

# Izazovi razvoja MEKC metode za određivanje pirfenidona i 5-karboksipirfenidona u biološkom uzorku

---

Serdar, Laura

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:163:779002>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**



Repository / Repozitorij:

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



**Laura Serdar**

**Izazovi razvoja MEKC metode za određivanje  
pirfenidona i 5-karboksipirfenidona u  
biološkom uzorku**

**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 u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić.

*Prvenstveno se želim od srca zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Mirandi Sertić na pruženoj prilici za izradu diplomskog rada na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova. Hvala Vam na strpljivosti, povjerenju, optimizmu i izdvojenom vremenu, kako za eksperimentalni, tako i za teorijski dio diplomskog rada. Osim toga, veliko hvala asistentu Edvinu na savjetima i pomoći prilikom rada u laboratoriju, ali i kod pisanja samog rada.*

*Želim se zahvaliti i prijateljima i prijateljicama koji su bili uz mene kroz cijeli moj studij, a naposljetku i pisanju diplomskog rada. Ne znate koliko mi to znači!*

*Zahvaljujem se i dečku Marinu, na ljubavi, podršci i svemu što mi je u tom trenutku bilo potrebno!*

*I na kraju najveće hvala mojoj obitelji bez kojih ništa ne bi bilo moguće!*

# SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
1.1	Bioanalitička ispitivanja .....	1
1.2	Pirfenidon .....	3
1.3	Kapilarna elektroforeza .....	5
2	OBRAZLOŽENJE TEME .....	13
3	MATERIJALI I METODE .....	14
3.1	Materijali .....	14
3.1.1	Kemikalije .....	14
3.1.2	Standardi.....	14
3.1.3	Radni instrumenti .....	14
3.1.4	Pribor.....	14
3.1.5	Programski paketi.....	15
3.2	Metode .....	15
3.2.1	Priprema standardnih otopina.....	15
3.2.2	Priprema unutarnjeg standarda.....	15
3.2.3	Priprema bioloških uzoraka.....	15
3.2.4	Priprema otopina radnog pufera .....	16
3.2.5	Kapilarnoelektroforetski uvjeti analize .....	17
4	REZULTATI I RASPRAVA .....	18
4.1	Uspostavljanje optimalnih radnih uvjeta na standardima.....	18
4.2	Provođenje analiza na biološkim uzorcima .....	23
4.3	Razmatranje pika 5-karboksipirfenidona.....	32
4.3.1	Promjena napona na uzorcima .....	32
4.3.2	Provjera standardnih otopina.....	33
4.3.3	Naknadno „obogaćivanje“ uzorka.....	34
4.3.4	Postupak predorade uzorka .....	36
4.3.5	Dodatak acetonitrila .....	38
5	ZAKLJUČCI.....	43
6	LITERATURA .....	45
7	SAŽETAK / SUMMARY.....	48
	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

## POPIS KRATICA I SIMBOLA

ACN – acetonitril

AUC – površina pika (engl. *Area under curve*)

c – koncentracija

CE – kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*)

CMC – kritična micelarna koncentracija (engl. *Critical micelle concentration*)

CZE – kapilarna zonska elektroforeza (engl. *Capillary Zone Electrophoresis*)

DAD – detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*)

EOF – elektroosmotski tok (engl. *Electroosmotic flow*)

FBF – Farmaceutsko-biokemijski fakultet

FFP – svježa smrznuta plazma (engl. *Fresh frozen plasma*)

FVC – forsirani vitalni kapacitet (engl. *Forced vital capacity*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

IL-6 – interleukin-6

IPF – idiopatska plućna fibroza (engl. *Idiopathic Pulmonary Fibrosis*)

IS – unutarnji standard (engl. *Internal standard*)

LC-MS/MS – vezani sustav tekućinska kromatografija sa spektrometrijom mase (engl. *Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry*)

LLE – ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-liquid extraction*)

M – metabolit pirfenidona, 5-karboksipirfenidon

MEKC – micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija (engl. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*)

MeOH – metanol

NaOH – natrijev hidroksid

P – pirfenidon

PPT – taloženje proteina (engl. *Protein precipitation*)

SDS – natrijev dodecil-sulfat (engl. *Sodium dodecyl sulfate*)

SK – salicilna kiselina

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *Solid phase extraction*)

TGF- $\beta$  – transformirajući faktor rasta beta (engl. *Transforming growth factor  $\beta$* )

TNF- $\alpha$  – faktor nekroze tumora alfa (engl. *Tumor necrosis factor  $\alpha$* )

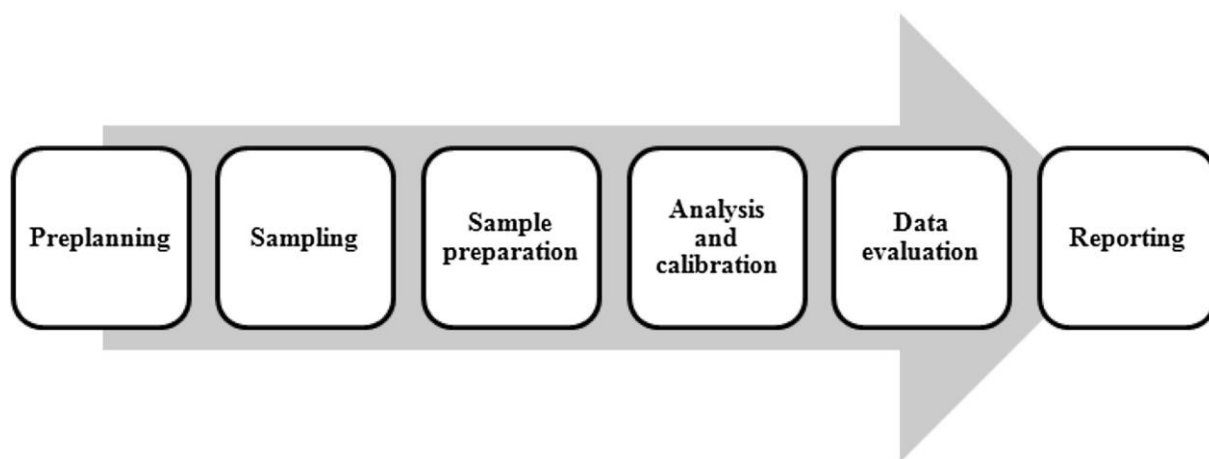
V-AL – postavke vakuum-alkohol (engl. *Vacuum-alcoholic*)

V-AQ – postavke vakuum-voda (engl. *Vacuum-aqueous*)

# 1 UVOD

## 1.1 Bioanalitička ispitivanja

Bioanalitika je grana analitike koja se bavi identifikacijom i određivanjem lijekova, metabolita, biomarkera i toksina u biološkim uzorcima. Ona je esencijalni dio otkrića i razvoja lijekova bez koje nije moguće napraviti toksikološku procjenu, ali i farmakokinetička i farmakodinamička ispitivanja. Sastoji se od dva dijela: identifikacije i kvantifikacije analita. Analiti su u pravilu male molekule poput lijekova i metabolita, ali je bioanalitikom moguće odrediti i velike molekule poput proteina i peptida. Sam postupak u bioanalitici uključuje nekoliko koraka od uzimanja uzoraka do analize uzoraka te obrade dobivenih podataka (Slika 1). Prvi korak je sakupljanje uzorka iz pretkliničkih i kliničkih ispitivanja i slanje tih uzoraka u laboratorij na analizu. Drugi korak obuhvaća predobradu uzorka što je ujedno jedan od najvažnijih koraka u bioanalitici, dok je zadnji korak analiza i identifikacija / kvantifikacija analita različitim tehnikama poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC), kapilarne elektroforeze (engl. *Capillary electrophoresis*, CE), imunokemijskim testovima, voltametrijom, itd. Tehnika izbora kvantifikacije analita je LC-MS/MS (engl. *Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry*) zbog svoje visoke selektivnosti i osjetljivosti. Osim toga, prije početka bioanalize potrebno je poznavati kemijsku strukturu i kemijska svojstva analita.



Slika 1 Shema bioanalitičkog ispitavanja (preuzeto iz: Moein i sur., 2016)

Bioanalitika je zahtjevna prvenstveno zbog složenosti biološkog uzorka kao što su krv, plazma, serum, slina, urin, cerebrospinalna tekućina, kosa, itd. Takvi uzorci imaju veliki udio različitih molekula (soli, kiseline, baze, stanice, proteine, lipide, lipoproteine, itd.) koje mogu interferirati u analizi ispitivanog analita (Moein i sur., 2016). Plazma, primjerice, sadrži značajnu količinu proteina (75 mg/ml) na koje se ispitivani analit može vezati, puna krv sadrži izvanstanične i stanične proteine (200 mg/ml) na koje se također analit od interesa može vezati, često na drugačiji način od proteina plazme, dok urin i cerebrospinalna tekućina sadrže, između ostalog, mnogo niže razine proteina (<1 mg/ml). No, pored proteina, endogeni spojevi kao što su fosfolipidi i masne kiseline prisutni u biološkim uzorcima mogu isto tako utjecati na razdvajanje i identifikaciju analita od interesa (Mulvana, 2010). Da bi se ti problemi otklonili, potrebna je temeljita i učinkovita predobrada uzorka prije injektiranja u analitički instrument. Uobičajene metode pripreme uzoraka u mnogim bioanalitičkim laboratorijima su taloženje proteina (engl. *protein precipitation*, PPT), ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid extraction*, LLE), ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, SPE). Pojednostavljeno, priprema uzorka je postupak koji ima za cilj selektivno izoliranje analita od interesa iz kompleksnog biološkog matriksa te minimiziranje / uklanjanje komponenata matriksa koje mogu biti interferencija te tako potencijalno utjecati na rezultate analize. Osim toga, potrebno je odabrati i odgovarajući detektor i unutarnji standard (engl. *internal standard*, IS). Odabir detektora ovisi o karakteristikama ispitivanog analita (veličina, struktura, polarnost, koncentracijski raspon, itd.) te o tehnici analize kompatibilnoj samoj detekciji, pa se u praksi najčešće koristi UV-Vis. UV-Vis je isplativ detektor, ali se može koristiti samo kad su u pitanju veće koncentracije analita ( $\mu\text{m}$  raspon) dok se za male količine uzorka i niske koncentracije analita (nm, pm) koristi pretežito maseni spektrometar. Međutim, da bi ispravili pogrešku uslijed gubitka analita ili varijaciju tokom obrade uzorka (npr. ekstrakcija, isparavanje), kromatografskog odjeljivanja i instrumentalne izvedbe (npr. mali volumeni ubrizgavanja), unutarnji standard (IS), koji ima ista ili slična fizikalno-kemijska svojstva ispitivanom analitu, dodaje se, prije predobrade uzorka, u kontrolni uzorak i „obogaćeni“ uzorak u jednakim koncentracijama (Moein i sur., 2016; Subramaniam, 2014). Stoga prilikom bioanalitičkih ispitivanja glavnu pozornost treba posvetiti samim biološkim uzorcima i njihovoj kvalitetnoj predobradi u cilju uklanjanja mogućih interferencija, osiguravanju ponovljivosti i pouzdanosti analize za namjeravanu upotrebu.

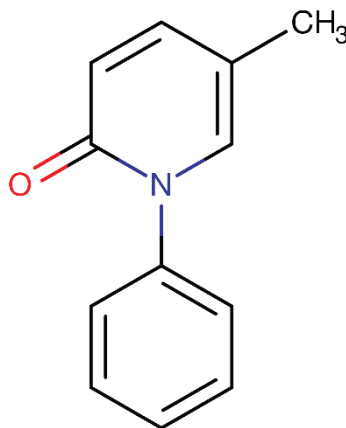


## 1.2 Pirfenidon

Pirfenidon (5-metil-1-fenilpiridin-2-on) je mala, sintetska, ne-peptidna molekula (Slika 2) koja se koristi u liječenju idiopatske plućne fibroze (IPF). To je kronična i nepovratna bolest pluća nepoznate etiologije s lošom prognozom. Procijenjeno preživljavanje nakon dijagnoze je otprilike 3 godine. Pojavljuje se najčešće kod muškaraca starijih od 60 godina, uglavnom pušača. Glavni simptomi su kratkoća daha i tvrdokoran kašalj (Margaritopoulos i sur, 2016; Hilberg i sur., 2012).

U početku se vjerovalo da je fibroza posljedica kronične upale, pa se bolest liječila protuupalnim lijekovima, npr. visokim dozama kortikosteroida (prednizolonom) te imunosupresivom (azatioprinom). Međutim, danas se smatra da je bolest rezultat interakcije između domaćina i okoliša u kojem upala može imati samo sporednu ulogu. Naime, dolazi do istodobne aktivacije više patogenih putova, aktiviranja miofibroblasta, pretjeranog taloženja izvanstaničnog matriksa, razvoja fibroze te posljedično nepovratnog gubitka funkcije pluća (Margaritopoulos i sur, 2016).

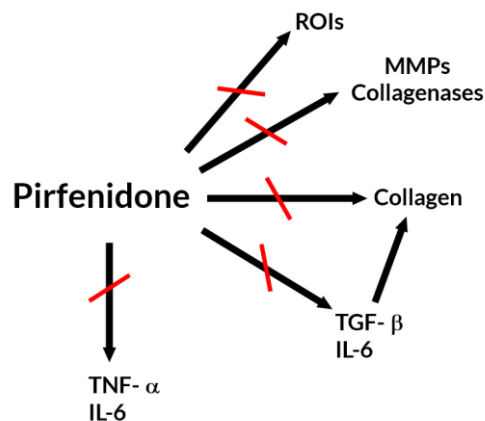
Nekadašnje liječenje bolesti bilo je ograničeno na palijativnu njegu i transplantaciju pluća, ali se situacija promijenila otkrićem lijeka pirfenidona (Jouneau i sur., 2019).



Slika 2 Struktura pirfenidona

Pirfenidon ima antifibrotičko, protuupalno i antioksidativno djelovanje. Iako točan mehanizam djelovanja pirfenidona nije u potpunosti razjašnjen, raznim prekliničkim studijama pokazalo se da djeluje na više različitih putova u organizmu. Neki od mogućih mehanizama pirfenidona prikazani su na Slici 3.

*In vitro* i *in vivo* pretklinička ispitivanja na miševima i hrčcima pokazala su da pirfenidon regulira aktivnost nekih od glavnih citokina, transformirajućeg faktora rasta beta (engl. *Transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ) i faktora nekroze tumora alfa (engl. *Tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ). Time je inhibirana proliferacija fibroblasta i sinteza kolagena (Hilberg i sur., 2012). Osim toga, s obzirom da ima i antioksidativna svojstva, primijećeno je da može djelovati kao sredstvo za uklanjanje slobodnih radikala, hidroksilnih (OH<sup>-</sup>) i superoksidnih aniona (O<sup>-</sup>). U mikrosomima jetre ovaca pirfenidon blokira lipidnu peroksidaciju ovisnu o NADPH (Margaritopoulos i sur., 2016).



Slika 3 Mogući mehanizmi pirfenidona u IPF-u IL-6, interleukin-6; TNF- $\alpha$ , faktor nekroze tumora- $\alpha$ ; ROI, reaktivne kisikove vrste; MMP-ovi, matriksne metaloproteinaze; TGF- $\beta$ , transformirajući faktor rasta- $\beta$

Dokazi o učinkovitosti pirfenidona pokazala su tri randomizirana, dvostruko slijepa, placebo kontrolirana klinička ispitivanja (u fazi III). To su dva ispitivanja CAPACITY i ispitivanje ASCEND registrirani na ClinicalTrials.gov, pod brojevima NCT00287729, NCT00287716 i NCT01366209. Ova ispitivanja pokazala su da pirfenidon značajno smanjuje stopu pada forsiranog vitalnog kapaciteta (engl. *Forced vital capacity*, FVC) kao i rizik od respiratorne hospitalizacije, ali i smanjuje smrtnost (Jouneau i sur., 2019). Između ostalog, tim studijama prijavljene su i najčešće nuspojave lijeka, one povezane s kožom (osip i fotoosjetljivost) i gastrointestinalne (mučnina, dispepsija, povraćanje i anoreksija). Kako bi se spriječile gastrointestinalne nuspojave, preporučuje se uzimati lijek tijekom obroka, a da bi se izbjegla fotoosjetljivost ne preporučuje se izlaganje suncu od prijepodne do kasno popodne (Margaritopoulos i sur., 2016).

Pirfenidon se uzima oralnim putem, lako se apsorbira iz gastrointestinalnog trakta s najvišom razinom u krvi nakon 1-2 sata, prelazi krvno-moždanu barijeru i eliminira se urinom u roku od 6 sati (Hilberg i sur., 2012). Njegova tri glavna metabolita su 5-karboksipirfenidon, 5-hidroksimetilpirfenidon i 4'-hidroksipirfenidon.

Za određivanje pirfenidona u biološkim uzorcima najčešće su korištene tehnika tekućinske kromatografije spregnute s tandem masenim spektrometrom (LC-MS/MS,) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) sa UV detekcijom (Desai i sur., 2014). Zbog različitih nedostataka ovih tehnika, one potencijalno nisu pogodne za intenzivnu praktičnu upotrebu jer zahtijevaju skupe i / ili dugotrajne pripreme uzoraka, velike količine uzorka, gradijentno ispiranje i dugotrajne analize. Međutim, postoji sve veća zainteresiranost za kapilarnu elektroforezu (CE) zbog njenih brzih, točnih, preciznih i jeftinih analiza. Jedini izazov kod analize lijeka pirfenidona s kapilarnom elektroforezom jest da je pirfenidon neutralna molekula. No taj problem je riješen primjenom micelarne elektrokinetičke kapilarne kromatografije (engl. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*, MEKC).

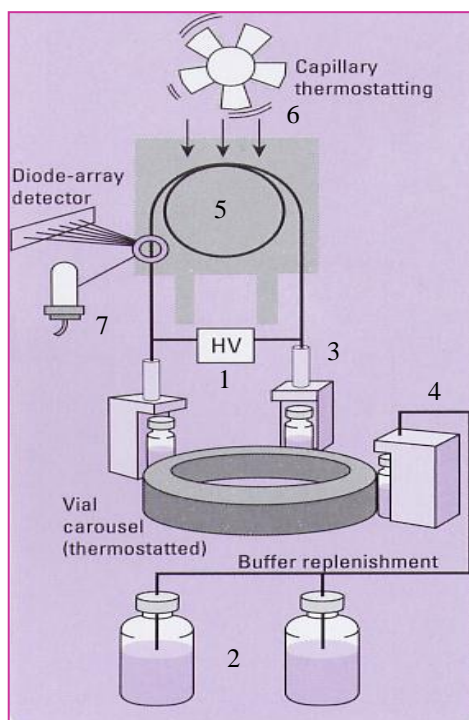
U usporedbi s objavljenim metodama HPLC-a, do sada objavljena MEKC metoda je jeftina i nezahtjevna, ima prihvatljivu osjetljivost i kratko vrijeme analize. Time se smatra atraktivnim pristupom za brzo i ponovljivo kvantitativno određivanje pirfenidona i njegovog glavnog metabolita 5-karboksipirfenidona (Sotgia i sur., 2019).

