

Nova bioanalitička kapilarnoelektroforetska metoda za istovremenu analizu pirfenidona i njegovog metabolita

Parag, Juraj

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:322847>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



Juraj Parag

**Nova bioanalitička kapilarnoelektroforetska
metoda za istovremenu analizu pirfenidona i
njegovog metabolita**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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 mojoj mentorici, doc. dr. sc. Mirandi Sertić, na pruženoj prilici i na stručnom vodstvu, pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem roditeljima i obitelji na podršci tijekom cijelog mog školovanja.

Posebno hvala mome djedu na svim danima koje je proveo sa mnom i na ogromnom strpljenju.

Veliko hvala Ivani za svaki trenutak u kojem je morala slušati moje isfrustrirane monologe o faksu i što mi je svojim prisutstvom olakšala turobne sate provedene u NSB-u.

Hvala puno mojim prijateljima što su mi još uvijek prijatelji.

Hvala svim laboratorijskim životinjama koje su dale svoj život za napredak znanosti.

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1 BIOANALITIČKE METODE | 1 |
| 1.2 KAPILARNA ELEKTROFOREZA | 2 |
| 1.2.1 Primjena kapilarne elektroforeze u farmaceutskoj analitici | 2 |
| 1.2.2 Instrument za kapilarnu elektroforezu | 2 |
| 1.2.3 Načelo metode | 3 |
| 1.2.4 Vrste kapilarne elektroforeze..... | 7 |
| 1.3 PIRFENIDON | 9 |
| 1.3.1 Idiopatska plućna fibroza i pirfenidon..... | 9 |
| 1.3.2 Farmakodinamika i farmakokinetika pirfenidona..... | 10 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 11 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 12 |
| 3.1. Materijali | 12 |
| 3.1.1. Kemikalije | 12 |
| 3.1.2. Standardi | 12 |
| 3.1.3. Uzorci | 12 |
| 3.1.4. Radni instrumenti | 13 |
| 3.1.5. Pribor | 13 |
| 3.1.6. Programski paketi..... | 13 |
| 3.2. Metode | 14 |
| 3.2.1. Priprema instrumenta za analizu | 14 |
| 3.2.2. Priprema radnog pufera | 14 |
| 3.2.3. Priprema standardnih otopina..... | 15 |
| 3.2.4. Uvjeti analize..... | 15 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 16 |
| 4.1. Početna ispitivanja | 16 |
| 4.2. Odabir unutarnjeg standarda | 20 |
| 4.3. Optimizacija uvjeta metode | 23 |
| 4.3.1. Odabir koncentracije boratnog pufera | 23 |
| 4.3.2. Odabir prikladnog napona | 25 |
| 4.3.3. Primjena metode na biološkim uzorcima | 28 |
| 5. ZAKLJUČAK | 31 |
| 6. LITERATURA | 32 |
| 7. SAŽETAK / SUMMARY | 34 |
| 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

1.1 BIOANALITIČKE METODE

Bioanalitičke metode su metode prikupljanja, procesiranja, pohrane i analize biološkog matriksa. One se bave kvantifikacijom ksenobiotika i njihovih metabolita, ali i bioloških molekula, poput proteina i nukleinskih kiselina, u biološkim uzorcima. Kvantifikacija ksenobiotika i njihovih metabolita u ljudskim i životinjskim tkivima i plazmi postala je vrlo bitan aspekt razvoja lijekova. Njome se dobivaju podaci koji se koriste u daljnjim istraživanjima farmakokinetike, farmakodinamike i toksokinetike lijekova. Posljedično tome, bioanalitičke metode su se razvijale kako je rastao broj lijekova u istraživanjima (Begum SS i sur., 2015; Xue YJ i sur., 2012). Njihov razvoj postao je mnogo zahtjevniji proteklih godina zbog sve strožih zahtjeva oko pouzdanosti, osjetljivosti i brzine metode, upravo zbog velike važnosti njihovih rezultata za daljnji tijek istraživanja. To je dovelo do usporenja razvoja bioanalitičkih metoda u usporedbi s brzinom registracije novih lijekova na tržište, pa danas postoji određeni vremenski odmak između registracije lijeka i razvoja bioanalitičke metode za njegovu analizu (Pathuri R. i sur.; Novakova L, 2012). Zlatni standard danas je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) s tandemskom masenom spektrometrijom (engl. Tandem Mass Spectrometry, MS/MS), koja je zamijenila HPLC s UV detekcijom u toj ulozi. Plinska kromatografija s masenim spektrometrom (engl. Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry, GC-MS) je također jedna od spregnutih metoda koje se koriste u bioanalizi, međutim ona je ipak popularnija u forenzici, gdje se smatra zlatnim standardom. Najmlađa od svih bioanalitičkih metoda te metoda koja se najbrže razvija, je kapilarna elektroforeza (Capillary Electrophoresis, CE), koja se također može sprežati s masenim spektrometrom (CE-MS). Ona objedinjuje visoku efikasnost odvajanja kapilarne elektroforeze te selektivnost i osjetljivost karakteristične za masenu spektrometriju (MS). Iako je CE vrlo interesantna tehnika, još uvijek zahtijeva dorade u smislu povećanja robustnosti i smanjenja varijacija vremena migracije kao posljedice fluktuacije elektroosmotskog toka, što će detaljnije biti opisano kasnije (prilagođeno, Begum SS i sur., 2015).

