stanje pacijenta (Burstein i sur., 2019).

## 1.2. TERAPIJSKE OPCIJE: RIBOCIKLIB I ANASTROZOL

### 1.2.1. Ribociklib

Ribociklib je mala molekula (434,5 g/mol) čija je struktura prikazana na slici 1. Koristi se za liječenje odraslih pacijenata s HR-pozitivnim i HER-2-negativnim uznapredovalim ili

metastatskim rakom dojke u kombinaciji s inhibitorima aromataze ili fulvestrantom. U organizmu djeluje kao inhibitor CDK 4 i 6 (<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/ribociclib-kisqali>). CDK4/6 spadaju u skupinu enzima s kinaznom aktivnošću, a njihova zadaća u organizmu je kataliziranje promjena koje kontroliraju stanični ciklus. Aktiviraju se vezanjem za regulatorni protein ciklin D (kodiran CCND1 genom), a kompleks ciklin D-CDK4/6 igra ključnu ulogu u regulaciji progresije staničnog ciklusa iz faze G1 u S fazu tako što fosforilira retinoblastomski protein (RBP) (Caldon i sur., 2006). Pretjerana ekspresija CDK4/6 te amplifikacija CCND1 gena često se primjećuju kod raka dojke pozitivnog na hormonske receptore (HR) (The Cancer Genome Atlas Network, 2012.). Ove su promjene također povezane s rezistencijom karcinoma na endokrinu terapiju (Zardavas i sur., 2013).



**Slika 1.** Struktura ribocikliba

Ribociklib je izrazito selektivan za CDK4/6 u odnosu na druge CDK ili druge kinaze. U stanicama raka dojke ribociklib inhibira fosforilaciju RBP te u nešto većim koncentracijama i proliferaciju stanica. Na ovaj se način sprečavaju rast i mutacije karcinoma koje mogu dovesti do rezistencije (Chen i sur., 2016). U ksenografskim modelima raka dojke dobivenim od pacijenata i pozitivnim na ER kombinacija ribocikliba i antiestrogenskog lijeka (letrozola ili fulvestranta) inhibira rast tumora u većoj mjeri nego bilo koji lijek zasebno (Wander i sur., 2022). Antitumorski učinci ribocikliba također su pokazani *in vitro* u stanicama leukemije (Tao i sur., 2017; Bortolozzi i sur., 2018).

Nakon oralne primjene ribocikliba kod pacijenata s uznapredovalim solidnim tumorima ili limfomima, srednje  $T_{max}$  (vrijeme do dostizanja maksimalne koncentracije lijeka

u plazmi [ $C_{max}$ ]) je između 1 i 5 sati. Nakon jednokratnog ili višestrukog doziranja, maksimalna koncentracija ribocikliba ( $C_{max}$ ) i površina ispod krivulje koncentracije i vremena (eng. *area under the curve*, AUC) blago se neproporcionalno povećavaju s dozom u rasponu doza od 50 do 1200 mg. Nakon uzastopne primjene od 600 mg jednom dnevno, ravnotežne koncentracije ribocikliba postignute su otprilike osmog dana (Infante i sur., 2016). Na izloženost ribociklibu nije utjecala istovremena primjena s letrozolom kod pacijenata s ranim stadijem raka dojke (Curigliano i sur., 2016). Hrana nije imala značajan učinak na  $C_{max}$  ili AUC ribocikliba, stoga se ribociklib može uzimati s hranom ili bez nje.

In vitro, vezanje ribocikliba za ljudske proteine plazme iznosi otprilike 70% i nije ovisno o koncentraciji. In vivo ribociklib je jednako raspodijeljen između plazme i crvenih krvnih stanica. Ribociklib se kod ljudi metabolizira preko citokroma P450 (eng. *Cytochrome P450*, CYP) što je dokazano in vitro i in vivo studijama. Primarno se metabolizira oksidacijom, a potom reakcijama konjugacije faze II koje uključuju N-acetilaciju, sulfaciju, konjugaciju s cisteinom, glikozilaciju i glukuronidaciju. Glavni metabolit lijeka u plazmi je nemetabolizirani ribociklib (44%). Matični lijek uglavnom je odgovoran za kliničku aktivnost ribocikliba, sa zanemarivim doprinosom cirkulirajućih metabolita. Neizmijenjeni lijek izlučuje se 17% u fecesu i 12% urinu, što ukazuje na to da se ribociklib značajno metabolizira. Srednje efektivno vrijeme poluživota ribocikliba je 32 h. Kod srednjeg do teškog oštećenja jetre povećava se izloženost ribociklibu dok kod oštećenja bubrega nema značajne promjene u farmakokinetici lijeka.

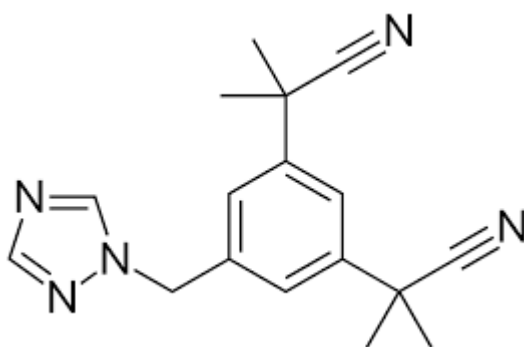
Budući da se ribociklib primarno metabolizira putem CYP3A4, istodobna uporaba ribocikliba s inhibitorima ili induktorima CYP3A4 trebala bi se izbjegavati jer će vjerojatno povećati odnosno smanjiti izloženost ribociklibu. Koadministracija ribocikliba s midazolamom (supstrat CYP3A4 s uskim terapijskim indeksom) povećava izloženost midazolamu; stoga bi se doza midazolama trebala dodatno nadzirati i smanjiti kada se primjenjuje istodobno s ribociklibom. Nema klinički relevantne interakcije lijekova između ribocikliba i lijekova kao što su letrozol, anastrozol ili eksemestan koja bi onemogućila koadministraciju ovih lijekova kod pacijenata s rakom dojke (<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/ribociclib-kisqali>).

Kod primjene ribocikliba u terapiji moguće su nuspojave koje ozbiljno narušavaju kvalitetu života pacijenta poput neutropenije, leukopenije, hipertenzije i limfopenije. Hepatotoksičnost ribocikliba izražena je zbog povećanja vrijednosti ALT (alanin

transaminaza) i AST (aspartat transaminaza). Također, jedna od važnijih nuspojava pri korištenju ribocikliba je produljenje korigiranog QT intervala (eng. corrected QT interval, QTcF), a zabilježeni su i značajni porasti QTcF (>60 ms) kod pacijenata koji su primali kombiniranu terapiju s letrozolom (inhibitor aromataze) i ribociklibom. Kako bi se smanjili neželjeni učinci i njihova učestalost, preporučuje se smanjenje doze, uz to svakako je preporuka i izbjegavanje lijekova koji produljuju QT interval te konstantno praćenje koncentracije ribocikliba u plazmi pacijenata (Onesti i Jerusalem, 2021).

### 1.2.2 Anastrozol

AI odobreni su kao prva linija endokrine terapije za žene u postmenopauzi s metastatskim rakom dojke pozitivnim na hormonske receptore. Anastrozol je mala molekula (molekularna masa 293,4 g/mol) čija je struktura, dizajnirana po uzoru na steroidne hormone uz dodatak benzotriazola, prikazana na slici 2. Ovaj lijek se pokazao posebno učinkovitim u liječenju lokalno uznapredovalog i metastaziranog karcinoma. Osim toga, indiciran je i za rano liječenje raka, kemoprevenciju tumora te kod žena u postmenopauzi koje su na terapiji tamoksifenom, posebno ako se lijek koristi tijekom produljenog razdoblja i ako je indiciran za ponovnu pojavu bolesti (Fabian, 2007; Goldhirsch i sur., 2009). Eksemestan, letrozol i anastrozol, predstavnici su treće (i najnovije) generacije AI lijekova koje karakterizira visoka specifičnosti za enzim aromatazu. Zbog toga imaju znatno manje nuspojava u usporedbi s prethodnim generacijama AI. Letrozol i anastrozol nesteroidni su spojevi s reverzibilnim djelovanjem i kompetitivni su AI, za razliku od eksemestana koji je steroidni spoj te stvara kovalentne veze s aromatazom (ireverzibilna inhibicija).



**Slika 2.** Struktura anastrozola

Antitumorsko djelovanje proizlazi iz blokiranja pretvorbe testosterona u estradiol i androstendiona u estron. Mehanizam uključuje vezanje inhibitora za hem skupinu CYP podjedinice enzima, smanjujući biosintezu estrogena u perifernim tkivima tijela pa tako i u dojci. Produljena uporaba anastrozola nema učinka na koncentracije steroidnih hormona kortizola, aldosterona, androstenediona i 16-hidroksiprogesterona zbog visoke selektivnosti za inhibiciju aromataze bez ometanja drugih puteva adrenalne steroidogeneze. Izostanak promjena u razinama luteinizirajućeg i folikulstimulirajućeg hormona pokazuje da anastrozol nema estrogenu, progestacijsku ili androgenu aktivnost te ne utječe na sintezu gonadotropina (Bhatnagar, 2007; Di Nardo i Gilardi, 2013).

Pri oralnoj primjeni na prazan želudac anastrozol se brzo apsorbira, ali nakon obroka njegova apsorpcija je značajno sporija. Kod preporučene doze od 1mg, anastrozol dostiže maksimalne koncentracije u plazmi unutar 2 sata nakon primjene te se nakon sedam dana uzastopne terapije postiže približno 90 do 95% ravnotežne koncentracije u plazmi. Manje od 10% anastrozola izlučuje se u obliku nepromijenjenog lijeka, dok se 60% izlučuje kao metaboliti (Buzdar, 2003; Johnston i Dowsett, 2003).

Anastrozol se metabolizira u jetri, pri čemu su uključene reakcije N-dealkilacije, hidroksilacije i glukuronidacije, što rezultira prosječnim vremenom poluživota u plazmi od 50 sati što omogućuje doziranje jednom dnevno. Tri glavna metabolita anastrozola koja su promatrana u plazmi i urinu pacijenata su: triazol, hidroksi-anastrozol glukuronid i anastrozol glukuronid. Izlučivanje ovih inaktivnih metabolita uglavnom je putem urina (Ingle i sur., 2010; Kamdem i sur., 2010).

