

Analiza palbocikliba metodom kapilarne zonske elektroforeze

Bobić, Dunja

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:163:975407>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



Dunja Bobić

**Analiza palbocikliba metodom kapilarne zonske
elektroforeze**

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 stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se i divnim asistentima Edvinu i Mariu sa zavoda koji su u svakom trenutku bili spremni ostaviti svoje mašine HPLC i GC kako bi priskočili u pomoć.

Zahvaljujem se Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu na stječenom znanju, iskoristit ću ga mudro!

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima na uspomenama koje su mi uljepšale lijepe, a olakšale manje lijepe studentske dane!

Big thanks to M, your support was proportional to the miles between us. Keep smiling!

I na kraju VELIKO HVALA mojoj obitelji bez koje ništa od ovog ne bi bilo ostvarivo!

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



SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rak dojke	1
1.2. Podjela raka dojke	2
1.3. Molekularna klasifikacija raka dojke.....	3
1.3.1. Hormonski status.....	3
1.3.2. HER2 status.....	4
1.3.3. Ki-67	4
1.4. Terapija raka dojke	5
1.4.1. Kemoterapija	6
1.4.2. Hormonska terapija	6
1.4.3. Ciljana terapija	7
1.5. Palbociklib.....	8
1.5.1. Mehanizam djelovanja palbocikliba	9
1.5.2. Farmakokinetika palbocikliba	9
1.6. Načelo kapilarne elektroforeze.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije.....	14
3.1.2. Standardi.....	14
3.1.4. Pribor	15
3.1.5. Programski paketi	15
3.2. Metode	16
3.2.1. Priprema radnog instrumenta	16
3.2.2. Priprema radnog pufera	16
3.2.3. Priprema standardnih otopina	17
3.2.4. Uvjeti analize	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. Odabir vrste i pH pufera.....	18
4.2. Odabir koncentracije pufera.....	21
4.3. Dodatak surfaktanta	21

4.4. Odabir unutarnjeg standarda	23
4.5. Promjena napona	24
4.6. Promjena temperature	30
5. ZAKLJUČCI	33
6. LITERATURA.....	34
7. SAŽETAK / SUMMARY	36

1. UVOD

1.1. Rak dojke

Rak dojke najčešća je zloćudna bolest u žena, a vrlo rijetko može se pojaviti i u muškaraca (< 1% ukupno oboljelih). U svijetu se svake godine dijagnosticira više od 1.700.000 novih slučajeva raka dojke, a 500.000 žena umire od ove teško izlječive bolesti. Usprkos visokoj incidenciji, smrtnost od raka dojke se u posljednjih 20-tak godina kontinuirano smanjuje zbog općeg napretka u medicini, novih lijekova na tržištu i najbitnije, pravovremenog dijagnosticiranja (<http://hlpr.hr/>).

Svim vrstama raka zajedničko je da nastaju iz zdravih stanica. U normalnim uvjetima u stanicama postoji ravnoteža između rasta i smrti. Međutim, postoje svakojaki čimbenici koji mogu dovesti do određenih promjena u genomu koji reguliraju te procese. Okolišni čimbenici poput kemijskih supstanci i ionizirajućeg zračenja, biološki čimbenici (npr. virusi), pa čak i stres mogu pridonijeti nastanku genskih mutacija. U tom slučaju zdrava stanica gubi mogućnost odgovora na određene signale, gubi nadzor nad staničnom diobom i počinje se nekontrolirano umnažati. Važno je napomenuti da ne uzrokuje svaka promjena u genima nastanak raka, već je to kompleksan proces za koji je nerijetko potrebno više mutacija u različitim genima da bi došlo do zloćudne preobrazbe (<http://www.onkologija.hr/>).

Iako se većina mutacija događa tijekom života, uočena je nasljedna komponenta koja pridonosi razvoju raka dojke. Geni BRCA1 i BRCA2 dobili su naziv upravo prema činjenici da mutacije u njihovim genskim lokusima značajno doprinose sklonosti za razvoj raka dojke (BRCA = BReast CAncer). Funkcionalni BRCA geni važni su za kontrolu staničnog rasta i mehanizma popravljivanja oštećenja DNA molekule. Ukoliko je osoba naslijedila mutaciju jednog ili obaju gena, bilo od strane oca ili majke, popravljivanje oštećenja DNA bit će narušeno. Stanica će lakše postati zloćudna zbog povećane osjetljivosti na djelovanje drugih štetnih čimbenika i genomske nestabilnosti. Istraživanja su pokazala da žene s mutiranim BRCA genima imaju vjerojatnost od 45-85% za nastanak raka dojke, a 11-62% za nastanak raka jajnika. Iz tog razloga teži se da se testiranje na naslijeđenu sklonost raku dojke

temeljenu na naslijeđenim mutacijama u genima BRCA1 i BRCA2 provodi kao dio preventive (Levanat i Levačić Cvok, 2010).

Osim genske sklonosti, u rizične čimbenike za razvoj tumora dojke ubrajaju se:

- Dob
- Povijest reproduktivnog i menstrualnog ciklusa (opasnost od nastanka tumora dojke raste proporcionalno s duljinom izloženosti estrogenu)
- Osobna i obiteljska anamneza
- Benigne bolesti dojke
- Izloženost ionizirajućem zračenju
- Konzumacija alkohola i pušenje
- Hormonska nadomjesna terapija (primjena oralnih kontraceptiva prije 25. godine života u trajanju dulje od 4 godine povećava rizik od nastanka tumora dojke za 52%)
- Visokokalorična prehrana, prekomjerna tjelesna težina, nedovoljna tjelesna aktivnost
- Socioekonomski status (žene višeg socioekonmskog statusa, s manje djece i prvorotkinje u kasnijoj životnoj dobi češće obolijevaju)

(Šercer, 2018; Kastelić, 2019).

1.2. Podjela raka dojke

Tumori dojke dijele se na dobroćudne (benigne) i zloćudne (maligne), a osnovna razlika je u njihovoj sposobnosti širenja. Benigni tumori za razliku od malignih ne infiltriraju druga tkiva i ne metastaziraju te ih je stoga lakše liječiti, a najčešći među njima je fibroadenom.

S obzirom na mjesto nastanka, zloćudni tumori dojke najčešće nastaju iz epitela. U čak 90% slučajeva radi se o duktalnom epitelu koji čini stijenku mliječnih kanalića, a rjeđe o lobularnom epitelu unutar mliječnih žlijezda. Postoje i neepitelni tumori čija je pojavnost manje česta, primjerice angiosarkomi, primarni stromalni sarkomi i filodes tumori. (<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/>).

Zloćudni tumori mogu se podijeliti na neinfiltrirajuće in situ tumore koji nisu probili bazalnu membranu (duktalni i lobularni karcinom in situ) i na infiltrirajući, invazivni rak koji je probio bazalnu membranu kanalića ili režnjića i proširio se u okolno tkivo dojke odkuda limfnim sustavom može metastazirati u ostale dijelove tijela. Metastatski rak dojke može zahvatiti gotovo sve organe, a najčešće zahvaća pluća, jetru, kosti, mozak i kožu. Može se liječiti, ali nije izlječiv (Kumar i sur., 1994).

U 8 od 10 slučajeva invazivnog raka radi se o invazivnom duktalnom karcinomu, a rjeđe o invazivnom lobularnom karcinomu, medularnom karcinomu, mucinoznom karcinomu, papilarnom karcinomu, tubularnom karcinomu i Pagetovoj bolesti (Damjanov i sur., 2014; <https://www.cancer.org/>).

1.3. Molekularna klasifikacija raka dojke

Osim prema mjestu nastanka i stupnju invazivnosti, tumori se razlikuju i na molekularnoj osnovi. Biopsijom se utvrđuju čimbenici i karakteristike koji određuju biološko ponašanje tumora i koji uz utvrđeni stadij bolesti utječu na prognozu i odabir liječenja.

1.3.1. Hormonski status

Hormonski ovisnim tumorima se nazivaju oni tumori u kojima su prisutni hormonski receptori. Ženski spolni hormoni (estrogen i progesteron) vežu se na receptore potičući ekspresiju specifičnih gena, ubrzan rast i zloćudno ponašanje stanice. Kod žena u premenopauzi 60%, a kod žena u postmenopauzi 67% tumora su hormon pozitivni. Ovako visok postotak zastupljenosti hormonski ovisnih tumora zapravo je povoljan jer su oni obično bolje diferencirani, nižeg stupnja zloćudnosti i imaju povoljniji tijek bolesti od hormonski neovisnih tumora (<http://hlpr.hr/>).

1.3.2. HER2 status

HER2 je transmembranski protein koji se nalazi na površini svih zdravih stanica i preko njega se kontrolira dijeljenje i rast stanica te osigurava obnavljanje oštećenih stanica i tkiva. Uslijed genskih oštećenja, u zloćudnim stanicama dolazi do stvaranja znatno većeg broja molekula receptora pa se rast stanica ubrzava i postaje nekontroliran i nezaustavljiv. HER2-pozitivni tumori znatno su zloćudniji od ostalih, brže metastaziraju i češće dovode do smrti i recidiva bolesnica. Svaka peta žena koja oboli od raka dojke ima HER2-pozitivan tumor. Od tumora koji su hormonski ovisni samo ih je oko 10% i HER2-pozitivno (<http://hlpr.hr/>).

1.3.3. Ki-67

Ki-67 nuklearni je protein koji je prisutan u jezgri stanice u svim fazama staničnog ciklusa, osim kad je stanica u mirovanju (G₀ faza). Pripada skupini proliferacijskih biljega. Funkcija mu nije u potpunosti razjašnjena, ali nesumnjivo je da je presudan u procesu stanične proliferacije jer je u slučaju njegova uklanjanja stanična dioba inhibirana. Visoke vrijednosti ovog prognostičkog faktora ukazuju na lošiju prognozu bolesti, veći rizik povrata bolesti i metastaziranja (<http://hlpr.hr/>).

Ovisno o proteinima koje eksprimiraju, tumori dojke klasificirani su na pet podtipova. Luminalni A karcinom dojke je estrogen i/ili progesteron ovisan, HER2-negativan s niskim razinama Ki-67 te ima najbolju prognozu u usporedbi s ostalim podtipovima. Luminalni B karcinom također je pozitivan na estrogenske i/ili progesteronske receptore, a ovisno o HER2 statusu može biti HER2-pozitivan i HER2-negativan. Ima visoku razinu Ki-67 zbog čega raste brže i ima nešto lošiju prognozu. Trostruko negativan karcinom nema receptore za hormone i ne eksprimira velike količine HER2 proteina što znatno otežava njegovo liječenje koje se svodi uglavnom na kemoterapiju s lijekovima na bazi platine. Raste i širi se brže nego ostali tipovi karcinoma dojke, a često se pojavljuje u žena mlađih od 40 godina koje imaju mutacije BRCA1 gena. HER2-pozitivan karcinom je hormonski neovisan. Raste brže od luminalnih podtipova i ima lošiju prognozu, ali se često uspješno liječi imunoterapijom (Damjanov i sur., 2014; <https://www.cancer.org/>).

1.4. Terapija raka dojke

Kirurško liječenje smatra se terapijom izbora za rani stadij karcinoma dojke. Cilj kirurškog zahvata je odstraniti tumorsku masu i pazušne limfne čvorove koji se potom šalju na patohistološku pretragu u svrhu procjene prognostičkih i prediktivnih čimbenika. Opseg i vrsta zahvata ovise o vrsti, veličini, smještaju i broju tumora unutar dojke. U poštenim operativnim zahvatima uklanja se tumor (tumorektomija) i/ili dio okolnog zdravog tkiva dojke (segmentektomija ili kvadrantektomija). Mastektomijom se uklanja cijela dojka, a subkutanom mastektomijom odstranjuje se svo tkivo, ali se ostavlja koža dojke i bradavica. Nakon kirurškog liječenja karcinoma dojke može se napraviti neki od rekonstruktivnih zahvata. U lokalno uznapredovalih te velikih tumora primjenjuje se sve više i neoadjuvantna terapija s idejom da se tumorska masa smanji i dovede u operabilan stadij nakon čega je moguće obaviti pošten kirurški zahvat i sačuvati dojku.

S ciljem liječenja mikrometastatskih žarišta i sprječavanja povrata bolesti uslijed eventualno zaostalih malignih stanica koje nisu operativno uklonjene koristi se adjuvantna terapija. Ona obuhvaća lokalnu radioterapiju (primjenjuje se na ležište tumora i regionalne limfne čvorove) ili sistemsko liječenje kemoterapijom, biološkim i hormonskim lijekovima ovisno o dobi pacijentice, stadiju bolesti i biološkim karakteristikama tumora. U samo 15% slučajeva nije potrebno primjenjivati adjuvantno liječenje, i to uglavnom kod žena u postmenopauzi s niskozloćudnim tumorima koji su hormonski ovisni i HER2 negativni, promjera manjeg od 2 cm i kod kojih nije došlo do limfovaskularne invazije okolnog zdravog tkiva.