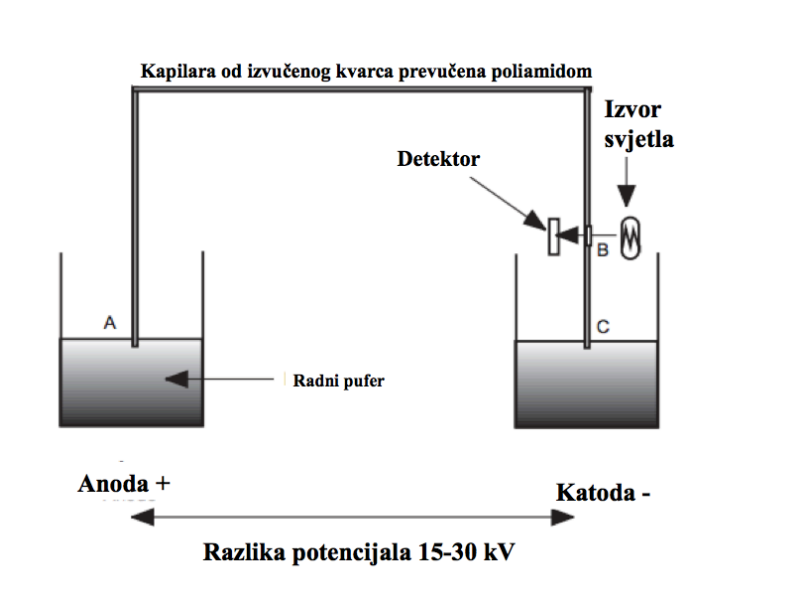
1.2 KAPILARNA ELEKTROFOREZA

1.2.1 Primjena kapilarne elektroforeze u farmaceutskoj analitici

Kapilarna elektroforeza je relativno nova separacijska analitička metoda koja se brzo razvija, a koristi se kao nadopuna tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) ili sve češće, kao njena zamjena (Damić M. i Nigović B, 2010). Njene prednosti u odnosu na HPLC uključuju brz razvoj metode, nisku potrošnju uzorka i otapala, brzu i vrlo učinkovitu separaciju, kraće vrijeme analize, te jeftinije kolone (kapilare) (Begum SS i sur., 2015). Ograničenja u odnosu na HPLC su mala osjetljivost, slaba robustnost, te potreba za optimizacijom više parametara (Watson, 2012). Zbog njene sposobnosti analize svih vrsta analita - od malih molekula neovisno o njihovom naboju poput lijekova, do velikih biomakromolekula poput DNA i proteina, kapilarna elektroforeza ima široku primjenu u farmaciji. U analitici lijekova prvenstveno se primjenjuje za određivanje sadržaja lijekova u svim vrstama ljekovitih oblika, a koristi se i pri određivanju profila čistoće lijekova te pri analizi lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama i tkivima (Damić M. i Nigović B, 2010).