### **1.3 Kapilarna elektroforeza**

Kapilarna elektroforeza (CE) je separacijska tehnika. Njome je moguće analizirati sve vrste analita, od malih organskih molekula, iona i neutralnih molekula do velikih biomakromolekula, poput DNA i proteina, a rezultati su prikazani elektroferogramom. Uspješno se primjenjuje u analizi lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama (urin, plazma, serum) i tkivima. Kapilarna elektroforeza se najviše primjenjuje u farmaciji, ali osim toga i u molekularnoj biologiji, genetici, biokemiji, mikrobiologiji, virologiji i forenzici (Sertić, 2016). Za razliku od kromatografskih tehnika, CE zahtjeva malu potrošnju uzorka i otapala, prilagodljiva je te ima visoku moć razlučivanja i veliku učinkovitost razdvajanja (Kapnissi-Christodoulou, 2012; Nigović, 2018).

Osnovno načelo tehnike je migracija električki nabijenih čestica u uskoj kapilari prema jednoj od elektroda pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala (10-30 kV). Kao što je vidljivo iz samog naziva tehnike, kapilara je njen ključni dio. Primjenjuje se najčešće kvarcna kapilara ispunjena elektrolitnom otopinom pufera, a duljine mogu varirati od 10 do 110 cm unutarnjim promjerom od 50 do 300  $\mu\text{m}$ . O vrsti i dimenzijama kapilare ovisi učinkovitost razdvajanja, razlučivanje i obilježja signala te odaziv detektora. Detekcija analita se pak može odvijati izravno u kapilari (*on-line* detekcija) ili izvan nje, primjerice kod detektora spektrometrije masa, amperometrijskog ili konduktometrijskog detektora. Danas se u pravilu prakticira *on-line* detekcija detektorom s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector, DAD*) (Sertić, 2016).

Uređaj za kapilarnu elektroforezu je prilično jednostavan (osim visokog napona koji se primjenjuje), ali parametri u optimizaciji tehnike za separaciju analita mnogo su kompleksniji nego u HPLC-u (Watson, 2012). Shema uređaja prikazana je na Slici 4.



Slika 4 Shema uređaja za kapilarnu elektroforezu: visokonaponski izvor istosmjerne struje (1), spremnici za puferne (2), dvije elektrode (3), sustav za unošenje uzorka (4), kapilara (5), termostat (6), detektor (7); (preuzeto iz: Nigović, 2018).

Razdvajanje analita u kapilarnoj elektroforezi temelji se na različitim brzinama kojima čestice putuju kroz kapilaru, a opisano je izrazom (1):

$$v_{ep} = \mu_{ep}E \quad (1)$$

gdje je  $v_{ep}$  brzina putovanja iona,  $\mu_{ep}$  je elektroforetska pokretljivost čestice, a  $E$  je jakost primijenjenoga električnog polja.

Elektroforetska pokretljivost čestice,  $\mu_{ep}$ , definirana je izrazom (2):

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

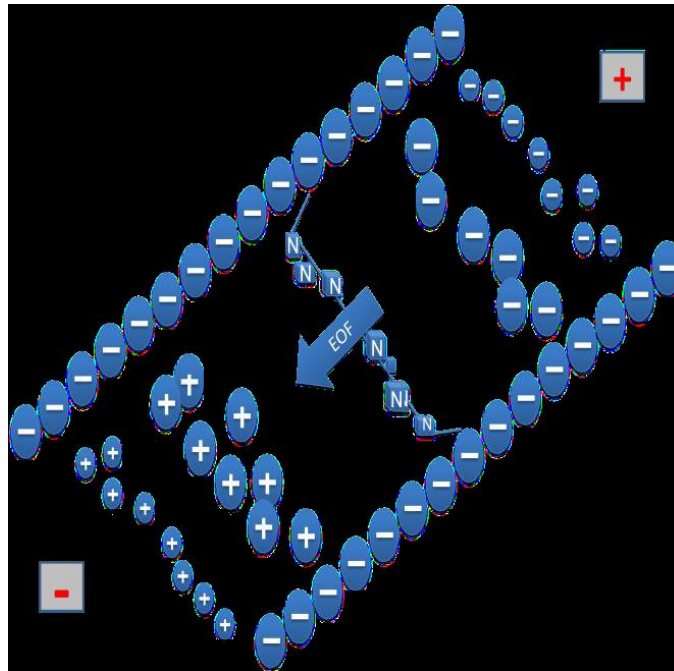
gdje je  $q$  naboj čestice,  $r$  polumjer čestice (Stokesov polumjer), a  $\eta$  viskoznost otopine elektrolita. Iz jednadžbe 2 vidljivo je da se elektroforetska pokretljivost povećava s nabojem iona, a obrnuto je proporcionalna polumjeru čestice. Jakost primijenjenoga električnog polja ( $E$ ) ovisi o primijenjenom naponu i duljini kapilare (3):

$$E = \frac{V}{L} \quad (3)$$

gdje je  $V$  primijenjeni napon u voltima, a  $L$  duljina kapilare u cm.

Iz navedenih jednadžbi vidljivo je da će analiti unutar kapilare putovati različitom brzinom, koja ovisi o njihovim svojstvima, kao i o duljini kapilare i primijenjenom naponu. No, iako se prema navedenim izrazima može zaključiti da se kapilarnom elektroforezom mogu isključivo analizirati nabijene čestice, to nije pravilo. Moguće je analizirati i neutralne spojeve. Naime, neutralni analiti će se kretati unutar kapilare nošeni tzv. elektroosmotskim tokom (engl. *electroosmotic flow*, EOF). EOF predstavlja tok čistog pufera u kapilari. Unutrašnja površina stijenske kvarcne kapilare sadrži brojne silanolne grupe koje ovisno o pH-vrijednosti elektrolita mogu biti više ili manje ionizirane. Pri pH vrijednostima 4,0 pa navise, EOF postaje značajan zbog porasta negativnog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare uslijed disocijacije većeg broja silanolnih grupa. Kad je kapilara ispunjena otopinom elektrolita, uz negativno nabijene silanolne skupine, elektrostatskim silama privučeni su pozitivno nabijeni ioni iz elektrolitske otopine, čime se stvara električni dvosloj. U čvrstom dijelu električnog dvosloja su kationi, nakon čega slijedi difuzijski dio, u kojem su i anioni i kationi. Kada se na krajevima kapilare primijeni napon, kationi u difuznom sloju privučeni su prema katodi, a za sobom nose i molekule vode koje ih okružuju, stvarajući elektroosmotski tok (Slika 5).

Zajedno s elektroosmotskim tokom bit će nošene i sve neutralne čestice uzorka te će tako izaći iz kapilare i biti detektirane (Nigović, 2018; Sertić, 2016).



Slika 5 Elektroosmotski tok (preuzeto iz: Sertić, 2016)

Brzina elektroosmotskog toka u kapilari,  $v_{eo}$  definirana je umnoškom elektroosmotske pokretljivosti pufera,  $\mu_{eo}$  i jakosti primijenjenog električnog polja,  $E$ , prema sljedećem izrazu (4):

$$v_{eo} = \mu_{eo}E = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \cdot \frac{V}{L} \quad (4)$$

iz kojeg je vidljivo da ovisi o dielektričnoj konstanti pufera,  $\varepsilon$ , zeta potencijalu na unutrašnjoj površini kapilare,  $\zeta$ , viskoznosti otopine elektrolita,  $\eta$ , te o primijenjenom naponu,  $V$ , kroz kapilaru duljine,  $L$ .

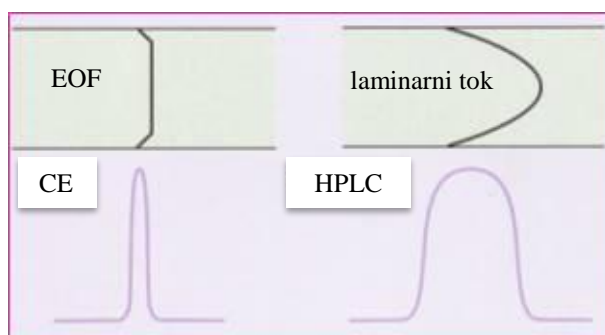
Kao što je prikazano na Slici 5, kationi putuju najbrže jer se zbog svoje elektroforetske pokretljivosti kreću u istom smjeru kao i EOF, odnosno prema negativno nabijenoj elektrodi, katodi. No zbog obrnute proporcionalnosti polumjera i elektroforetske pokretljivosti čestice, kationi manjeg polumjera putovat će brže od kationa većeg polumjera. Neutralne molekule putuju nošene elektroosmotskim tokom prema katodi kao neovisna zona, bez međusobnog razdvajanja, dok anioni zbog svog negativnog naboja bivaju nošeni prema pozitivno nabijenoj elektrodi, anodi, suprotno elektroosmotskom toku. Međutim, oni će također putovati prema

katodi jer je veličina EOF-a za više od jednog reda veličine veća od elektroforetske pokretljivosti aniona. Uz to će anioni najmanjeg polumjera putovati najsporije. Upravo je zbog elektroosmotskog toka moguće odvajanje svih analita, neovisno o njihovom naboju, što čini jednu od prednosti EOF-a, iako treba uzeti u obzir i ostale čimbenike koji na njega utječu (Tablica 1).

Tablica 1 Čimbenici koji utječu na elektroosmotski tok

<b>pH pufera</b>	EOF raste porastom pH
<b>Ionska jakost pufera</b>	EOF se smanjuje porastom ionske jakosti pufera
<b>Električno polje</b>	EOF raste porastom napona
<b>Temperatura</b>	EOF raste porastom temperature
<b>Organski modifikatori</b>	Smanjuju EOF, najčešće
<b>Površinsko aktivne tvari</b>	Anionske povećavaju, kationske smanjuju EOF
<b>Modificiranje unutrašnje stijenke kapilare</b>	Neutralni sloj smanjuje, ionski povećava EOF

Druga velika prednost EOF-a jest njegov ravan profil toka kroz kapilaru, što za posljedicu ima značajno manju disperziju zona analita, odnosno uske i oštre pikove, a time i bolje razlučivanje, odnosno veću učinkovitost same tehnike (Slika 6), za razliku od HPLC-a gdje se stvara laminarni ili parabolni tok te dolazi do širenja zona zbog različitih brzina kretanja iona iste vrste u ovisnosti o udaljenosti od unutrašnje stijenke kapilare.



Slika 6 Prikaz elektroosmotskog toka u CE i laminarnog toka u HPLC-u (preuzeto iz: Sertić, 2016)

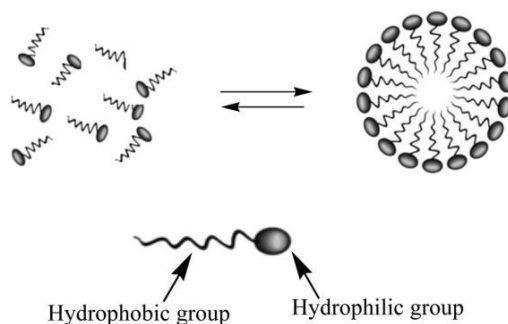
No, elektroosmotski tok, iako glavna pokretačka sila u kapilarnoj elektroforezi, ima i svoje nedostatke. Naime, elektroosmotski tok se tijekom uzastopnih analiza mijenja uslijed adsorpcije ispitivanih tvari na unutrašnju stijenku kapilare.

Zbog toga je potrebno optimizirati i ispiranja kapilare između dva mjerenja, kako bi se na taj način osigurala ponovljivost metode i spriječilo čak i moguće začepeljivanje te pucanje kapilare (Sertić, 2016).

Do danas je razvijeno više vrsta kapilarne elektroforeze temeljeno na različitim principima odvajanja: kapilarna zonska elektroforeza – CZE (zasnovana na razlikama između elektroforetske pokretljivosti analita), micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija – MEKC (razdvajanje neutralnih spojeva pomoću površinski aktivnih tvari), kapilarna gel elektroforeza – CGE (filtracija analita kroz gel mrežu), kapilarno izoelektrično fokusiranje – CIEF (razdvajanje zwitterionskih analita unutar pH gradijenta), kapilarna elektrokromatografija – CEC (odvajanje analita u kapilari punjenoj kromatografskom nepokretnom fazom). Najzastupljenije su kapilarna zonska elektroforeza i micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija (Hancu i sur., 2013). S obzirom da se u ovom diplomskom radu koristi MEKC, nadalje će biti više govora o njenom mehanizmu odjeljivanja.

Micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija je drugi najvažniji tip kapilarne elektroforeze kojim je, za razliku od kapilarne zonske elektroforeze, moguće analizirati i neutralne analite. Princip koji to omogućuje jest dodatak površinski aktivnih tvari, surfaktanata, u otopinu radnog pufera. Površinski aktivne tvari sastoje se od hidrofobnog repa ugljikovodičnog lanca i hidrofilne glave koja može sadržavati kationske, anionske, neutralne ili *zwitterion* skupine. Iznad kritične micelarne koncentracije (engl. *critical micelle concentration*, CMC), molekule surfaktanta će formirati micide, sferične nakupine (Slika 7), pri čemu se hidrofobni repovi orijentiraju prema središtu micide da bi izbjegli kontakt s hidrofilnim puferom, dok će polarne glave biti na površini u kontaktu s puferom.

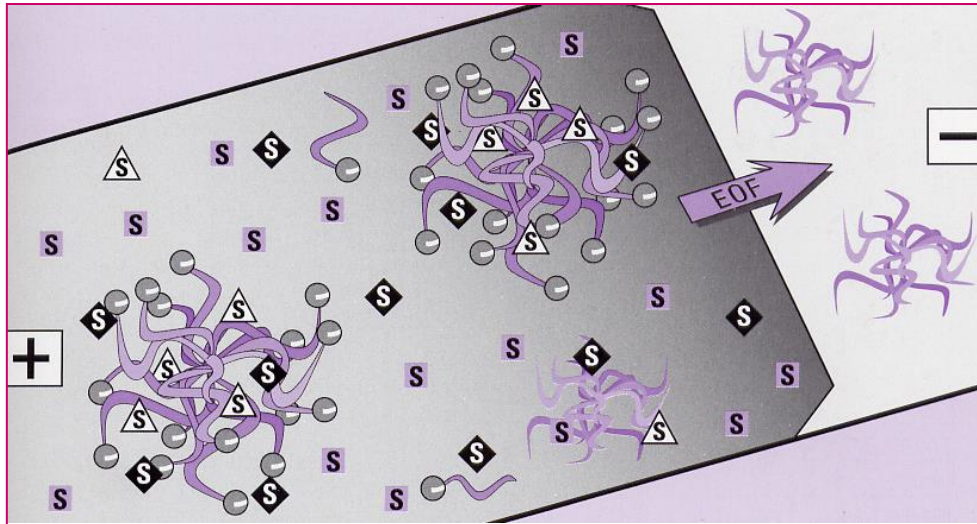




Slika 7 Građa micelle (preuzeto iz: Terabe, 1992)

Neutralni spojevi stupaju u različite interakcije s micelama zahvaljujući naboju na micelama putuju kroz kapilaru. Micele najčešće imaju određen naboj jer su molekule surfaktanta koje ih tvore, u najvećem broju slučajeva, nabijene. Premda postoji iznimno veliki broj različitih surfaktanata, u praksi se najviše koristi natrijev dodecil-sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS). Budući da je SDS anionski surfaktant, on je elektrostatski privučen prema pozitivno nabijenoj elektrodi, anodi, na injektorskom dijelu kapilare. Suprotno tome, EOF ima smjer od anode prema katodi, negativno nabijenoj elektrodi na detektorskom dijelu kapilare. Kako je EOF jači od elektroforetske pokretljivosti SDS-a, njegove micelle u konačnici se kreću prema katodi. Budući da analiti stupaju u različite interakcije s micelama putem hidrofobnih i elektrostatskih interakcija te tako tvore „pseudostacionarnu“ fazu, ova je tehnika na jedinstven način ujedinila elemente kromatografije i elektroforeze (Slika 8).

Kako brzina kretanja neutralnih analita ovisi samo o konstanti raspodjele između micelle i vodene otopine, što analit ima veću interakciju s micelom, dulje je njegovo vrijeme zadržavanja, s obzirom da ga micela vuče u smjeru suprotnom od EOF-a. Za nabijene analite brzina putovanja ovisi o konstanti raspodjele između micela i otopine pufera te o elektroforetskoj pokretljivosti samog analita. Anioni uglavnom ostaju u otopini pufera zbog elektrostatskog odbijanja s negativno nabijenom micelom SDS-a i putuju najbrže, a kationi eluiraju zadnji zbog jakih elektrostatskih interakcija sa micelom (Hancu i sur., 2013; Sertić, 2016).



Slika 8 Micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija (preuzeto iz: Nigović, 2018)

Micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija je učinkovita analitička tehnika zbog male potrošnje reagensa, visoke učinkovitosti i selektivnosti s razmjerno kratkim vremenom analize. Nažalost, tehnika još uvijek pati od slabe osjetljivosti zbog malog volumena ubrizgavanog uzorka (nl) i uskog optičkog puta definiranog unutrašnjim promjerom kapilare (najčešće 50  $\mu\text{m}$ ). Taj se problem nastoji otkloniti *on-line* metodama ukoncentriravanja uzorka, injektiranjem većeg volumena uzorka ili fokusiranjem analita u uske zone unutar kapilare (El Deeb, 2013).

## 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Optimizacija radnih uvjeta analize bioloških uzoraka predstavlja vrlo zahtjevan i dugotrajan proces, ne samo kod tehnike kapilarne elektroforeze, već i svake analitičke metode. Samim time što su biološki uzorci vrlo kompleksni zahtijevaju detaljnu predobradu, te je potrebno osigurati detekciju i kvantifikaciju već ionako niske koncentracije ispitivanog analita što predstavlja veliki analitički izazov.

U ovom diplomskom radu, analiti od interesa su pirfenidon i njegov glavni metabolit, 5-karboksipirfenidon. Inače lijek u terapiji vrlo rijetke bolesti, idiopatske plućne fibroze, kojom se pirfenidon svrstava u skupinu tzv. lijekova siročadi (engl. *orphan drugs*). Iz tog razloga, samo istraživanje i razvoj takvih lijekova je skupo, dugotrajno i ponekad neprofitabilno s obzirom da su ti lijekovi namijenjeni za liječenje malog broja ljudi.

Cilj ovog diplomskog rada je postaviti optimalne radne uvjete za istovremenu analizu lijeka pirfenidona i njegovog metabolita, 5-karboksipirfenidona u biološkim uzorcima, plazmi i serumu, primjenom kapilarne elektroforeze.