Nažalost, unatoč adjuvantnom liječenju, kod određenog broja pacijentica doći će do povrata bolesti, a kod nekih žena već u trenutku dijagnoze postoje metastaze u ostalim dijelovima tijela. Cilj sustavnog liječenja za uznapredovalu bolest je produljenje života i poboljšanje njegove kvalitete. Uznapredovali metastatski rak dojke većinom se tretira sistemski kemoterapijom, hormonskom, biološkom terapijom ili njihovim kombinacijama. Lokalna terapija poput zračenja i kirurških zahvata ne koristi se u svrhu liječenja raka, nego olakšavanja simptoma, boli i komplikacija (npr. smanjenje boli u kostima uslijed metastaza u kostima, kirurški zahvat kako bi se smanjio pritisak tumora na leđnu moždinu). Svakoj pacijentici pristupa se individualno, a odabir sistemske terapije ovisi o vrsti tumora (prisutnost ER/PR receptora, HER2 status), stupnju proširenosti bolesti, prisutnim komorbiditetima, dobi i menopauzalnom statusu pacijentice (<https://www.cancer.org/>; <http://hlpr.hr/>).

1.4.1. Kemoterapija

Kemoterapijski lijekovi djeluju na stanice koje su u fazi diobe. Svaki citostatik djeluje na pojedinu fazu (ili više njih) u staničnom ciklusu. Kombiniranjem različitih citostatika se djeluje na više faza staničnog ciklusa i tako poboljšava protutumorski učinak. Citostatici ne djeluju samo na tumorske stanice, već i na zdrave stanice koje su u fazi dijeljenja. Zato se prilikom primjene kemoterapije javljaju brojne nuspojave (gubitak kose, proljevi, mučnina i povraćanje, osipi, poremećaji krvi, umor i slabost). Primjenjuju se u ciklusima kako bi se omogućio oporavak zdravih stanica. Osnovne skupine citostatika su antraciklini (doksorubicin, epirubicin), taksani (paklitaksel, docetaksel), antimetaboliti (5-FU, kapecitabin, gemcitabin, metotreksat), alkilirajući lijekovi (ciklofosfamid, tiotepa), derivati platine (cisplatina, karboplatina) i vinka alkaloidi (vinkristin, vinorelbin, vinblastin) (<http://www.onkologija.hr/>; <http://hlpr.hr/>; cancer.org).

1.4.2. Hormonska terapija

Hormonska terapija prvi je izbor liječenja kad zloćudne stanice na svojoj površini ekspimiraju estrogenske i/ili progesteronske receptore. Djelujući na te receptore, ženski spolni hormoni potiču rast tumora i metastaziranje. Cilj hormonske terapije je blokirati proizvodnju estrogena ili interakciju estrogena i estrogenskog receptora te posljedičnu aktivaciju signalnih puteva koji kontroliraju angiogenezu, proliferaciju i apoptozu te zaustaviti rast tumora. Postoji nekoliko vrsta hormonske terapije ovisno o mehanizmu djelovanja. Selektivni modulatori estrogenskih receptora imaju agonističko, odnosno antagonističko djelovanje na estrogenske receptore ovisno o ciljnom tkivu odnosno stanici za koju se vežu. Najpoznatiji predstavnik je tamoksifen koji ima antiestrogensko djelovanje na stanice dojke, a uz to smanjuje razinu kolesterola u krvi i pridonosi očuvanju gustoće kostiju žena u menopauzi zbog agonističkog djelovanja u navedenim tkivima.

U predmenopauzalnih žena, ER pozitivni rak dojke obično će se liječiti s tamoksifenom tijekom 5 do 10 godina. Ova terapija se može zamijeniti inhibitorom aromataze ako bolesnica

tijekom prvih 5 godina uzimanja tamoksifena postane postmenopauzalna (Vrbanec i sur., 2015).

U postmenopauzalnih žena najveći dio estrogena ne potječe iz jajnika čija se funkcija smanjuje, nego biosintezom iz muškog spolnog hormona androstendiona koji se izlučuje u nadbubrežnoj žlijezdi. Aromatazni inhibitori blokiraju enzim aromatazu koji sudjeluje u toj pretvorbi i smanjuju stvaranje estrogena u perifernim tkivima. Razlikujemo nesteroidne, reverzibilne inhibitore anastrozol i letrozol te steroidni, ireverzibilni inhibitor eksemestan. Dobro se podnose, a studije su pokazale da su učinkovitiji u sprječavanju povrata bolesti od tamoksifena. U terapiji se koristi i fulvestrant koji je potpuni antagonist estrogenskih receptora i potiče njihovu degradaciju. Indiciran je u liječenju hormonski ovisnog raka dojke s udaljenim metastazama ukoliko je liječenje tamoksifenom i inhibitorima aromataze bilo neuspješno. U premenopauzalnih žena učinkovit način snižavanja razina estrogena je supresija funkcije jajnika. Ona se može postići uklanjanjem jajnika ili potiskivanjem proizvodnje estrogena zračenjem, metodama koje su zbog svoje ireverzibilnosti i mogućnosti nastanka sekundarnih tumora uglavnom napuštene, a u svjetlu nove vrste tzv. kemijske kastracije primjenom LHRH agonista (goserelin, leuprolid) (Vrdoljak i sur., 2013).

1.4.3. Ciljana terapija

U svakom se liječenju, a posebice onkološkom, teži da bude što učinkovitije, selektivnije i što manje toksično. Dobro poznavanje biologije i funkcioniranja tumorskih stanica omogućilo je ciljano djelovanje terapije na specifične tumorske biljege koji imaju ulogu u procesu rasta, razvoja i širenja tumora. Glavna prednost ciljane terapije je upravo usmjereno uništavanje tumorskih stanica bez negativnog učinka na zdrave stanice, a posljedično i manjeg broja inače karakterističnih nuspojava kemoterapije (www.onkologija.hr).

Anti-HER2 lijekovi djeluju na HER2 receptor blokirajući signalizaciju i smanjujući proliferaciju stanica kod HER2 pozitivnog raka dojke. Trastuzumab, lapatinib, pertuzumab, trastuzumab emtansine (T-DM1) i neratinib koriste se kao suvremeni anti-HER2 lijekovi. Palbociklib, ribociklib i abemaciclib smanjuju proliferaciju stanica u tumorima blokirajući kinazu ovisnu o ciklinima. Inhibitori ciljane molekule rapamicina (mTOR), kao što je everolimus, smanjuju rast i umnožavanje tumorskih stanica stimuliran mTOR intrastaničnom

signalizacijom. Inhibitori enzima poli ADP-riboza polimeraze (PARP) otežavaju stanicama raka popravak oštećene DNA što dovodi do smrti stanica raka. Olaparib i talazoparib su novi PARP inhibitori koji se mogu koristiti u liječenju nekih bolesnica s BRCA mutacijama. Inhibitor receptora vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) bevacizumab sprječava rast krvnih žila unutar tumora (neoangiogenezu), te na taj način uskraćuje tumoru kisik i hranu potrebnu za rast (Podolski i sur., 2015).

1.5. Palbociklib

Palbociklib je nov antineoplastik plasiran na tržište 2016. godine pod trgovačkim nazivom Ibrance od strane Pfizera (<https://www.ema.europa.eu/>). Indiciran je za liječenje lokalno uznapredovalog ili metastatskog raka dojke koji je pozitivan na hormonski receptor (HR+), a negativan na receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2) (<https://www.pfizer.com/>).

U postmenopauzalnih žena primjenjuje se zajedno s hormonskim lijekovima protiv raka dojke čija je svrha zaustaviti, odnosno smanjiti učinak estrogena na proliferaciju tumorskih stanica. Hormonska terapija pokazala se vrlo učinkovitom u liječenju karcinoma dojke, ali joj je učinak ograničen učestalom pojavom rezistencije. U razvoju rezistencije veliku ulogu igra promjena aktivnosti proteina koji reguliraju stanični ciklus (ciklina D1), a koji je glavna meta djelovanja palbocikliba (Kovačević, 2016). Jedna od mogućih kombinacija je s letrozolom, inhibitorom enzima aromataze koji je odgovoran za biosintezu estrogena iz androgena. Druga je s fulvestrantom, kompetitivnim antagonistom estrogenskih receptora, u žena koje su prethodno neuspješno primile endokrinu terapiju. Klinička su ispitivanja pokazala da kombinacija palbocikliba s letrozolom i fulvestrantom značajno produžuje vrijeme bez progresije bolesti. Bolesnice koje su uzimale palbociklib i letrozol živjele su u prosjeku 24,8 mjeseci bez pogoršanja bolesti, za razliku od 14,5 mjeseci za žene kojima je davan placebo i letrozol. Pozitivni rezultati uočeni su i kod ispitivanja zajedničke primjene palbocikliba i fulvestranta gdje je vrijeme bez progresije bolesti za 6,6 mjeseci dulje nego pri primjeni placeba i fulvestranta. Važno je napomenuti da se za premenopauzalne žene endokrina terapija uvijek kombinira s agonistom hormona koji oslobađa luteinizirajući hormon (<http://www.halmed.hr/>).

Palbociklib se primjenjuje oralno, a preporučena doza je 125 mg jednom dnevno uzastopno tijekom 21 dana nakon čega slijedi 7 dana bez terapije kako bi se dovršio potpuni ciklus od 28 dana (<http://www.halmed.hr/>).

Inhibitori CDK 4/6 generalno imaju relativno prihvatljiv sigurnosni profil. Toksičnost palbocikliba pretežno je hematološka. Najčešća nuspojava jest neutropenija i razlikuje se od one uzrokovane kemoterapijom jer se javlja kao posljedica antiproliferativnoga, a ne citotoksičnog djelovanja na prekursorske stanice u koštanoj srži (Ban i sur., 2019).

1.5.1. Mehanizam djelovanja palbocikliba

Tumor, između ostalog, nastaje kao posljedica abnormalnosti u regulaciji staničnog ciklusa. Danas se zna da su važni čimbenici uključeni u prijelaz staničnog ciklusa iz faze u fazu grupa proteina ciklini i enzimi kinaze koje aktiviraju. S patogeneom raka dojke je povezana pretjerana aktivnost ciklina D1 i ciklin ovisnih kinaza CDK4 i CDK6. Naime, kad se nađu u kompleksu s ciklinom D1, CDK4/6 fosforilirat će retinoblastomski (Rb) protein koji je u hipofosforiliranom obliku čvrsto vezan na transkripcijski faktor E2F. Fosforilacija potiče otpuštanje Rb proteina i transkripciju gena koji su odgovorni za prijelaz iz G_1 u S fazu i napredovanje staničnog ciklusa. Također je poznato da ciklin D ima ulogu u razvijanju rezistencije na hormonsku terapiju jer može aktivirati prijenos signala preko estrogenskih receptora bez prisutnosti estrogena. U svrhu utišavanja proliferacije tumorskih stanica i smanjenja hormonske rezistencije, palbociklib je razvijen kao visoko selektivan, reverzibilni inhibitor CDK4 i CDK6 (Ban i sur., 2019).

1.5.2. Farmakokinetika palbocikliba

Nakon peroralne primjene apsorbira se 46% doze, a stanje dinamičke ravnoteže postiže se unutar 8 dana kad se lijek dozira jednom dnevno. Hrana utječe na apsorpciju i bioraspoloživost lijeka. Ukoliko se uzima s masnom hranom, AUC se poveća za 21%, a c_{max} za 38%. Nadalje, unos hrane značajno smanjuje varijabilnost između pacijenata, stoga je preporuka uzimati ga uz obrok. 85% apsorbirane doze veže se na proteine plazme. Intenzivno

se metabolizira u jetri, a glavni metabolički putevi uključuju oksidaciju i sulfonaciju preko CYP3A i SULT2A1. Iz tog razloga, potrebno je izbjegavati snažne inhibitore (klaritromicin, azolne antimikotike, sakvinavir, sok od grejpa) i induktore CYP3A (karbamazepin, fenitoin, rifampicin, gospina trava). Metaboliti se većinski izlučuju fecesom, a samo 17% urinom. Nije potrebna prilagodba doze lijeka u bolesnica s blagim, umjerenim i teškim oštećenjem bubrega (klirens kreatinina > 15ml/min). U slučaju teškog oštećenja jetre (Child Pugh stadij C), preporučena doza lijeka je 75 mg dnevno u istom režimu (<http://www.halmed.hr/>).