1.2.2 Instrument za kapilarnu elektroforezu

Instrument je puno jednostavniji od onog za HPLC, izuzev visokog napona potrebnog za provođenje analize. Na slici 1 prikazana je shema uređaja. Kapilara s elektrolitom je na oba kraja uronjena u radni pufer. Kapilare su najčešće izrađene od kvarcnog stakla te su radi zaštite od lomljenja obavijene slojem poliamida. Unutarnji promjer im je u rasponu od 10 do 250 μm , a duljina od 10 do 110 cm (Piljac I, 2006). Visokonaponski izvor struje preko dviju elektroda osigurava uspostavu električnog polja u kapilari. Otopina uzorka se injektira pomoću sustava za unošenje uzorka (*autosamplera*) na ulaznom kraju kapilare, a njegova detekcija se vrši na izlaznom kraju kapilare gdje se nalazi i sam detektor. Najčešće korištena tehnika detekcije je UV-VIS spektrofotometrija, međutim koriste se i fluorescencija, amperometrija, konduktometrija, potenciometrija i masena spektrometrija (MS), ovisno o vrsti analita i cilju analize. Instrument sadrži i termostat, koji osigurava željenu temperaturu kapilare (Shintani H, 1997).



Slika 1 Shematski prikaz uređaja za kapilarnu elektroforezu (Prilagođeno iz: Watson, 2012)

1.2.3 Načelo metode

Separacija analita u kapilarnoj elektroforezi temelji se na razlici u brzinama migracije analita kroz kapilaru u električnom polju. Primijenjeno električno polje, E (V/cm), ovisi o duljini kapilare, L , i o primijenjenom naponu, V .

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

Brzina iona je dana sljedećom jednačbom:

$$v = \mu_e E$$

gdje v predstavlja brzinu migracije iona, μ_e elektroforetsku pokretljivost iona, a E primijenjeno električno polje.

Elektroforetska pokretljivost analita, μ_e opisana je jednačbom:

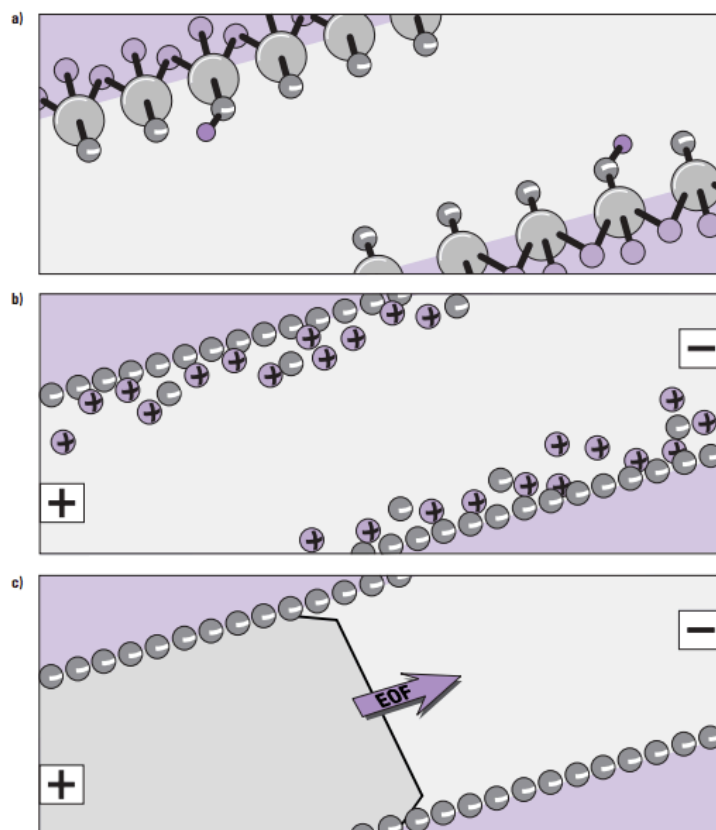
$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r v}$$

gdje q predstavlja naboj iona, η predstavlja viskoznost otopine elektrolita, a r Stoksov polumjer iona. Kada primijenjeno električno polje bude jače od sile trenja, čestica će početi migrirati. Iz formule je vidljivo da se elektroforetska pokretljivost povećava povećanjem naboja iona, te smanjenjem veličine čestice. Stoga, mobilnost molekule u električnom polju može biti mijenjana promjenom stupnja ionizacije molekule – što je molekula ioniziranija, to se brže kreće (Watson 2012).