## **3 MATERIJALI I METODE**

### **3.1 Materijali**

#### **3.1.1 Kemikalije**

- Acetonitril (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Natrijev tetraborat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Otopina natrijeva hidroksida, 1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanjem vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

#### **3.1.2 Standardi**

- 5-karboksipirfenidon (Toronto Research Chemicals, Kanada)
- Pirfenidon (Toronto Research Chemicals, Kanada)
- Salicilna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

#### **3.1.3 Radni instrumenti**

- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Mini-Centrifuge 600 rpm (IKA-Werke, Staufen, Njemačka)
- Mini-Vortex (IKA-Werke, Staufen, Njemačka)
- Sustav za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Elmasonic XtraTT, Singen, Njemačka)
- Uređaj za kapilarnu elektroforezu (G1600A) s integriranim detektorom niza dioda (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

#### **3.1.4 Pribor**

- Bočice za uzorkovanje 2,0 ml sustavom za kapilarnu elektroforezu (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Eppendorf tubica 1,5 ml (Eppendorf, Hauppauge, SAD)
- Injekcijski membranski Acrodisc GHP filteri, veličina pora 0,2  $\mu\text{m}$ , promjer 26 mm (Gelman, Ann Arbor, SAD)

- Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 36 cm, duljine do detektora 27 cm, unutrašnjeg promjera 50  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Pipete, model Pipet-Lite XLS (Rainin Instrument LLC, Oakland, CA, SAD)

### 3.1.5 Programski paketi

- ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- Microsoft® Office Word 2003 (Microsoft, Seattle, SAD)

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprema standardnih otopina

Matične standardne otopine pirfenidona i njegovog metabolita 5-karboksipirfenidona pripremljene su vaganjem odgovarajuće količine standarda i otapanjem u odmjerne tikvici od 5,0 ml u vodi kako bi se postigla koncentracija 1 mg/ml. Sve matične standardne otopine čuvale su se u hladnjaku na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Radne standardne otopine korištene za optimizaciju metode i analize s biološkim uzorcima pripremane su svaki četvrti dan dodatkom odgovarajuće količine matične standardne otopine pirfenidona i 5-karboksipirfenidona te unutarnjeg standarda salicilne kiseline i razrjeđivanjem do odgovarajuće koncentracije vodom.

### 3.2.2 Priprema unutarnjeg standarda

Unutarnji standard izabran je prethodnim ispitivanjima na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (Parag, 2019). Korištena je salicilna kiselina čija se otopina priredila otapanjem odgovarajuće količine salicilne kiseline u odmjerne tikvici od 5,0 ml i dopunjavanjem vodom do oznake kako bi konačna koncentracija bila 1 mg/ml. Čuvana je također u hladnjaku na  $+4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3 Priprema bioloških uzoraka

Analizirani biološki uzorci u ovom diplomskom radu su plazma i serum koji su uzeti od dobrovoljnih davatelja krvi. Svježa smrznuta plazma (engl. *fresh frozen plasma*, FFP), kao i serum čuvani su u dubokom zamrzivaču na  $-80^{\circ}\text{C}$  (Basu i Kulkarni, 2014), a prilikom korištenja za analize odleđeni su stavljanjem u ultrazvučnu kupelj 5-10 minuta.

Prilikom analize bioloških uzoraka, napravljeni su „obogaćeni“ uzorci bilo plazme bilo seruma, na način da se u biološki uzorak dodaje određena količina matičnih standardnih otopina pirfenidona, njegovog metabolita 5-karboksipirfenidona i unutarnjeg standarda salicilne kiseline. Te je osim toga potrebno uz svaki „obogaćeni“ uzorak pripremiti i kontrolni uzorak bez dodatka matične standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline.

Kontrolni uzorak plazme napravljen je uzimanjem 50 µl plazme uz dodatak 150 µl ACN potrebnog za taloženje proteina. Zatim je taj uzorak promiješan minutu na mini-vortexu i nakon toga centrifugiran 10 minuta na mini-centrifugi. Kad je centrifugiranje gotovo, 170 µl supernatanta prebačeno je u novu bočicu i stavljen na koncentrator. Postupak ukoncentriravanja provodio se postupno, sve do konačnog dobivanja suhog ostatka. Prvo je koncentrator stavljen na postavke vakuum-alkohol (engl. *vacuum-alcoholic*, V-AL) na pola sata pa zatim na postavke vakuum-voda (engl. *vacuum-aqueous*, V-AQ) najprije sat, pa još sat i 10 minuta, te sutradan (nakon što je bilo u hladnjaku na +4°C preko noći) dodatnih petnaest minuta. Suhi ostatak otopljen je u 50 µl vode.

„Obogaćeni“ uzorak plazme napravljen je uzimanjem plazme volumena 50 µl uz dodatak po 2 µl standardne otopine pirfenidona ( $c=1$  mg/ml), njegovog metabolita 5-karboksipirfenidona ( $c=1$  mg/ml) i unutarnjeg standarda salicilne kiseline ( $c=1$  mg/ml) te istaložen s 144 µl ACN. Nakon toga, uzorak je promiješan minutu na mini-vortexu, centrifugiran 10 minuta te potom 170 µl supernatanta uzeto je dalje u postupak ukoncentriravanja na koncentratoru. Suhi ostatak otopljen je u 42,5 µl vode do konačne koncentracije analita od 40 µg/ml.

Na isti način pripremljeni su i kontrolni i „obogaćeni“ uzorak seruma.

### **3.2.4 Priprema otopina radnog pufera**

Boratni pufer (pH 9,3) pripremljen je otapanjem odgovarajuće količine natrijevog tetraborata u odmjernoj tikvici 10,0 ml nadopunjavanjem do oznake vodom kako bi konačna koncentracija bila 100 mM. Kako bi se pospješilo otapanje krutog natrijevog tetraborata, otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 5 minuta.

Otopina surfaktanta natrijevog dodecil-sulfata (SDS) konačne koncentracije 100 mM pripremljena je u odmjernoj tikvici od 50,0 ml otapanjem odgovarajuće količine SDS-a u vodi. Otopina je stavljena na ultrazvučnu kupelj na 5 minuta radi boljeg otapanja.

Matične otopine pufera i surfaktanta čuvane su na sobnoj temperaturi. One su neposredno prije pripreme radnih pufera za analizu profiltrirane kroz membranski filter (promjer 0,2  $\mu\text{m}$ ). Otopine radnih pufera pripremljene su svakodnevno neposredno prije analize miješanjem odgovarajućeg volumena odabranog pufera, otopine SDS-a i vode.

### 3.2.5 Kapilarnoelektroforetski uvjeti analize

Prije prvog korištenja kapilara je aktivirana ispiranjem 5 minuta sa metanolom, 15 minuta sa 1 M natrijevim hidroksidom (NaOH), vodom 10 minuta i otopinom radnog pufera 20 minuta. Svakodnevno je kapilara ispirana 10 minuta sa 0,1 M NaOH, 10 minuta vodom te 10 minuta otopinom svježe pripremljenog radnog pufera. Između analiza ispiralo se 10 minuta otopinom radnog pufera. Time se omogućavalo uklanjanje svih adsorbiranih analita nakupljenih iz prethodnih analiza i postizanje ioniziranosti silanolnih skupina unutrašnje stijenke kapilare.

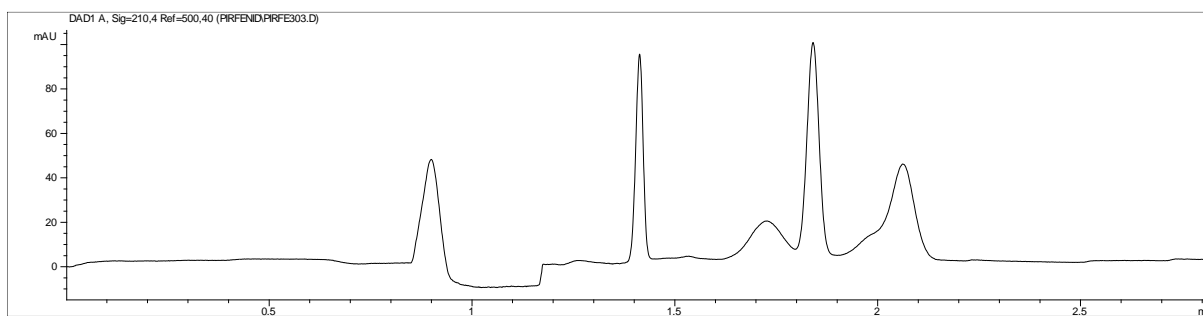
Sve analize su provedene na uređaju za kapilarnu elektroforezu uz kvarcnu kapilaru, duljine 36 cm i unutrašnjeg promjera od 50  $\mu\text{m}$ . Korištena je kapilara s produljenim optičkim putom, tzv. *bubble cell* kapilara. Ona je napravljena tako da točno na mjestu detekcije ima proširenje, mjehurić, čime se povećava optički put detektora 2,7-5 puta, a da se ne gubi na separacijskoj učinkovitosti i razlučivanju (Sertić, 2016). Uzorci su injektirani u kapilaru pod tlakom od 50 mbar, pri temperaturi od 25°C tijekom 6-8 s. Analize su tijekom inicijanih eksperimenata provođene pri naponu od 23-30 kV dok su analiti praćeni na samo jednoj valnoj duljini, 210 nm. Na kraju radnog dana kapilara je 20 minuta ispirana vodom, a elektrode su uronjene u bočice s vodom.

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Uspostavljanje optimalnih radnih uvjeta na standardima

S obzirom na prethodna ispitivanja optimizacije uvjeta metode na lijeku pirfenidonu i njegovom glavnom metabolitu 5-karboksipirfenidonu kapilarnom elektroforezom na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova FBF-a (Parag, 2019) ustanovljeni su radni uvjeti pod kojima su rađene i ove nadolazeće analize. Prva analiza je bila samo potvrda radnih uvjeta prilikom analize otopina matičnih standarda pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline u smjesi acetonitrila (ACN) i vode (H<sub>2</sub>O) u volumnom udjelu 50:50. Primijenjeni radni pufer sastojao se od 20 mM boratnog pufera (pH 9,3) uz dodatak surfaktanta SDS-a koncentracije 70 mM pri temperaturi od 25°C i naponu od 25 kV. Odabrana valna duljina detektora je 210 nm iz razloga što na toj valnoj duljini pirfenidon i 5-karboksipirfenidon najbolje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje.

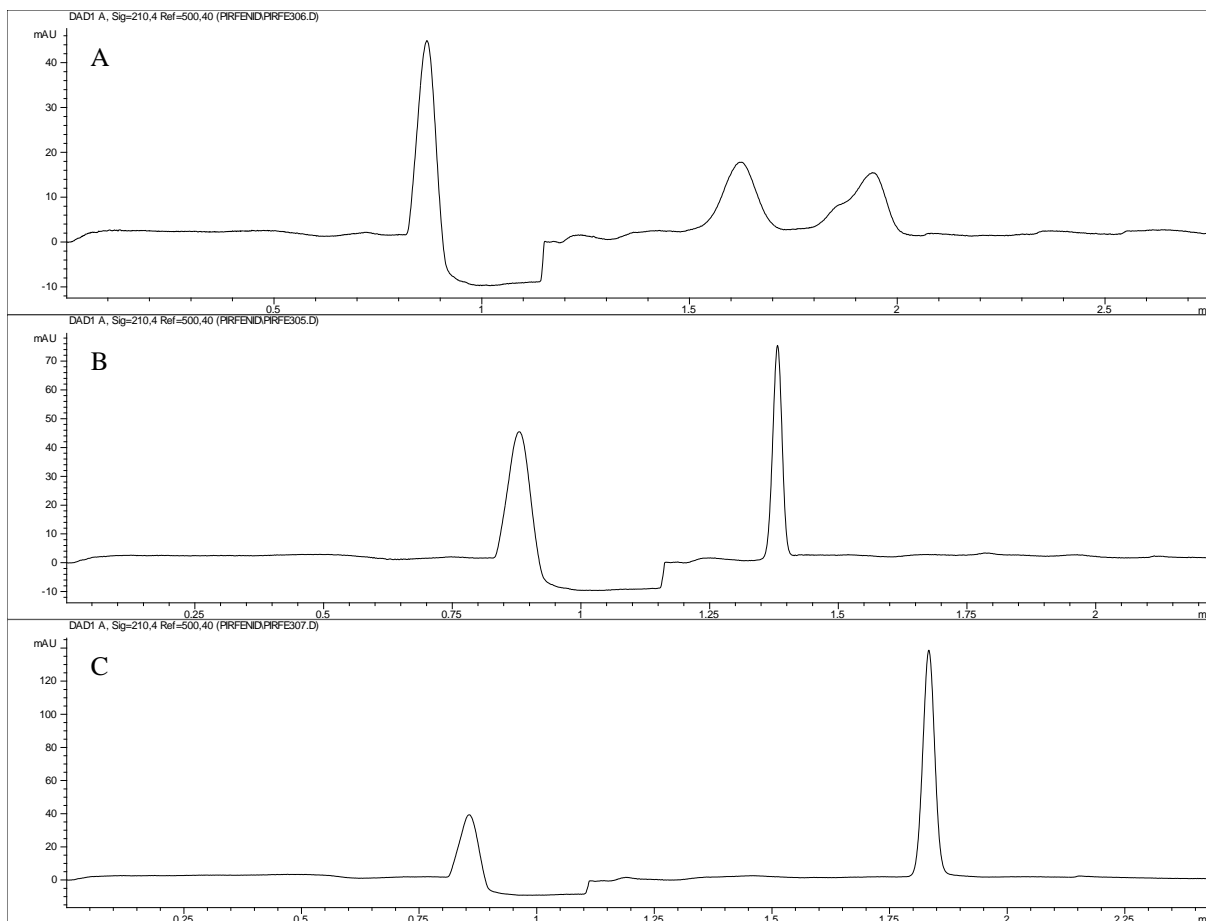
Time je dobiven elektroferogram (Slika 9) sličan elektroferogramu iz prethodnih analiza na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova FBF-a (Parag, 2019). Iz slike 9 vidljivo je neodgovarajuće razdvajanje pikova analiziranih analita te kako bi se otkrilo koji pik pripada kojem analitu, odnosno vremena migracije pojedinih analita u uzorku, provedene su pojedinačne analize standardnih otopina svakog analita (Slika 10).



Slika 9 Elektroferogram otopine standarda pirfenidona, metabolita 5-karboksipirfenidona i unutarnjeg standarda salicilne kiseline

UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 70 mM SDS, 25 kV, 25°C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline u smjesi ACN:H<sub>2</sub>O = 50:50, v/v





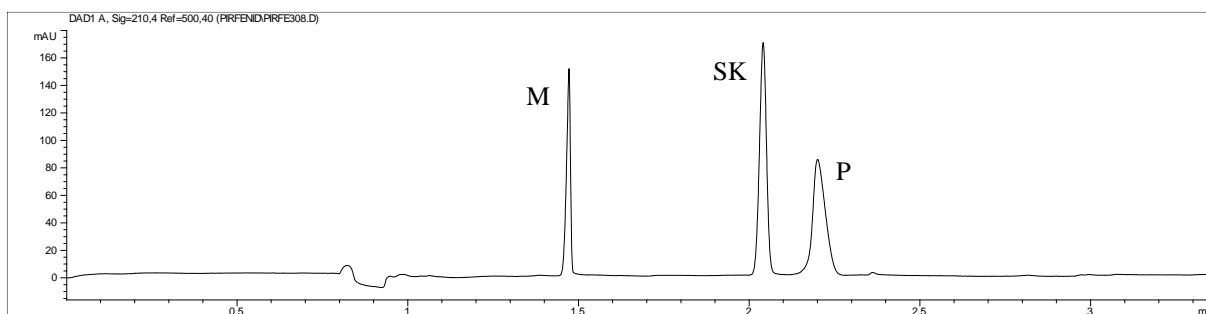
Slika 10 Elektroferogram (A) standardne otopine pirfenidona, (B) 5-karboksipirfenidona, i (C) salicilne kiseline

UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 70 mM SDS, 25 kV, 25°C, uzorak:

- (A) 40 µg/ml matične standardne otopine pirfenidona u smjesi ACN:H<sub>2</sub>O = 50:50,
- (B) 40 µg/ml matične standardne otopine 5-karboksipirfenidona u smjesi ACN:H<sub>2</sub>O = 50:50 i
- (C) 40 µg/ml matične standardne otopine salicilne kiseline u vodi

Analizom pojedinačnih analita u uzorku otkriveno je da razdijeljeni pik sa Slike 9 potječe od samog pirfenidona dok su 5-karboksipirfenidon i salicilna kiselina pokazali zadovoljavajući oblik pika te također različita i dovoljno odvojena vremena migracije.

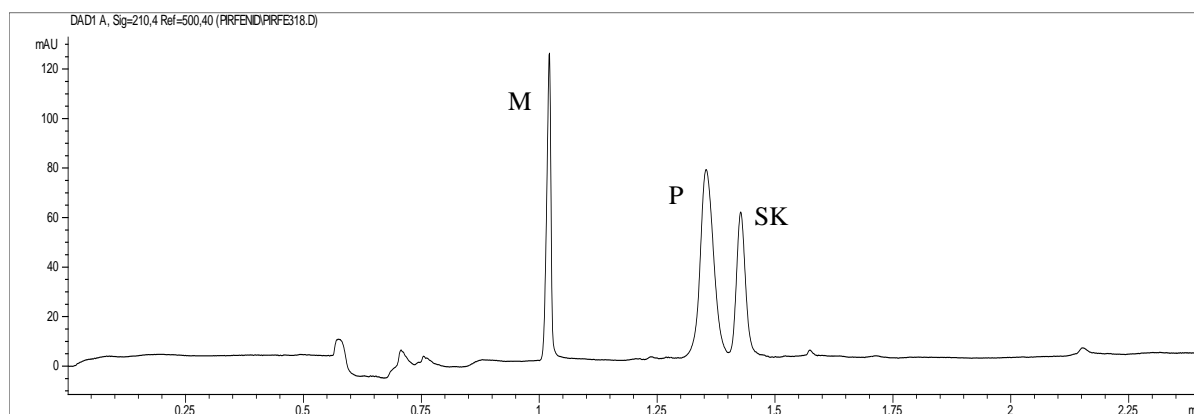
Iz tog razloga sljedeća analiza napravljena je razrjeđenjem matičnih standardnih otopina u vodi, dakle bez dodatka organskog otapala tj. acetonitrila. Na Slici 11 prikazan je elektroferogram matičnih standardnih otopina pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline otopljen u odgovarajućoj količini vode. Time je dobiveno povoljno razdvajanje pikova te također oblik pirfenidona, prethodno razdijeljen, ovoga puta odgovarajućeg oblika i simetrije. Stoga je iz tih razloga u daljnjim analizama matična standardna otopina pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline otopljena u vodi.



Slika 11 Elektroferogram otopine standarda pirfenidona (P), metabolita 5-karboksipirfenidona (M) i unutarnjeg standarda salicilne kiseline (SK)  
 UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 70 mM SDS, 25 kV, 25°C, uzorak: 50 µg/ml matične standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline razrijeđene u vodi.