1.6. Načelo kapilarne elektroforeze

Kapilarna elektroforeza je separacijska tehnika u kojoj nabijene čestice pod utjecajem električnog polja putuju kroz kapilaru ispunjenu otopinom elektrolita prema jednoj od elektroda. Razdvajanje analita temelji se na različitoj brzini putovanja iona koju opisuje izraz:

$$v = \mu_e E$$

gdje v označava brzinu putovanja iona, μ_e elektroforetsku pokretljivost, a E primijenjeno električno polje. Jakost električnog polja izražava se u V/cm jer ono ovisi o primijenjenom naponu i duljini kapilare:

$$E = V/l$$

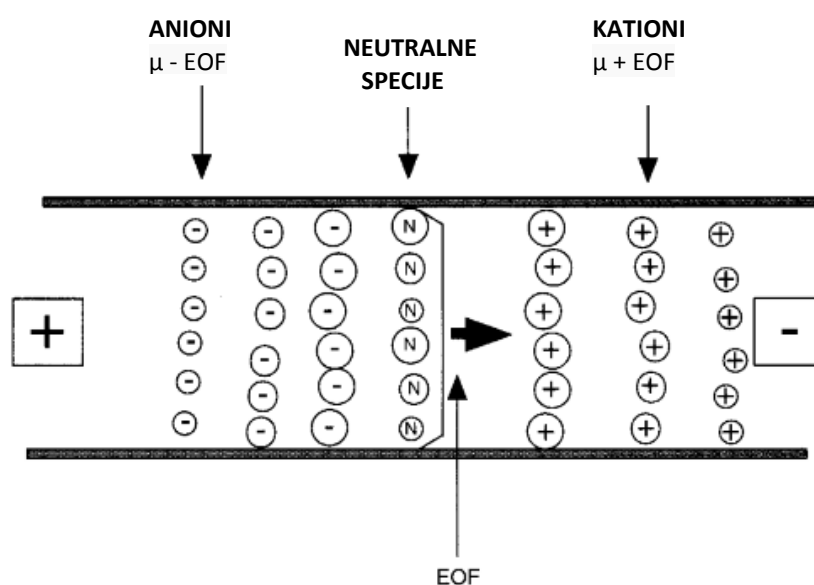
Što se veći potencijal primjeni kroz kapilaru, ioni će se brže kretati ovisno o njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti koja je opisana izrazom:

$$\mu_e = q/6\pi\eta r$$

gdje q označava naboj iona, η viskoznost medija te r radijus iona. Iz formule je vidljivo da je pokretljivost proporcionalna naboju iona, a obrnuto proporcionalna polumjeru čestice. Dakle, djelovanjem električnog polja manje će čestice s većim nabojem prve doći do detektora (Slika 1, Sertić, 2013; Nigović, 2014).

Bitna karakteristika kapilarne elektroforeze je elektroosmotski tok koji uvelike utječe na vrijeme migracije iona, ali omogućuje i kretanje neutralnih analita kroz kapilaru. To je tok čistog pufera, a posljedica je silanolnih skupina u unutrašnjosti kapilare čiji negativni naboj raste s porastom pH pufera. Ukoliko je pH dovoljno visok ($\text{pH} > 3$), silanolne skupine će biti deprotonirane i privlačiti će katione iz otopine elektrolita. Nastaje takozvani električni dvosloj

koji se sastoji od čvrstog (kationi privučeni silananim skupinama) i difuzijskog dijela (kationi i anioni). Pod utjecajem električnog polja, kationi iz difuzijskog dijela privučeni su katodi, a za sobom povlače okolnu tekućinu. Budući da je smjer kretanja kationa i elektroosmotkog toka jednako usmjeren, elektroosmotska pokretljivost toka pridodat će se pokretljivosti kationa i oni će prvi doći do detektora. Slijede neutralne čestice koje su nošene isključivo elektroosmotskim tokom i kreću se jednakom brzinom. Njihovo razdvajanje moguće je postići dodatkom surfaktanta u otopinu pufera. S obzirom da je veličina elektroosmotskog toka za jedan red veličine veća od elektroforetske pokretljivosti aniona, i anioni putuju prema katodi (Damić i Nigović, 2010; Watson, 2012).



Slika 1 Putovanje ionskih i neutralnih čestica kroz kapilaru u CE (prilagođeno iz Watson, 2012)

Osim što omogućuje kretanje svih analita u istom smjeru neovisno o naboju, specifična odlika elektroosmotskog toka u kapilari je ravan profil toka koji, za razliku od laminarnog u tekućinskoj kromatografiji, uzrokuje manju disperziju zona analita, odnosno daje uže i više pikove (Watson, 2012).

Prilikom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode potrebno je uložiti vremena za optimizaciju parametara koji utječu na elektroforetsku pokretljivost analita i elektroosmotski tok poput vrste, koncentracije i pH pufera, vrste i koncentracije surfaktanta, dodatka organskog otapala, temperature i napona (Tablica 1). No, prednosti su brojne pa tako treba

istaknuti kratko vrijeme analize, visoku učinkovitost i niske troškove, jednostavnost tehnike te ekološku prihvatljivost zbog malog potrebnog volumena otapala i uzorka (Damić i Nigović, 2010). Brzina, preciznost i točnost ove tehnike iskorištena je u kvantitativnoj analizi lijekova u svim vrstama ljekovitih oblika. Zbog visoke moći razlučivanja djelotvorna je u određivanju profila čistoće lijekova, a svoju primjenu je našla i u analizi peptidnih lijekova, odijeljivanju enantiomera te analizi lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama (Nigović, 2014).

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

pH pufera	EOF raste s porastom pH pufera (prebrz EOF rezultira eluacijom analita prije njihove separacije, prespor EOF uzrokuje adsorpciju kationa na SiO- Coulombovim interakcijama)
Ionska jakost pufera	EOF se smanjuje s povećanjem ionske jakosti pufera (prevelika ionska jakost generira visoku struju i uzrokuje Jouleovo zagrijavanje)
Električno polje	EOF raste s porastom napona (opasnost od Jouleovog zagrijavanja kod prejakog električnog polja)
Temperatura	EOF raste s porastom temperature jer se smanjuje viskoznost
Organski modifikatori	Najčešće smanjuju EOF mijenjajući potencijal na unutrašnjosti kapilare, dielektričku konstantu pufera i viskoznost
Surfaktant	Kationski smanjuju EOF, anionski povećavaju
Modifikacije unutrašnje stijenke	Neutralni sloj smanjuje EOF, ionski povećava

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Karcinom dojke najčešća je zloćudna bolest i ima najvišu incidenciju mortaliteta u ženskoj populaciji u svijetu. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) u 2018. godini rak dojke bio je poguban za 627 000 žena, što čini 15 % ukupnih smrti uzrokovanih malignim bolestima (<https://www.who.int/>). S obzirom na ionako visoku, a uz to i u porastu, pojavnost raka dojke, zabrinjava i činjenica da je čak 20 % pogođenih žena mlađe od 50 godina, a 36 % mlađe od 64 (<https://www.europadonna.org/>).

Individualni odgovor pacijentica na terapiju, velik broj nuspojava citostatika te razvoj rezistencije dodatni su razlozi za velik interes farmaceutske industrije u potrazi za što selektivnijim, sigurnijim i učinkovitijim lijekovima.

Palbociklib je relativno nov antineoplastik na tržištu, a koristi se u politerapiji s inhibitorom aromataze ili fulvestrantom kod hormonski ovisnog tumora dojke koji je negativan na HER2 (humani epidermalni faktor rasta 2) (<https://www.ema.europa.eu/en/>).

Registraciji svakog lijeka prethode ispitivanja radi utvrđivanja kakvoće, djelotvornosti i sigurnosti primjene. Djelotvornost se dokazuje kliničkim ispitivanjima, neškodljivost toksikološko-farmakološkim ispitivanjima, a farmaceutskim ispitivanjima provjerava se i utvrđuje njegova kakvoća. Ljekovite i pomoćne tvari koje ulaze u sastav gotovog farmaceutskog oblika moraju odgovarati farmakopejskim zahtjevima kakvoće s obzirom na kvalitativan i kvantitativan sastav. Analitička ispitivanja obuhvaćaju identifikaciju, ispitivanje čistoće, određivanje sadržaja, ispitivanje stabilnosti dozirnih oblika, oslobađanja aktivnih tvari iz ljekovitog oblika, određivanje onečišćenja i razgradnih produkata te koncentracije lijekova i metabolita u biološkim uzorcima (Nigović i sur., 2014b).

Cilj ovog istraživanja bio je razviti kapilarnoelektroforetsku metodu analize palbocikliba, odnosno optimizirati parametre kako bi njegova detekcija i kvantifikacija u farmaceutskom obliku bila što jednostavnija i brža.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Acetonitril (Bisolve Chimie SARL, Dieuze, Francuska)
- Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Fosforna kiselina 10% (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Metanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Otopina fosfatnog pufera pH=2,5 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Otopina natrijevog hidoksida 0,1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Otopina natrijevog hidoksida 1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Natrijev tetraborat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

3.1.2. Standardi

- Cefaleksin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Diazepam (JGL, Rijeka, Hrvatska)
- Palbociklib (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Salicilna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Sulfadiazin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Sulfametoksazol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Sulfatiazol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

3.1.3. Radni instrumenti

- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Centrifugirka (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Sustav za kapilarnu elektroforezu (G1600A) s integriranim detektorom niza dioda (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Sustav za pročišćivanje vode WaterPro (Labonco, Kansas City, MI, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)
- Vortex mješalica (Ika, Njemačka)

3.1.4. Pribor

- Bočice za uzorkovanje za kapilarnu elektroforezu od 1,5 mL (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Injekcijski filtri, Acrodisc GHP, veličina pora 0,20 μm , promjera 26 mm (Gelman, Ann Arbor, SAD)
- Kapilara od izvučenog kvarca unutrašnjeg promjera 50 μm , ukupne duljine 35 cm, duljine 27 cm do detektora (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Pipete model Pipet-Lite XLS (Rainin Instrument LLC, Oakland, CA, SAD)

3.1.5. Programski paketi

- 3D-CE/MSD ChemStation, Rev. A. 10.02 (1757) (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema radnog instrumenta

Prije prvog korištenja kapilaru smo kondicionirali 5 minuta s metanolom, 10 minuta s 1 M NaOH, 10 minuta s ultračistom vodom te na kraju 20 minuta s otopinom radnog pufera.

Na početku svakog radnog dana za ispiranje kapilare korišteni su redom 0,1 M NaOH, ultračista voda i otopina radnog pufera, svako ispiranje u trajanju od 10 minuta. Nakon što je utvrđeno da je za analizu pogodan pufer niskog pH, umjesto 0,1 M NaOH, korištena je 10 % (v/v) fosforna kiselina.

Nakon svake analize kapilara je ispirana 2 minute fosfornom kiselinom, a potom 2 minute otopinom radnog pufera. Prilikom mijenjanja pH radnog pufera, kapilara je obavezno ispirana 15 minuta s otopinom radnog pufera novog pH.

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

3.2.2. Priprema radnog pufera

Otopina boratnog pufera koncentracije 100 mM pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine natrijevog tetraborata dekahidrata u ultračistoj vodi u odmjerne tikvici od 100 mL. Otapanje je pospješeno korištenjem ultrazvučne kupelji.

Otopina surfaktanta natrijevog dodecil sulfata koncentracije 100 mM pripremljena je na isti način.

100 mM otopina borata i 100 mM otopina SDS razrijeđivane su s ultračistom vodom u odgovarajućem omjeru kako bismo dobili 20 mM otopinu boratnog pufera i 30, odnosno 60 mM otopinu SDS.

100 mM otopina fosfatnog pufera pH=7,4 pripremljena je otapajući odgovarajuće količine natrijevog dihidrogenfosfat dihidrata i dinatrijevog hidrogenfosfata dihidrata u ultračistoj vodi u odmjerne tikvici od 50 mL. Za pripremu otopina nižih pH, dodavani su različiti volumeni klorovodične kiseline uz istovremeno mjerenje pH vrijednosti na pH-metru.

Matične otopine pufera i surfaktanta čuvane su na sobnoj temperaturi na tamnom mjestu, a svaki su dan prije pripreme radnih pufera profiltrirane kroz membranski filter širine pora 0,20 µm.

3.2.3. Priprema standardnih otopina

Matična standardna otopina palbocikliba pripremljena je otapanjem 0,578 mg standarda palbocikliba u 2 ml smjese otapala H₂O:acetonitril (ACN) = 50:50 (v/v). Eppendorfica je čuvana omotana parafilmom na +4 °C.