Glavne nuspojave upotrebe anastrozola uključuju valunge (35%), asteniju (17%), glavobolju (13%) i edeme (10%). Mučnina je najčešća gastrointestinalna nuspojava (19%), dok se proljev, zatvor, bolovi u trbuhu i anoreksija rjeđe javljaju (8%) (Wilkinson, 2004). Ipak, osim ovih relativno bezopasnih i prolaznih nuspojava, nedavne su studije otkrile prisutnost bolova u mišićima i zglobovima, kao i pojačan gubitak koštane mase, što dovodi do povećane incidencije osteopenije i osteoporoze (Abubakar i sur., 2014; Ingle i sur., 2015).

### 1.3. BIOLOŠKI UZORCI

Biološkim uzorcima smatraju se materijali sakupljeni iz živih organizama ili njihovog okoliša. Izvor mogu biti ljudi, ali i druga živa bića ili njihove izlučevine (Luque-Garcia i Neubert, 2007; Jones i Golding, 2009). Razumijevanje vrsta bioloških uzoraka i njihovih karakteristika omogućuje bolju interpretaciju podataka i primjenu u znanstvenim istraživanjima. Sastav uzoraka ovisi o vrsti, ali zajedničko im je da se u njima može pronaći mnogo različitih komponenti, počevši od stanica i izvanstaničnog matriksa preko proteina sve do najsitnijih sastavnica poput monosaharida. Ovakav sastav uvelike otežava detekciju i kvantifikaciju pojedinih komponenti zbog čega je nužna obrada uzorka te korištenje raznih standardizacija prije samih ispitivanja kako bi minimalizirali potencijalne smetnje i dobili što točnije rezultate (Luque-Garcia i Neubert, 2007; Marchi i sur., 2010).

#### 1.3.1. Vrste bioloških uzoraka

Krvni uzorci jedna su od najčešće korištenih vrsta bioloških uzoraka u kliničkim istraživanjima. Ovisno o sastavu dijele se na punu krv, serum i plazmu. Puna krv uključuje sve komponente i najbližija je krvi koja cirkulira organizmom (ima krvne stanice, faktore zgrušavanja i plazmu). Serum se dobiva na način da se izvađena krv zgruša te se pomoću centrifuge istalože krvne stanice i ugrušak. Tijekom tog procesa, trombociti oslobađaju proteine i metabolite u serum. Tekući dio, odnosno supernatant, se potom odvaja za daljnje procesuiranje. Za dobivanje krvne plazme, u punu krv dodaje se antikoagulans poput etilendiamintetraoctene kiseline (eng. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ili heparina. Time se sprječava zgrušavanje krvi te nakon centrifugiranja u talogu zaostaju krvne stanice, a supernatant je krvna plazma koja sadrži i faktore zgrušavanja (Marchi i sur., 2010).

Tkivni uzorci prikupljaju se invazivnijim tehnikama poput kirurških zahvata ili biopsija. Ovi uzorci pružaju uvid u međustanične interakcije te strukturnu uređenost organa iz kojih su uzeti. Ključni su za razumijevanje mehanizama bolesti te predstavljaju temelj za histološka istraživanja, ciljanu terapiju raka i genetsku analizu (Aydin i sur., 2014).

Neki od bioloških uzoraka koji se prikupljaju manje invazivnim metodama su slina, urin i feces. Svaki od njih ima svoju specifičnu primjenu koja proizlazi iz procesa njihovog formiranja u organizmu. Uzorci urina lako se prikupljaju neinvazivnim tehnikama te se koriste za testiranje metaboličkih produkata i tvari izlučenih iz tijela. Obično se koriste u testiranju

lijekova, procjeni funkcije bubrega i metaboličkim studijama (Echeverry i sur., 2010). Uzorci fecesa važni su u proučavanju gastrointestinalnog trakta jer daju uvid u mikrobiom, probavu i prisutnost gastrointestinalnih poremećaja. Također se koriste u studijama prehrane i za otkrivanje patogena (Sinha i sur., 2016). Uzorci sline koriste se u genetskom testiranju, hormonskim studijama te otkrivanju bolesti, posebno za oralne patogene ili stanja. Prikupljanje sline posebno je korisno za epidemiološke studije zbog svoje jednostavnosti i prihvatljivosti (Gröschl, 2017).

### **1.3.2. Karakteristike bioloških uzoraka**

Većina pogrešaka u laboratorijskoj medicini nastaje u van-analitičkim fazama cjelokupnog procesa testiranja, posebice u predanalitičkoj fazi, tijekom prikupljanja i transporta uzoraka. Hemoliza uzorka najčešći je razlog nesukladnosti analize u kliničkim laboratorijima (40–70%), a slijede nedovoljan ili neodgovarajući volumen prikupljenog uzorka (10–20%), korištenje pogrešnog spremnika (5–15%) te neželjeno zgrušavanje (5–10%). Manje česti razlozi narušene kvalitete uzorka uključuju kontaminaciju infuzijskim tekućinama (fiziološkom otopinom ili glukoznim otopinama), neodgovarajuće uvjete skladištenja uzorka ili ponovljene cikluse zamrzavanja i odmrzavanja. Kako bi se ovo sve izbjeglo u najvećoj mogućoj mjeri, nužno je slijediti pravila dobre laboratorijske prakse te koristiti sterilnu opremu i metode kako ne bi došlo do kontaminacije uzorka (Flores i sur., 2020).

Jedno od ključnih svojstava o kojem trebamo voditi računa pri analizi bioloških uzoraka je stabilnost. Biološki uzorci mogu se razgraditi ili promijeniti tijekom vremena. Čimbenici kao što su temperatura, pH i izloženost enzimima mogu utjecati na njihov integritet. Odgovarajući uvjeti skladištenja (poput zamrzavanja ili specifičnih konzervansa) ključni su za održavanje kvalitete uzorka. U slučaju krvne plazme i seruma uzorci se mogu skladištiti na temperaturama i do  $-20^{\circ}\text{C}$  te time zadržati stabilnost i do 30 dana. Reprezentativnost uzorka nužna je kako bi se rezultati mogli uzeti u obzir za tumačenje značenja. Uzorak koji se testira mora točno odražavati stanje ili populaciju koja se proučava. Na primjer, uzorke tkiva treba uzeti iz relevantnih područja organa. Za uzorke krvi treba uzeti u obzir cirkadijalni ritam te ih sakupiti u odgovarajuće vrijeme kako bi se točno interpretirali fiziološki uvjeti. Volumen uzorka mora biti dostatan za provođenje ispitivanja i po potrebi ponavljanja mjerenja (Chenel i sur., 2005; Lippi i sur., 2019).



### 1.3.3. Razvoj metode analize biološkog uzorka

U krvi se nalazi mnoštvo polarnih analita (kao što su aminokiseline, šećeri i slično), ali i nepolarnih lipida. Zbog ovih karakteristika krv je vrlo zahtjevna tjelesna tekućina za analizu. Jedna od problematičnijih sastavnica su lipidi. Za to je zaslužna njihova sklonost vezanju na analitičku kolonu u tekućinskoj kromatografiji (eng. *liquid chromatography*, LC) čime modificiraju stacionarnu fazu i smanjuju životni vijek kolone, stabilnost vremena zadržavanja te učinkovitost separacije.

Plazma je preferirani i najčešće korišteni tip uzorka krvi za izvođenje analize pomoću LC spregnute sa masenom spektrometrijom (MS) ili tandem masenom spektrometrijom (MS/MS). Plazma čini otprilike 55% ukupne krvi. Za izolaciju plazme u punu krv dodaje se antikoagulans poput EDTA, citrata, heparina ili nekog drugog zbog čega se ne aktivira kaskada zgrušavanja fibrinogena. To osigurava zadržavanje faktora zgrušavanja u uzorku. Na taj način se zadržala sličnost sa plazmom u organizmu, ali i ovdje može biti potencijalnih problema pri analizi. Visoka koncentracija antikoagulansa ili aditiva (polietilen glikol) iz epruveta za krv može dati ometajuće signale prilikom analize.

Plazma i serum sadrže značajne količine proteina, stoga je potrebna priprema uzorka kako bi se izbjeglo začepljenje analitičkog sustava. Tehnike pripreme uzorka koje se najčešće koriste uključuju taloženje proteina i ekstrakciju na čvrstoj fazi (eng. *solid-phase extraction*, SPE) (Michopoulos i sur., 2009; Zelena i sur., 2009; Gika i Theodoridis, 2011). Ovisno o svojstvima korištenog otapala i omjeru otapalo/uzorak mogu se pojaviti potencijalni problemi, kao što su gubici analita zbog slabe topljivosti u otapalu za ekstrakciju, efekti zasićenja otapalom, ko-precipitacija analita s proteinima te loša kromatografska razlučivost zbog ko-elucije s endogenim spojevima poput fosfolipida (Cajka i Fiehn, 2016).

Uklanjanje proteina taloženjem organskim otapalima metoda je koja se najčešće koristi u konvencionalnim bioanalizama. Uzorak za analizu priprema se taloženjem proteina hladnim organskim otapalom kao što su metanol ili acetonitril koji se dodaju u višestruko većim volumenima. Kad se proteini istalože, uklanjaju se centrifugiranjem, a dobiveni supernatant se koristi za daljnju analizu (Bruce i sur., 2009; Gika i Theodoridis, 2011).

Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE) je najčešće korištena tehnika pripreme uzoraka u ciljanoj analizi kojom se selektivno ekstrahira analit iz matriksa. Ovisno o izboru sorbenta za SPE, određene skupine molekula bit će zadržane sorbentom, dok će druge skupine biti isprane pri punjenju uzorka na kolonu. Elucija određenim otapalom neće uvijek kvantitativno eluirati

sve metabolite jer neki mogu biti ireverzibilno vezani. Važna prednost SPE metode je mogućnost automatizacije što znatno smanjuje ljudski rad i minimalizira mogućnost pogrešaka (Michopoulos i sur., 2009; Dettmer i sur., 2010).

Kada se za identifikaciju spojeva koristi masena spektrometrija, postoje određena ograničenja zbog efekata matriksa (ME). Ova su ograničenja posebno izražena u složenim biološkim uzorcima jer je veća šansa da traženi analit ulazi u interakcije sa sastavnicama uzorka zbog čega može doći do pojačavanja ili supresije signala što utječe na kvantitativne rezultate analize. Ti efekti obično su uzrokovani endogenim (npr. metabolitima ciljanog analita, proteinima ili lipidima) ili egzogenim (sve tvari unesene tijekom obrade i analize uzorka) spojevima. Ovisno o njihovim kemijskim svojstvima, može biti potrebno ukloniti sve te interferente iz uzorka prije injektiranja u LC-MS sustav (Beer i sur., 2010).