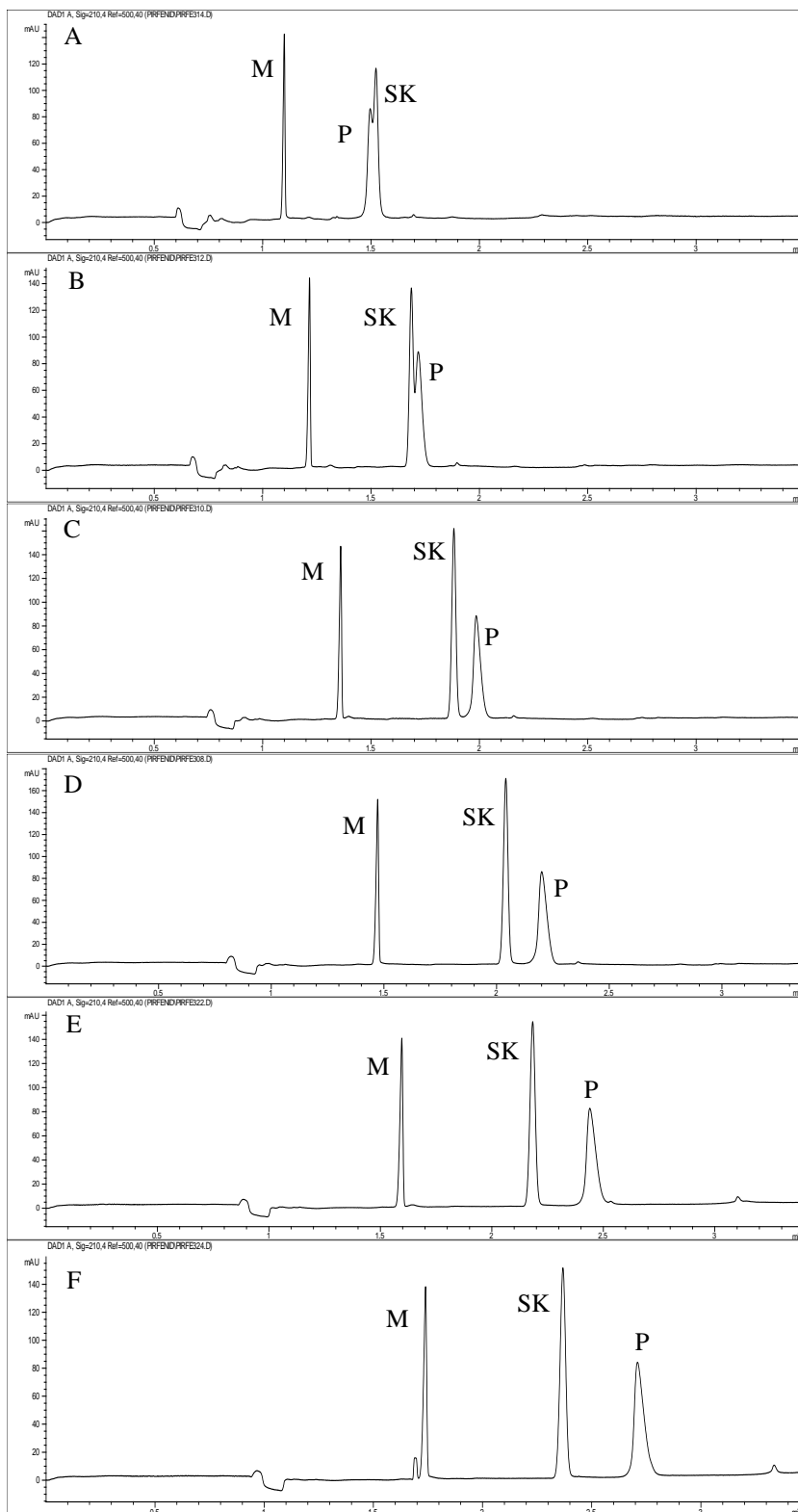
S obzirom da je napon jedan od ključnih parametara u optimizaciji uvjeta metode, sljedeći korak bio je provođenje analize matične otopine standarda pri promjeni napona. Ispitan je utjecaj napona (23-30 kV) na razdvajanje analita u 20 mM boratnom puferu (pH 9,3) kod 70 mM SDS-a. U skladu s teorijom kapilarne elektroforeze, odnosno s izrazom za elektroforetsku pokretljivost analita iz jednadžbe 1, ona je proporcionalna jakosti električnog polja, odnosno primijenjenom naponu. Stoga, su pikovi počeli brže izlaziti pri više primijenjenom naponu. Međutim, uz skraćenje vremena analize, može se uočiti i promjena u redoslijedu izlaženja pikova, naime, u jednom trenutku određeni pikovi zamijene mjesta. Prvi elektroferogram snimljen pri najvećem naponu od 30 kV (Slika 12) prikazuje najprije izlazak pika 5-karboksipirfenidona, zatim samog pirfenidona te naposljetku pika salicilne kiseline, dok sniženjem napona ispod 28 kV pikovi pirfenidona i salicilne kiseline mijenjaju mjesta, pa izlaze redom 5-karboksipirfenidon, salicilna kiselina i naposljetku pirfenidon (Slika 13). Osim toga, smanjenjem napona se površina pika povećava, čime je osjetljivost metode veća. No, ne samo to, primjenom manjeg napona, produljuje se i vrijeme putovanja analita kroz kapilaru. Stoga je tijekom optimizacije analitičke metode potrebno istovremeno voditi računa o nekoliko različitih parametara. Vrijeme trajanja analize jest samo jedan od njih. Iako je porastom napona vrijeme analize kraće, mora se voditi računa o razlučivanju, odnosno da svi pikovi analita budu dobro razdvojeni. Kod bioanalitičke metode, odnosno određivanja koncentracije lijeka i metabolita u biološkim uzorcima, očekivane koncentracije su vrlo niske, pa je potrebno posvetiti veliku pozornost osiguravanju odgovarajuće osjetljivosti metode. Stoga je prilikom odabira odgovarajućeg napona pri kojem će se izvoditi

kapilarnoelektroforetska analiza, potrebno voditi računa najprije o obliku pika i razlučivanju, a tek onda o vremenu analize. Naime, primjenom nižeg napona i dalje je relativno kratko vrijeme migracije. Na Slici 13, elektroferogramu F, svi analiti izlaze iz kapilare do 3. minute. Iz navedenih razloga odabrani napon za daljnje analize je 25 kV (Slika 13D).



Slika 12 Elektroferogram standardnih otopina pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i salicilne kiseline (SK) pri naponu od 30 kV

UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 70 mM SDS, 25°C, uzorak: 50 µg/ml matične standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline razrijeđene u vodi



Slika 13 Elektroferogrami standardnih otopina pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i salicilne kiseline (SK) u ovisnosti o naponu (A) 28 kV, (B) 27 kV, (C) 26 kV, (D) 25 kV, (E) 24 kV, (F) 23 kV

UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 70 mM SDS, 25°C, uzorak: 50 µg/ml matične standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline razrijeđene u vodi

## 4.2 Provođenje analiza na biološkim uzorcima

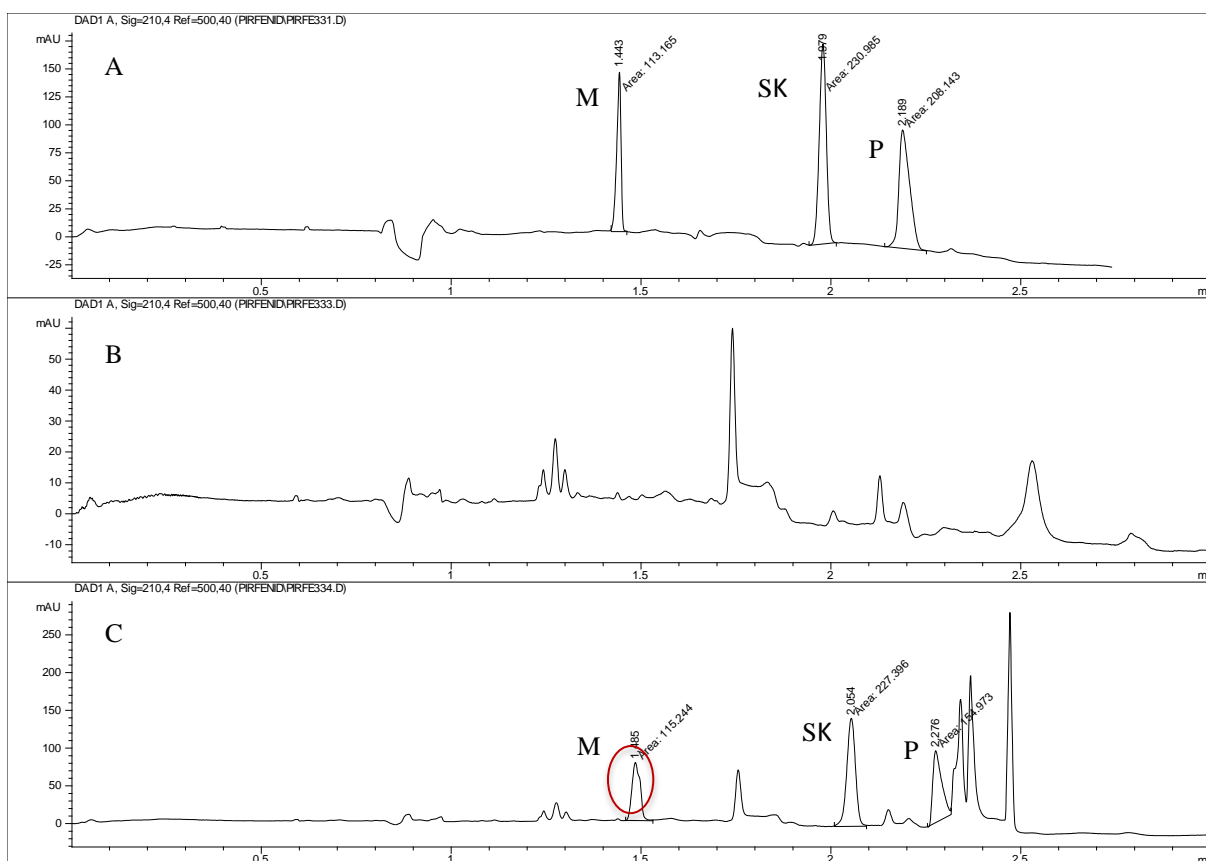
Analizirajući standardne otopine u kojima nisu bile prisutne nikakve interferencije, bilo je relativno jednostavno odrediti pikove analiziranih tvari. Međutim uvođenjem bioloških uzoraka poput plazme i seruma, analiza ispitivanih analita postala je zahtjevnija. Razlog tomu je prisutnost različitih proteina i makromolekula unutar biološkog uzorka koji se mogu apsorbirati na unutrašnje stijenke kapilare ili interferirati u detekciji i / ili odjeljivanju analita. Kao što je i ranije navedeno, potrebno je napraviti postupak predobrade uzorka. U ovom diplomskom radu, korišten je postupak taloženja proteina (PPT) s organskim otapalom, acetonitrilom (ACN). Organska otapala djeluju na način da smanjuju dielektričnu konstantu otopine proteina u plazmi ili jednostavno rečeno, smanjuju topljivost proteina te na taj način povećavaju elektrostatičku interakciju između proteinskih molekula. Proteini se tako talože i potom lako uklanjaju centrifugiranjem ili filtriranjem smjese čime se dobije bistri supernatant. Ovo je vrlo jednostavna i praktična tehnika kojom se može ukloniti i do 98% proteina iz uzorka. Međutim, tehnika ne koncentrira analite te u stvari dolazi do razrjeđivanja, stoga je nakon taloženja proteina potrebno napraviti postupak ukoncentriravanja (Majors, 2013).

Prvi korišteni biološki uzorak bila je plazma. Plazma je glavna komponenta krvi, ali bez krvnih stanica. Ona, kao i serum, ima veliku prisutnost različitih proteina kao što su fibrinogen, albumin, globulini. Serum je, za razliku od plazme, dio krvi koji ne sadržava antikoagulans. S obzirom na nisku koncentraciju pirfenidona i 5-karboksipirfenidona u odnosu na makromolekule iz bioloških uzoraka, glavni izazov je ustvari postići dostatnu osjetljivost metode. Iz tog razloga, svaki biološki uzorak je „obogaćen“ (engl. *spiked*) odgovarajućim količinama standardnih otopina pirfenidona, njegovog metabolita 5-karboksipirfenidona i unutarnjeg standarda salicilne kiseline s ciljem pronalaska optimalnih uvjeta za njihovo razdvajanje. Uz svaki „obogaćeni“ uzorak napravljeni je i kontrolni uzorak, odnosno onaj bez dodatka standardnih otopina. Postupak predobrade bioloških uzoraka opisan je u poglavlju 3.2.3.

Nakon pripreme uzoraka napravljena je analiza, najprije standardnih otopina pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline, zatim „obogaćenog“ uzorka plazme te također kontrolnog uzorka plazme radi kontrole redoslijeda izlaženja željenih pikova analita (Slika 14). Radni pufer korišten u ovoj analizi jest 20 mM boratni pufer (pH 9,3) uz dodatak 70 mM

SDS-a. Primijenjeni napon na kapilaru je 25 kV pri 25°C. Duljina kapilare je 36 cm, a elektroferogrami su snimljeni na 210 nm.

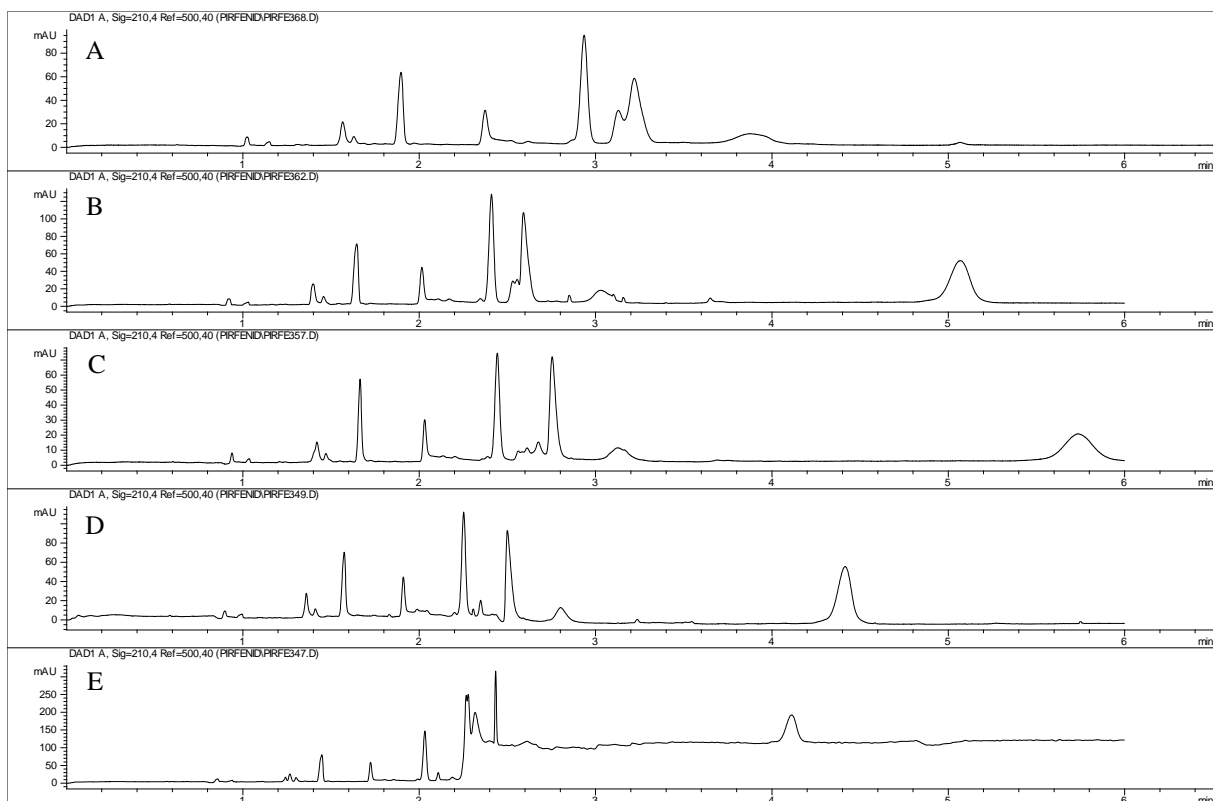
Vrijeme migracije ispitivanih analita između standardnih otopina i „obogaćenog“ uzorka plazme mnogo se ne razlikuju. Kao i kod analize standardnih otopina, 5-karboksipirfenidon je najbrže izašao iz kapilare. Njegov pik vidljiv je na 1,44 minute kod analize standardnih otopina (Slika 14A) i 1,49 minute kod „obogaćenog“ uzorka plazme (Slika 14C). Prati ga salicilna kiselina na (A) 1,98 minuti i (C) 2,05 minuti, dok posljednji pik izlazi pirfenidon na (A) 2,19 minuti i (C) 2,28 minuti. Osim vremena migracije, na Slici 14 uočen je nepravilan oblik pika 5-karboksipirfenidona (zaokruženo crveno) te se pretpostavlja da on koeluiru s nepoznatom tvari iz uzorka, dok je oko pika pirfenidona velika prisutnost ostalih pikova iz biološkog uzorka.



Slika 14 Elektroferogrami (A) standardne otopina pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M), i salicilne kiseline (SK), (B) kontrolni uzorak plazme i (C) „obogaćeni“ uzorak plazme  
UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 70 mM SDS, 25 kV, 25°C, uzorak: (A) 50 µg/ml matične standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline razrijeđene u vodi, (B) uzorak 50 µl plazme istaložen u 150 µl ACN proveden kroz standardni postupak pripreme uzorka i (C) uzorak 50 µl plazme „obogaćen“ s po 2 µl standardne otopine pirfenidona (c=1 mg/ml), 5-karboksipirfenidona (c=1 mg/ml) i salicilne kiseline (c=1 mg/ml) proveden kroz standardni postupak predobrade do konačne koncentracije 40 µg/ml



100 mM normalno se koriste i kao površinski aktivno sredstvo za pufer. Visoke koncentracije rezultirat će relativno visokom viskoznošću i visokim strujama, a time i posljedično padom napona, koje treba izbjegavati (Hancu, 2013). Na Slici 16 prikazani su elektroferogrami „obogaćenog“ uzorka plazme pri povećanju koncentracije SDS-a od 60 do 80 mM u otopini radnog pufera. Sukladno teoriji o SDS-u, daljnji porast koncentracije SDS-a će produžiti vremena migracije analita i dovesti do gubitka simetrije pikova, unatoč poboljšanju razlučivanja (Sotgia i sur., 2019). Iako je dodatak SDS-a imao mali utjecaj na odjeljivanje analita, opaženo je zanimljivo ponašanje analita, odnosno neočekivano skraćenje vremena migracije analita uz poboljšanje simetrije pikova. Pri čemu se, pri koncentracijama SDS-a od 60 do 70 mM, pikovi bolje odjeljuju i postaju oštriji. Daljnjim dodatkom SDS-a, 70-80 mM, skraćuje se vrijeme analize i postiže odgovarajuće odjeljivanje pikova ispitivanih analita, premda se bazna linija pogoršala pri najvišoj koncentraciji SDS-a. Odabrana koncentracija SDS-a za daljnje analize je 65 mM (Slika 16B).