Standardne otopine tvari koje su bile ispitivane kao potencijalni unutarnji standardi pripremljene su otapanjem odgovarajuće količine tvari u različitim otapalima. Diazepam je otopljen u metanolu u odmjernoj tikvici od 5 mL, tako da se postigne koncentracija od 2 mg/mL. Za otapanje cefaleksina i salicilne kiseline korištena je voda, a za otapanje sulfadiazina, sulfatiazola i sulfametoksazola acetonitril. Odmjerne tikvice čuvane su na +4 °C. Svaki dan su se radne otopine neposredno prije analize pripremle razrjeđivanjem matičnih otopina sa smjesom otapala H₂O:ACN u različitim omjerima. Koncentracije unutarnjih standarda iznosile su 50 µg/mL, a palbocikliba 100 µg/mL.

Budući da je palbociklib citostatik, tijekom rada korištena je odgovarajuća zaštitna oprema.

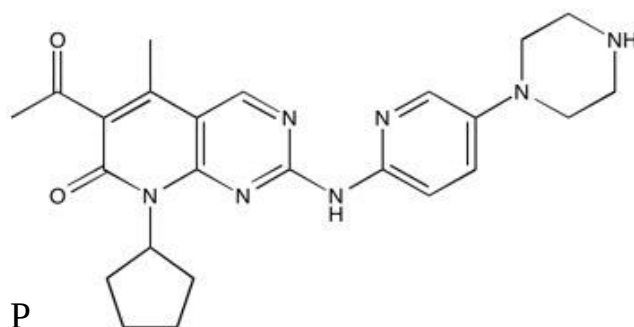
3.2.4. Uvjeti analize

Analiza je provedena na uređaju za kapilarnu elektroforezu s kapilarom od izvučenog kvarca duljine 35 cm, unutrašnjeg promjera 50 µm, proizvođača Agilent Technologies (Waldbronn, Njemačka). Uzorci su injektirani u kapilaru pri temperaturi od 25 °C, pod tlakom od 50 mbar, tijekom 6 sekundi. Analize su provedene pri valnoj duljini detektora od 210 nm. Napon od 25 kV i 50 mM fosfatni pufer pH=2,5 pokazali su se optimalnim za analizu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Odabir vrste i pH pufera

Prvi parametar koji smo ispitivali u razvoju nove metode bio je vrsta i pH pufera. Odabrati prikladan pH pufera ključno je za kontrolu elektroosmotskog toka, a o njemu ovise i stupanj ionizacije te posljedično elektroforetska pokretljivost analita. Pri visokom pH kisele silanolne skupine su u unutrašnjosti kapilare većinom deprotonirane i nalaze se u ioniziranom obliku (SiO^-). Kationi iz otopine elektrolita privučeni su im jakim elektrostatskim silama što za posljedicu ima brži EOF i kraće vrijeme analize. Budući da su pK_a vrijednosti palbocikliba 3,1 (piridinski N) i 7,4 (piperazinski N), molekula će biti neutralna pri pH većem od 7,4, ionizirana u pH rasponu 3,1-7,4, te dvostruko ionizirana pri pH manjem od 3,1. Za očekivati je da će analizi pogodovati nizak pH. Takav radni pufer pak nije pogodan za EOF, ali palbociklib kao kation putuje ispred njega što opet ide u prilog odabiru kapilarne zonske elektroforeze i niskog pH pufera. Struktura palbocikliba prikazana je na Slici 2.



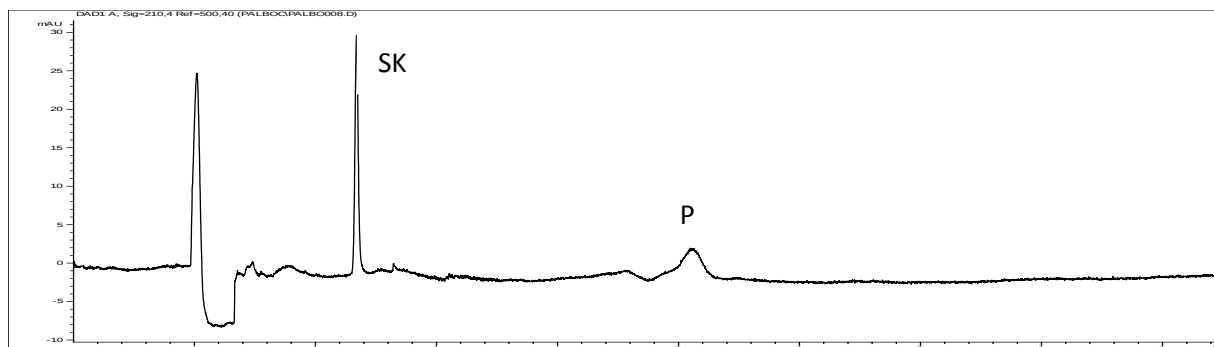
Slika 2 Kemijska struktura palbocikliba (P)

Tijekom izrade diplomskog rada, isprobana su dva radna pufera. Prvi je bio 20 mM boratni pufer pH=9. Pri tom je pH analit nenabijen, a jedina vrsta kapilarne elektroforeze koja omogućava istovremenu analizu i nabijenih i neutralnih čestica je micelarna elektrokinetička kromatografija. Stoga je u radni pufer dodan surfaktant SDS koncentracije 30, odnosno 60 mM. On stvara negativne micle koje čine pseudostacionarnu fazu i stupaju u interakcije s analitom. Kako su negativno nabijene, micle putuju prema anodi, u suprotnom smjeru od EOF. Stoga je potrebno osigurati dovoljno jak EOF koji će osigurati ukupno kretanje micela

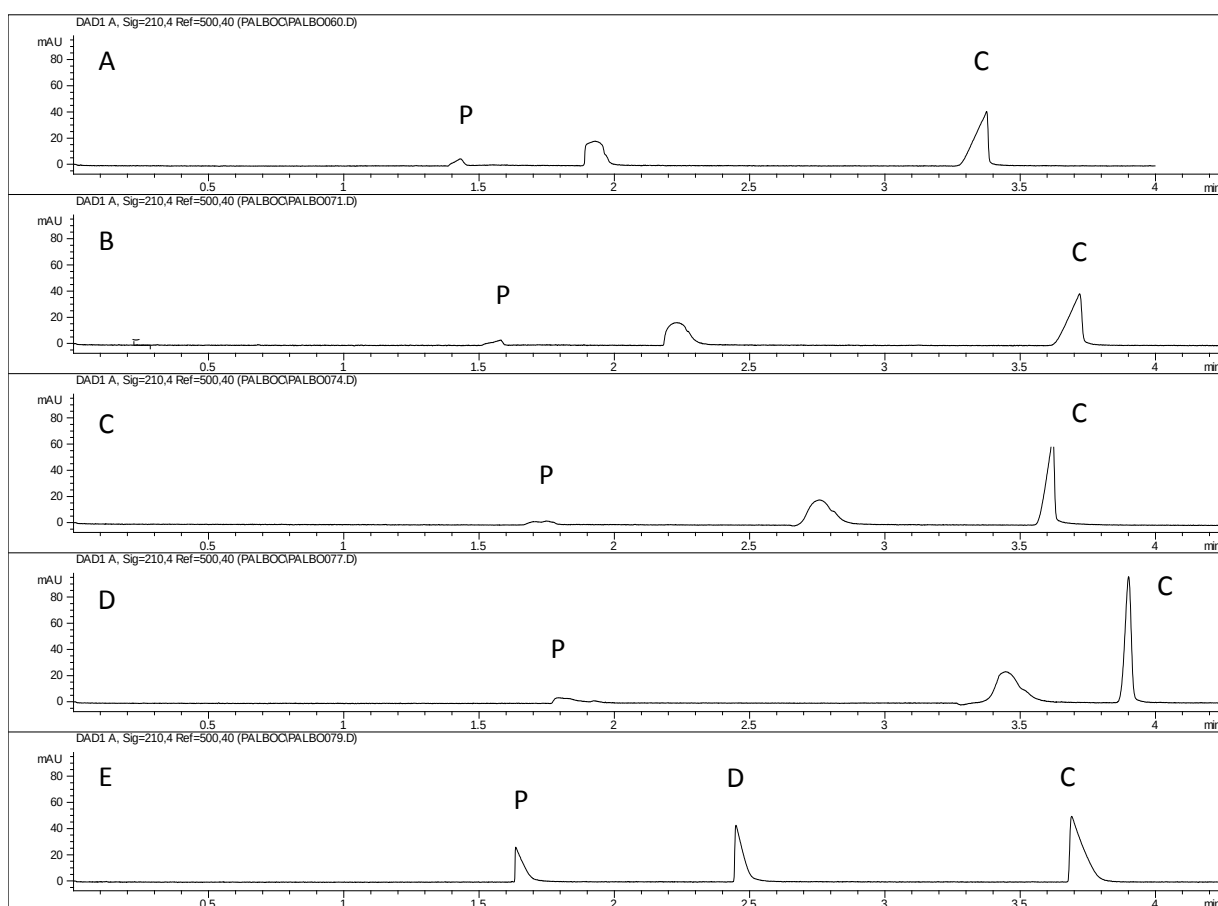
prema katodi, odnosno detektoru na kraju kapilare. To smo postigli visokim pH i deprotonacijom silanolnih skupina. Zbog relativno duge analize (palbociklib eluira nakon 5 min), nezadovoljavajućeg oblika i simetrije pika pri ovim uvjetima (Slika 3), isproban je 30 mM fosfatni pufer u pH rasponu od 2,5 - 6,71 (Slika 4). Pri ovom pH, palbociklib je protoniran i putuje kroz kapilaru bez dodatka surfaktanta, odnosno moguća je primjena kapilarne zonske elektroforeze. S druge strane tako nizak pH pufera ima utjecaj na silanolne skupine na unutrašnjoj stijenci kapilare, a nestalan i spor elektroosmotski tok koji se mogao očekivati, pokazao se i u eksperimentima. Velika odstupanja u vremenu migracije i površini pikova analita pokušali su se umanjiti optimizacijom ispiranja kapilare između analiza. Tako je uvedeno ispiranje s 10% fosfornom kiselinom, a nakon analize kapilara je ispirana s vodom. Također se pokazalo da je iznimno važno bilo zamijeniti pufer svake nekoliko analiza kako bi se osigurala stabilnost toka i ponovljivost metode.

Kao unutarnji standardi korišteni su diazepam i cefaleksin. Budući da je pKa vrijednost diazepama 3,4, pik je vidljiv samo na elektroferogramu u kojem je korišten pufer pH=2,5. Pri drugim korištenim pH vrijednostima pufera, diazepam je nenabijen i eluira zajedno s elektroosmotskim tokom. pKa vrijednosti cefaleksina su 2,56 za karboksilnu i 6,88 za amino skupinu. U rasponu pH=5,37-6,71 obje skupine su ionizirane, ali ukupno prevladava negativan naboj karboksilne skupine. Iz tog razloga, privučen pozitivnoj anodi eluira iza EOF. Pri pH pufera 2,5 situacija je suprotna. Budući da je $\text{pH} < \text{pKa}$ karboksilne skupine, ona je neionizirana. S druge strane amino skupina je u potpunosti protonirana i cefaleksin brzo putuje prema katodi.

Što je pH pufera bio viši, analiza je bila kraća zbog jačeg EOF, ali oblik pikova je bio vrlo loš. Kao najbolji izbor pokazao se pretpostavljeni pH=2,5. Simetrija, oblik pika i razlučivanje između pikova su dobri, a vrijeme analize je i dalje kratko (dvostruko nabijeni palbociklib eluira ispred EOF unutar 2 minute).



Slika 3 Elektroferogram standardne otopine palbocikliba (P) i salicilne kiseline (SK)
UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer s dodatkom 60 mM SDS-a, 30 kV, 25 °C, uzorak: smjesa 50 µg/ml standardne otopine palbocikliba, 50 µg/ml standardne otopine salicilne kiseline



Slika 4 Elektroferogrami otopine standarda palbocikliba (P), diazepama (D) i cefaleksina (C) pri različitim pH vrijednostima pufera: (A) pH=6,71, (B) pH=6,44 , (C) pH=5,97, (D) pH=5,37, (E) pH=2,5
UVJETI ANALIZE: 30 mM fosfatni pufer, 30 kV, 25 °C, uzorak: smjesa 50 µg/ml standardne otopine palbocikliba, 50 µg/ml standardne otopine diazepama i 50 µg/ml standardne otopine cefaleksina

4.2. Odabir koncentracije pufera

Jedan od čimbenika koji utječe na elektroosmotski tok je koncentracija, odnosno ionska jakost radnog pufera. Naime, s povećanjem iste, smanjuje se zeta potencijal na unutrašnjoj stijenci kapilare. To znači da se smanjuje elektroosmotski tok, a vrijeme migracije analita produljuje. Najčešće korištene koncentracije pufera su u rasponu od 30–50 mM. Moguće je koristiti i veće koncentracije (100–500 mM), no s oprezom jer povećanjem ionske jakosti pufera raste električna struja što može dovesti do Jouleovog zagrijavanja u kapilari.