ME se može procijeniti koristeći tri glavne tehnike: sustav infuzije nakon kolone, metoda dodavanja standarda nakon ekstrakcije i njena modifikacija analiza omjera nagiba. Sustav infuzije nakon kolone najprikladniji je za kvalitativni pristup evaluaciji ME. Na kromatogramu se identificiraju rasponi vremena zadržavanja najpodložniji pojavi pojačavanja ili suprimiranja signala analita. Kod metode dodavanjem standarda nakon ekstrakcije, odaziv analita u standardnoj otopini uspoređuje se s odazivom analita koji je dodan u uzorak nakon ekstrakcije u istoj koncentraciji. Odstupanja od odaziva dviju otopina identificiraju se kao pojačanje ili suzbijanje signala na MS. Prednost ove metode je što omogućuje kvantitativnu i precizniju procjenu ME. Modifikacija ove metode uključuje izradu koncentracijskog niza kalibracijskih standarda s matriksom. Usporedbom odaziva sa standardnom otopinom analita na LC-MS dobivaju se kalibracijske krivulje čijom analizom se određuju parametri od interesa (Cortese i sur., 2020).

Nakon što je metoda razvijena, validacija bioanalitičke metode dokazuje da je metoda prikladna za analizu uzoraka studije (European Medicines Agency (EMA), 2022.).

#### 1.4. USPOREDBA VALIDACIJSKIH PARAMETARA ZA ANALITIČKE I KROMATOGRAFSKE BIOANALITIČKE METODE

Validacija bioanalitičke metode ključna je kako bi se osigurala pravilna izvedba i pouzdanost analitičkih rezultata. Cilj analitičkog postupka određuje sastavnice validacijskog

procesa koje treba ispitati. Većina parametara koji se ispituju pri validaciji običnih analitičkih metoda bitni su i pri validaciji bioanalitičkih postupaka.

#### **1.4.1. Linearnost, raspon, kalibracijska krivulja i kalibracijski standardi**

Linearnost analitičkog postupka je svojstvo da, unutar zadanog raspona, dobiveni rezultati ispitivanja budu izravno proporcionalni koncentraciji (količini) analita u uzorku. Linearnost se može izravno demonstrirati izradom koncentracijskog niza (razrjeđivanjem standardne otopine analita). Vizualna procjena linearnosti na grafičkom prikazu ovisnosti signala o koncentraciji analita potvrđuje se statističkim metodama, na primjer, izračunom regresijskog pravca metodom najmanjih kvadrata.

Parametri ključni za procjenu linearnosti su: koeficijent korelacije, y-odsječak, nagib regresijske linije i rezidualna suma kvadrata. Određivanje raspona i utvrđivanje linearnosti jednako su bitni u svim metodama, razlika je u tome što se u bioanalitičkim metodama uzima više koncentracijskih razina za izradu kalibracijske krivulje (6, u usporedbi s 5 za analitičke metode). Kod bioanalitičkih metoda, znatno se više pažnje i opreza pridaje izradi uzoraka za kontrolu kvalitete (eng. *quality control*, QC).

Kalibracijski standardi, pripremljeni dodavanjem poznate količine analita u matriks, obuhvaćaju raspon kalibracije i osnova su za kalibracijsku krivulju. Kalibracijski standardi pripremaju se u istom biološkom matriksu kao i uzorci za analizu. Raspon kalibracije definiran je s najnižom granicom kvantifikacije (eng. *lowest limit of quantification*, LLOQ) koja je najniži kalibracijski standard te s najvišom granicom kvantifikacije (eng. *upper limit of quantification*, ULOQ) koja je najviši kalibracijski standard. Svaki analit koji se proučava tijekom validacije metode te svako analitičko mjerenje treba imati svoju kalibracijsku krivulju.

#### **1.4.2. Točnost**

Točnost analitičkog postupka izražava podudarnost između nominalne, konvencionalno očekivane ili referentne vrijednosti sa eksperimentalno dobivenom vrijednošću. Točnost se procjenjuje na uzorcima s dodanim poznatim količinama analita, a ako to nije moguće, prihvatljivo je usporediti dobivene rezultate s drugim provjerenim postupkom. Za procjenu točnosti običnih analitičkih metoda potrebno je minimalno 9 mjerenja na 3 različite koncentracije koje pokrivaju raspon analitičke metode. Točnost se izražava kao postotak

analita poznate dodane količine koji je zadržan u uzorku ili kao razlika između izračunate i nominalne vrijednosti.

QC uzorci za validaciju točnosti bioanalitičkih metoda pripremaju se na najmanje 4 različite koncentracije unutar raspona kalibracijske krivulje: LLOQ, do tri puta veća koncentracija od LLOQ (niski QC), zatim na 30 - 50% raspona kalibracijske krivulje (srednji QC) i posljednji na najmanje 75% od ULOQ (visoki QC). Točnost između ispitivanja evaluira se analizom najmanje 5 replika na svakoj koncentraciji QC uzorka, u najmanje 3 analitička ispitivanja tijekom najmanje dva dana.

### **1.4.3. Preciznost**

Preciznost analitičkog postupka izražava podudarnost (stupanj rasipanja) između niza mjerenja dobivenih višestrukim mjerenjem istog matičnog uzorka u propisanim uvjetima. Preciznost možemo razmatrati na tri razine: ponovljivost, srednja preciznost i reproduktivnost. Preciznost analitičkog postupka izražava se kao varijacija, standardna devijacija ili koeficijent varijacije niza mjerenja.

Ponovljivost (preciznost unutar ispitivanja) izražava preciznost pod istim radnim uvjetima tijekom kratkog vremenskog intervala. Ponovljivost se za obične analitičke metode procjenjuje korištenjem minimalno 9 mjerenja koja pokrivaju raspon analitičke metode (npr. 3 koncentracije i 3 ponavljanja za svaku) ili minimalno 6 mjerenja na jednoj koncentraciji. Srednja preciznost izražava varijacije unutar laboratorija: različiti dani, različiti analitičari, različita oprema itd. Ona se uzima u obzir kako bi se uklonili učinci slučajnih događaja. Reprodiktivnost izražava preciznost između laboratorija. Ovaj parametar razmatra se kod standardizacije analitičkog postupka, na primjer, za uključivanje postupaka u farmakopeje.

Za bioanalitičke metode evaluacija ponovljivosti i srednje preciznosti provodi se kao i evaluacija točnosti, 5 replika na svakoj koncentraciji QC uzorka, u najmanje 3 analitička ispitivanja tijekom najmanje dva dana.

### **1.4.4. Granica detekcije i kvantifikacije**

Granica detekcije (eng. *limit of detection*, LOD) analitičke metode najmanja je količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne nužno i kvantificirati kao točna

vrijednost. Granica kvantifikacije (eng. *limit of quantification*, LOQ) analitičkog postupka najmanja je količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom preciznošću i točnošću. Definiranje granice kvantifikacije neizostavan je korak pri validaciji kvantitativnih postupaka kod kojih se očekuju niske razine analita u matriksu uzoraka. Također se koristi i za određivanje nečistoća te produkata razgradnje. Granica kvantifikacije puno je bitnija od granice detekcije u bioanalitičkim metodama kada želimo znati pouzdano kolika je stvarna koncentracija analita u uzorku.

#### **1.4.5. Parametri specifični za bioanalitičke metode**

Reproducibilnost metode procjenjuje se ponavljanim mjerenjima QC uzoraka. Za postupke kod kojih postoji mogućnost ponovne injekcije uzoraka (npr. u slučaju prekida rada instrumenta ili iz drugih razloga kao što je kvar opreme), potrebno je procijeniti injekcijsku reproducibilnost.

Efekt matriksa definira se kao promjena odaziva analita zbog ometajućih, te često neidentificiranih, komponenata u matriksu uzorka. Tijekom validacije metode efekt matriksa se procjenjuje između različitih neovisnih izvora/serija. Za valjanu procjenu provodi se mjerenje najmanje 3 replike niskih i visokih koncentracija QC uzoraka, za čiju pripremu se koristi matriks iz najmanje 6 različitih izvora (pojedinač koji nisu na terapiji lijekom od interesa). Za dodatnu procjenu efekta matriksa koriste se hemolizirani ili lipemični uzorci matriksa kada se očekuje da će se ti uvjeti pojaviti u studiji. Posebna evaluacija potrebna je i kod pacijenata s oštećenjem jetre ili bubrega.

Prijenos (eng. *carry-over*) je promjena izmjerene koncentracije zbog zaostatka analita iz prethodnog uzorka u analitičkom instrumentu. Tijekom validacije prijenos se procjenjuje analiziranjem slijepih uzoraka nakon analize kalibracijskog standarda na ULOQ. Prijenos u slijepim uzorcima nakon najvišeg kalibracijskog standarda ne smije biti veći od 20% odaziva analita na LLOQ i 5% odaziva za IS. Injektiranjem slijepog uzorka ili više njih nakon uzoraka s očekivano visokim koncentracijama analita može se smanjiti učinak prijenosa na sljedeći uzorka analize.

#### **1.4.6. Ostali parametri**

Selektivnost je svojstvo analitičke metode da razlikuje i kvantificira analit u prisutnosti potencijalno ometajućih tvari (čest slučaj u biološkom matriksu). Ispitivanje selektivnosti metode kod bioloških uzoraka bitno je za kvantitativnost procesa te dopušta određenu granicu do kojeg postotka odaziva analita LOQ se mogu tolerirati onečišćenja koja su gotovo uvijek prisutna. Također se zahtjeva puno detaljnija kontrola selektivnosti, sa po 6 uzoraka.

Robusnost analitičkog postupka sposobnost je metode da male, ali namjerne varijacije u parametrima metode ne utječu na rezultate mjerenja. Ova svojstvo pruža garanciju pouzdanosti tijekom normalne uporabe. Primjeri tipičnih varijacija za ispitivanje robusnosti za tekućinsku kromatografiju su: pH u mobilnoj fazi, sastav mobilne faze, različite kolone (različite serije ili dobavljači) te temperatura ili brzina protoka.

Integritet razrjeđivanja je svojstvo postupka koje definira utjecaj razrjeđivanja bioloških uzoraka na točnost i preciznost izmjerene koncentracije analita. Za razrjeđivanje se koristi isti matriks koji se koristi i za pripremu QC uzoraka. Kontrolni uzorci za razrjeđivanje pripremaju se u koncentracijama analita većim od ULOQ te zatim razrjeđuju slijepim matriksom.