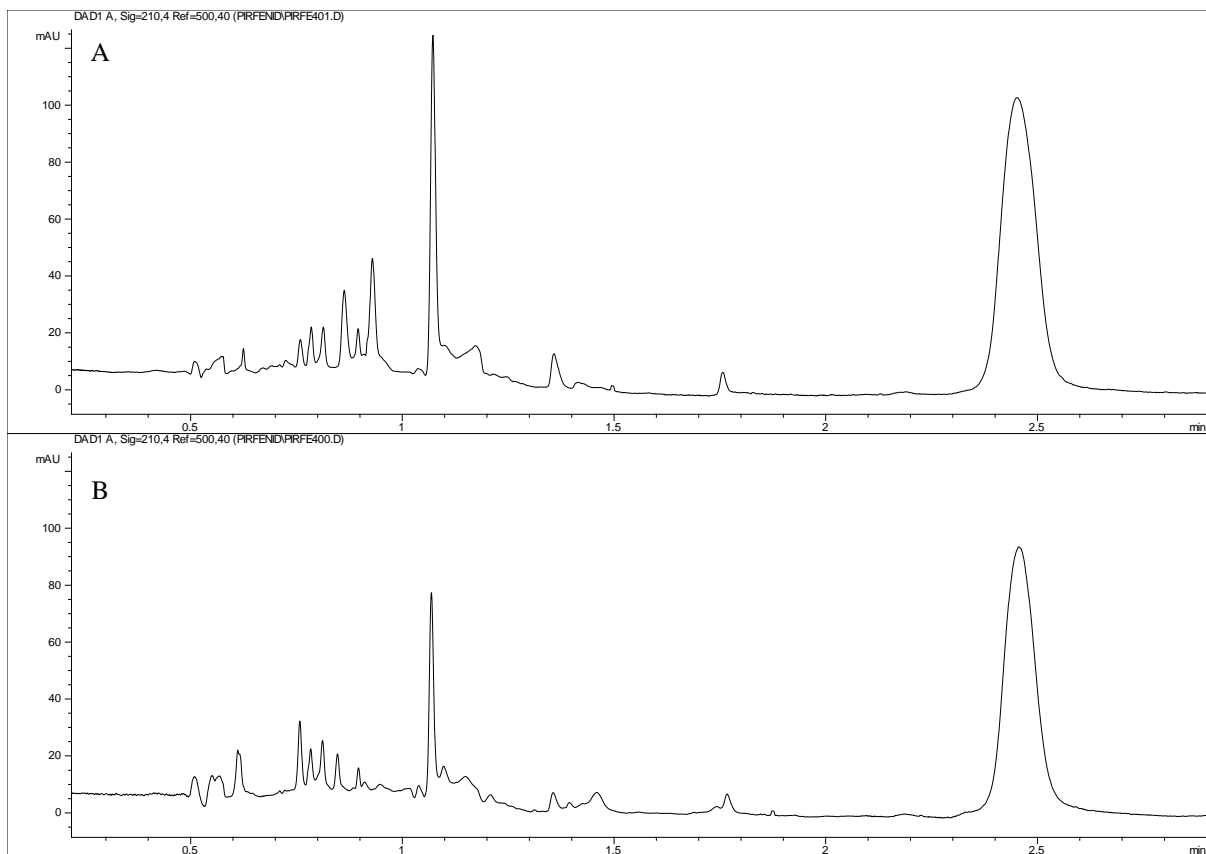


Slika 16 Elektroferogrami „obogaćenog“ uzorka plazme pri koncentracijama surfaktanta SDS-a od (A) 60 mM, (B) 65 mM, (C) 70 mM, (D) 75 mM, (E) 80 mM  
 UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 25 kV, 25°C, uzorak: uzorak 50  $\mu$ l plazme „obogaćen“ s po 2  $\mu$ l standardne otopine pirfenidona ( $c=1$  mg/ml), 5-karboksipirfenidona ( $c=1$  mg/ml) i salicilne kiseline ( $c=1$  mg/ml) proveden kroz standardni postupak predobrade uzorka do konačne koncentracije od 40  $\mu$ g/ml



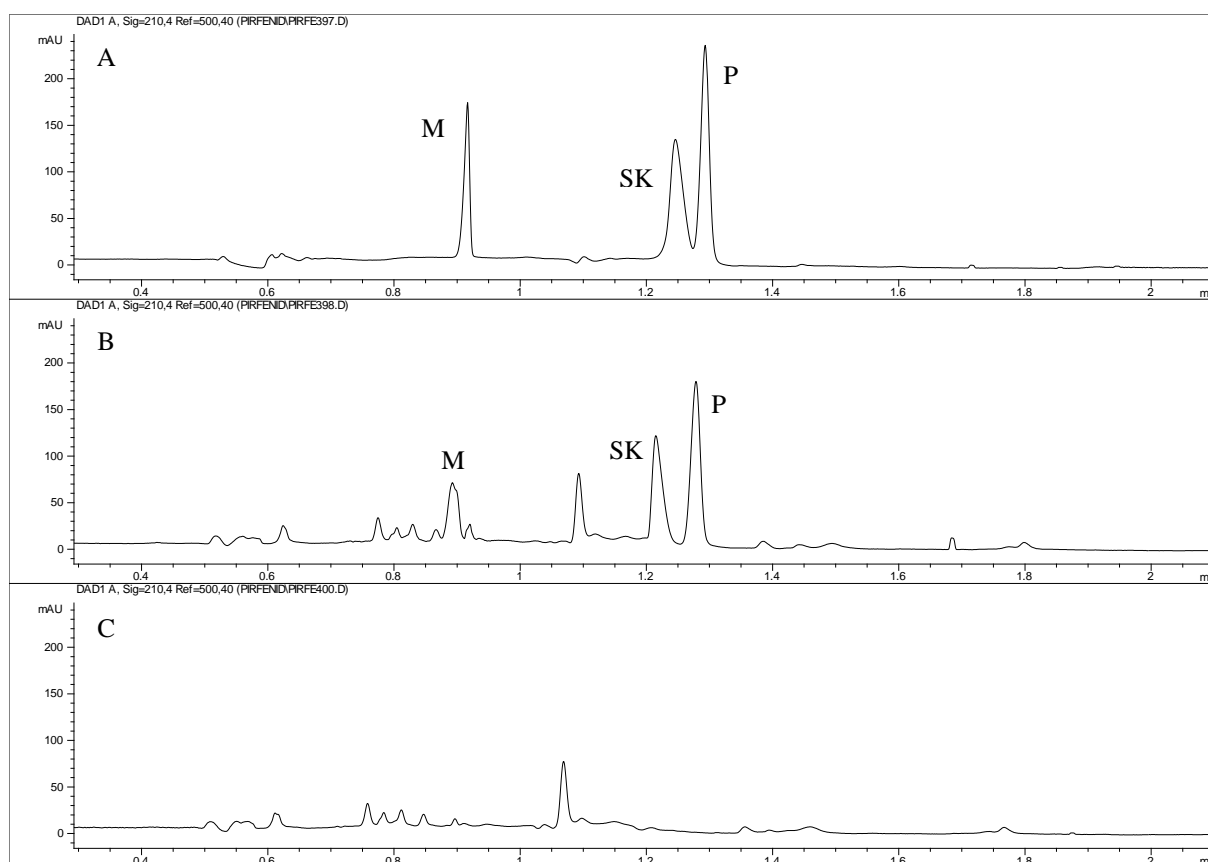
Budući da je riječ o optimizaciji nove bioanalitičke metode s ciljem kvantitativnog određivanja i terapijskog praćenja lijeka, željelo se ispitati mogućnost analize pirfenidona i njegovog metabolita i u serumu.

S obzirom da su plazma i serum najkorišteniji biološki uzorci važno je istaknuti neke njihove sličnosti i razlike. Serum je bistri tekući dio odvojen od krvnih stanica bez antikoagulansa, a plazma je tekući dio odvojen od krvnih stanica koji sadrži antikoagulans. Serum se dobiva iz krvi koja se zgrušala. Fibrinski ugrušci nastali tijekom koagulacije, zajedno s krvnim stanicama i povezanim faktorima zgrušavanja, odvajaju se iz seruma centrifugiranjem. Za dobivanje plazme dodaje se antikoagulans poput EDTA ili heparina prije uklanjanja krvnih stanica (Yu i sur., 2011). Osim toga, plazmu i serum karakteriziraju prisutnost različitih proteina poput albumina i globulina, hormona, enzima, itd. Analiza se provodi u 20 mM koncentraciji boratnog pufera (pH 9,3) i 65 mM koncentraciji SDS-a pri 25°C i naponu od 25 kV. Postupak pripreme kontrolnog uzorka seruma provodi se na isti način kao i za plazmu, a opisan je u već ranije navedenom poglavlju 3.2.3. Na Slici 17 prikazana je usporedba kontrolnog uzorka plazme i kontrolnog uzorka seruma na temelju čega možemo zaključiti da su elektroferogrami prilično slični, odnosno da su plazma i serum slični po svojoj molekularnoj osnovi, odnosno sadržaju.



Slika 17 Elektroferogram (A) kontrolnog uzorka plazme i (B) kontrolnog uzorka seruma  
UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 25 kV, 25°C, uzorak:  
kontrolni uzorak plazme pripremljen je uzimanjem 50  $\mu$ l plazme i taloženjem sa 150  $\mu$ l ACN  
uz daljnji postupak ukoncentriravanja do suha i otapanja suhog ostatka u 42,5  $\mu$ L vode dok je  
kontrolni uzorak seruma pripremljen na identičan način

Nakon analize kontrolnog uzorka seruma, potrebno je i provesti analizu „obogaćenog“ uzorka seruma. Postupak predobrade „obogaćenog“ uzorka seruma je napravljen na isti način kao i za „obogaćeni“ uzorak plazme (detaljnije opisan u poglavlju 3.2.3.). Na Slici 18 prikazani su elektroferogrami (A) otopine standarda, zatim (B) „obogaćenog“ uzorka seruma te (C) kontrolnog uzorka seruma. Elektroferogram standardnih otopina pokazuje da se pikovi pirfenidona i salicilne kiseline nisu dobro odvojili. Dok se u „obogaćenom“ uzorku seruma pojavio nepravilni pik 5-karboksipirfenidona, iako je postignuto odgovarajuće odjeljivanje željenih analita.

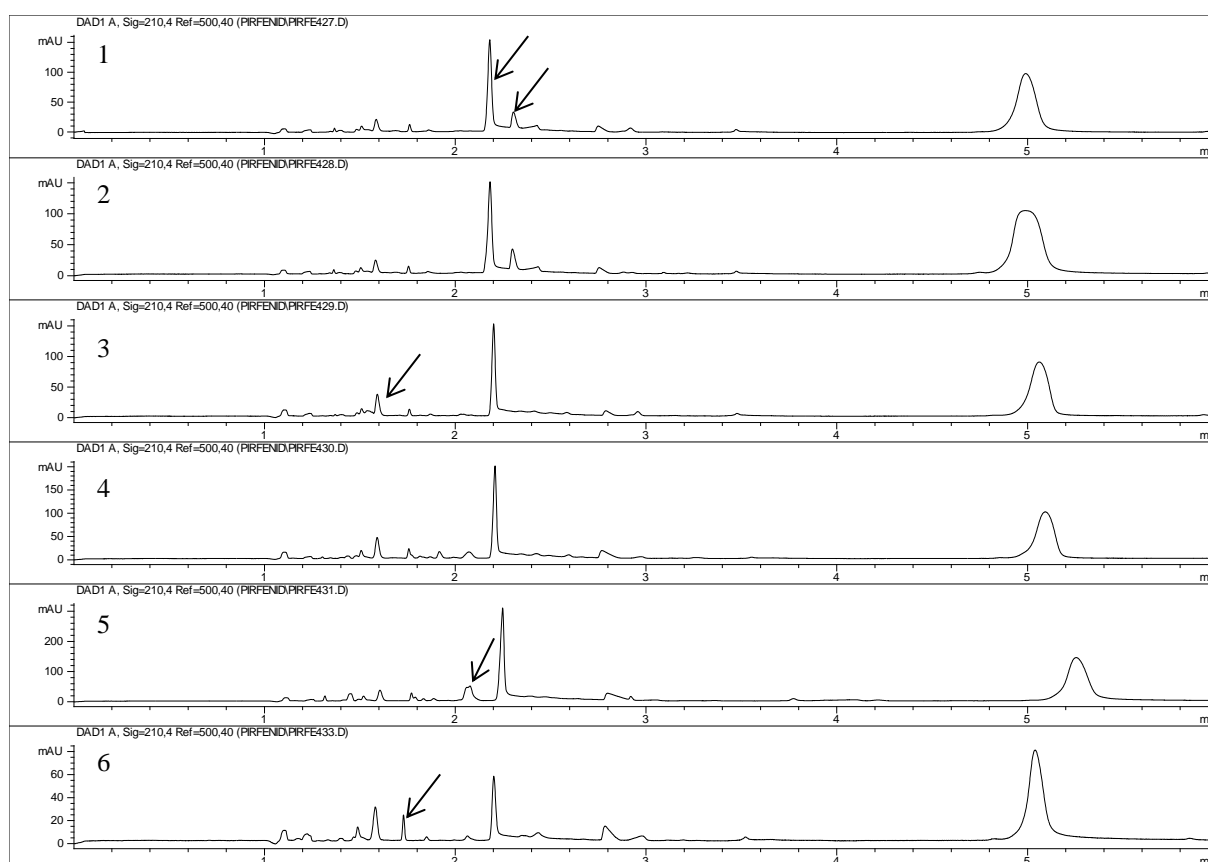


Slika 18 Elektroferogrami (A) uzorka standardne otopine, (B) „obogaćenog“ uzorka seruma i (C) kontrolnog uzorka seruma

UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 25 kV, 25°C, uzorak: (A) 50  $\mu\text{g/ml}$  matične standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline razrijeđene u vodi, (B) „obogaćeni“ uzorak seruma dobiven uzimanjem 50 ml seruma te po 2 ml standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline, provedeno daljnjim postupkom predobrade uzorka do konačne koncentracije od 40  $\mu\text{g/ml}$  i (C) kontrolni uzorak seruma dobiven taloženjem 50 ml seruma s 150 ml ACN, te ukoncentriravanjem i otapanjem suhog ostatka

Želeći pokazati sličnosti i razlike unutar različitih uzoraka plazme, snimljeni su elektroferogrami kontrolnih uzoraka plazmi šest različitih osoba. Slika 19 prikazuje elektroferograme kontrolnih uzoraka plazme te su strelicama označene razlike među njima. Iako je plazma složeni biološki uzorak sama po sebi, potrebno je napomenuti da ove razlike proizlaze iz činjenice da su ovo uzorci plazme od šest različitih osoba, nepovezanih krvnim srodstvom. Stoga, upravo te inter-varijabilnosti predstavljaju jedan od izazova u razvoju bioanalitičke metode.

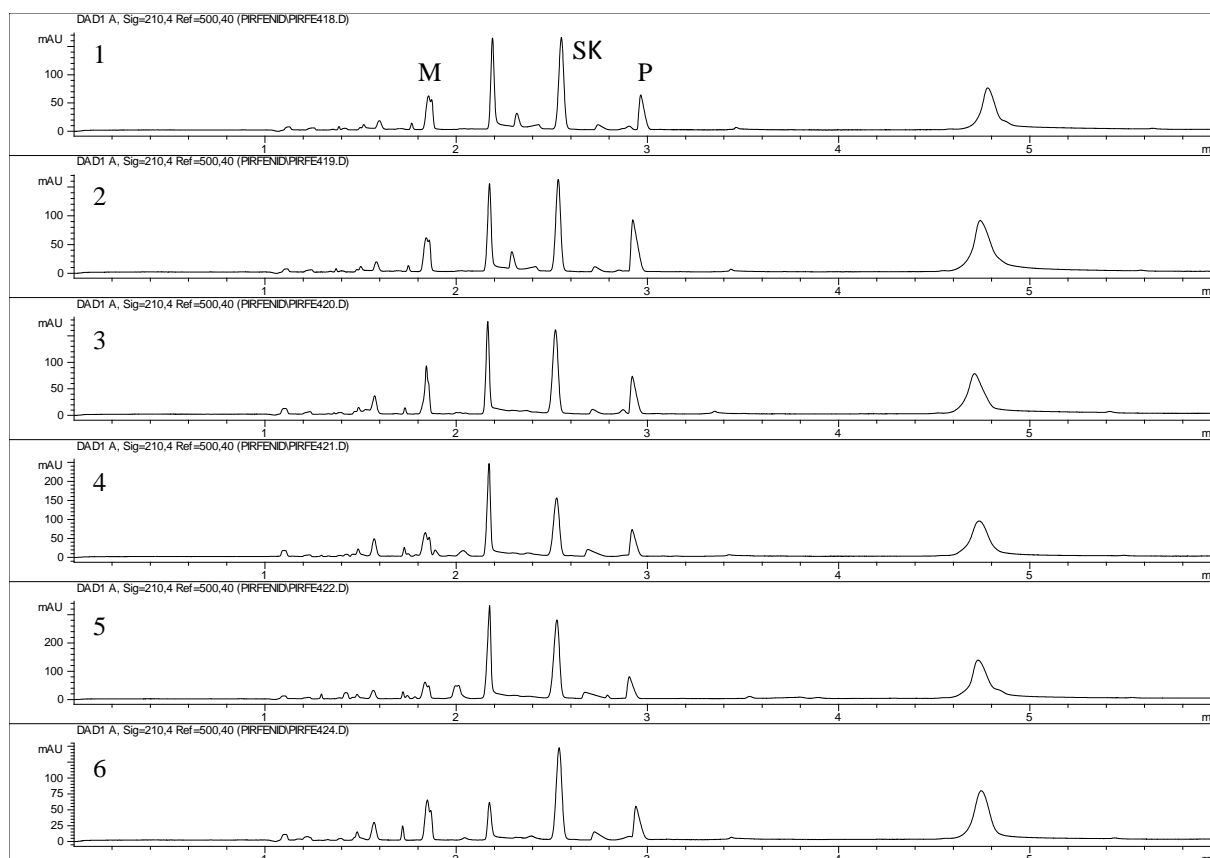
Uvjeti izvođenja analiza su: boratni pufer koncentracije 20 mM (pH 9,3) uz dodatak surfaktanta SDS-a koncentracije 65 mM na 25°C i pri naponu od 20 kV.