Na unutrašnjoj stijenci kapilare od kvarcnog stakla nalaze se silanolne skupine (-Si-OH), koje pri pH vrijednostima većim od 3 ioniziraju te se stvara negativan naboj. Kationi iz pufera bivaju privučeni tim negativnim nabojem na stijenci kapilare, što rezultira stvaranjem električnog dvostrukog sloja, koji se sastoji od čvrstog dijela (sloj kationa uz stijenu kapilare) i difuznog dijela (kationi i anioni) (Piljac I, 2006; Damić M. i Nigović B, 2010). Primjenom napona na krajevima kapilare, kationi iz difuznog sloja kreću migrirati prema katodi. Budući da su otopljeni, oni za sobom povlače molekule vode prema katodi, tako stvarajući elektroosmotski tok (EOF) (slika 2) (Damić M. i Nigović B, 2010; Watson, 2012). Brzina elektroosmotskog toka v_{EOF} je definirana izrazom:

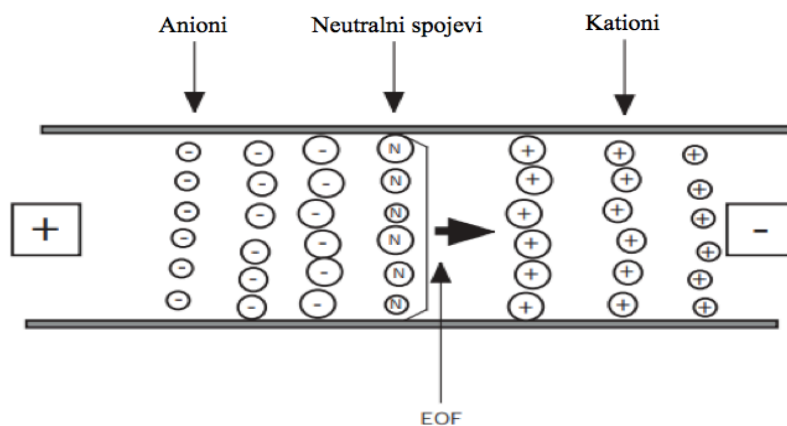
$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E = \frac{\varepsilon \zeta V}{\eta L}$$

u kojem je ε dielektrična konstanta pufera, a ζ je zeta potencijal na unutrašnjoj površini kapilare. Osim o ε i ζ , vidljivo je da brzina elektroosmotskog toka ovisi i o viskoznosti otopine elektrolita, primijenjenom naponu i duljini kapilare (Sertić M, 2016).



Slika 2 Nastanak elektroosmotskog toka (EOF): **a)** negativno nabijene silanolne skupine na unutrašnjoj strani kapilare od izvučenog kvarcnog stakla, **b)** nastanak električnog dvostrukog sloja **c)** elektroosmotski tok prema katodi (preuzeto iz: Heiger D., 2000.)

Elektroosmotski tok predstavlja pokretačku silu za sve molekule u kapilari – nabijene i nenabijene. Kationi će se kretati prema katodi brzinom određenom njihovom veličinom i nabojem, a neutralni spojevi će se kretati prema anodi brzinom elektroosmotskog toka. Anioni će se kretati prema anodi brzinom određenom njihovom veličinom i nabojem, međutim, s obzirom da je brzina elektroosmotskog toka prema katodi veća od brzine migracije aniona prema anodi, ukupan smjer kretanja aniona je ipak prema katodi. Na slici 3 je prikazana tipična separacija kod kapilarne elektroforeze. Zbog obrnuto proporcionalnog odnosa brzine migracije i veličine iona, kationi manjeg promjera prvi dolaze do katode, a zatim oni većeg promjera. Neutralni spojevi do katode dolaze kao neovisna zona nošeni elektroosmotskim tokom, a anioni izlaze posljednji. Kako se anioni kreću prema anodi, do katode će prvi doći oni manje pokretljivosti, tj oni veći, a zadnji će izaći oni manji (Watson, 2012).