Procjena stabilnosti posebno je bitna kod bioloških uzoraka, a provodi se kako bi se osiguralo da koraci pripreme uzoraka, obrade i analize te uvjeti skladištenja ne utječu na koncentraciju analita. Validacija razdoblja skladištenja provodi se na QC uzorcima pohranjenim minimalno jednako dugo koliko i uzorci za analizu. Stabilnost spojeva u matriksu procjenjuje se kontrolnim uzorcima niske i visoke koncentracije. Kontrolni uzorci analiziraju se nakon izrade te nakon primijenjenih uvjeta skladištenja koji se evaluiraju (EMA/CHMP/ICH, 2022, 2023).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ispitivanja je validirati bioanalitičku metodu za istovremenu analizu ribocikliba i anastrozola u ljudskoj plazmi. Validacija metode provodi se ispitivanjem propisanih parametara za oba analita. Odabrana metoda za analizu je LC-MS/MS pa se i priprema uzoraka provodi prikladnim tehnikama. Započinje se s odvajanjem plazme iz pune krvi te izradom kalibracijskih standardnih otopina i QC uzoraka. Idući korak je odvajanje analita iz uzoraka i standarda SPE metodom. Nakon toga provodi se separacija i mjerenje odaziva analita na fenilnoj koloni (obrnuto-fazna kromatografija) uz prihvatljivu selektivnost i razlučivanje potrebno je odabrati povoljan sastav i brzinu protoka mobilne faze, vrstu elucije te temperaturu kolone. Nakon provedenih mjerenja rezultati se broječno interpretiraju te uspoređuju s propisanim zahtjevima u smjernicama Međunarodnog vijeća za usklađivanje tehničkih zahtjeva farmaceutskih pripravaka za ljudsku upotrebu (eng. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH). Za prikladnost metode nužno je da su zadovoljeni svi potrebni parametri validacije propisani u smjernicama. Ovim ispitivanjem provjeravat će se parametri linearnosti, preciznosti, točnosti, injekcijske reproducibilnosti, *carry-over* te matriks efekt

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju - Carlo ERBA reagents S.A.S.  
(Njemačka)

Acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju - Carlo ERBA reagents S.A.S.  
(Njemačka)

Mravlja kiselina - Supelco (Njemačka)

Standard anastrozola – Tokyo Chemical Industry (Japan)

Standard ribocikliba – Toronto Research Chemicals (Kanada)

##### 3.1.2. Radni instrumenti

Ultrazvučna kupelj - Elma S30H Elmasonic, Elma Schmidbauer GmbH (Njemačka)

Sustav za pročišćavanje vode - Millipore Milli-Q IQ 7015 - Merck (Njemačka)

Analitička vaga - MX5, Mettler Toledo (SAD)

Centrifuga - Nanofuge, Hofer Inc. (SAD)

- Z326K, Hermle (Njemačka)

Uparivač - Concentrator plus, Eppendorf (Njemačka)

Vorteks - IKA mini G (Njemačka)

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti - 1290 Infinity II, Agilent (SAD)

Maseni spektrometar - 6470 QQQ Mass Spectrometer, Agilent (SAD)

Vakuumpumpa - N816 Laboport, KNF Neuberger GmbH (Njemačka)



Manifold za ekstrakciju na čvrstoj fazi - Visiprep SPE Vacuum Manifold DL, Supelco (Njemačka)

### **3.1.3. Pribor**

Sorbensi za ekstrakciju na čvrstoj fazi - Sep-Pak Vac 3cc C8 Cartridge, 200 mg, Waters (SAD)

Kromatografska kolona - XBridge Phenyl dimenzija 150×4.6 mm, veličine čestica 2.5 μm, Waters (SAD)

Plastične epruvete - 1,5 ml, Deltalab (Španjolska)

Mikrotube - 2 ml, Deltalab (Španjolska)

Nastavci za ekstrakciju na čvrstoj fazi - Disposable Liners for Visiprep DL Manifolds, Supelco (SAD)

Mikropipete - 20, 200, 1000 ul, ID 3011, Crux (Hrvatska)

Nastavci za mikropipete - Rainin 20, 200, 1000 ul, Mettler Toledo (SAD)

### **3.1.4. Programi**

Microsoft Excel 2019 - Microsoft (SAD)

GraphPad Prism 10 - GraphPad Software (SAD)

MassHunter 10 - Agilent (SAD)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema otopina standarda

Primarna matična otopina standarda anastrozola i ribocikliba pripravljena je otapanjem odgovarajuće količine standarda u metanolu. Za ribociklib je u 5 ml metanola otopljeno 4,983 mg standarda što daje koncentraciju 0,9966 mg/mL. Za otapanje se koristila ultrazvučna kupelj. Otopina anastrozola pripravljena je otapanjem 5,004 mg standarda u 10 ml metanola pa je koncentracija 0,5004 mg/ml. Iz primarnih matičnih otopina standarda izrađuje se kalibracijska standardna otopina najveće koncentracije (ULOQ) iz koje se razrjeđivanjem u metanolu dobivaju standardne otopine za kalibracijski niz. U tablici 1. navedene su koncentracije kalibracijskih standarda i QC uzoraka.

Za potrebe ispitivanja izrađuje se 25 mL metanolne otopine standarda na ULOQ koncentraciji kao smjesa oba analita. ULOQ koncentracija ribocikliba je 35 µg/mL pa se uzima 875 µl matične otopine koncentracije 1000 µg/mL. Za anastrozol tražena vrijednost koncentracije je 1 µg/mL za što je potrebno 50 µl matične otopine koncentracije 500 µg/mL. Ostatak volumena do 25 ml dopuni se metanolom te se isto otapalo koristi za daljnje razrjeđivanje pri izradi kalibracijskog niza otopina.

**Tablica 1.** Radne otopine – kalibracijski niz standarda (ng/mL)

	<b>RIB</b>	<b>ANA</b>
1	35000	1000
2	28000	800
3	25200	720
4	21000	600
5	17500	500
6	14000	400
7	11200	320
8	7000	200

### **3.2.2. Dobivanje plazme iz pune krvi**

Za postupak se koristila puna krv prikupljena u Vacutainer epruvete s ljubičastim čepom, što ukazuje da sadrže EDTA kao antikoagulans. Nakon skupljanja, krv je centrifugirana u Hermle Z326K centrifugi na 18000 okretaja u minuti tijekom 10 minuta. Supernatant je zatim pažljivo prenesen u novu plastičnu epruvetu te ponovno centrifugiran 10 minuta na 6000 okretaja u minuti. Dobiveni supernatant se prebacuje u nove plastične epruvete te čuva u zamrzivaču na -18 °C.

### **3.2.3. Uklanjanje matriksa iz plazme**

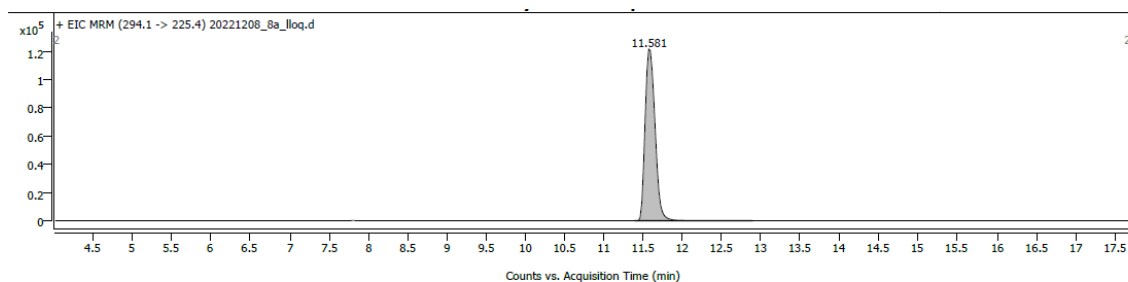
Svaka obrada plazme s ciljem uklanjanja matriksa počinje temperiranjem dobivene plazme na sobnoj temperaturi pola sata.

Koristila se SPE metoda i Sep-Pak Vac 3 ml C8 sorbensi mase 200 mg za ekstrakciju na čvrstoj fazi. U uzorke plazme (180 µL) dodaje se 20 µL otopine standarda čime se dobije razrjeđenje standarda od 10x te 200 µL vode. Sorbensi se potom kondicioniraju s dva puta po 1 mL metanola te dva puta po 1 mL H<sub>2</sub>O, prilikom ovog postupka bitno je paziti da se iznad sorbensa uvijek zadrži tanki sloj tekućine. Nakon toga na kolonu se nanosi uzorak s dodanim standardom i vodom te slijedi pranje s 1 mL vode pa s 1 mL 5%-tnom otopinom metanola u vodi. Nakon toga stavljamo novu plastičnu epruvetu za skupljanje te slijedi elucija analita s 2x 750 µL metanola. 1200 µL svakog dobivenog uzorka se uparava te zatim otapa u 80 µL 65%-tnog metanola. Ovako dobivene otopine injektiraju se u kromatografsku kolonu.

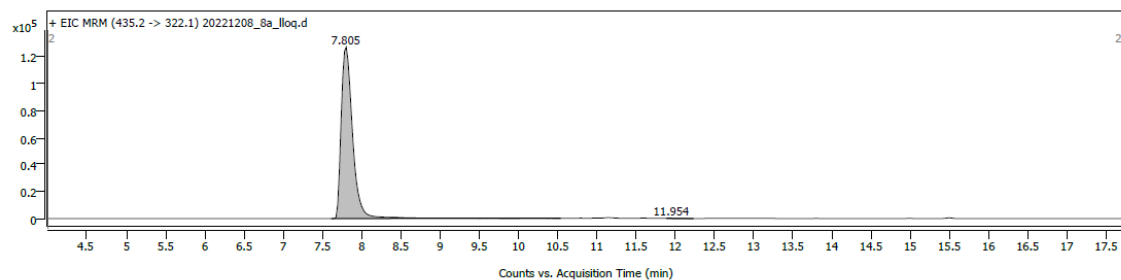
### **3.2.4. Kromatografski uvjeti**

Za separaciju je korištena XBridge fenilna kolona dimenzija 150 x 4,6 mm, veličine čestica stacionarne faze 2,5 µm. Optimalna temperatura kolone iznosila je 35 °C. Gradijentna elucija provedena je kombinacijom mobilnih faza A (voda i mravlja kiselina) i B (metanol i mravlja kiselina). Udio sastava mobilne faze kroz vrijeme prikazan je u tablici 2. Brzina protoka mobilne faze bila je 0,6 mL/min. Injekcijski volumen iznosio je 10 µL te je igla prije svakog injektiranja isprana s 50%-tnim metanolom. Na slici 3. može se vidjeti vrijeme zadržavanja analita koje iznosi 7,8 minuta za ribociklib te 11,6 minuta za anastrozol. Slika 3. također pokazuje zadovoljavajuće razlučivanje pikova na LLOQ koncentraciji.

a)



b)



Slika 3. Reprezentativni kromatogrami anastrozola (a) i ribocikliba (b) na LLOQ koncentraciji.