Slika 19 Elektroferogrami kontrolnih uzoraka plazme redoslijedom od P1 do P6 te strelicama označene razlike među njima

UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 20 kV, 25°C, uzorak: kontrolni uzorak plazme napravljen je uzimanjem 50  $\mu$ l pojedine plazme i taloženjem sa 150  $\mu$ l ACN uz daljnji postupak ukoncentriravanja do suha i otapanja suhog ostatka u 42,5  $\mu$ l vode

Nakon analize kontrolnih uzoraka plazmi, napravljene su i analize „obogaćenih“ uzoraka plazme u istim uvjetima. Elektroferogrami „obogaćenih“ uzoraka plazme pokazuju dobro odijeljene pikove. Međutim u „obogaćenim“ uzorcima plazme P4 i P5 vidljiv je veći broj pikova oko metabolita, tj. 5-karboksipirfenidona. Osim toga može se ponovno uočiti nepravilna simetrija pika 5-karboksipirfenidona te je potrebno provesti dodatne analize u cilju optimizacije radnih uvjeta prilikom razdvajanja ispitivanih analita u biološkim uzorcima.



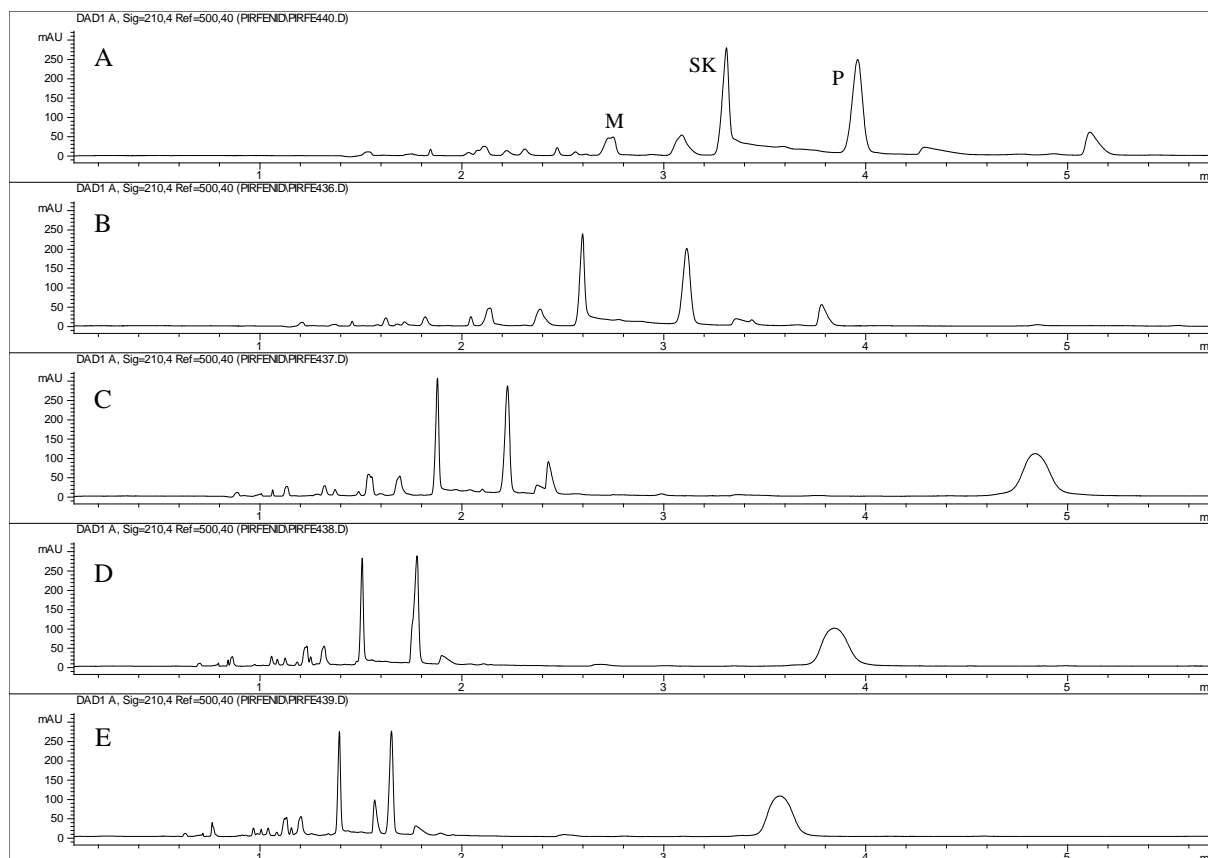
Slika 20 Elektroferogrami „obogaćenih“ uzoraka plazme redoslijedom od P1 do P6  
UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 20 kV, 25°C, uzorak:  
„obogaćeni“ uzorak plazme pripremljen je dodatkom 50 µl pojedine plazme koja je  
„obogaćena“ sa po 2 µl otopine standarda pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i  
salicilne kiseline (SK) te provedena daljnjim postupkom predobrade do konačne koncentracije  
od 40 µg/ml

### 4.3 Razmatranje pika 5-karboksipirfenidona

Uočivši oblik i širinu pika 5-karboksipirfenidona prilikom izvođenja analiza na bioloških uzorcima, provedene su daljnje analize radi utvrđivanja razloga istom. Svrha toga je postići optimalne radne uvjete za analizu lijeka pirfenidona i njegovog glavnog metabolita, 5-karboksipirfenidona u složenim biološkim uzorcima na kapilarnoj elektroforezi.

#### 4.3.1 Promjena napona na uzorcima

Analizom „obogaćenog“ uzorka plazme pri promjeni napona od 17 kV do 27 kV znatno se skratilo vrijeme analize, ali i poboljšao oblik pikova. Pikovi su oštrije i veće površine što pridonosi osjetljivosti metode. Osim toga, postiglo se i bolje razdjeljivanje pikova. Međutim, pik metabolita je i dalje nepravilan, čime nisu zadovoljeni optimalni uvjeti analize.

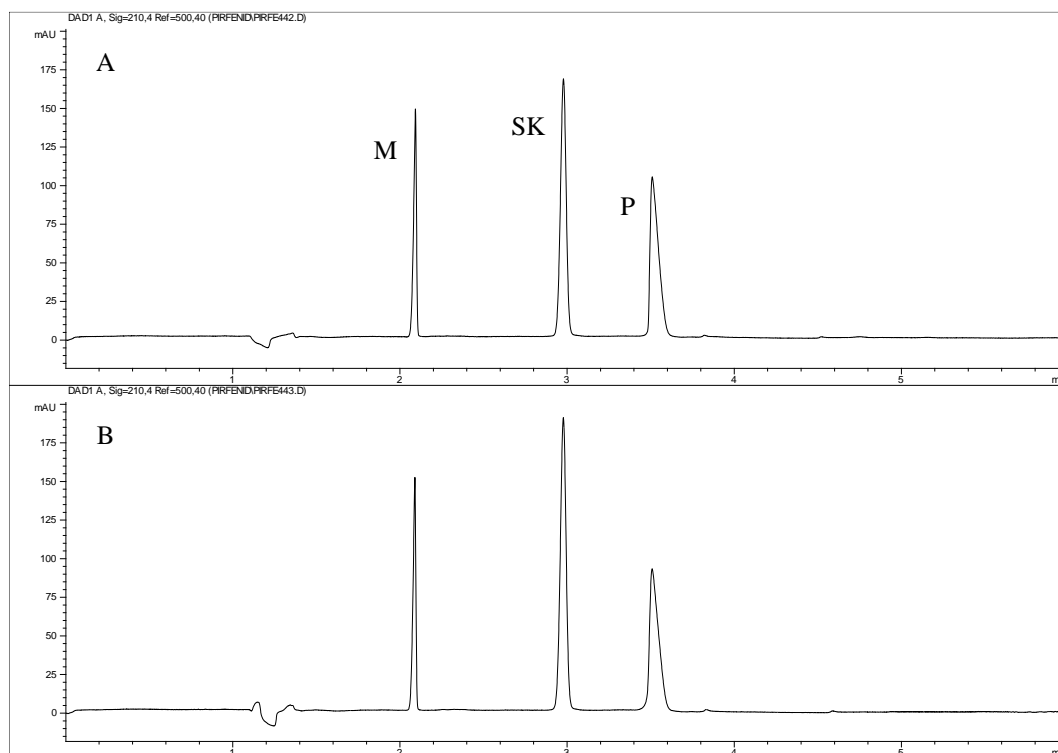


Slika 21 Elektroferogrami „obogaćenog“ uzorka plazme u ovisnosti o naponu (A) 17 kV, (B) 20 kV, (C) 23 kV, (D) 25 kV i (E) 27 kV

UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 25°C, uzorak: „obogaćeni“ uzorak plazme proveden kroz standardni postupak predobrade uzorka

### 4.3.2 Provjera standardnih otopina

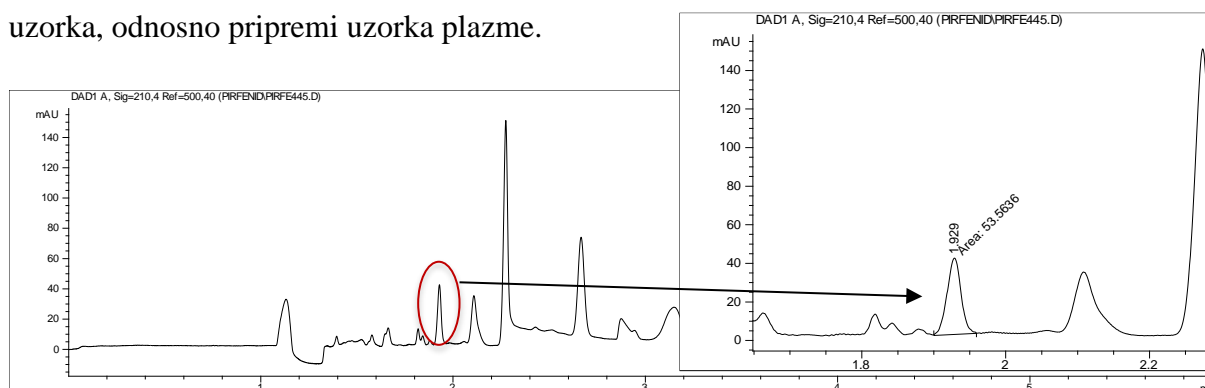
Slijedeće što je provedeno jest usporedba novo napravljenih standardnih otopina sa starima. Koncentracija novih standardnih otopina je identična, dakle 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline razrijeđene u vodi. Analize se odvijaju pri 20 kV, 25°C i boratnom puferu (pH 9,3) koncentracije 20 mM s dodatkom surfaktanta SDS-a koncentracije 65 mM. Iz Slike 22 vidljivo je da je pik 5-karboksipirfenidona dobre simetrije i oblika, stoga razlog razdvajanja pika nije u standardnim otopinama, već biološkom uzorku.



Slika 22 Elektroferogram (A) standardnih otopina korištenim u prethodnim analizama i (B) nanovo napravljenim standardnim otopinama  
UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 20 kV, 25°C, uzorak: 50 µg/ml matične standardne otopine pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i salicilne kiseline (SK) razrijeđene u vodi

### 4.3.3 Naknadno „obogaćivanje“ uzorka

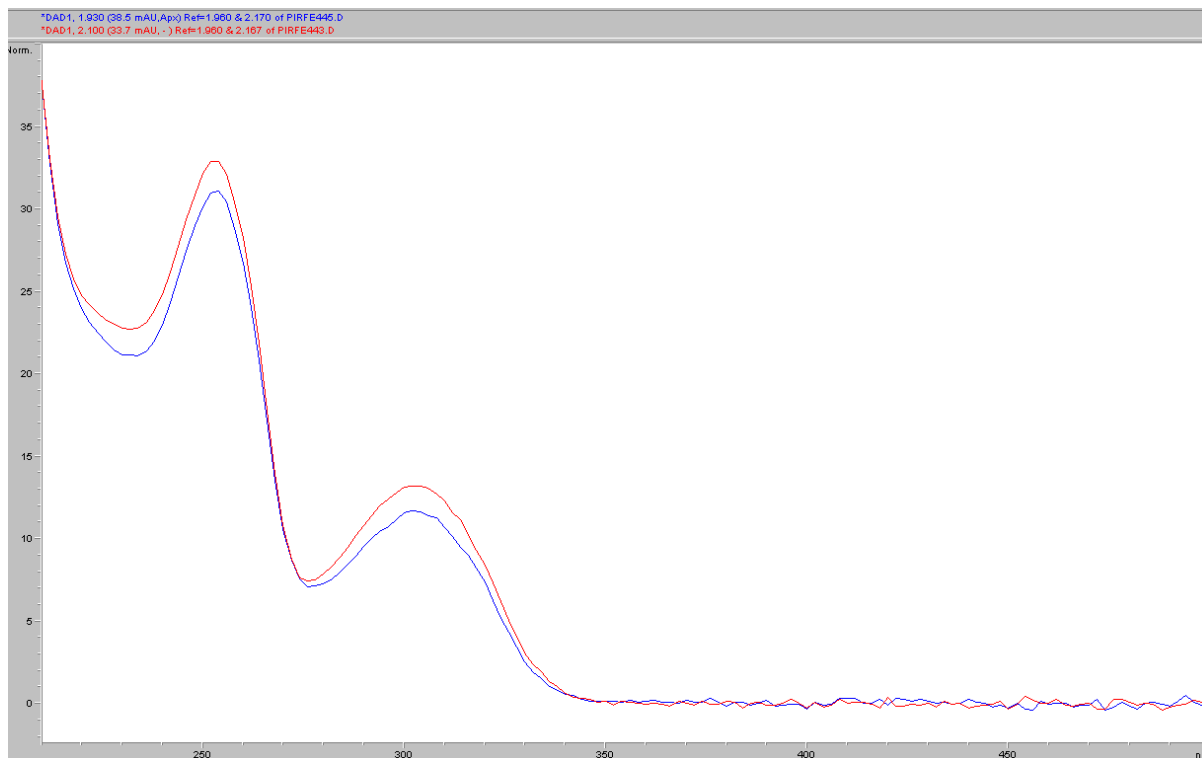
Da bi se pronašao razlog razdvajanja pika 5-karboksipirfenidona u biološkom uzorku uzet je prethodno ukoncentriran kontrolni uzorak plazme volumena 20  $\mu\text{l}$  i „obogaćen“ je sa 8  $\mu\text{l}$  standardne otopine pirfenidona ( $c=100 \mu\text{g/ml}$ ), 8  $\mu\text{l}$  standardne otopine 5-karboksipirfenidona ( $c=100 \mu\text{g/ml}$ ) i 8  $\mu\text{l}$  standardne otopine salicilne kiseline ( $c=100 \mu\text{g/ml}$ ) do konačne koncentracije od približno 40  $\mu\text{g/ml}$ , pri čemu je dobiven elektroferogram na kojem pik metabolita tj. 5-karboksipirfenidona nije nepravilnog oblika kao do sada (Slika 23). Iz tog razloga moguće je tvrditi da se problem simetrije pika krije u složenosti biološkog uzorka, odnosno pripremi uzorka plazme.



Slika 23 Elektroferogram kontrolnog uzorka ukoncentrirane plazme naknadno „obogaćene“, dok je strelicom označen uvećani pik 5-karboksipirfenidona  
UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 20 kV, 25°C, uzorak: 20  $\mu\text{l}$  kontrolnog uzorka plazme prethodno ukoncentrirane uz dodatak po 8  $\mu\text{l}$  standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline do konačne koncentracije  $\approx 40 \mu\text{g/ml}$

Na slici 24 moguće je vidjeti da su UV-Vis spektri pikova 5-karboksipirfenidona u standardnoj otopini i u kontrolnom uzorku „obogaćenom“ standardnim otopinama pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline, identični. Nadalje faktor čistoće pika 5-karboksipirfenidona iznosio je 996,842.





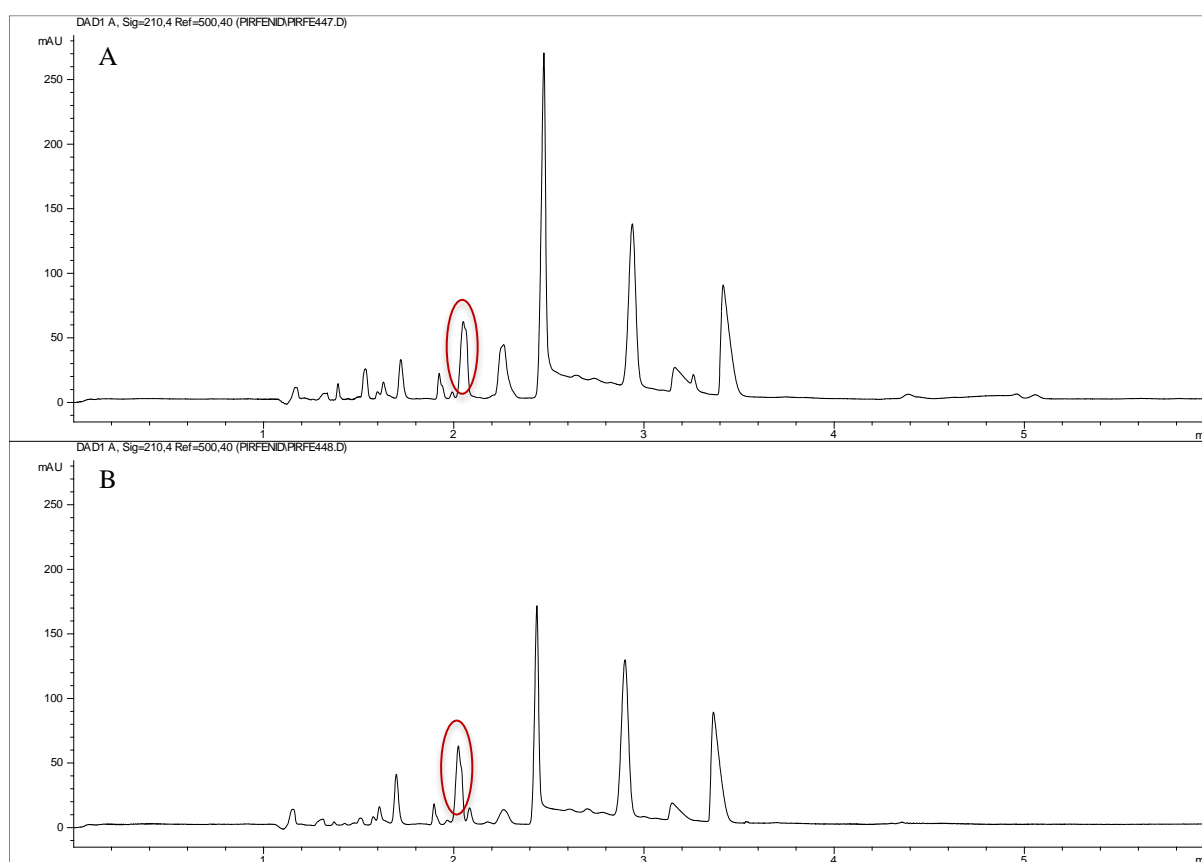
Slika 24 UV-Vis spektar pika 5-karboksipirfenidona iz kontrolnog uzorka ukoncentrirane plazme naknadno „obogaćene“ preklopljen sa UV-Vis spektrom istog pika iz standardnih otopina

UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 20 kV, 25°C, uzorak: kontrolni uzorak plazme prethodno ukoncentriran, uz naknadni dodatak standardnih otopina pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline te 50 µg/ml matične standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline razrijeđene u vodi

## 4.3.4 Postupak predobrade uzorka

### 4.3.4.1 Ponovljeni postupak predobrade uzorka

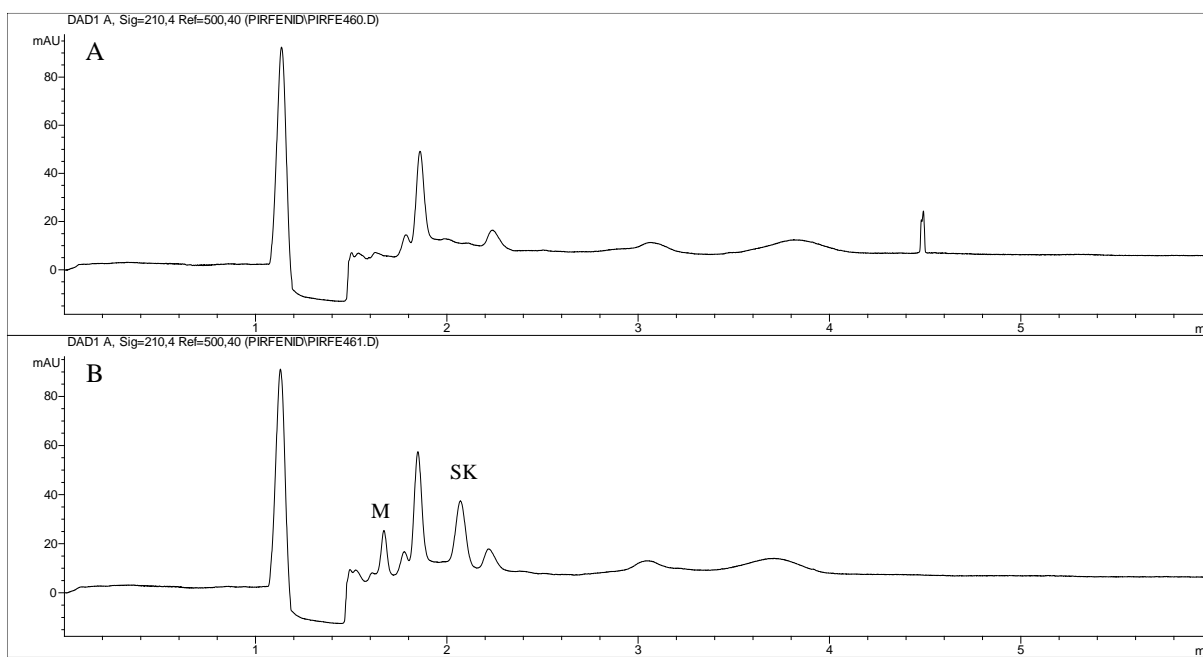
Nakon što je utvrđeno da problem simetrije pika 5-karboksipirfenidona proizlazi iz postupka predobrade uzorka, odnosno ukoncentriravanjem uzorka, ponovljen je cijeli postupak pripreme. Postupak predobrade opisan je u poglavlju 3.2.3., budući da je to standardni protokol. U analizu su uzeta dva „obogaćena“ uzoraka plazme kako bi se mogla usporediti. U obje plazme vidljiv je i dalje nepravilan pik 5-karboksipirfenidona (zaokruženo crveno) usprkos ponovljenom postupku predobrade uzorka (Slika 25).



Slika 25 Elektroferogrami „obogaćenih“ uzoraka (A) plazme 1 i (B) plazme 2  
UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 20 kV, 25°C, uzorak:  
„obogaćeni“ uzorci plazme dobiveni su standardnim protokolom predobrade uzorka, a  
konačna koncentracija je 40 µg/ml

#### 4.3.4.2 Postupak predobrade uzorka bez koncentratora

Kako prethodnom analizom nije otklonjen problem simetrije pika, napravljen je postupak pripreme uzorka, ali bez ukoncentriravanja istog. Uzet je kontrolni uzorak plazme i „obogaćeni“ uzorak plazme koji je „obogaćen“ sa 2  $\mu$ l standardne otopine pirfenidona ( $c=1$  mg/ml), 2  $\mu$ l standardne otopine 5-karboksipirfenidona ( $c=1$  mg/ml) i 2  $\mu$ l standardne otopine salicilne kiseline ( $c=1$  mg/ml). Nakon što su u uzorcima istaloženi proteini sa 144 ml ACN-a, supernatant je prebačen u novu bočicu i stavljen u uređaj za kapilarnu elektroforezu na analizu. Na Slici 26 su prikazani elektroferogrami uzoraka otopljenih u organskom otapalu. Na prvi pogled, uočena je drugačija bazna linija u usporedbi s otapanjem uzoraka u čistoj vodi. Acetonitril je skratio vrijeme migracije i omogućio odjeljivanje pikova, premda nezadovoljavajuće. Nije postignuta dostatna osjetljivost jer su pikovi vrlo mali te pik pirfenidona nije uopće vidljiv. Moguće je da pik pirfenidona nije detektiran (Slika 26) zbog tehničke pogreške, odnosno nepreciznosti i mogućeg zaostatka 2  $\mu$ l standardne otopine pirfenidona na stijenci bočice. Međutim, pik 5-karboksipirfenidona je ovoga puta dobre simetrije.



Slika 26 Elektroferogrami (A) kontrolnog uzorka plazme i (B) „obogaćenog“ uzorka plazme  
UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 20 kV, 25°C, uzorak: (A) kontrolni uzorak plazme i (B) „obogaćeni“ uzorak plazme, pripremljeni po standardnom protokolu pripreme uzorka

Prethodnom analizom uzorka bez upotrebe koncentratora, odnosno stavljanjem uzorka na analizu nakon samog taloženja proteina organskim otapalom, dobivena je dobra simetrija pika 5-karboksipirfenidona, ali uz gubitak osjetljivosti.

#### 4.3.5 Dodatak acetonitrila

Acetonitril dodan u otopinu radnog pufera nema izražen utjecaj na EOF, kao što to ima primjerice pH (Sertić, 2016), premda postoji mogući utjecaj na vrijeme migracije analita i poboljšano razlučivanje željenih analita (Cao, 2015).

Organska otapala su vrlo važna u kapilarnoj elektroforezi, prije svega zbog svojih svojstava kao što su odgovarajuće vrelište i talište, dostupnost dovoljne čistoće, mala toksičnost, prihvatljiva cijena i kemijska stabilnost. Organska otapala mogu značajno poboljšati topljivost analita, čineći kapilarnoelektroforetsku analizu dostupnom za one analite s malom topljivošću (npr. hidrofobne analite) u čistim vodenim otopinama pufera. Osim toga pogodno povećavaju selektivnost CE, odnosno uspješnost odjeljivanja sastavnica uzorka djelujući na efektivnu pokretljivost analita i elektroosmotski tok, EOF. Oni utječu na EOF, ne samo mijenjanjem viskoznosti radnog pufera, već i zeta potencijalom (Sertić, 2016; Huie, 2003; Sarmini i Kenndler, 1997).

Najčešće korištena organska otapala u CE su metanol (MeOH) i acetonitril (ACN), usprkos tome što imaju niske dielektrične konstante u odnosu na vodu. Niske dielektrične konstante omogućavaju primjenu relativno visokih napona na kapilaru bez izazivanja bilo kakvog značajnog širenja pojasa zbog Jouleovog zagrijavanja<sup>1</sup>. Međutim, dodatak organskih otapala (primjerice 2% acetonitrila i metanola) u elektrolitnu otopinu pufera jako povećava viskoznost pufera i rezultira poboljšanim razlučivanjem određenih analita te istovremeno može pogoršati analizu drugih (Huie, 2003).

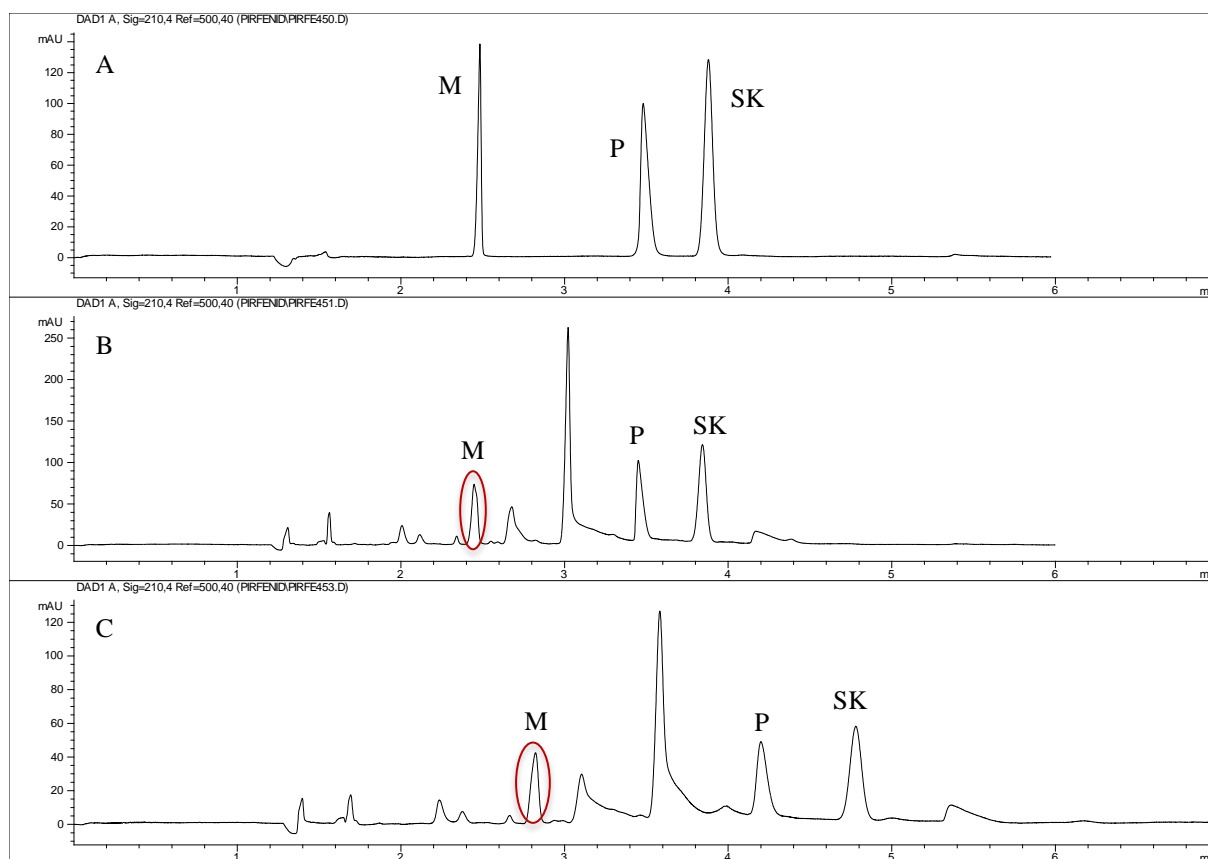
Stoga je njihov utjecaj u CE vrlo složen i u pravilu se određuje eksperimentalno.

---

<sup>1</sup>Jouleovo zagrijavanje je toplina koja se razvija u kapilari protjecanjem električne struje. U CE ono se nastoji izbjeći iz dva razloga. Prvi je moguća degradacija ispitivanog analita zbog njegove termolabilnosti, dok je drugi zbog stvaranja temperaturnog gradijenta unutar kapilare što naposljetku može dovesti do gubitka učinkovitosti i razlučivanja (Sertić, 2016).

Kako bi optimizirali uvjete analize slijedeći korak bio je dodatak organskog otapala u otopinu radnog pufera. Uz boratni pufer (pH 9,3) koncentracije 20 mM i surfaktant SDS-a koncentracije 65 mM dodan je i 5%-tni acetonitril. Analiza se odvija pri naponu od 20 kV i temperaturi od 25°C. Napravljena je najprije analiza standardnih otopina kako bi se usporedila vremena migracije ispitivanih analita s onima u „obogaćenom“ uzorku plazme i ukocentrirane plazme naknadno „obogaćene“. Postupak predobrade „obogaćenog“ uzorka plazme opisan je u već ranije navedenom poglavlju 3.2.3., dok je uzorak ukocentrirane plazme naknadno „obogaćene“ opisan u poglavlju 4.3.3.

Na Slici 27 može se vidjeti da je dodatkom ACN pik 5-karboksipirfenidona u „obogaćenom“ uzorku plazme i dalje nepravilan, ali je u kontrolnom uzorku ukoncentrirane plazme naknadno „obogaćene“ puno boljeg oblika, odnosno simetrije (zaokružen crveno). Osim toga, analizom UV-Vis spektra uočen je drugačiji poredak izlaženja pikova kako u standardnim otopinama tako i u „obogaćenim“ uzorcima plazme. Naime, iz prethodnih analiza, opaženo je da najprije izlazi pik metabolita, 5-karboksipirfenidona pa zatim unutarnjeg standarda, salicilne kiseline i naposljetku pirfenidona, dok se uvođenjem 5% ACN u otopinu radnog pufera poredak promijenio. Pik pirfenidona izlazi nakon 5-karboksipirfenidona, dok pik salicilne kiseline izlazi posljednji. Općenito, dodatkom acetonitrila poboljšano je odjeljivanje ispitivanih analita iako su se pikovi počeli širiti i vrijeme analize se produljilo što je u skladu s teorijom o dodatku organskih otapala u otopinu elektrolita.



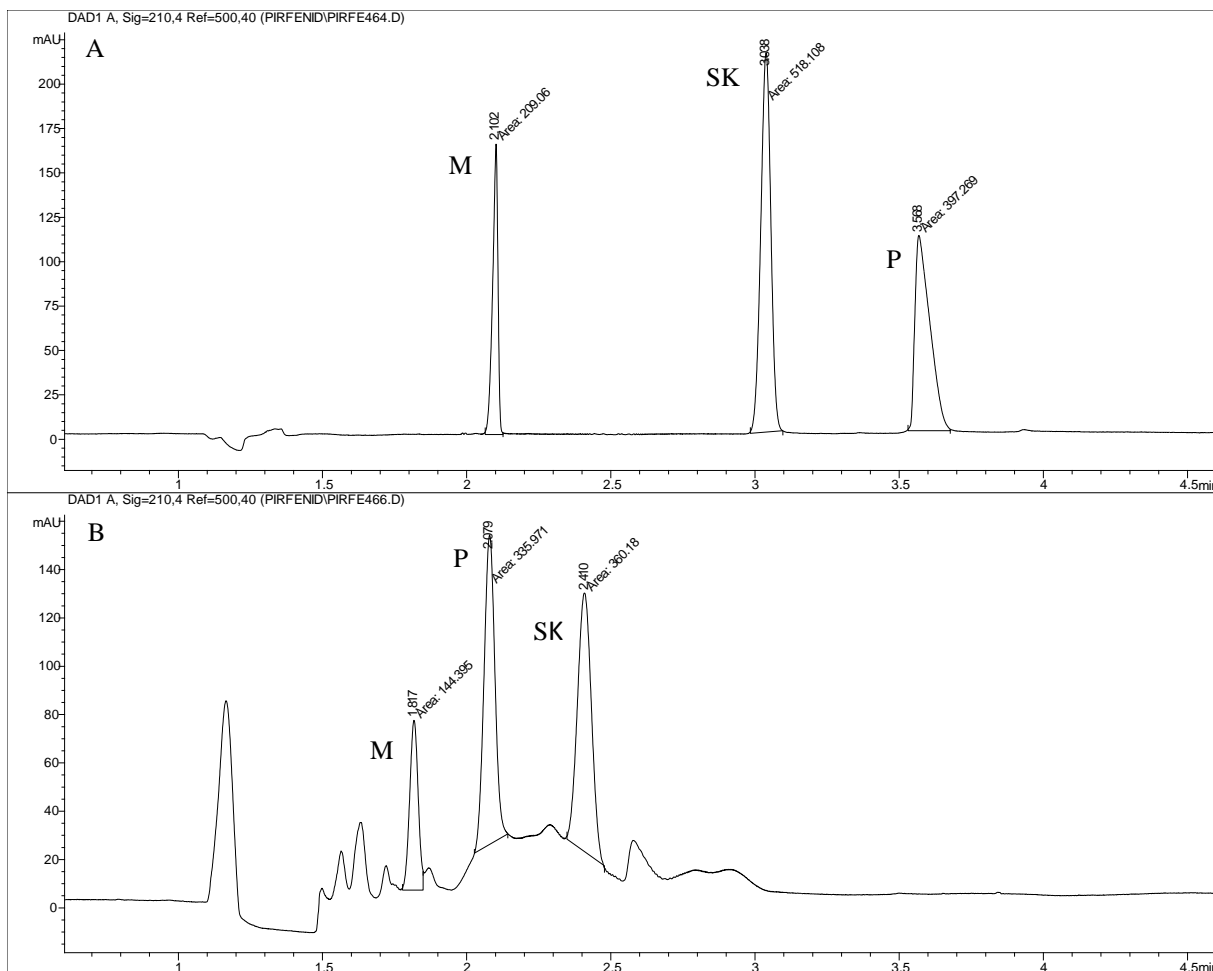
Slika 27 Elektroferogram (A) standardnih otopina pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i salicilne kiseline (SK), (B) „obogaćeni“ uzorak plazme, (C) kontrolni uzorak ukoncentrirane plazme naknadno „obogaćene“

UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 5% ACN, 20 kV, 25°C,  
 uzorak: (A) 50 µg/ml matične standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline razrijeđene u vodi, (B) „obogaćeni“ uzorak plazme proveden standardnim postupkom predobrade do konačne koncentracije od 40 µg/ml, (C) kontrolni uzorka plazme prethodno ukoncentriran i naknadno „obogaćen“

Osim toga, napravljena je i posljednja analiza „obogaćenog“ uzorka plazme, također priređenog prema standardnom postupku predobrade (poglavlje 3.2.3.) s jedinom razlikom u zadnjem koraku. Suhi ostatak je ovaj put otopljen u ACN:H<sub>2</sub>O=50:50, v/v do konačne koncentracije od 40 µg/ml.

Analiza se odvija u boratnom puferu (pH 9,3) koncentracije 20 mM uz dodatak surfaktanta SDS-a koncentracije 65 mM, pri 25°C i 20 kV.