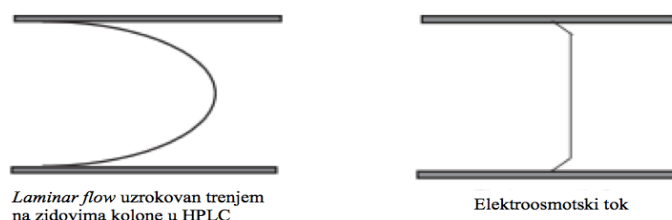
Slika 3 Migracija iona i neutralnih spojeva u CE (preuzeto iz: Watson, 2012)

Na elektroosmotski tok utječu brojni čimbenici koje treba imati u vidu prilikom analize, poput pH i ionske jakosti radnog pufera, jačine električnog polja, temperature, dodatka organskih modifikatora i površinski aktivnih tvari te modifikacija unutrašnje stijenke kapilare. Količina parametara koji utječu na elektroosmotski tok, a s time i na analizu, omogućuje modificiranje metode prema željama analitičara, ali je ujedno i glavni nedostatak kapilarne elektroforeze u odnosu na HPLC (Tablica 1).

Tablica 1 čimbenici koji utječu na elektroosmotski tok (prilagođeno iz: Nigović B. 2017.)

| ELEKTROOSMOTSKI TOK | |
|--|--|
| pH pufera | Raste porastom pH |
| Ionska jakost pufera | Smanjuje se porastom ionske jakosti |
| Električno polje | Raste porastom napona |
| Temperatura | Raste porastom temperature |
| Organski modifikatori | Najčešće se smanjuje njihovim dodatkom |
| Površinski aktivne tvari | Anionske povećavaju, a kationske smanjuju |
| Modifikacije unutrašnje stijenke kapilare | Neutralni sloj smanjuje, a ionski povećava |

Kada bismo uspoređivali kapilarnu elektroforezu s HPLC, elektroosmotski tok bismo mogli usporediti sa tlakom pumpe koji je pokretačka sila u HPLC, no ipak prednost EOF je da njegov ravan profil ne uzrokuje disperziju zone analita, tj. širenje vrpci, što omogućuje bolju simetriju pikova u odnosu na HPLC (slika 4) (Shintani H, 1997).



Slika 4 Usporedba laminarnog toka u HPLC i elektroosmotskog toka u kapilarnoj elektroforezi (Preuzeto iz: Watson 2012.)

1.2.4 Vrste kapilarne elektroforeze

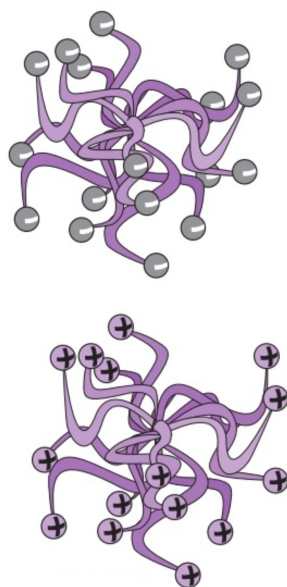
Kapilarna elektroforeza je vrlo prilagodljiva tehnika koja nudi mnogo različitih načina razdvajanja analita, modifikacija kapilare ili radnog pufera te načina detekcije. Ta njena prilagodljivost nudi velike mogućnosti primjene metode u različite svrhe (Heiger D., 2000; Sertić M. 2016). Mehanizmi separacije analita su različiti u svakoj vrsti metode, a odabir vrste tehnike ovisi o analitu. Deset različitih vrsta kapilarne elektroforeze prikazano je u tablici 2.

Tablica 2 Vrste kapilarne elektroforeze i prikladni analiti (prilagođeno, Sertić M, 2013)

| Vrsta kapilarne elektroforeze | Vrsta analita |
|---|---|
| Kapilarna zonska elektroforeza (CZE) | Nabijeni analiti |
| Kapilarna gel elektroforeza (CGE) | Biološke makromolekule (DNA, RNA, proteini) |
| Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC) | Neutralni i nabijeni analiti |
| Kapilarno izoelektrično fokusiranje (CIEF) | Proteini i peptidi |
| Kapilarna izotahoforeza (CITP) | Ioni |
| Kiralna kapilarna elektroforeza (CCE) | Kiralne molekule |
| Kapilarna elektrokromatografija (CEC) | Male molekule |
| Mikroemulzijska elektrokinetička kromatografija (MEEKC) | Analiti slabo topljivi u vodi |
| Nevodena kapilarna elektroforeza (NACE) | Analiti netopljivi u vodi |

1.2.4.1 Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC)