Tablica 2. Gradijent sastava mobilne faze

Vrijeme (min)	Mobilna faza B (%) MeOH + 0.1% HCOOH
0.0 (start)	5.0
10.5	85.0
14.5	90.0
15.0	100.0
20.0	100.0
20.5	30.0
26.0 (stop)	30.0

### 3.2.5. Uvjeti za masenu spektrometriju

Korišten je spektrometar masa Agilent 6470 QQQ, uz pozitivni način elektrosprej ionizacije. Temperatura izvora ionizacije iznosila je 300 °C, a napon na kapilari 3,5 kV. Kao plin za sušenje i raspršivanje mobilne faze te plin nosač korišten je dušik pri protoku od 13 L/min i tlaku 35 psi. Kao plin za fragmentaciju korišten je dušik te su osigurani uvjeti za dobivanje maksimalnog intenziteta koji osiguravaju selektivnost postupka. Pratila se fragmentacija prekursor-iona ribocikliba omjera mase i naboja ( $m/z$ ) 435.2 na 2 produkt-iona pod naponom od 200V. Prvi ima  $m/z$  322.1 uz energiju kolizije 25 eV, a drugi 252.1 uz energiju kolizije 30 eV. Za anastrozol se pratila fragmentacija prekursor-iona s  $m/z$  294.1 na 2 iona pod naponom od 140V. Prvi je imao  $m/z$  225.4 uz energiju kolizije 25 eV, a drugi 115.2 uz energiju kolizije 70 eV.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. VALIDACIJSKI PARAMETRI

#### 4.1.1. Linearnost

Raspon koncentracija za koje je metoda validirana za ribociklib je od 700 do 3500 ng/ml, a za anastrozol od 20 do 100 ng/ml. Kalibracijske krivulje dobivene su korištenjem programa GraphPad Prism 10, a rezultati su prikazani u tablici 3. Vrijednosti koeficijenta korelacije (R) su zadovoljavajuće, odnosno veće su ili jednake 0,993 što znači da ove krivulje prikazuju linearnu funkciju ovisnosti odaziva o koncentraciji analita u uzorku. Također je jasno da između dana može doći do značajnih varijacija parametara krivulje, posebno kod anastrozola gdje je razlika u nagibu iznosila preko 20%. Iz posljednje informacije može se zaključiti da je pri validaciji metode nužno uzeti u obzir rezultate dobivene s određenim vremenskim odmakom kako bi se dobila što realniju sliku o uvjetima ispitivanja.

**Tablica 3.** Parametri kalibracijskih krivulja dobivenih ispitivanjem metode kroz 2 dana.

Parametri krivulje	RIB		ANA	
	1. DAN	2. DAN	1.DAN	2. DAN
<b>R</b>	0,995	0,996	0,997	0,993
<b>Nagib</b>	1139	1102	56764	69677
<b>Odsječak</b>	487987	695637	136362	41384
<b>Razlika u nagibu pravaca između dva dana (%)</b>	3,30		20,43	

Odstupanje povratno izračunatih koncentracija za točke uzete pri izradi kalibracijske krivulje prikazano je u tablici 4. Pri računanju ovih vrijednosti korištenjem dobivenih jednadžbi pravaca, uvjet koji čini metodu zadovoljavajućom je da izračunate koncentracije ne odstupaju više od 15% od nominalne koncentracije te da na LLOQ ne odstupaju više od 20%. Svi navedeni uvjeti su zadovoljeni u mjerenjima što znači da je kriterij linearnosti uspješno validiran.

**Tablica 4.** Odstupanja izračunatih vrijednosti kalibracijskih standarda od nominalne koncentracije.

<b>RIB</b>			<b>ANA</b>		
<b>Koncentracija (ng/ml)</b>	<b>1. DAN (%)</b>	<b>2. DAN (%)</b>	<b>Koncentracija (ng/ml)</b>	<b>1. DAN (%)</b>	<b>2. DAN (%)</b>
700	-6,28	-5,25	20	0,65	-0,75
1120	5,81	5,65	32	-4,62	5,34
1400	7,3	4,29	40	2,59	-9,49
1750	3,09	0,86	50	3,55	5,03
2100	-0,21	2,58	60	1,57	-0,81
2520	-0,05	2,88	72	1,19	7,73
2800	-3	-3,88	80	-6,97	-6,35
3500	-6,36	-7	100	2,03	-0,69

#### 4.1.2. Preciznost

Preciznost metode ispitivala se na 3 razine koncentracije kalibracijskih standarda, od kojih je jedan uzorak LLOQ, drugi niske koncentracije, a treći visoke (ispod ULOQ). RSD vrijednosti za validaciju parametara ponovljivosti i srednje preciznosti navedene su u tablici 5. Ovi podaci očekivano pokazuju da je preciznost manja na nižim koncentracijama te se dodatno smanjuje kada se u obzir uzimaju rezultati više dana. Kriterij preciznosti metode se tijekom validacije smatra zadovoljenim ako su RSD vrijednosti za svaku ispitivanu koncentraciju do 15%, osim za LLOQ za koju treba biti do 20%. Prema vrijednostima u tablici može se zaključiti da je parametar preciznosti u ovome ispitivanju zadovoljen.

**Tablica 5.** Izračunate vrijednosti ponovljivosti i srednje preciznosti

<b>analit</b>	<b>konc. (ng/mL)</b>	<b>PONOVLJIVOST (%)</b>	<b>SREDNJA PRECIZNOST (%)</b>
<b>RIB</b>	700	4,71	6,23
	1120	1,33	3,97
	2800	1,51	2,28
<b>ANA</b>	20	9,23	11,35
	32	6,43	11,40
	80	4,31	14,78

#### 4.1.3. Točnost

Točnost se ispitivala na QC uzorcima na LLOQ, jednoj niskoj koncentraciji i jednoj visokoj. U tablici 6. točnost je izražena kao postotna razlika od nominalne koncentracije (analitički prinos). Točnost je u ovom slučaju veća od preciznosti kada se u obzir uzimaju rezultati dobiveni u različitim danima, a zajednička karakteristika ova dva parametra je da su veći na višim koncentracijama (manja apsolutna vrijednost RSD, odnosno analitičkog prinosa znači veću preciznost, odnosno točnost). Ovo su također očekivani rezultati jer se točnost prilikom računanja prilagođava kalibracijskoj krivulji svakog dana. Kako bi validacijski kriterij točnosti bio zadovoljen, analitički prinos na svakoj koncentraciji mora biti unutar 15% nominalne vrijednosti koncentracije QC uzoraka, osim za LLOQ kada se tolerira do 20% i taj uvjet je ovdje zadovoljen.

**Tablica 6.** Analitički prinos po koncentracijskim razinama unutar i između dana

analit	konc (ng/mL)	analitički prinos unutar dana (%)	analitički prinos između dana (%)
<b>RIB</b>	700	11,22	-1,85
	1120	8,94	8,21
	2800	-3,95	-3,89
<b>ANA</b>	20	-10,92	-8,98
	32	-6,12	-4,66
	80	-4,55	-1,55

#### 4.1.4. Injekcijska reproducibilnost

Isti uzorak srednje razine koncentracije injektiran je više puta kroz dva dana kako bi se pratila oscilacija izmjerene vrijednosti istog standarda. Mjerenjem se pokazalo da je RSD vrijednost unutar dana za ribociklib iznosila 6,93% za prvi te 3,98% za drugi dan. Rezultati za anastrozol iznosili su 3,34% za prvi dan te 6,55% za drugi dan. Budući da su sve RSD vrijednosti manje od 15% može se zaključiti da je ovaj parametar zadovoljen. Ovim ispitivanjem se procjenjuje instrumentalna varijabilnost pri injektiranju istog uzorka.



#### **4.1.5. Carry-over**

Vrijednost koja pokazuje koliko iznosi zaostajanje analita u mjernom instrumentu između injektiranja dobiva se na način da se prvo injektira i izmjeri vrijednost analita gornje granice kvantifikacije (ULOQ) nakon čega se igla ispiri standardnom procedurom. Zatim se injektira slijepi uzorak plazme te se dobivena vrijednost odaziva uspoređuje sa odazivom analita na najnižoj granici kvantifikacije (LLOQ). Kako bi se osiguralo da ova neizbježna pojava ne utječe značajno na rezultate ispitivanja važno je da se zadovolji vrijednost od do 20% odaziva analita na LLOQ. Rezultati u ispitivanju pokazali su da je *carry-over* efekt 1,75% što zadovoljava kriterije validacije.

#### **4.1.6. Efekt matriksa**

Efekt matriksa ispitivao se na 6 različitih uzoraka plazme uzetih od pacijenata koji nisu na terapiji lijekovima koji se ispituju niti njima sličnim. U uzorke matriksa se neposredno prije mjerenja, a nakon postupka ekstrakcije dodaju standardi poznate koncentracije te se potom uspoređuje odaziv matriksa s odazivom čistog standarda. Procjena se provodi na dvije koncentracijske razine, niskoj i visokoj, za svaki analit i svaki uzorak. Rezultati su prikazani u tablicama 7.(a-d) kao postotak ionske supresije, odnosno ionskog pojačavanja odaziva. Također su navedene i RSD vrijednosti za pojedini uzorak koje ne prelaze 15% što znači da je preciznost metode zadovoljavajuća.

**Tablice 7.** Matriks efekt u ispitivanim uzorcima i RSD vrijednosti za provedena mjerenja.

a)	<b>RIB 1120 ng/ml</b>	
Uzorak	Matriks efekt (%)	RSD
1	23,05	3,35
2	19,84	4,19
3	15,22	5,92
4	-1,31	2,05
5	22,81	5,56
6	6,66	8,33

b)	<b>RIB 2800 ng/ml</b>	
Uzorak	Matriks efekt (%)	RSD
1	10,52	6,11
2	4,98	1,07
3	9,15	4,30
4	-2,12	5,16
5	11,84	3,34
6	10,22	2,36

c)	<b>ANA 32 ng/ml</b>	
Uzorak	Matriks efekt (%)	RSD
1	-21,95	1,07
2	-19,23	0,86
3	-11	2,81
4	-25,48	4,38
5	-22,42	0,99
6	-16,93	0,001

d)	<b>ANA 80 ng/ml</b>	
Uzorak	Matriks efekt (%)	RSD
1	-19,28	4,40
2	-22,19	3,63
3	-10,21	1,12
4	-29,59	2,07
5	-23,42	0,23
6	-16,03	0,90

Iz dobivenih vrijednost ionskih supresija i ionskih pojačavanja odaziva na ispitivanim uzorcima plazme te uz činjenicu da je uzorak 4 bio lipemičan, a uzorak 6 hemoliziran može se izvući nekoliko zaključaka. Na niskoj koncentraciji je efekt matriksa kod ribocikliba znatno veći nego na visokoj te gotovo isključivo dolazi do ionskog pojačavanja, osim kod lipemičnog uzorka. To znači da masti u uzorku uzrokuju jaku ionsku supresiju pri određivanju ribocikliba. Hemolizirani uzorak pokazuje nešto niže ionsko pojačavanje od ostalih što može značiti da hemoglobin i ostali produkti uzrokuju umjerenu ionsku supresiju.