Tijekom izrade ovog diplomskog rada, prvotne su analize vršene uz 30 mM fosfatni pufer. Pri toj koncentraciji, analize su bile izrazito neponovljive. Oblik i veličina pikova su se mijenjali svakom sljedećom analizom, a struja je bila niska (oko 50 μA) i promjenjiva. Isproban je fosfatni pufer koncentracije 50 mM, što je pozitivno utjecalo na gore navedene probleme. Pikovi su bili uži, struja je postala konstantna i porasla na 80 μA , ali je i dalje bila dovoljno niska da se izbjegne Jouleovo zagrijavanje.

4.3. Dodatak surfaktanta

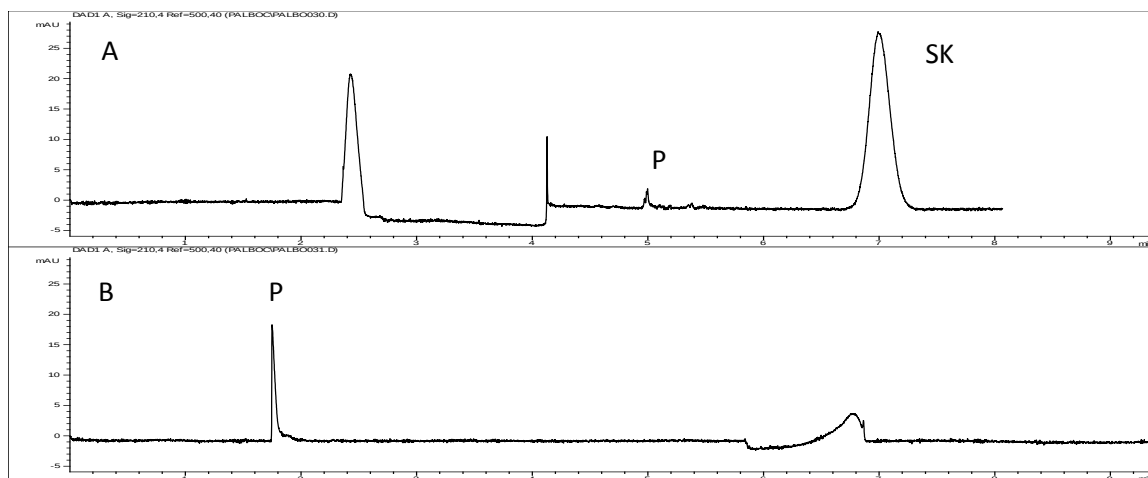
Micelarna elektrokinetička kromatografija koristi se za analizu neutralnih molekula koje su u uobičajenoj zonskoj elektroforezi nošene brzinom elektroosmotskog toka, ali se ne mogu razdvojiti jedne od drugih niti analizirati jer izlaze iz kapilare zajedno s elektroosmotskim tokom. U tu svrhu, u otopinu radnog pufera dodaju se površinski aktivne tvari koje iznad kritične micelarne koncentracije formiraju micle. Micle su sferične strukture s polarnim glavama koje su u kontaktu s puferom i hidrofobnim repovima okrenutim prema unutrašnjosti. Neutralni spojevi stupaju u različite interakcije s micelama koje predstavljaju pseudostacionarnu fazu te zbog njihovog naboja putuju kroz kapilaru. Vrijeme migracije ovisit će isključivo o koeficijentu raspodjele između micle i okolnog pufera. Što je spoj hidrofobniji, duže će se zadržavati u kapilari.

Zbog svoje dostupnosti i niske cijene, najčešće se koristi anionski surfaktant natrijev dodecilsulfat (SDS). Iako ga privlači anoda zbog svojeg negativnog naboja, nošen elektroosmotskim tokom putuje prema katodi i dolazi do detektora.

S druge strane nabijeni analiti u micelarnoj elektrokinetičkoj kromatografiji migriraju na temelju dva čimbenika, elektroforetske pokretljivosti samog analita na koju utječu naboj i veličina analita te koeficijenta raspodjele između micela i pufera koji pak ovisi o lipofilnosti.

Iako je palbociklib u odabranom pH pufera bio u ioniziranom stanju te ga se moglo analizirati CZE, isproban je dodatak surfaktanta zbog mogućnosti poboljšanja oblika i simetrije pika analita (Slika 5). Kao unutarnji standard u ovim eksperimentima korištena je salicilna kiselina. U micelarnoj elektrokinetičkoj kromatografiji salicilna kiselina eluira iza palbocikliba jer stupa u jače interakcije s micelama. Palbociklib kroz kapilaru putuje brže zbog dvostruko pozitivnog naboja i posljedično manje interakcija s lipofilnim micelama. pKa salicilne kiseline iznosi 3 i pri pH pufera 2,5 je nenabijena te ju nismo mogli detektirati koristeći kapilarnu zonsku elektroforezu.

S obzirom da je dodatak surfaktanta pogoršao oblik pika palbocikliba, smanjio osjetljivost metode i produljio vrijeme analize, u daljnjem radu nije uzet u razmatranje, a potraga za boljim unutarnjim standardom opisana je u sljedećem poglavlju.



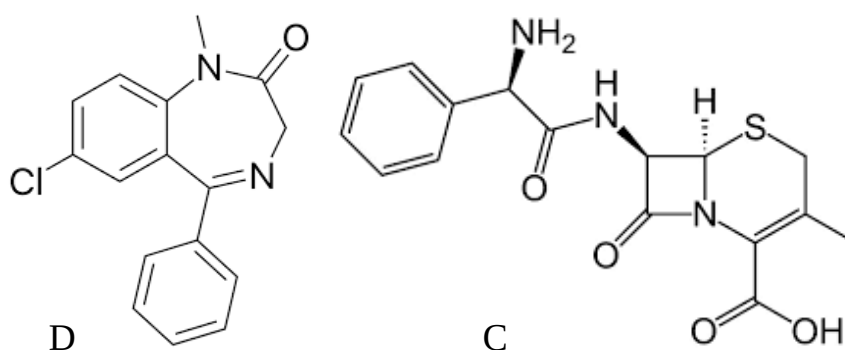
Slika 5 Elektroferogrami standardnih otopina palbocikliba (P) i salicilne kiseline (SK) ovisno o dodatku SDS pri (A) 30 mM fosfatni pufer pH=2,5 + 20 mM SDS i (B) 30 mM fosfatni pufer pH=2,5

UVJETI ANALIZE: 30 kV, 25 °C, uzorak: 111 µg/ml standardne otopine palbocikliba (P) i 50 µg/ml standardne otopine salicilne kiseline (SK)

4.4. Odabir unutarnjeg standarda

Unutarnji standard koristi se prvenstveno u kvantitativnoj analizi da se osigura preciznost i točnost analitičke metode. U kapilarnoj elektroforezi nužan je iz više razloga. Neki od njih su nestabilna unutarnja stijenka koja utječe na elektroosmotski tok, moguća adsorpcija analita na stijenkku, promjene u naponu i vrlo mala količina analita koja se prilikom analize injektira u nL volumenu što je čak za tri reda veličine niže od tekućinske kromatografije s kojom se kapilarna elektroforeza najčešće uspoređuje. Prilikom odabira unutarnjeg standarda traži se spoj koji ima sličnu strukturu analitu, odnosno fizikalno kemijska svojstva koja iz nje proizlaze.

U ovim eksperimentima isprobano je pet potencijalnih standarda: diazepam, sulfametoksazol, sulfatiazol, sulfadiazin i cefaleksin. Najprije smo analizirali standardne otopine lijekova samostalno pri pH radnog pufera koji se pokazao najboljim za analizu palbocikliba. Na temelju oblika pikova i vremena migracije ustanovljeno je da su najodgovarajući bili diazepam i cefaleksin. Njihove strukture prikazane su na Slici 6.



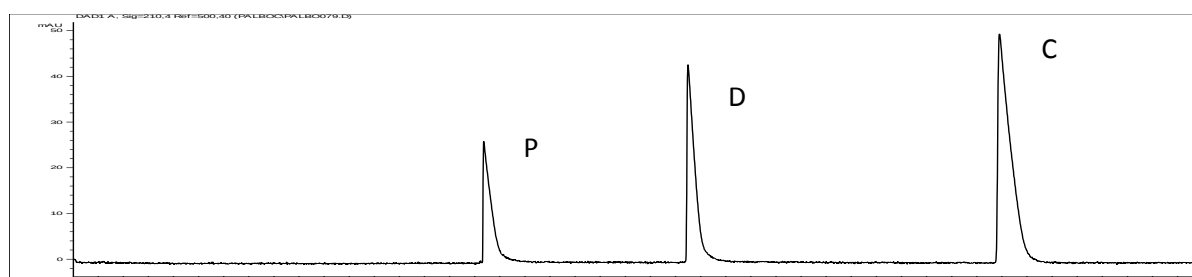
Slika 6 Kemijska struktura diazepam (D) i cefaleksina (C)

Diazepam posjeduje amino skupinu pKa 3,4, a cefaleksin amino skupinu pKa 6,88 i karboksilnu skupinu čiji pKa iznosi 2,56. U kiselom pH fosfatnog pufera sva tri analita bit će protonirana te će se u kapilarno zonskoj elektroforezi kretati prema detektoru. Kao što je već spomenuto, razlike u brzini putovanja analita ovisiti će o naboju i veličini iona. Iako relativna molekulska masa ne podrazumijeva nužno da molekula ima veći radijus, u tumačenju ovog

elektroferograma (Slika 7) pretpostavit ćemo da je tako. Palbociklib unatoč najvećoj relativnoj molekulskoj masi ($M_{rP} = 447,5$) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) ima najkraće vrijeme migracije zbog dvije protonirane amino skupine za razliku od cefaleksina i diazepama koji nose samo jedan pozitivan naboj. S druge strane čini se da u separaciji diazepama i cefaleksina ključnu ulogu ima razlika u veličini iona. Iako je pri $pH=2,5$ cefaleksin stopostotno ioniziran, značajno je veći od diazepama na što ukazuju i njihove relativne molekulske mase ($M_{rC} = 347,4$, $M_{rD} = 284,74$) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Iz tog razloga cefaleksin eluira nakon diazepama.

Pikovi diazepama i cefaleksina pri optimiziranim uvjetima bili su dobro odijeljeni od pika palbocikliba, oštri i simetrični. Iako cefaleksin ima najdulje vrijeme migracije, on eluira unutar 4 minute i ne produžuje značajno vrijeme analize, pa su u daljnjim ispitivanjima korištena oba unutarnja standarda kako bi se pronašao optimalan unutarnji standard za kapilarnozonsku elektroforetsku analizu palbocikliba.

Međutim ovaj sustav pokazao se nestabilnim što će biti spomenuto kasnije.