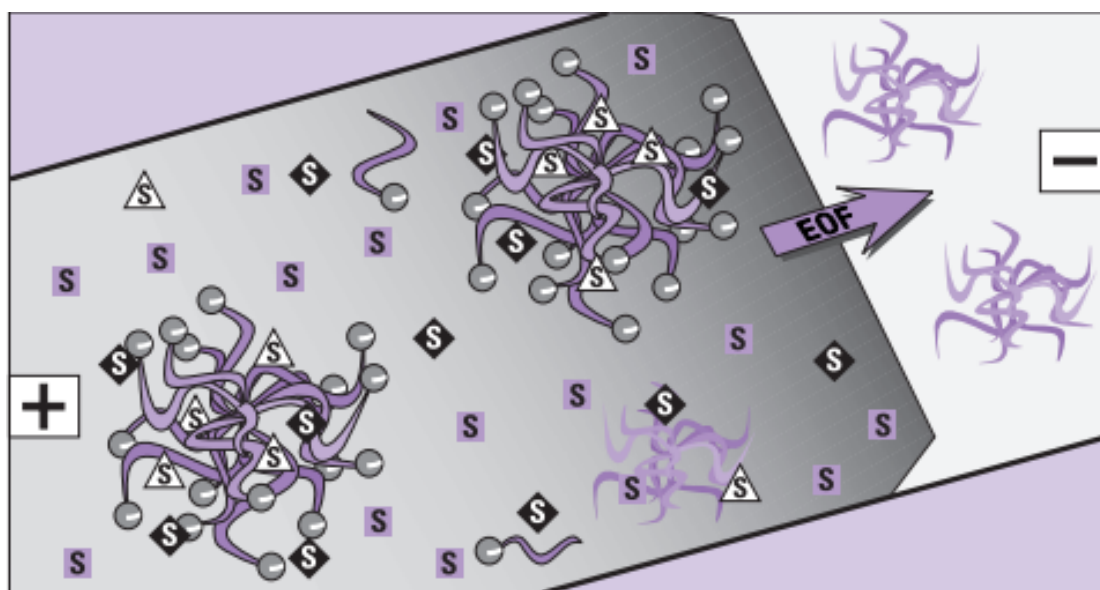
Micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC) je tip elektroforeze uveden 1984., koja je svojevrsna kombinacija elektroforeze i kromatografije. Ona jedina može razdvajati i neutralne i nabijene analite, što ju svrstava među najmoćnije separacijske metode. Separacija neutralnih analita postiže se dodatkom surfaktanta u radni pufer u koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije (CMC). Pri takvim koncentracijama surfaktanta nastaju micelle – sferične strukture s hidrofobnim repovima orijentiranim prema unutrašnjosti, s ciljem izbjegavanja interakcije s hidrofilnim puferom te s hidrofilnim nabijenim glavama orijentiranim prema van (slika 5).



Slika 5 Shematski prikaz kationske i anionske micelle (prilagođeno iz: Heiger D, 2000)

Neutralni analiti stupaju u hidrofobne i elektrostatske interakcije s micelama. Takve interakcije su karakteristične za kromatografiju, pa se kaže da micelle tvore pseudostacionarnu fazu. Micelle su nabijene te zahvaljujući njihovom naboju, neutralni analiti putuju kroz kapilaru. Surfaktanti koji se koriste u MEKC mogu biti pozitivno ili negativno nabijeni, u obliku *zwitter iona* ili čak neutralni. Međutim, u praksi se najčešće koriste negativno nabijeni surfaktanti kao što je natrij dodecil sulfat (SDS). S obzirom na to da su negativno nabijene, micelle SDS-a se ponašaju kao anioni – kreću se prema anodi, ali kako je brzina kretanja EOF veća, on ih nosi prema katodi. Iz toga proizlazi da upravo interakcija neutralnog analita i

micelle određuje brzinu migracije analita kroz kapilaru. Što je analit hidrofobniji, to stupa u jače interakcije s micelama te posljedično sporije putuje kroz kapilaru, pa se kaže da brzina migracije neutralnih analita ovisi samo o konstanti raspodjele između micelle i vodene otopine. S druge pak strane, brzina migracije nabijenih analita osim o konstanti raspodjele između micelle i vodene otopine, ovisi i o elektroforetskoj pokretljivosti samog analita (slika 6) (Heiger D, 2000; Sertić M, 2016).