Kod anastrozola u svim uzorcima dolazi do značajne ionske supresije koja je reproducibilna na visokim i niskim koncentracijama, uz podjednaku preciznost koja ima trend blagog povećanja na višim koncentracijama. Ove vrijednosti ne variraju značajno između uzoraka, čak ni kod lipemičnog ili hemoliziranog uzorka stoga su prihvatljive za validaciju metode. Jedino značajno odstupanje je kod uzorka 3 što se najvjerojatnije može pripisati sastavu plazme pojedinca.

## 4.2. UZORAK PACIJENTA

Validirana metoda primijenjena je na realnom uzorku plazme pacijentice na dvojnoj terapiji. Dobivene su sljedeće vrijednosti:

$$c(\text{RIB}) = 978,33 \text{ ng/ml}$$

$$c(\text{ANA}) = 41,56 \text{ ng/ml}$$

Navedene koncentracije nalaze se unutar raspona koncentracija koji se ispitivao u procesu validacije metode. Na zadanom rasponu dokazana je linearna ovisnost odaziva instrumenta o koncentraciji analita u uzorku kao i valjanost ostalih parametara. Na temelju toga može se ustvrditi da su izračunate koncentracije točne i precizne.

Treba istaknuti da su izmjerene vrijednosti kod pacijentice bliže nižim koncentracijskim razinama iz validiranog raspona kod kojih je utvrđena veća devijacija točnosti i preciznosti pa su, posebno kod ribocikliba, moguće varijacije u izmjerenim vrijednostima. Svi validacijski parametri su zadovoljeni, ali za daljnji razvoj metode postoji mogućnost optimizacije mjerenja na nižim koncentracijama kako bi se preciznije pratilo održavanje lijeka u terapijskom rasponu. Dodatni razlog za ovo je i učinak efekta matriksa za kojeg se pokazalo da varira ovisno o pojedinom pacijentu, ali je redovito veći na niskim koncentracijama te može potencijalno ometati mjerenje koncentracije lijekova krvi.

## 5. ZAKLJUČCI

Validirana je LC-MS metoda za selektivno istovremeno određivanje koncentracije anastrozola i ribocikliba u biološkom uzorku plazme. Metoda je validirana u skladu s ICH M10 smjericama.

Mjerenjima provedenim na 8 koncentracijskih razina, određen je parametar linearnosti na rasponu koncentracija od 700 do 3500 ng/ml za ribociklib, a za anastrozol od 20 do 100 ng/ml. Linearnost je na ovom rasponu dokazana konstrukcijom kalibracijskih krivulja zadovoljavajućeg koeficijenta korelacije za oba analita u oba dana ispitivanja te su povratno izračunate koncentracije bile unutar propisanog raspona od 15% nominalne vrijednosti..

Parametri preciznosti i točnosti ispitani su na tri koncentracijske razine QC uzoraka. Dobivene RSD vrijednosti unutar raspona od 15% za QC uzorke pokazuju da su zadovoljeni kriteriji ponovljivosti i srednje preciznosti metode za sve ispitivane koncentracije. Preciznost je osjetno manja na nižim koncentracijama kod oba analita. Slična je i situacija za parametar točnosti, izračunate vrijednosti analitičkog prinosa pokazuju da je točnost zadovoljavajuća, unutar 15% nominalne vrijednosti za sve koncentracije. Točnost je također veća na višim koncentracijama za oba analita što ukazuje na to da se treba opreznije pristupiti određivanju pri nižim vrijednostima.

Injekcijska reproducibilnost ispitana je injektiranjem istog uzorka srednje razine koncentracije kroz dva dana, pri čemu su RSD vrijednosti za ribociklib iznosile 6,93% i 3,98%, dok su za anastrozol iznosile 3,34% i 6,55%. Budući da su sve RSD vrijednosti manje od 15%, može se zaključiti da je instrumentalna varijabilnost pri injektiranju istog uzorka zadovoljavajuća. *Carry-over* efekt nakon injektiranja uzorka ULOQ i slijepe plazme je 1,75% odaziva analita na LLOQ što je također unutar prihvatljivih granica. Ovime je pokazano da je standardni proces ispiranja igle za injektiranje dovoljan te nije nužno dodatno ispiranje.

Ispitan je i parametar utjecaja matriksa na rezultate te se RSD vrijednosti kod svih uzoraka nalaze unutar dozvoljenog raspona od 15%, što potvrđuje ponovljivost metode. Na niskoj koncentraciji ribocikliba ionsko pojačavanje prelazi 15% propisane vrijednosti, za sve uzorke, osim za hemolitičan i lipemičan kod kojih je na obje koncentracijske razine došlo do ionske supresije (jače kod lipemičnog uzorka). Ionsko pojačavanje na visokoj koncentraciji ribocikliba je manje od 15% pa se kod nižih koncentracija preporuča dodatna provjera pri određivanju ribocikliba. Kod anastrozola, svi uzorci pokazuju značajnu ionsku supresiju koja

uglavnom prelazi 15%, ali je reproducibilna na obje koncentracijske razine. Ove vrijednosti ne variraju značajno između uzoraka, uključujući lipemične i hemolizirane uzorke, te su prihvatljive za validaciju metode.

Po svim ispitanim validacijskim parametrima ova je metoda zadovoljavajuća za istovremeno određivanje koncentracije ribocikliba i anastrozola u plazmi. U daljnjim istraživanjima fokus bi mogao biti na otklanjanju učinka matriksa na nižim koncentracijama ribocikliba.

## 6. LITERATURA

Abubakar MB, Wei K, Gan SH. (2014) 'The influence of genetic polymorphisms on the efficacy and side effects of anastrozole in postmenopausal breast cancer patients', *Pharmacogenetics and Genomics*, 24(12), str. 575–581

Aydin S, Kuloglu T, Kalayci M, Yilmaz M, Cakmak T, Albayrak S, Gungor S, Colakoglu N, Ozeran IH. (2014) 'A comprehensive immunohistochemical examination of the distribution of the fat-burning protein irisin in biological tissues', *Peptides*, 61, str. 130–136

Beer B, Schubert B, Oberguggenberger A, Meraner V, Hubalek M, Oberacher H. (2010) 'Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of tamoxifen, anastrozole, and letrozole in human plasma and its application to a clinical study', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(4), str. 1791–1800

Bellanger M, Zeinomar N, Tehranifar P, Terry MB. (2018) 'Are Global Breast Cancer Incidence and Mortality Patterns Related to Country-Specific Economic Development and Prevention Strategies?', *Journal of Global Oncology*, (4), str. 1–16

Bhatnagar AS. (2007) 'The discovery and mechanism of action of letrozole', *Breast Cancer Research and Treatment*, 105(S1), str. 7–17

Bortolozzi R, Mattiuzzo E, Trentin L, Accordi B, Basso G, Viola G. (2018) 'Ribociclib, a Cdk4/Cdk6 kinase inhibitor, enhances glucocorticoid sensitivity in B-acute lymphoblastic leukemia (B-All)', *Biochemical Pharmacology*, 153, str. 230–241

Bruce SJ, Tavazzi I, Parisod V, Rezzi S, Kochhar S, Guy PA. (2009) 'Investigation of Human Blood Plasma Sample Preparation for Performing Metabolomics Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry', *Analytical Chemistry*, 81(9), str. 3285–3296

Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsy P, Gnant M, Poortmans P, Colleoni M, Denkert C, Piccart-Gebhart M, Regan M, Senn HJ, Winer EP, Thurlimann B. (2019) 'Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019', *Annals of Oncology*, 30(10), str. 1541–1557

Cajka T, Fiehn O. (2016) ‘Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics’, *Analytical Chemistry*, 88(1), str. 524–545

Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA. (2006) ‘Cell cycle control in breast cancer cells’, *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(2), str. 261–274

Chen P, Lee NV, Hu W, Xu M, Ferre RA, Lam H, Bergqvist S, Solowiej J, Diehl W, He Y-A, Yu X, Nagata A, VanArsdale T, Murray BW. (2016) ‘Spectrum and Degree of CDK Drug Interactions Predicts Clinical Performance’, *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(10), str. 2273–2281

Chenel M, Ogungbenro K, Duval V, Laveille C, Jochemsen R, Aarons L. (2005) ‘Optimal Blood Sampling Time Windows for Parameter Estimation Using a Population Approach: Design of a Phase II Clinical Trial’, *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 32(5–6), str. 737–756

Claessens AKM, Ibragimova KIE, Geurts SME, Bos MEMM, Erdkamp FLG, Tjan-Heijnen VCG. (2020) ‘The role of chemotherapy in treatment of advanced breast cancer: an overview for clinical practice’, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 153, str. 102988

Colomer R, Aranda F, Albanell J, García-Caballero T, Ciruelos E, López-García M, Cortés J, Rojo F, Martín M, Palacios-Calvo J. (2018) ‘Biomarkers in breast cancer: A consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology’, *Clinical and Translational Oncology*, 20(7), str. 815–826

Cortese M, Gigliobianco MR, Magnoni F, Censi R, Di Martino PD. (2020) ‘Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review’, *Molecules*, 25(13), str. 3047

Curigliano G, Gomez Pardo P, Meric-Bernstam F, Conte P, Lolkema MP, Beck JT, Bardia A, Martínez García M, Penault-Llorca F, Dhuria S, Tang Z, Solovieff N, Miller M, Di Tomaso E, Hurvitz SA. (2016) ‘Ribociclib plus letrozole in early breast cancer: A presurgical, window-of-opportunity study’, *The Breast*, 28, str. 191–198

Dettmer K, Almstetter MF, Appel IJ, Nürnberger N, Schlamberger G, Gronwald W, Meyer HHD, Oefner PJ. (2010) ‘Comparison of serum versus plasma collection in gas

chromatography – Mass spectrometry-based metabolomics’, *ELECTROPHORESIS*, 31(14), str. 2365–2373

Di Nardo G, Gilardi G. (2013) ‘Human aromatase: Perspectives in biochemistry and biotechnology’, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 60(1), str. 92–101

Echeverry G, Hortin GL, Rai AJ. (2010) ‘Introduction to Urinalysis: Historical Perspectives and Clinical Application’, U: Rai AJ. *The Urinary Proteome*. urednici: Totowa NJ, Humana Press (Methods in Molecular Biology), str. 1–12

EMA/CHMP/ICH (2022) ‘ICH M10 on bioanalytical method validation - Scientific guideline | European Medicines Agency‘

EMA/CHMP/ICH (2023) ‘ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures - Step 5’.