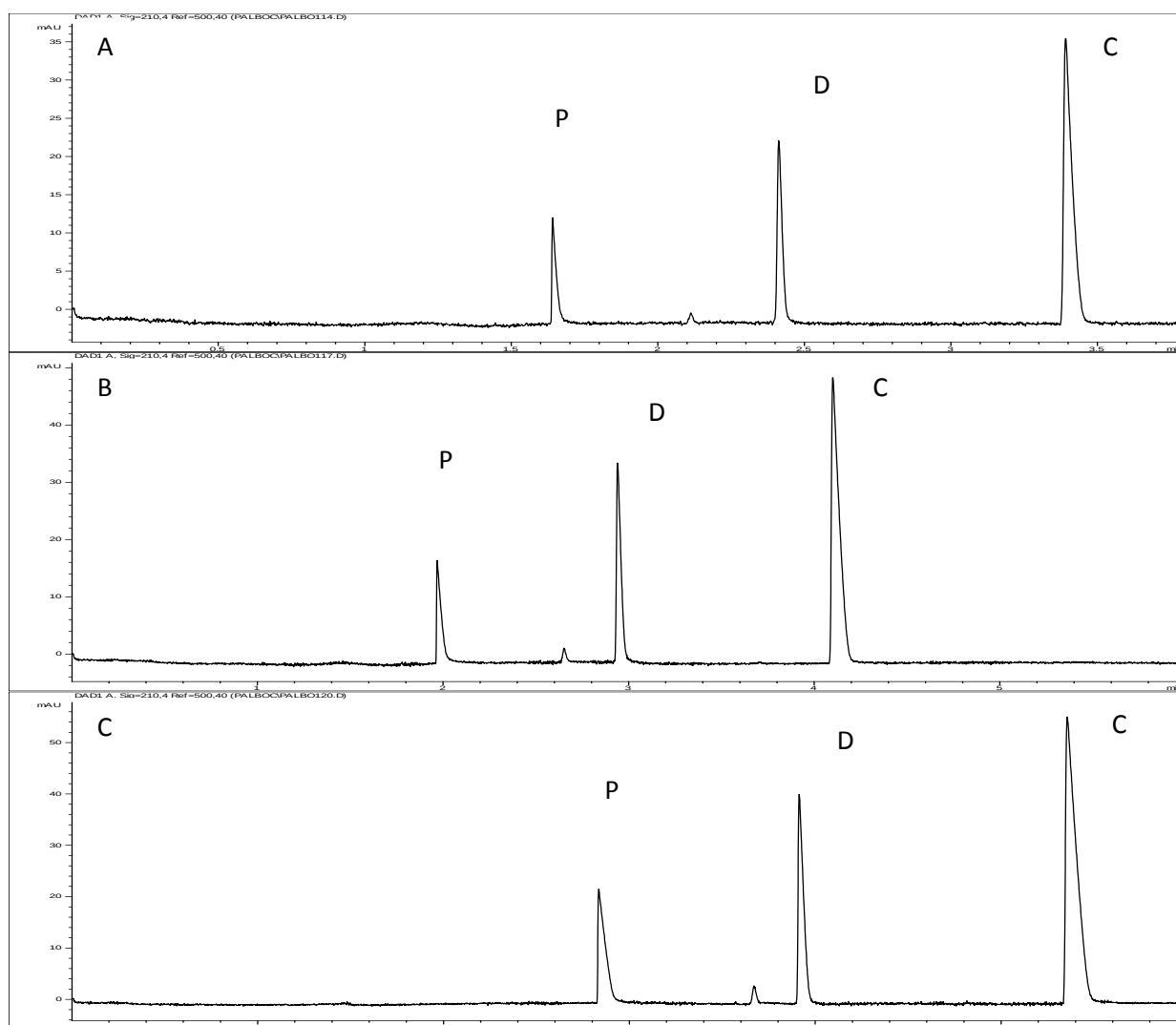
Slika 7 Elektroferogram smjese palbocikliba i unutarnjih standarda diazepama i cefaleksina
UVJETI ANALIZE: 30 mM fosfatni pufer $pH = 2,5$, 30kV, 25 °C, uzorak: 100 $\mu g/ml$ standardne otopine palbocikliba, 50 $\mu g/ml$ standardne otopine diazepama i 50 $\mu g/ml$ standardne otopine cefaleksina

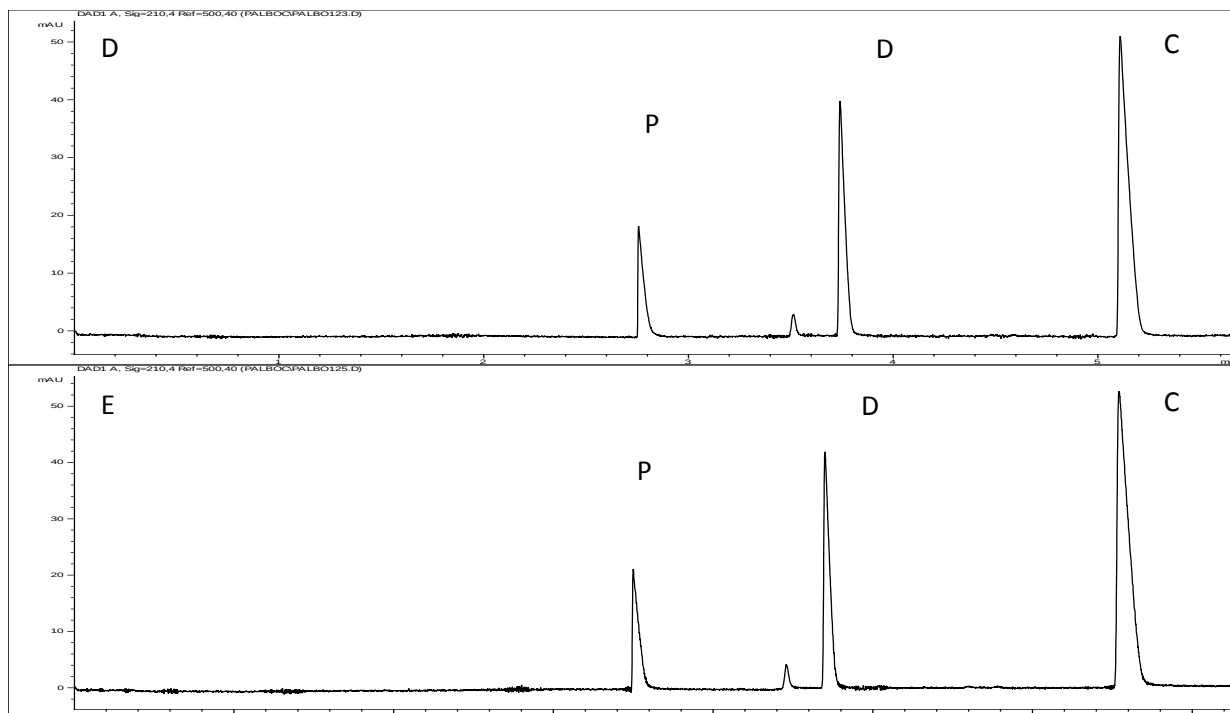
4.5. Promjena napona

Kod razvoja kapilarnoelektroforetske metode, promjena napona je važan čimbenik u optimizaciji jer bitno utječe na elektroosmotski tok i brzinu analita. Sukladno povećanju napona povećava se jakost električnog polja i ubrzava se elektroosmotska pokretljivost analita, ali i samog pufera. Promjenom napona, dakle, može se utjecati na brzinu analize. Budući da se u analitici uvijek teži što kraćem vremenu analize, najbolje bi ju bilo provoditi

pri što višem naponu. Međutim, pri visokom naponu nerijetko dolazi do takozvanog Jouleovog zagrijavanja. Kao posljedica porasta temperature u kapilari, može doći do neželjenog širenja zona analita. Još jedan od razloga povećanog opreza pri optimizaciji napona je smanjenje ionako male osjetljivosti metode koje se očituje smanjenjem površine pikova.

U svrhu ispitivanja utjecaja napona na vremena migracije i površine pikova, provedene su analize na 20, 22,5, 25, 27,5 i 30 kV u triplicatu. Dobiveni elektroferogrami prikazani su na Slici 8.

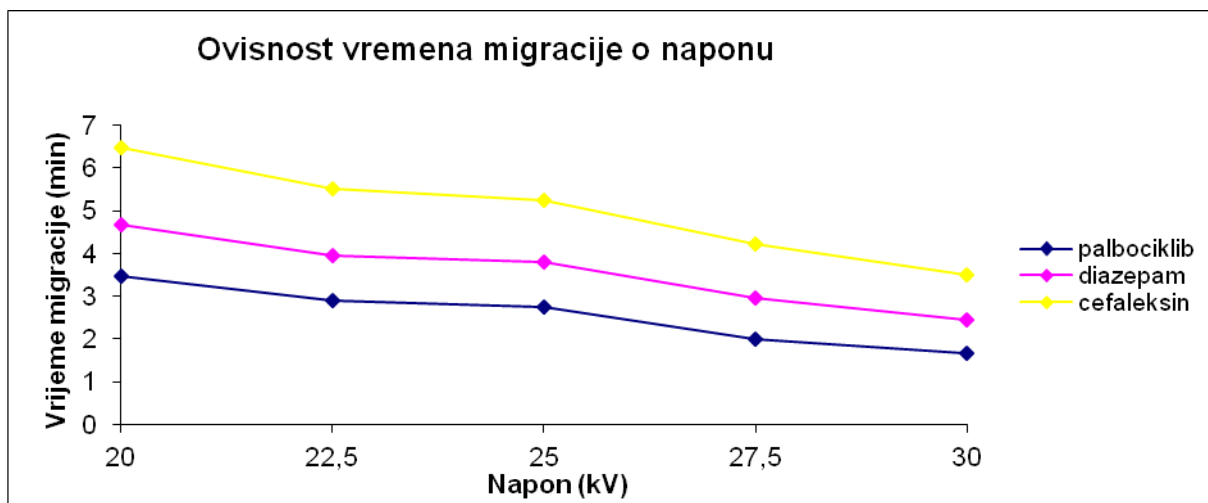




Slika 8 Elektroferogrami standardnih otopina palbocikliba (P), diazepama (D) i cefaleksina (C) u ovisnosti o naponu (A) 30 kV, (B) 27,5 kV, (C) 25 kV, (D) 22,5 kV, (E) 20 kV

UVJETI ANALIZE: 30 mM fosfatni pufer pH=2,5, 30kV, 25 °C, uzorak: 100 µg/ml standardne otopine palbocikliba, 50 µg/ml standardne otopine diazepama i 50 µg/ml standardne otopine cefaleksina

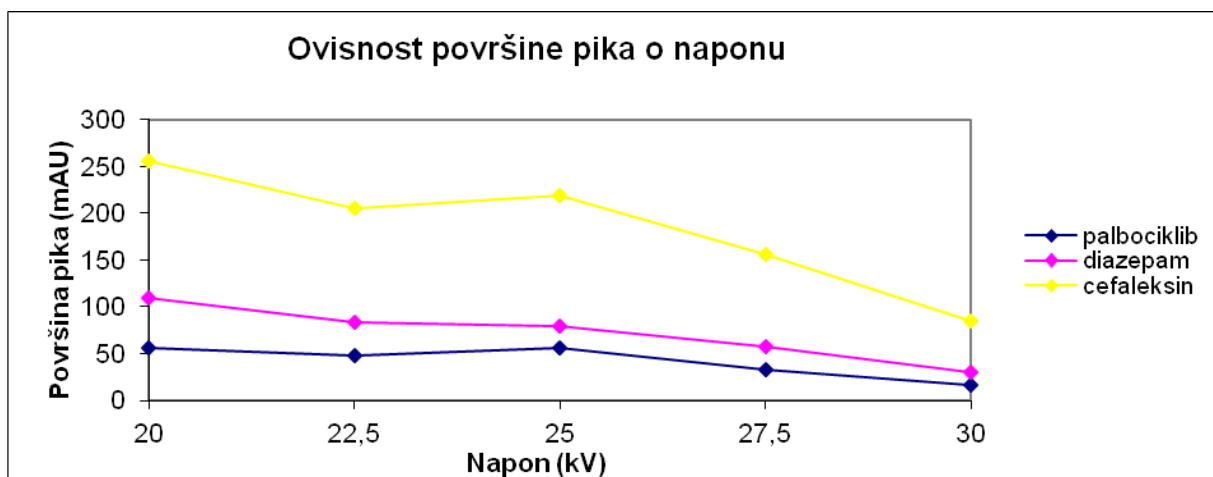
Iz grafičkog prikaza ovisnosti vremena migracije o naponu (Slika 9), vidljivo je da se s povišenjem napona s 20 kV na maksimalnih 30 kV čak upola skratilo vrijeme analize. Vrijeme migracije za palbociklib pri 20 kV iznosilo je 3,48 min, a pri 30 kV samo 1,67 min. Struja unutar kapilare pri najvišem naponu nije prelazila 90 µA pa je uspješno izbjegnuto Jouleovo zagrijavanje.