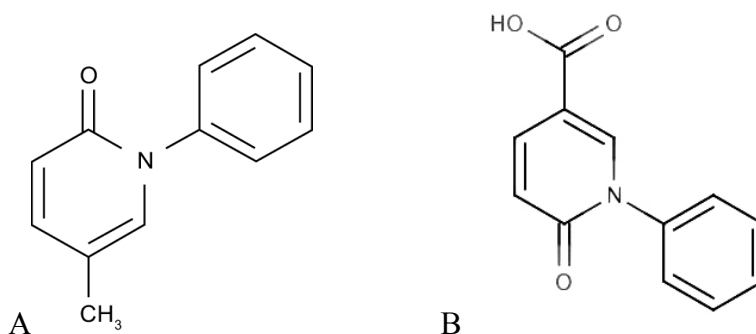
Slika 6 Shematski prikaz separacije u MEKC. **S u bijelom trokutu** – neutralni analit, **S u rozom kvadratiću** – nabijeni analit (preuzeto iz Heiger D, 2000)

1.3 PIRFENIDON

1.3.1 Idiopatska plućna fibroza i pirfenidon

Idiopatska plućna fibroza je kronična, progresivna i fatalna plućna bolest (median preživljenja je 3-5 godina), za koju još uvijek nema učinkovitog lijeka, a koja se javlja u srednjoj do starijoj životnoj dobi (55-75 godina). Karakterizirana je kroničnom i progresivnom dispnejom i kašljem, a najčešći uzrok smrti je zatajenje disanja (www.nhlbi.nih.gov; King TE Jr i sur., 2011). Aktualne studije pretpostavljaju da se razvija uslijed kroničnog oštećenja epitelnih stanica te njihove posljedične fibroze. U skladu s tim

saznanjima, fokus liječenja je prebačen s kortikosteroida i imunosupresiva na lijekove koji smanjuju fibrozu. Pirfenidon (5-metil-1-fenil-2(1H)-on) je relativno novi antifibrotički lijek koji je pokazao obećavajuće rezultate u kliničkim ispitivanjima (slika 7A) (Taniguchi H. i sur., 2010).



Slika 7. Kemijske strukture (A) pirfenidona i (B) 5-karboksipirfenidona

1.3.2 Farmakodinamika i farmakokinetika pirfenidona

U kliničkim ispitivanjima faze II i III provedenima u Japanu pokazano je da pirfenidon ima potencijalno kombinirana antiinflamatorna, antioksidativna i antifibrozirajuća svojstva. Ta ispitivanja uključivala su dvostruko slijepu, placebo kontroliranu kliničku studiju u kojoj je pirfenidon pokazao utjecaj na usporavanje degradacije forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC) u periodu od 9 mjeseci. Mehanizam djelovanja pirfenidona još uvijek nije u potpunosti utvrđen, međutim pretpostavlja se da smanjuje nakupljanje upalnih stanica poput $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{IL-1}\beta$. Utvrđeno je i da smanjuje proliferaciju fibroblasta, stvaranje proteina povezanih s fibrozom, stvaranje citokina te povećanu biosintezu i akumulaciju izvanstaničnog matriksa kao odgovor na citokine. (Taniguchi H. i sur., 2010; www.ema.europa.eu). Nakon oralne apsorpcije - koja je veća natašte - pirfenidon se vezuje za proteine ljudske plazme, prvenstveno za serumski albumin. Volumen distribucije u stanju dinamičke ravnoteže mu iznosi približno 70 L, prema čemu spada u lijekove umjerene distribucije u tkiva. Oko 70-80% lijeka se metabolizira prvenstveno pomoću CYP1A2 enzima, uz manji doprinos drugih CYP enzima. Glavni metabolit je 5-karboksipirfenidon, koji je u *in vitro* istraživanjima također pokazao određenu farmakološku aktivnost (slika 7B) (www.ema.europa.eu).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pirfenidon je relativno novi lijek na tržištu registriran za terapiju rijetke i smrtonosne bolesti – plućne fibroze, koji je u kliničkim istraživanjima pokazao vrlo obećavajuće rezultate. Oko 70 do 80 % pirfenidona se intenzivno metabolizira preko enzima CYP, a glavni metabolit mu je 5-karboksipirfenidon koji je također pokazao farmakološku aktivnost. Unatoč sve češćoj upotrebi pirfenidona, još uvijek ne postoji brza i jednostavna metoda njegove analize u biološkim uzorcima.