Fabian CJ. (2007) ‘The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer: Hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer’, *International Journal of Clinical Practice*, 61(12), str. 2051–2063

Flores CFY, de Las Mercedes Hurtado Pineda Á, Bonilla VMC, Sáenz-Flor K. (2020) ‘Sample Management: Stability of Plasma and Serum on Different Storage Conditions’, *EJIFCC*, 31(1), str. 46–55

Gika H, Theodoridis G. (2011) ‘Sample Preparation Prior to The LC–MS-Based Metabolomics/Metabonomics of Blood-Derived Samples’, *Bioanalysis*, 3(14), str. 1647–1661

Global Cancer Observatory, 2022., <https://gco.iarc.fr/>, pristupljeno 01.06.2024.

Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. (2009) ‘Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009’, *Annals of Oncology*, 20(8), str. 1319–1329

Gröschl M. (2017) ‘Saliva: A Reliable Sample Matrix in Bioanalytics’, *Bioanalysis*, 9(8), str. 655–668

Hanahan D, Weinberg RA. (2000) ‘The Hallmarks of Cancer’, *Cell*, 100(1), str. 57–70



Hassan MSU, Ansari J, Spooner D, Hussain SA. (2010) 'Chemotherapy for breast cancer (Review)', *Oncology Reports*, 24(5)

Infante JR, Cassier PA, Gerecitano JF, Witteveen PO, Chugh R, Ribrag V, Chakraborty A, Matano A, Dobson JR, Crystal AS, Parasuraman S, Shapiro GI. (2016) 'A Phase I Study of the Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor Ribociclib (LEE011) in Patients with Advanced Solid Tumors and Lymphomas', *Clinical Cancer Research*, 22(23), str. 5696–5705

Ingle JN, Buzdar AU, Schaid DJ, Goetz MP, Batzler A, Robson ME, Northfelt DW, Olson JE, Perez EA, Desta Z, Weintraub RA, Williard CV, Flockhart DA, Weinshilboum RM. (2010) 'Variation in Anastrozole Metabolism and Pharmacodynamics in Women with Early Breast Cancer', *Cancer Research*, 70(8), str. 3278–3286

Ingle JN, Kalari KR, Buzdar AU, Robson ME, Goetz MP, Desta Z, Barman P, Dudenkov TT, Northfelt DW, Perez EA, Flockhart DA, Williard CV, Wang L, Weinshilboum RM. (2015) 'Estrogens and their precursors in postmenopausal women with early breast cancer receiving anastrozole', *Steroids*, 99, str. 32–38

Jones R, Golding J. (2009) 'Choosing the types of biological sample to collect in longitudinal birth cohort studies', *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 23(s1), str. 103–113

Kamdem, LK, Liu Y, Stearns V, Kadlubar SA, Ramirez J, Jeter S, Shahverdi K, Ward BA, Ogburn E, Ratain MJ, Flockhart DA, Desta Z. (2010) 'In vitro and in vivo oxidative metabolism and glucuronidation of anastrozole', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 70(6), str. 854–869

Kwapisz D. (2017) 'Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib', *Breast Cancer Research and Treatment*, 166(1)

Li Y, Yang D, Yin X, Zhang X, Huang J, Wu Y, Wang M, Yi Z, Li H, Li H, Ren G. (2020) 'Clinicopathological Characteristics and Breast Cancer-Specific Survival of Patients With Single Hormone Receptor-Positive Breast Cancer', *JAMA Network Open*, 3(1)

Lippi G, von Meyer A, Cadamuro J, Simundic AM. (2019) 'Blood sample quality', *Diagnosis*, 6(1), str. 25–31

Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. (2021) ‘Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review’, *Cancers*, 13(17), str. 4287

Luque-Garcia JL, Neubert TA. (2007) ‘Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry’, *Journal of Chromatography A*, 1153(1–2), str. 259–276

Makki J. (2015) ‘Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance’, *Clinical Medicine Insights: Pathology*, 8

Marchi I, Viette V, Badoud F, Fathi M, Saugy M, Rudaz S, Veuthey JL. (2010) ‘Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses’, *Journal of Chromatography A*, 1217(25), str. 4071–4078

Michopoulos F, Lai L, Gika H, Theodoridis G, Wilson I. (2009) ‘UPLC-MS-Based Analysis of Human Plasma for Metabonomics Using Solvent Precipitation or Solid Phase Extraction’, *Journal of Proteome Research*, 8(4), str. 2114–2121

Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, Parmelli E, Pistotti V, Guarneri V, D’Amico R. (2012) ‘Trastuzumab containing regimens for early breast cancer’, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Edited by Cochrane Breast Cancer Group, 2021(2)

Nardin S, Mora E, Varughese FM, D’Avanzo F, Vachanaram AR, Rossi V, Saggia C, Rubinelli S, Gennari A. (2020) ‘Breast Cancer Survivorship, Quality of Life, and Late Toxicities’, *Frontiers in Oncology*, 10, str. 864

Onesti CE, Jerusalem G. (2021) ‘CDK4/6 inhibitors in breast cancer: differences in toxicity profiles and impact on agent choice. A systematic review and meta-analysis’, *Expert Review of Anticancer Therapy*, 21(3), str. 283–298

Ribociclib (Kisqali), 2023., <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/ribociclib-kisqali>, pristupljeno 16.06.2024.

Riccardi F, Colantuoni G, Diana A, Mocerino C, Lauria R, Febbraro A, Nuzzo F, Addeo R, Marano O, Incoronato P, De Placido S, Ciardiello F, Orditura M. (2018) ‘Exemestane and Everolimus combination treatment of hormone receptor positive, HER2 negative metastatic

breast cancer: A retrospective study of 9 cancer centers in the Campania Region (Southern Italy) focused on activity, efficacy and safety', *Molecular and Clinical Oncology* [Preprint]

Royce ME, Osman D. (2015) 'Everolimus in the Treatment of Metastatic Breast Cancer', *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 9, str. BCBCR.S29268

Shah A, Bloomquist E, Tang S, Fu W, Bi Y, Liu Q, Yu J, Zhao P, Palmby TR, Goldberg KB, Chang CJG, Patel P, Alebachew E, Tilley A, Pierce WF, Ibrahim A, Blumenthal GM, Sridhara R, Beaver JA, Pazdur R. (2018) 'FDA Approval: Ribociclib for the Treatment of Postmenopausal Women with Hormone Receptor–Positive, HER2-Negative Advanced or Metastatic Breast Cancer', *Clinical Cancer Research*, 24(13), str. 2999–3004

Sinha R, Chen J, Amir A, Vogtmann E, Shi J, Inman KS, Flores R, Sampson J, Knight R, Chia N. (2016) 'Collecting Fecal Samples for Microbiome Analyses in Epidemiology Studies', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 25(2), str. 407–416

Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H. (2022) 'Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature)', *Cancers*, 14(10), str. 2569

Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, Geyer CE, Dees EC, Goetz MP, Olson JA, Lively T, Badve SS, Saphner TJ, Wagner LI, Whelan TJ, Ellis MJ, Paik S, Wood C, Ravdin M, Keane M, Gomez Moreno HL, Reddy PS, Goggins TF, Mayer IA, Brufsky AM, Toppmeyer DL, Kaklamani VG, Berenberg JL, Abrams J, Sledge GW. (2018) 'Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer', *New England Journal of Medicine*, 379(2), str. 111–121

Steger GG, Gnant M, Bartsch R. (2016) 'Palbociclib for the treatment of postmenopausal breast cancer – an update', *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 17(2), str. 255–263

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2021) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), str. 209–249

Tao YF, Wang NN, Xu LX, Li ZH, Xu YY, Fang F, Li M, Qian GH, Li YH, Li YP, Wu Y, Ren JL, Du WW, Lu J, Feng X, Wang J, He WQ, Hu SJ, Pan J. (2017) 'Molecular mechanism of G1 arrest and cellular senescence induced by LEE011, a novel CDK4/CDK6 inhibitor, in leukemia cells', *Cancer Cell International*, 17(1), str. 35

The Cancer Genome Atlas Network (2012) ‘Comprehensive molecular portraits of human breast tumours’, *Nature*, 490(7418), str. 61–70

Wander SA, O’Brien N, Litchfield LM, O’Dea D, Morato Guimaraes C, Slamon DJ, Goel S. (2022) ‘Targeting CDK4 and 6 in Cancer Therapy: Emerging Preclinical Insights Related to Abemaciclib’, *The Oncologist*, 27(10), str. 811–821

Wilkinson K. (2004) ‘Anastrozole (Arimidex®)’, *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 8(1), str. 87–88

Zardavas D, Baselga J, Piccart M. (2013) ‘Emerging targeted agents in metastatic breast cancer’, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(4), str. 191–210

Zelena E, Dunn WB, Broadhurst D, Francis-McIntyre S, Carroll KM, Begley P, O’Hagan SP, Knowles JD, Halsall A, Consortium H, Wilson ID, Kell DB. (2009) ‘Development of a Robust and Repeatable UPLC–MS Method for the Long-Term Metabolomic Study of Human Serum’, *Analytical Chemistry*, 81(4), str. 1357–1364

## 7. SAŽETAK

Anastrozol i ribociklib se u kombiniranoj primjeni koriste za liječenje ER pozitivnih tumora dojke kod žena u postmenopauzi. Cilj rada bio je validirati analitičku metodu za istovremenu analizu ribocikliba i anastrozola u ljudskoj plazmi.

Kromatografska separacija analita provodila se na XBridge Phenyl koloni pri temperaturi 35 °C. Primijenjena je gradijentna elucija kombinacijom mobilnih faza (A: voda i mravlja kiselina; B: metanol i mravlja kiselina), uz brzinu protoka 0,6 mL/min. Detekcija je vršena pomoću spektrometra masa (fragmentacija ribociklib  $m/z$  435.2 →  $m/z$  322.1(25eV) +  $m/z$  252.1(30eV), anastrozol  $m/z$  294.1 →  $m/z$  225.4 (25eV) +  $m/z$  115.2 (70eV)).