Slika 9 Graf ovisnosti vremena migracije palbocikliba, diazepama i cefaleksina o primjenjenom naponu

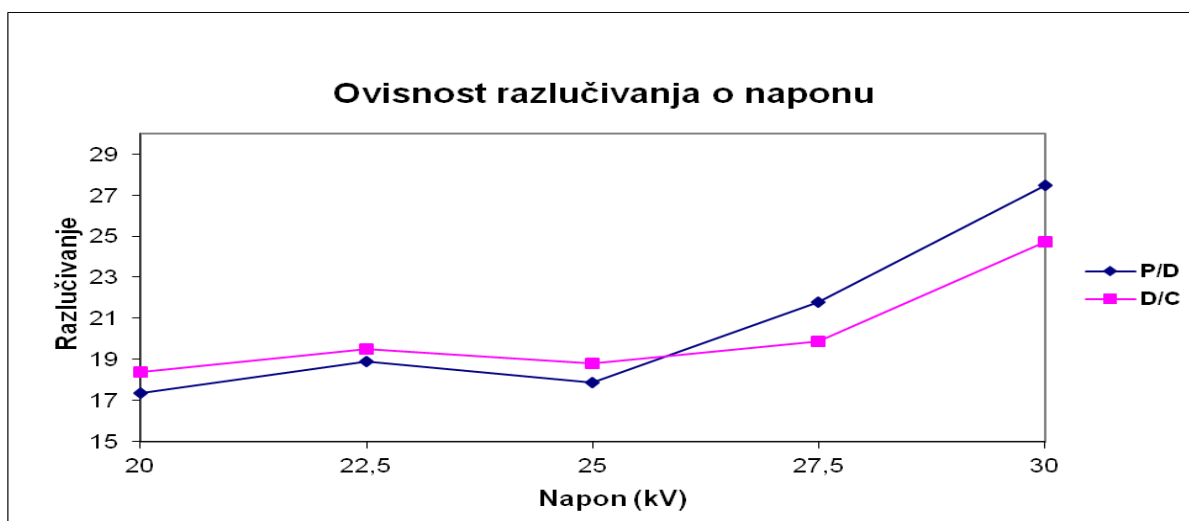
UVJETI ANALIZE: 50 mM boratni pufer, 25 °C, uzorak: 100 µg/ml standardne otopine palbocikliba, 50 µg/ml standardne otopine diazepama i cefaleksina

U skladu s opisanom teorijom kapilarne elektroforeze, na Slici 10 potvrđeno je pak smanjenje površine svih analita s porastom napona. S obzirom da je kapilarna elektroforeza brza metoda, cilj je osigurati što veću osjetljivost. Na temelju grafičkih prikaza i elektroferograma, napon od 25 kV daje dobar oblik i veličinu pika palbocikliba uz zadovoljavajuće vrijeme analize i razlučivanje od unutarnjih standarda ($R_s > 1,5$, Slika 11).



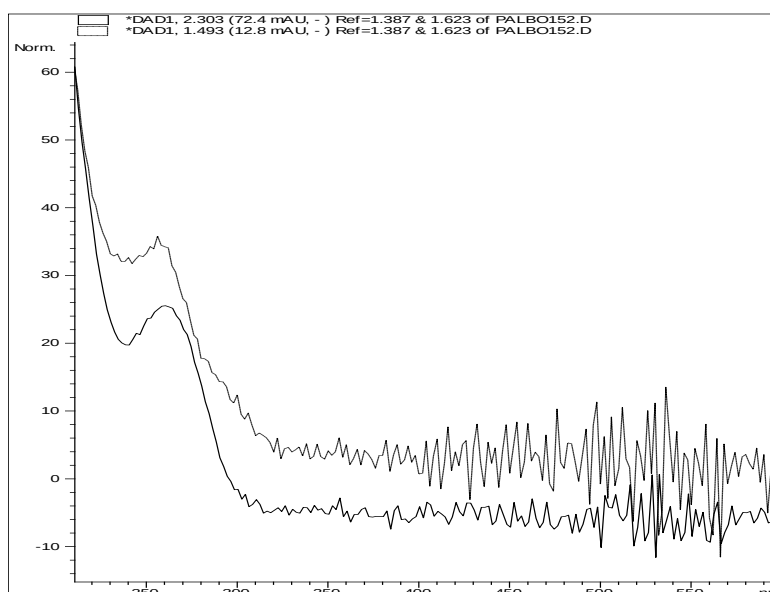
Slika 10 Graf ovisnosti površine pikova palbocikliba, diazepama i cefaleksina o primjenjenom naponu

UVJETI ANALIZE: 50 mM boratni pufer, 25 °C, uzorak: 100 µg/ml standardne otopine palbocikliba, 50 µg/ml standardne otopine diazepama i cefaleksina



Slika 11 Graf ovisnosti razlučivanja između analita o primjenjenom naponu
UVJETI ANALIZE: 50 mM boratni pufer, 25 °C, uzorak: 100 µg/ml standardne otopine palbocikliba (P), 50 µg/ml standardne otopine diazepama (D) i cefaleksina (C)

Tijekom optimizacije napona, na elektroferogramima uočen je dosad nepostojeći pik ispred pika diazepama. Uspoređujući UV spektar nepoznate tvari s UV spektrima ostalih analita, uviđena je sličnost s UV spektrom cefaleksina koja je upućivala na mogućnost razgradnje cefaleksina (Slika 12).



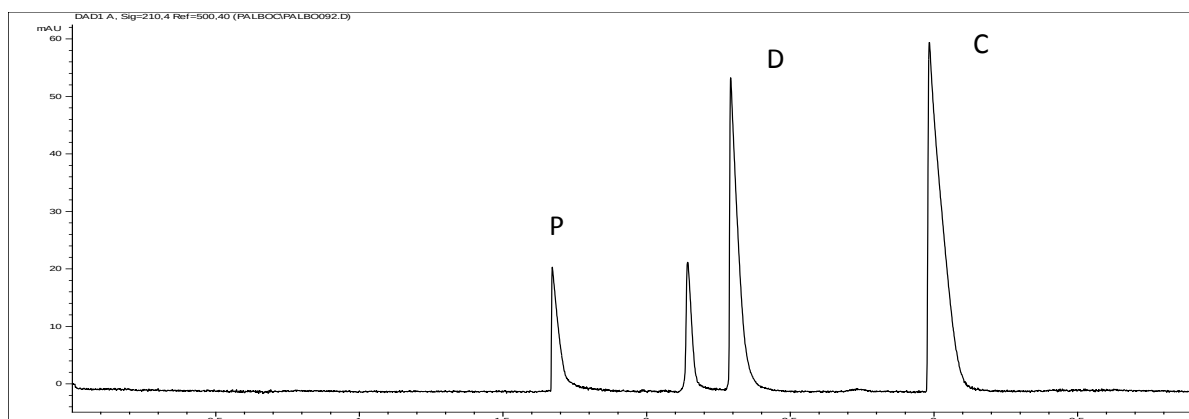
Slika 12 UV spektar cefaleksina i nepoznatog pika

Da bismo to provjerili, u vijalu smo otpipetirali standardnu otopinu cefaleksina i otapala u kojima su bili otopljeni palbociklib i diazepam te razrijedili s ACN i vodom u omjeru 1:1. Nakon par dana snimljen je elektroferogram na kojem se vidio samo pik cefaleksina što je ukazivalo na to da novonastali pik ipak nije njegov razgradni produkt.

Za svaki slučaj isto smo ponovili s diazepamom, a rezultat je bio isti.

Drugo objašnjenje je da je došlo do kemijske reakcije između unutarnjih standarda. Analizirana je vijala s uzorkom palbocikliba, cefaleksina i diazepama koja je čuvana par dana u frižderu na 4 °C. Na elektroferogramu (Slika 13) vidi se pik koji vremenom migracije i UV spektrom odgovara novonastalom piku, međutim vidno se povećao što znači da se povećala njegova koncentracija u smjesi.

S obzirom da je ovaj sustav nestabilan, u daljnjem razvoju metode bit će potrebno odabrati odgovarajući unutarnji standard.



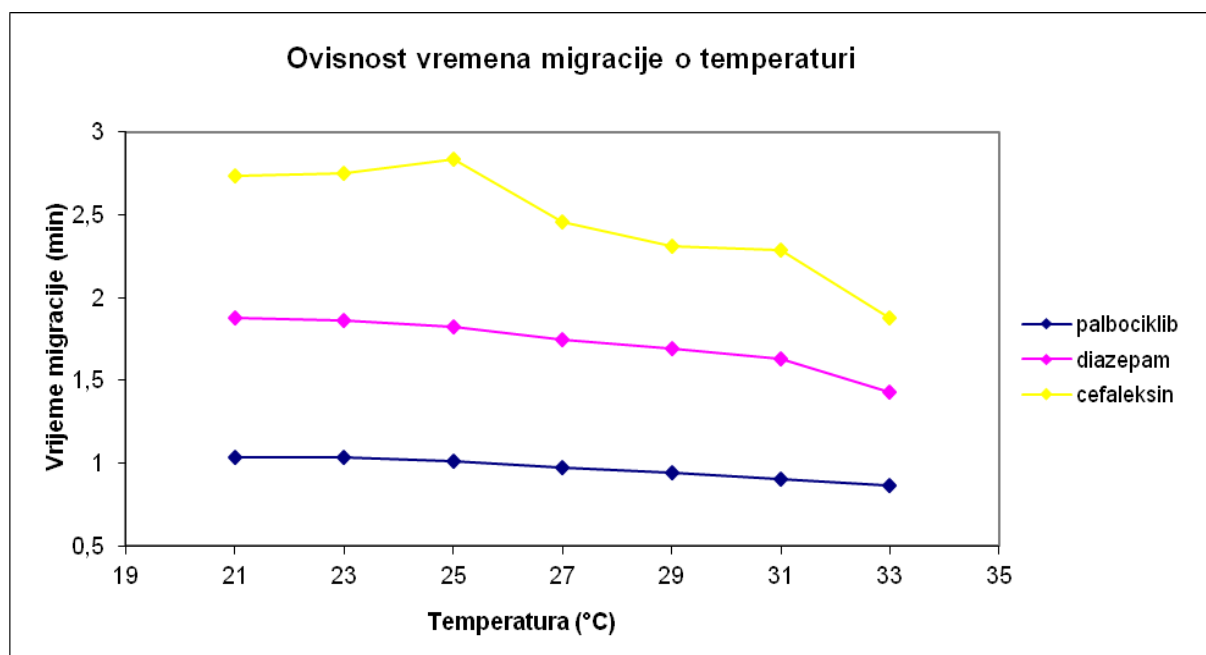
Slika 13 Elektroferogram smjese standardnih otopina palbocikliba (P), diazepama (D) i cefaleksina (C) nakon par dana stajanja u vijali
UVJETI ANALIZE: 50 mM fosfatni pufer pH=2,5, 25 °C, uzorak: 100 µg/ml standardne otopine palbocikliba, 50 µg/ml standardne otopine diazepama i cefaleksina

4.6. Promjena temperature

Promjenom temperature mijenja se viskoznost elektrolita, a time i EOF te vrijeme analize.

Ispitan je utjecaj temperature na brzinu analize u rasponu od 21 – 33 °C. Tijekom rada začepila se kapilara koju smo zatim morali skratiti. Međutim, nastavili smo rad s istom jer je ipak riječ o preliminarnom eksperimentu. Budući da analiti tada prelaze manji put do detektora, vremena migracije razlikovati će se od ostalih ispitivanja pri istim uvjetima.

Kao što je vidljivo na Slici 14, vremena migracije s povišenjem temperature imaju padajući trend. Iznimka je cefaleksin kojem je vrijeme migracije najveće na temperaturi od 25 °C i iznosi 2,84 min. Očekivano, pri 33 °C trajanje analize je najkraće: vrijeme migracije palbocikliba je 0,9 min, diazepam 1,43 min, a cefaleksin eluira unutar 1,9 min.

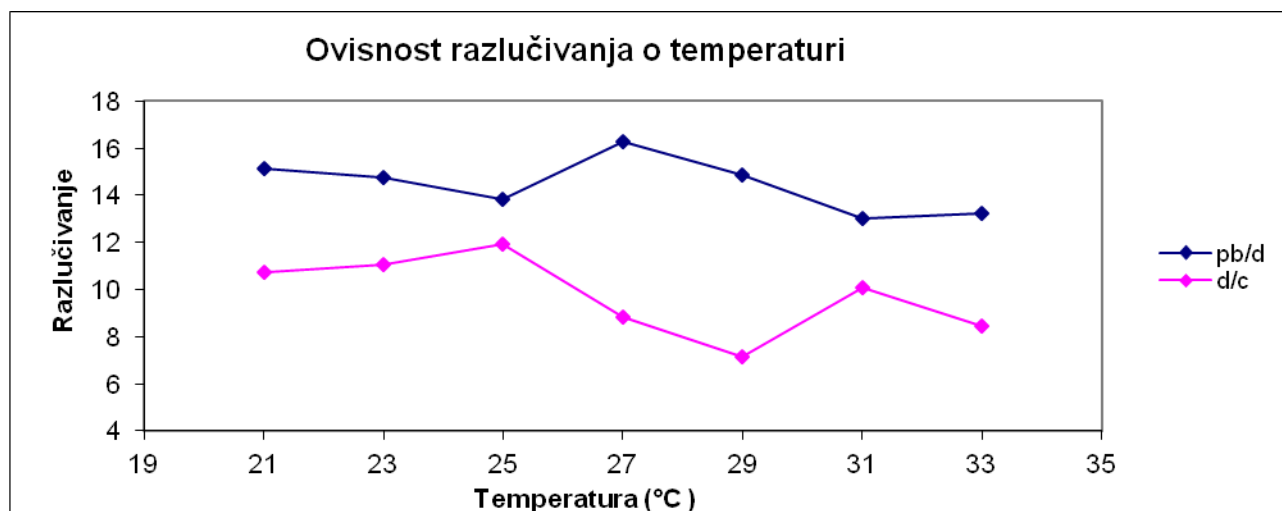


Slika 14 Graf ovisnosti vremena migracije o primijenjenoj temperaturi

UVJETI ANALIZE: 50 mM fosfatni pufer pH=2,5, 30 kV, uzorak: smjesa 100 µg/ml standardne otopine palbocikliba, 50 µg/ml standardne otopine diazepam i cefaleksina

Pri svim ispitivanim temperaturama, susjedni pikovi su dobro odijeljeni jedan od drugog što je prikazano na grafu ovisnosti razlučivanja o promjeni temperature (Slika 15). Najmanje

razlučivanje između palbocikliba i diazepama je na temperaturi od 31 °C i iznosi 13,04 , a između diazepama i cefaleksina na 29 °C i iznosi 7,1 što je i dalje puno iznad minimalne granice Rs od 1,5 za koju se smatra da omogućava dostatno razdvajanje pikova analita na baznoj liniji.