Na slici 28 prikazani su elektroferogrami standardne otopine otopljene u čistoj vodi i „obogaćenog“ uzorka plazme otopljen u smjesi ACN:H<sub>2</sub>O=50:50, v/v. Prvenstveno treba spomenuti prvu analizu na standardnim otopinama (poglavlje 4.1.) otopljenim također u smjesi ACN:H<sub>2</sub>O=50:50 pri čemu se pik pirfenidona razdvojio na dva dijela. Nasuprot tome na Slici 28 pik pirfenidona je dobre simetrije. Osim toga, može se uočiti nepravilna bazna linija, karakteristična za acetonitril, a potom i drugačiji poredak izlaženja pikova kao i na prethodnoj Slici 27. Naime otapanjem uzorka u smjesi ACN:H<sub>2</sub>O=50:50 najprije izlazi pik metabolita, 5-karboksipirfenidona, nakon njega pik pirfenidona te na kraju pik unutarnjeg standarda, salicilne kiseline. Ono što je pak u ovoj analizi zanimljivo jest upravo skraćenje vremena migracije ispitivanih analita (ispitivani analiti izlaze iz kapilare u roku 2,5 minute) što je iznenađujući efekt s obzirom da se radi o organskom otapalu.



Slika 28 Elektroferogram (A) standardnih otopina i (B) „obogaćenog“ uzorka plazme  
 UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer pH 9,3, 65 mM SDS, 20 kV, 25°C, uzorak: (A) 50  
 µg/ml matične standardne otopine pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i salicilne  
 kiseline (SK) razrijeđene u vodi i (B) „obogaćeni“ uzorak plazme proveden kroz standardni  
 postupak pripreme, ali je suhi ostatak otopljen u ACN:H<sub>2</sub>O = 50:50, v/v do konačne  
 koncentracije od 40 µg/ml



## 5 ZAKLJUČCI

Micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija je vrlo moćna analitička tehnika. Najfleksibilnija je od svih CE tehnika koja nudi najveću selektivnost za najširi raspon spojeva, od malih do velikih molekula, organskih do anorganskih te od ionskih do neutralnih molekula, kao što je pirfenidon. Osim toga, karakteriziraju je i mala potrošnja uzoraka i otapala, kratkoća vremena migracije, brz razvoj metode i jednostavna instrumentacija.

Analizom lijeka pirfenidona i njegovog metabolita, 5-karboksipirfenidona, kontinuirano su se mijenjali uvjeti analize s ciljem pronalaska optimalnih radnih uvjeta za njihovo učinkovito odjeljivanje. Problem su stvarale vrlo niske koncentracije analita u biološkim matriksima i koelucija sa komponentama iz biološkog matriksa zbog čega je bila otežana detekcija samih analita. Da bi se to izbjeglo, prije svake analize s biološkim uzorkom, napravljena je predobrada uzorka. Ovaj naizgled bezazleni korak je od velike važnosti prilikom optimizacije bioanalitičke tehnike. Time se postiže odgovarajuća osjetljivost, razlučivanje i robusnost tehnike.

Optimizacija radnih uvjeta najprije je provedena na standardnim otopinama, a potom i na biološkim uzorcima, plazmi i serumu. Premda se većinom koristila plazma, analize s uzorcima seruma su također pokazale dobro razlučivanje i selektivnost pikova. Kao unutarnji standard se koristila salicilna kiselina. Budući da su bile prisutne interferencije iz složenog biološkog matriksa, uz pomoć MEKC omogućeno je povoljno odjeljivanje analita od interesa. Najbolji radni uvjeti potvrđeni su korištenjem tzv. *bubble cell* kvarcne kapilare i boratnog pufera (pH 9,3) koncentracije 20 mM uz dodatak surfaktanta, SDS-a koncentracije 65 mM. Provedena je i analiza uz dodatak 5% ACN u radni pufer kojom se dobilo dobro odjeljivanje ispitivanih analita uz promjenu redoslijeda izlaženja pikova, ali i produljenja vremena migracije pikova. Najčešće primjenjivani naponi na kojima su se izvodile analize su 20 i 25 kV, dok je temperatura bila konstanta, 25°C. Detekcija analita omogućena je uz pomoć UV-Vis detekora, a odabrana valna duljina je 210 nm. Trajanje metode bilo je kraće od 6 minuta u svim ispitanim uvjetima.

Iako se isprobala i primjena organskog otapala (ACN), kao otapala za uzorke, najbolje se otapalo za uzorke pokazala čista voda. Međutim prilikom predobrade bioloških uzoraka, otapanjem u ACN:H<sub>2</sub>O=50:50, v/v dobiveno je dobro odjeljivanje ispitivanih analita, ali i simetrija pika metabolita.

Ovim diplomskim radom, potvrđeni su i ustanovljeni optimalni radni uvjeti u analizama pirfenidona i njegovog metabolita, 5-karboksipirfenidona korištenjem bioloških uzoraka na CE. Međutim, daljnjim analizama potrebno je dodatno istražiti ponašanje ispitivanih analita pri različitim uvjetima (npr. korištenjem organskih otapala) s ciljem optimizacije uvjeta analize, ali isto tako u svrhu prikupljanja pouzdanih, točnih i ponovljivih rezultata za sljedeći korak, odnosno za validaciju bioanalitičke metode.

## 6 LITERATURA

1. Basu D, Kulkarni R. Overview of blood components and their preparation. *Indian J Anaesth*, 2014, 58, 529-538.
2. Cao J, Hu J, Wei J, Li B, Zhang M, Xiang C i Peng Li. Optimization of Micellar Electrokinetic Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Seven Hydrophilic and Four Lipophilic Bioactive Components in Three Salvia Species. *Molecules*, 2015, 20, 15304-15318.
3. Desai SB, Parmar VK, Vaja T. RP-HPLC and UV Spectrophotometric Methods for Estimation of Pirfenidone in Pharmaceutical Formulations. *Indian J Pharm Sci*, 2014, 76, 225-229.
4. El Deeb S, Asad Dawwas H, Gust R. Recent methodological and instrumental development in MEKC. *Electrophoresis*, 2013, 34, 1295-1303.
5. Hancu G, Simon B, Rusu A, Mircia E, Gyéresi Á. Principles of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Applied in Pharmaceutical Analysis. *Adv Pharm Bull*, 2013, 3, 1-8.
6. Hilberg O, Simonsen U, du Bois R, Bendstrup E. Pirfenidone: significant treatment effects in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Clin Respir J*, 2012, 6, 131-143.
7. Huie CW. Effects of organic solvents on sample pretreatment and separation performances in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, 24, 1508-1529.
8. Jouneau S, Gamez AS, Tracllet J, Nunes H, Marchand-Adam S, Kessler R, Israël-Bietg D, Borie R, Strombom I, Scalori A, Crestani B, Valeyre D, Cottin V. A 2-Year Observational Study in Patients Suffering from Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Treated with Pirfenidone: A French Ancillary Study of PASSPORT. *Respiration*, 2019, 1-10.
9. Kapnissi-Christodoulou CP. Method Development by Use of Capillary Electrophoresis and Applications in Pharmaceutical, Biological and Natural Samples. *Electrophoresis*, 2012, 17-40.
10. Majors RE. Sample preparation fundamentals for chromatography. Agilent Technologies, Inc. 2013, 235-239.

11. Margaritopoulos GA, Vasarmidi E, M Antoniou K. Pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evid*, 2016, 11, 11-22.
12. Moeina MM, El Beqqalib A, Abdel-Rehimb M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *J Chromatogr, B*, 2016, 1043, 3-11.
13. Mulvana DE. Critical topics in ensuring data quality in bioanalytical LC-MS method development. *Bioanalysis*, 2010, 2, 1051-1072.
14. Nigović B. Kapilarna elektroforeza. U: Analitika lijekova. Zagreb, 2018.
15. Parag J. Nova bioanalitička kapilarnoelektroforetska metoda za istovremenu analizu pirfenidona i njegovog metabolita, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2019.
16. Sarmini K, Kenndler E. Influence of organic solvents on the separation selectivity in capillary electrophoresis. *J Chromatogr, A*, 1997, 792, 3-11.
17. Sertić M. Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom, Specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.
18. Sotgia S, G Fois A, Sotgiu E, Zinellu A, Paliogiannis P, A Mangoni A, Carru C. Micellar electrokinetic capillary chromatographic determination of pirfenidone and 5-carboxy-pirfenidone by direct injection of plasma from patients receiving treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Microchem J*, 2019, 1-25.
19. Subramaniam, S. Bioanalysis. U: FDA Bioequivalence Standards. Lawrence X Yu, Bing V Li, urednici, New York, Springer, 2014, 419-458.
20. Terabe S. Micellar Electrokinetic Chromatography. Hyogo, Beckman, 1992, 1-5.
21. UNODC. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. Dostupno na: [https://www.unodc.org/documents/scientific/validation\\_E.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf), Datum pristupa: 1.5.2020.

22. Watson DG. Ur. Pharmaceutical Analysis. Churchill Livingstone, Elsevier Limited, 2005, str. 376-397.

23. Yu Z, Kastenmüller G, He Y, Belcredi P, Möller G, Prehn C, Mendes J, Wahl S, Roemisch-Margl W, Ceglarek U, Polonikov A, Dahmen N, Prokisch H, Xie L, Li Y, Erich Wichmann H, Peters A, Kronenberg F, Suhre K, Adamski J, Illig T, Wang-Sattler R. Differences between Human Plasma and Serum Metabolite Profiles. *PLoS ONE*, 2011, 6, 1-6

## 7 SAŽETAK / SUMMARY

Idiopatska plućna fibroza (IPF) je kronična bolest pluća kojoj se ne zna točan uzrok, a i patofiziologija nije u potpunosti razumljiva. Lijek pirfenidon se pokazao vrlo korisnim u terapiji bolesti IPF. On smanjuje propadanje funkcije pluća, a time i progresiju bolesti i posljedičnu smrtnost. Pirfenidon je analiziran istovremeno sa svojim glavnim metabolitom, 5-karboksipirfenidonom i unutarnjim standardom salicilnom kiselinom s ciljem uspostavljanja optimalnih radnih uvjeta na CE. Budući da se radi o neutralnoj molekuli, korištena je micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija koja je omogućila analizu pirfenidona, ali i 5-karboksipirfenidona te salicilne kiseline u složenom biološkom matriksu. Kako bi utvrdili vremena migracije, najprije su napravljene analize na standardnim otopinama pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilnoj kiselini, pri čemu se najbolja analiza pokazala kad su standardi bili razrijeđeni u čistoj vodi. Slijedeće su se analize provodile na plazmi i serumu, pri čemu je veliki naglasak bio na predobradi uzorka zbog složenosti biološkog uzorka. Osim toga, svaki je put uz „obogaćeni“ uzorak napravljen i kontrolni uzorak da bi se utvrdila vremena migracije ispitivanih analita te dostatno odjeljivanje samih pikova. Prilikom analize „obogaćenih“ uzoraka, pravi je izazov predstavljalo osiguravanje osjetljivosti s obzirom na vrlo niske koncentracije ispitivanih analita u biološkim uzorcima. U većini analiza uočena je nepravilna simetrija pika metabolita 5-karboksipirfenidona te je stoga njemu bilo posvećeno više pažnje tokom ovog diplomskog rada. Međutim, bez obzira na to, optimalni uvjeti analize dobiveni su korištenjem 20 mM boratnog pufera (pH 9,3) uz dodatak SDS-a koncentracije 65 mM. Temperatura od 25°C bila je konstanta dok je napon bio ili 20 ili 25 kV ovisno o analizi. Odabrana valna duljina na kojoj su proučavani ispitivani analiti je 210 nm. Na kraju je kao otapalo za uzorke ispitan i acetonitril, što je pokazalo zanimljive rezultate poput skraćanja vremena analize, dobru simetriju i odjeljivanje pikova. Ovim diplomskim radom utvrđeni su i ustanovljeni optimalni uvjeti odvajanja pikova analita od interesa, primjenom na biološkim uzorcima, metodom kapilarne elektroforeze.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic lung disease whose exact cause is not known, and the pathophysiology is not fully understood. The drug pirfenidone has been shown to be very useful in therapy of IPF. It reduces the deterioration of lung function and thus disease progression and consequent mortality. Pirfenidone was analyzed simultaneously with its major metabolite, 5-carboxypirfenidone, and the internal standard salicylic acid in order to establish optimal assay conditions in CE. Since it is a neutral molecule, micellar electrokinetic capillary chromatography was used, which enabled the analysis of pirfenidone, but also 5-carboxypirfenidone and salicylic acid in a complex biological matrix. To determine migration times, analyses were first performed on standard solutions of pirfenidone, 5-carboxypirfenidone, and salicylic acid, with the best analysis being shown when the standards were diluted in pure water. The following analyses were performed in plasma and serum, with great emphasis on sample pretreatment due to the complexity of the biological sample. Furthermore, a control sample was made each time in addition to the spiked sample in order to determine the migration times of the tested analytes and to provide sufficient separation of the peaks themselves. When analyzing spiked samples, the challenge was to ensure sufficient sensitivity given the very low concentrations of test analytes in the biological samples. In most analyses, an irregular symmetry of the peak of the metabolite 5-carboxypirfenidone was observed and therefore brought more attention to itself. Nevertheless, optimal assay conditions were obtained using 20 mM borate buffer (pH 9.3) with the addition of 65 mM SDS. The temperature of 25 ° C was constant while the voltage was either 20 or 25 kV depending on the analysis. The selected wavelength at which the test analytes were studied was 210 nm. Finally, acetonitrile, was tested as the sample solvent, which showed interesting results such as shortening of the analysis time, good symmetry and peak separation. This diploma thesis determines and establishes the optimal assay conditions for separation of the tested analytes in biological samples by capillary electrophoresis.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### IZAZOVI RAZVOJA MEKC METODE ZA ODREĐIVANJE PIRFENIDONA I 5-KARBOKSIPIRFENIDONA U BIOLOŠKOM UZORKU

Laura Serdar

#### SAŽETAK

Idiopatska plućna fibroza (IPF) je kronična bolest pluća kojoj se ne zna točan uzrok, a i patofiziologija nije u potpunosti razumljiva. Lijek pirfenidon se pokazao vrlo korisnim u terapiji bolesti IPF. On smanjuje propadanje funkcije pluća, a time i progresiju bolesti i posljedičnu smrtnost. Pirfenidon je analiziran istovremeno sa svojim glavnim metabolitom, 5-karboksipirfenidonom i unutarnjim standardom salicilnom kiselinom s ciljem uspostavljanja optimalnih radnih uvjeta na CE. Budući da se radi o neutralnoj molekuli, korištena je micelarna elektrokinetička kapilarna kromatografija koja je omogućila analizu pirfenidona, ali i 5-karboksipirfenidona te salicilne kiseline u složenom biološkom matriksu. Kako bi utvrdili vremena migracije, najprije su napravljene analize na standardnim otopinama pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilnoj kiselini, pri čemu se najbolja analiza pokazala kad su standardi bili razrijeđeni u čistoj vodi. Slijedeće su se analize provodile na plazmi i serumu, pri čemu je veliki naglasak bio na predobradi uzorka zbog složenosti biološkog uzorka. Osim toga, svaki je put uz „obogaćeni“ uzorak napravljen i kontrolni uzorak da bi se utvrdila vremena migracije ispitivanih analita te dostatno odjeljivanje samih pikova. Prilikom analize „obogaćenih“ uzoraka, pravi je izazov predstavljalo osiguravanje osjetljivosti s obzirom na vrlo niske koncentracije ispitivanih analita u biološkim uzorcima. U većini analiza uočena je nepravilna simetrija pika metabolita 5-karboksipirfenidona te je stoga njemu bilo posvećeno više pažnje tokom ovog diplomskog rada. Međutim, bez obzira na to, optimalni uvjeti analize dobiveni su korištenjem 20 mM boratnog pufera (pH 9,3) uz dodatak SDS-a koncentracije 65 mM. Temperatura od 25°C bila je konstanta dok je napon bio ili 20 ili 25 kV ovisno o analizi. Odabrana valna duljina na kojoj su proučavani ispitivani analiti je 210 nm. Na kraju je kao otapalo za uzorke ispitan i acetonitril, što je pokazalo zanimljive rezultate poput skraćivanja vremena analize, dobru simetriju i odjeljivanje pikova. Ovim diplomskim radom utvrđeni su i ustanovljeni optimalni uvjeti odvajanja pikova analita od interesa, primjenom na biološkim uzorcima, metodom kapilarne elektroforeze.

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

Rad sadrži: 49 stranica, 28 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 24 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: pirfenidon, kapilarna elektroforeza, 5-karboksipirfenidon, salicilna kiselina, acetonitril

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

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

**Izv. prof. dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Kristina Pavić**, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2020.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of of Analytics and Control of Medicines  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### CHALLENGES OF DEVELOPMENT OF MEKC METHOD FOR DETERMINATION OF PIRFENIDONE AND 5-CARBOXYPIRFENIDONE IN BIOLOGICAL SAMPLE

**Laura Serdar**

#### SUMMARY

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic lung disease whose exact cause is not known, and the pathophysiology is not fully understood. The drug pirfenidone has been shown to be very useful in therapy of IPF. It reduces the deterioration of lung function and thus disease progression and consequent mortality. Pirfenidone was analyzed simultaneously with its major metabolite, 5-carboxypyrfenidone, and the internal standard salicylic acid in order to establish optimal assay conditions in CE. Since it is a neutral molecule, micellar electrokinetic capillary chromatography was used, which enabled the analysis of pirfenidone, but also 5-carboxypyrfenidone and salicylic acid in a complex biological matrix. To determine migration times, analyses were first performed on standard solutions of pirfenidone, 5-carboxypyrfenidone, and salicylic acid, with the best analysis being shown when the standards were diluted in pure water. The following analyses were performed in plasma and serum, with great emphasis on sample pretreatment due to the complexity of the biological sample. Furthermore, a control sample was made each time in addition to the spiked sample in order to determine the migration times of the tested analytes and to provide sufficient separation of the peaks themselves. When analyzing spiked samples, the challenge was to ensure sufficient sensitivity given the very low concentrations of test analytes in the biological samples. In most analyses, an irregular symmetry of the peak of the metabolite 5-carboxypyrfenidone was observed and therefore brought more attention to itself. Nevertheless, optimal assay conditions were obtained using 20 mM borate buffer (pH 9.3) with the addition of 65 mM SDS. The temperature of 25 ° C was constant while the voltage was either 20 or 25 kV depending on the analysis. The selected wavelength at which the test analytes were studied was 210 nm. Finally, acetonitrile, was tested as the sample solvent, which showed interesting results such as shortening of the analysis time, good symmetry and peak separation. This diploma thesis determines and establishes the optimal assay conditions for separation of the tested analytes in biological samples by capillary electrophoresis.

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

Thesis includes: 49 pages, 28 figures, 1 table and 24 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Pirfenidone, capillary chromatography, 5-carboxypyrfenidone, salicylic acid, acetonitrile

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

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

The thesis was accepted: July 2020.