Linearnost metode ispitana je na rasponu koncentracija od 700 do 3500 ng/mL za ribociklib te od 20 do 100ng/ml za anastrozol. Preciznost i točnost metode ispitavani su na 3 koncentracijske razine (LLOQ, do 3xLLOQ, 80%ULOQ). Dobivene su zadovoljavajuće RSD vrijednosti ponovljivosti (ribociklib → 4,71%, 1,33%, 1,51%; anastrozol → 9,23%, 6,43%, 4,31%) i srednje preciznosti (ribociklib → 6,23%, 3,97%, 2,28%; anastrozol → 11,35%, 11,40%, 14,78%). Izračunati analitički prinosi (ribociklib: unutar dana → 11,22%, 8,94%, -3,95%; između dana → -1,85%, 8,21%, -3,89%; anastrozol: unutar dana → -10,92%, -6,12%, -4,55%; između dana → -8,98%, -4,66%, -1,55%) zadovoljili su validacijski kriterij točnosti. Ispitani su i parametri injekcijske reproducibilnosti (RSD<7%) i *carry-over* efekta (<2%) te su dobivene vrijednosti oba parametra zadovoljile validacijske kriterije. Prema ICH smjernicama za validaciju bioanalitičkih metoda na šest slijepih uzoraka plazme (različitih donora) na visokim i niskim koncentracijama ispitano je utjecaj matriks efekta na rezultate. Prilikom određivanja ribocikliba došlo je do ionskog pojačanja u svim uzorcima, osim u hemolitičkom i lipemičnom. Utjecaj matriksa kod anastrozola uzrokovao je ionsku supresiju reproducibilnu kroz sve uzorke i ispitane koncentracijske razine. Po svim ispitanim validacijskim parametrima ova je metoda zadovoljavajuća za istovremeno određivanje koncentracije ribocikliba i anastrozola u plazmi.

## SUMMARY

Anastrozole and ribociclib are used in combination for the treatment of ER-positive breast tumors in postmenopausal women. The aim of this study was to validate an analytical method for the simultaneous analysis of ribociclib and anastrozole in human plasma.

Chromatographic separation of the analytes was performed on an XBridge Phenyl column at a temperature of 35 °C. Gradient elution was applied using mobile phases (A: water and formic acid; B: methanol and formic acid) at a flow rate of 0.6 mL/min. Detection was carried out using a mass spectrometer (ribociclib fragmentation  $m/z$  435.2  $\rightarrow$   $m/z$  322.1 (25eV) +  $m/z$  252.1 (30eV), anastrozole  $m/z$  294.1  $\rightarrow$   $m/z$  225.4 (25eV) +  $m/z$  115.2 (70eV)).

The linearity of the method was tested in the concentration range of 700 to 3500 ng/mL for ribociclib and 20 to 100 ng/mL for anastrozole. Precision and accuracy of the method were tested at three concentration levels (LLOQ, up to 3xLLOQ, 80% ULOQ). Satisfactory RSD values for repeatability (ribociclib  $\rightarrow$  4.71%, 1.33%, 1.51%; anastrozole  $\rightarrow$  9.23%, 6.43%, 4.31%) and intermediate precision (ribociclib  $\rightarrow$  6.23%, 3.97%, 2.28%; anastrozole  $\rightarrow$  11.35%, 11.40%, 14.78%) were obtained. The calculated analytical recoveries (ribociclib: within-day  $\rightarrow$  11.22%, 8.94%, -3.95%; between-day  $\rightarrow$  -1.85%, 8.21%, -3.89%; anastrozole: within-day  $\rightarrow$  -10.92%, -6.12%, -4.55%; between-day  $\rightarrow$  -8.98%, -4.66%, -1.55%) met the accuracy validation criteria. Injection reproducibility parameters (RSD < 7%) and carry-over effect (< 2%) were also tested, and the obtained values for both parameters met the validation criteria. According to ICH guidelines for the validation of bioanalytical methods, the matrix effect on the results was tested on six blank plasma samples (from different donors) at high and low concentrations. During the determination of ribociclib, ion enhancement occurred in all samples except the hemolytic and lipemic ones. The matrix effect for anastrozole caused ion suppression, which was reproducible across all samples and tested concentration levels. Based on all the tested validation parameters, this method is satisfactory for the simultaneous determination of ribociclib and anastrozole concentrations in plasma.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### VALIDACIJA LC-MS/MS BIOANALITIČKE METODE ZA ANALIZU RIBOCIKLIBA I ANASTROZOLA UZ PRIMJENU EKSTRAKCIJE NA ČVRSTOJ FAZI

Mihovil Moškun

#### SAŽETAK

Anastrozol i ribociklib se u kombiniranoj primjeni koriste za liječenje ER pozitivnih tumora dojke kod žena u postmenopauzi. Cilj rada bio je validirati analitičku metodu za istovremenu analizu ribocikliba i anastrozola u ljudskoj plazmi.

Kromatografska separacija analita provodila se na XBridge Phenyl koloni pri temperaturi 35 °C. Primijenjena je gradijentna elucija kombinacijom mobilnih faza (A: voda i mravlja kiselina; B: metanol i mravlja kiselina), uz brzinu protoka 0,6 mL/min. Detekcija je vršena pomoću spektrometra masa (fragmentacija ribociklib  $m/z$  435.2  $\rightarrow$   $m/z$  322.1(25eV) +  $m/z$  252.1(30eV), anastrozol  $m/z$  294.1  $\rightarrow$   $m/z$  225.4 (25eV) +  $m/z$  115.2 (70eV)).

Linearnost metode ispitana je na rasponu koncentracija od 700 do 3500 ng/mL za ribociklib te od 20 do 100ng/ml za anastrozol. Preciznost i točnost metode ispitavani su na 3 koncentracijske razine (LLOQ, do 3xLLOQ, 80%ULOQ). Dobivene su zadovoljavajuće RSD vrijednosti ponovljivosti (ribociklib  $\rightarrow$  4,71%, 1,33%, 1,51%; anastrozol  $\rightarrow$  9,23%, 6,43%, 4,31%) i srednje preciznosti (ribociklib  $\rightarrow$  6,23%, 3,97%, 2,28%; anastrozol  $\rightarrow$  11,35%, 11,40%, 14,78%). Izračunati analitički prinosi (ribociklib: unutar dana  $\rightarrow$  11,22%, 8,94%, -3,95%; između dana  $\rightarrow$  -1,85%, 8,21%, -3,89%; anastrozol: unutar dana  $\rightarrow$  -10,92%, -6,12%, -4,55%; između dana  $\rightarrow$  -8,98%, -4,66%, -1,55%) zadovoljili su validacijski kriterij točnosti. Ispitani su i parametri injekcijske reproducibilnosti (RSD<7%) i *carry-over* efekta (<2%) te su dobivene vrijednosti oba parametra zadovoljile validacijske kriterije. Prema ICH smjernicama za validaciju bioanalitičkih metoda na šest slijepih uzoraka plazme (različitih donora) na visokim i niskim koncentracijama ispitan je utjecaj matriks efekta na rezultate. Prilikom određivanja ribocikliba došlo je do ionskog pojačanja u svim uzorcima, osim u hemolitičkom i lipemičnom. Utjecaj matriksa kod anastrozola uzrokovao je ionsku supresiju reproducibilnu kroz sve uzorke i ispitane koncentracijske razine. Po svim ispitanim validacijskim parametrima ova je metoda zadovoljavajuća za istovremeno određivanje koncentracije ribocikliba i anastrozola u plazmi.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 3 grafička prikaza, 7 tablica i 60 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: anastrozol, ribociklib, LC-MS/MS, krvna plazma, validacija

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### VALIDATION OF THE LC-MS/MS BIOANALYTICAL METHOD FOR THE ANALYSIS OF RIBOCICLIB AND ANASTROZOLE USING SOLID-PHASE EXTRACTION

Mihovil Moškun

#### SUMMARY

Anastrozole and ribociclib are used in combination for the treatment of ER-positive breast tumors in postmenopausal women. The aim of this study was to validate an analytical method for the simultaneous analysis of ribociclib and anastrozole in human plasma.

Chromatographic separation of the analytes was performed on an XBridge Phenyl column at a temperature of 35 °C. Gradient elution was applied using mobile phases (A: water and formic acid; B: methanol and formic acid) at a flow rate of 0.6 mL/min. Detection was carried out using a mass spectrometer (ribociclib fragmentation  $m/z$  435.2  $\rightarrow$   $m/z$  322.1 (25eV) +  $m/z$  252.1 (30eV), anastrozole  $m/z$  294.1  $\rightarrow$   $m/z$  225.4 (25eV) +  $m/z$  115.2 (70eV)).

The linearity of the method was tested in the concentration range of 700 to 3500 ng/mL for ribociclib and 20 to 100 ng/mL for anastrozole. Precision and accuracy of the method were tested at three concentration levels (LLOQ, up to 3xLLOQ, 80% ULOQ). Satisfactory RSD values for repeatability (ribociclib  $\rightarrow$  4.71%, 1.33%, 1.51%; anastrozole  $\rightarrow$  9.23%, 6.43%, 4.31%) and intermediate precision (ribociclib  $\rightarrow$  6.23%, 3.97%, 2.28%; anastrozole  $\rightarrow$  11.35%, 11.40%, 14.78%) were obtained. The calculated analytical recoveries (ribociclib: within-day  $\rightarrow$  11.22%, 8.94%, -3.95%; between-day  $\rightarrow$  -1.85%, 8.21%, -3.89%; anastrozole: within-day  $\rightarrow$  -10.92%, -6.12%, -4.55%; between-day  $\rightarrow$  -8.98%, -4.66%, -1.55%) met the accuracy validation criteria. Injection reproducibility parameters (RSD < 7%) and carry-over effect (< 2%) were also tested, and the obtained values for both parameters met the validation criteria. According to ICH guidelines for the validation of bioanalytical methods, the matrix effect on the results was tested on six blank plasma samples (from different donors) at high and low concentrations. During the determination of ribociclib, ion enhancement occurred in all samples except the hemolytic and lipemic ones. The matrix effect for anastrozole caused ion suppression, which was reproducible across all samples and tested concentration levels. Based on all the tested validation parameters, this method is satisfactory for the simultaneous determination of ribociclib and anastrozole concentrations in plasma.

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

Thesis includes: 39 pages, 3 figures, 7 tables and 60 references. Original is in Croatian language.

Keywords: anastrozole, ribociclib, LC-MS/MS, blood plasma, validation

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

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2024