Slika 15 Graf ovisnosti razlučivanja o primijenjenoj temperaturi

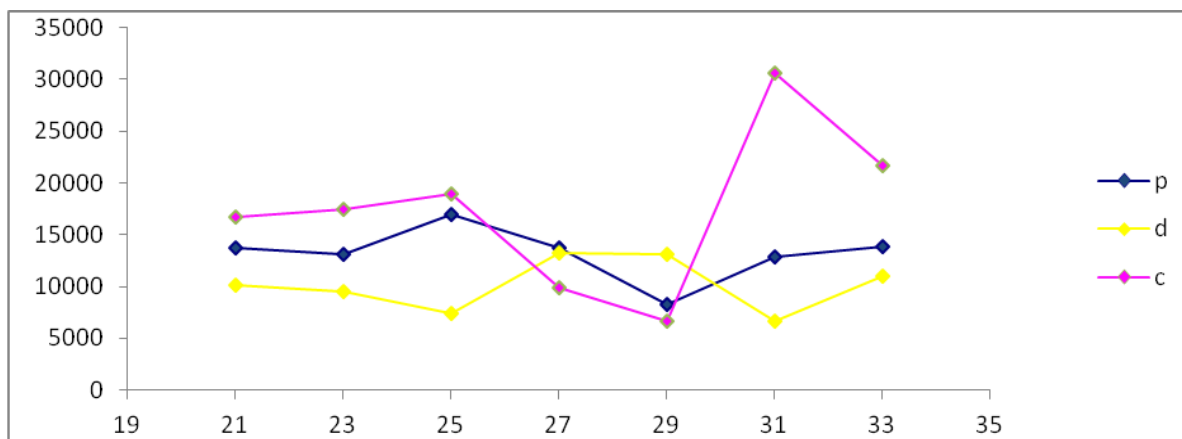
UVJETI ANALIZE: 50 mM fosfatni pufer pH=2,5, 30 kV, uzorak: smjesa 100 µg/ml standardne otopine palbocikliba, 50 µg/ml standardne otopine diazepama i cefaleksina

Prilikom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode, poželjno je pogledati broj teorijskih tavana u ovisnosti o raznim parametrima jer je on kvantitativni pokazatelj učinkovitosti kapilare, odnosno kromatografske kolone u tekućinskoj kromatografiji. Broj teorijskih tavana je matematički koncept, odnosno hipotetsko stanje u kojem se uspostavlja ravnoteža između nepokretne faze (kapilare) i pokretne faze (radnog pufera). Jednostavno se može odrediti iz elektroferograma prema izrazu:

$$N = 5,54 (t/w_{1/2})^2$$

gdje je t migracijsko vrijeme, a $w_{1/2}$ širina kromatografskog pika na polovici visine. Što je broj teorijskih tavana veći, kapilara je učinkovitija (Sertić, 2013).

Graf prikazuje da je za palbociklib analiza najučinkovitija na 25 °C, za diazepam na 27 °C, a cefaleksin na 31 °C (Slika 16).



Slika 16 Graf ovisnosti broja teorijskih tavana o primijenjenoj temperaturi

UVJETI ANALIZE: 50 mM fosfatni pufer pH=2,5, 30 kV, uzorak: smjesa 100 µg/ml standardne otopine palbocikliba, 50 µg/ml standardne otopine diazepama i cefaleksina

5. ZAKLJUČCI

Budući da je palbociklib nov lijek, postoji potreba za razvojem novih brzih i pouzdanih analitičkih metoda za detekciju i kvantifikaciju. U ovom istraživanju ispitivani su parametri za analizu palbocikliba kapilarnom elektroforezom.

Tijekom rada korišteni su boratni (pH=9) i fosfatni (pH u rasponu 2,5-6,71) radni pufer, a najoptimalnijim pokazao se fosfatni pufer pH=2,5. Problem neponovljivosti analiza riješen je povećanjem koncentracije radnog pufera s 30 mM na 50 mM, ispiranjem s 10 % fosfornom kiselinom, a između pojedinačnih analiza vodom te redovitim mijenjanjem pufera svakih nekoliko analiza.

Dodatak surfaktanta izrazito je nepovoljno utjecao na oblik pika, osjetljivost i vrijeme analize što je dovelo do zaključka da je zonska kapilarna elektroforeza najpogodnija za analizu palbocikliba.

Nadalje, primijećeno je da se smanjenjem napona povećala osjetljivost metode, ali na uštrb duljine trajanja analize. No, s obzirom da je pri svim promjenama napona (20-30 kV) trajanje analize palbocikliba bilo unutar 5 minuta, odlučujući faktor za odabir napona od 25 kV bio je oblik i površina pika.

Analize su provedene u kapilari duljine 35 cm, unutarnjeg promjera 50 μm pri 25 °C, s UV-Vis detektorom uz detekciju na 210 nm, a u daljnjim istraživanjima bit će potrebno pronaći odgovarajući unutarnji standard.

6. LITERATURA

American Cancer Society, 2020, <https://www.cancer.org/>, pristupljeno svibanj 2020.

Ban M, Strikić A, Petrić Miše B, Vrdoljak E. Uloga inhibitora CDK4/6 u liječenju hormonski ovisnog metastatskog raka dojke negativnog na HER2. *Liječnički vjesnik*, 2019, 141, 33-39.

Baza lijekova, <http://www.halmed.hr/>, pristupljeno 17.-19.05.2020.

Breast Cancer, <https://www.who.int/>, pristupljeno lipanj 2020.

Breast Cancer Facts, <https://www.europadonna.org/>, pristupljeno lipanj 2020.

Damjanov I, Jukić S, Seimwerth S. Patologija. 4. izdanje. Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 639-657.

Data base, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno svibanj 2020.

Hrvatska liga protiv raka, 2020, <http://hlpr.hr/>, pristupljeno svibanj 2020.

Ibrance (palbociclib), 2020, <https://www.pfizer.com/>, pristupljeno svibanj 2020.

Ibrance Public Assessment report, <https://www.ema.europa.eu/en>, pristupljeno lipanj 2020.

Kastelić N. Mogućnost rekonstrukcije bradavice i areole nakon mastektomije s poštedom kože kod pacijentica s rakom dojke. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2018.

Kovačević L, Patogenetski mehanizam hormonske rezistencije raka dojke. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2016.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Osnove patologije. Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 635-639.

Lauer HH, Rozing GP. High Performance Capillary Electrophoresis. A primer. Agilent Technologies, 2009.

Levanat S, Cvok Levačić M. Molekularna osnova raka dojke vezano uz gene BRCA1 i BRCA2: karakteristike i ciljana terapija. *Liječnički vjesnik*, 2010, 132, str. 4-37.

Nigović B. Kapilarna elektroforezaa. U: Analitika lijekova, Zagreb, 2018.

Nigović B, Sertić M. Onečišćenja u lijekovima. *Farm Glas*, 2012, 68, str. 77-88.

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

Onkologija, 2020, <http://www.onkologija.hr/>, pristupljeno svibanj 2020.

Podolski P, Tomek R, Vrbanec D. Znanjem protiv raka dojke, informacijska knjižica za bolesnice. 3. izdanje, Hrvatska liga protiv raka, 2015.

Rak dojke, 2014, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/>, pristupljeno travanj 2020.

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

Sertić M. Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom. Specijalistički rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2016.

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

Šercer D. Genetičko savjetovanje i testiranje na nasljedni rak dojke i jajnika. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2018.

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

7. SAŽETAK / SUMMARY

Cilj ovog istraživanja bio je razviti jednostavnu, brzu, osjetljivu i ekološki prihvatljivu kapilarnoelektroforetsku metodu za analizu relativno novog citostatika palbocikliba. S obzirom na bazični karakter palbocikliba, odabrana je zonska kapilarna elektroforeza uz dodatak unutarnjih standarda diazepama i cefaleksina. Analiza je provedena u kapilari duljine 35 cm, unutarnjeg promjera 50 μm , pri 25 °C. Tijekom optimizacije parametara, kao optimalan napon odabran je onaj od 25 kV, a analizi je pogodovao fosfatni radni pufer niskog pH=2,5 u koncentraciji od 50 mM.

Identifikacija i kvantifikacija lijekovitih tvari rutinski je postupak u kontroli lijekova, te bi se u budućnosti potencijal kapilarne elektroforeze i njene brojne prednosti (ekološka prihvatljivost, brzina i jednostavnost nakon razvoja metode i optimizacije parametara) zasigurno trebali više koristiti.

The main goal of this research was to develop a simple, fast, sensitive and ecologically acceptable capillary electrophoretic method for analysis of a relatively novel cytostatic drug palbociclib. Palbociclib has a basic character, therefore capillary zone electrophoresis has proven to be most apt. In order to minimize possible errors, diazepam and cefalexin were used as internal standards. The analysis was carried out in a 35 cm long capillary, with 50 μm internal diameter at 25 °C. Best results were shown when 25 kV voltage was applied and 50 mM phosphate buffer pH=2,5 was used.

Identification and quantification of therapeutic substances is a routine drug control procedure. It needs to be fast, simple and eco-friendly. Capillary electrophoresis has all of the listed advantages and we should definitely exploit its potential more in the future.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zavod za analitiku i kontrolu lijekova

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Analiza palbocikliba metodom kapilarne zonske elektroforeze

Dunja Bobić

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je razviti jednostavnu, brzu, osjetljivu i ekološki prihvatljivu kapilarnoelektroforetsku metodu za analizu relativno novog citostatika palbocikliba. S obzirom na bazični karakter palbocikliba, odabrana je zonska kapilarna elektroforeza uz dodatak unutarnjih standarda diazepama i cefaleksina. Analiza je provedena u kapilari duljine 35 cm, unutarnjeg promjera 50 μm , pri 25 °C. Tijekom optimizacije parametara, kao optimalan napon odabran je onaj od 25 kV, a analizi je odgovarao fosfatni radni pufer niskog pH=2,5 u koncentraciji od 50 mM.

Identifikacija i kvantifikacija ljekovitih tvari rutinski je postupak u kontroli lijekova, te bi se u budućnosti potencijal kapilarne elektroforeze i njene brojne prednosti (ekološka prihvatljivost, brzina i jednostavnost nakon razvoja metode i optimizacije parametara) zasigurno trebali više koristiti.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 16 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: rak dojke, palbociklib, kapilarna elektroforeza, optimizacija

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. Kristina Pavić, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, izv. prof. Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: srpanj 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb

Diploma thesis

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Department of Pharmaceutical Analysis

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Analysis of palbociclib by capillary zone electrophoresis

Dunja Bobić

SUMMARY

The main goal of this research was to develop a simple, fast, sensitive and ecologically acceptable capillary electrophoretic method for analysis of a relatively novel cytostatic drug palbociclib. Palbociclib has a basic character, therefore capillary zone electrophoresis has proven to be most apt. In order to minimize possible errors, diazepam and cefalexin were used as internal standards. The analysis was carried out in a 35 cm long capillary, with 50 μm internal diameter at 25 °C. Best results were shown when 25 kV voltage was applied and 50 mM phosphate buffer pH=2,5 was used.

Identification and quantification of therapeutic substances is a routine drug control procedure. It needs to be fast, simple and eco-friendly. Capillary electrophoresis has all of the listed advantages and we should definitely exploit its potential more in the future.

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

Thesis includes: 37 pages, 16 figures, 1 table and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords: breast cancer, palbociklib, capillary electrophoresis, optimization

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

Ocjenjivači: **Miranda Sertić, Ph.D.**, Assistant Professor, University in Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Kristina Pavić, Ph. D., Senior research assistant, University in Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali Čepo, Ph.D., Associate Professor, University in Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2020.