Cilj ovog istraživanja bio je razviti kapilarnoelektroforetsku metodu analize pirfenidona i njegovog glavnog metabolita, kako bi se omogućila njihova brza i jednostavna detekcija i kvantifikacija u biološkim uzorcima. Kapilarna elektroforeza je odabrana zbog svoje brzine i prilagodljivosti. Kako je pirfenidon neutralna molekula, korištena je inačica kapilarne elektroforeze naziva Micelarna elektrokinetička kromatografija. U ovakvom tipu elektroforeze, u radni pufer je dodan surfaktant natrijev dodecil sulfat u koncentraciji većoj od njegove kritične micelarne koncentracije, pri čemu su nastale micle koje su stupale u interakciju s neutralnim analitom i omogućavale njegovo kretanje kroz kapilaru. Parametri analitičke metode su prvo optimizirani primjenom standardnih otopina analita, pri čemu su dobiveni uvjeti koji omogućavaju dobro razlučivanje, izgled i simetriju pikova te je odabran unutarnji standard. Nakon optimizacije uvjeta u analizi sa standardnim otopinama, metoda je primjenjena na biološke uzorke tkiva štakora tretiranih pirfenidonom. Potrebno je bilo ponovo optimizirati uvjete predložene metode zbog raznih interferencija iz složenog matriksa bioloških uzoraka, a problem je predstavljala i niska koncentracija analita. Problem niske koncentracije analita i male osjetljivosti metode bit će izazov u daljnjem razvoju ove metode.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

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

3.1.2. Standardi

- 5-karboksipirfenidon (Toronto Research Chemicals, Kanada)
- Ketoprofen (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany)
- Kodein (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Kofein (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Pirfenidon (Toronto Research Chemicals, Kanada)
- Propifenazon (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Salicilna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

3.1.3. Uzorci

- Uzorak tkiva desnog ventrikula izoliran nakon tretiranja štakora pirfenidonom

3.1.4. 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 pročišćavanje vode Waterpro (Labonco, Kansas City, MI, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)
- Vortex mješalica (Ika, Njemačka)

3.1.5. Pribor

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

3.1.6. 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 instrumenta za analizu

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

3.2.2. Priprema radnog pufera

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

Otopina boratnog pufera koncentracije 150 mM pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine natrijeva tetraborata dekahidrata u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 50,0 mL. U svrhu pospješivanja otapanja krutog tetraborata, tikvica je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta

Otopina surfaktanta natrij dodecil sulfata koncentracije 100 mM pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine natrij dodecil sulfata u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 100,0 mL.

Pripremljene matične otopine boratnog pufera i surfaktanta su čuvane na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi. Iz matičnih otopina je neposredno prije analize pripravljana otopina radnog pufera, njihovim međusobnim miješanjem u željenim omjerima uz dodatak potrebnog volumena ultračiste vode. Prije svake pripreme radnog pufera matične otopine su profiltrirane kroz membranski filter širine pora 0,22 μm .

3.2.3. Priprema standardnih otopina

Standardna otopina pirfenidona pripremljena je otapanjem standarda pirfenidona u smjesi otapala H₂O:acetonitril (ACN) = 50:50 (v/v) u odmjerne tikvici od 5mL, tako da se postigne koncentracija standarda pirfenidona od 0,5 mg/mL.

Standardna otopina 5-karboksipirfenidona pripremljena je otapanjem standarda 5-karboksipirfenidona u smjesi otapala H₂O:ACN = 50:50 (v/v) u odmjerne tikvici od 5mL, tako da se postigne koncentracija standarda pirfenidona od 1,0 mg/mL.

Standardne otopine supstancija koje se ispitalo kao moguće unutarnje standarde (ketoprofen, kodein, kofein, paracetamol, propifenazon i salicilna kiselina) pripremljene su otapanjem standarda svake pojedinačne supstancije u smjesi otapala H₂O:ACN = 50:50 (v/v) u odmjerne tikvici od 5mL, tako da se postigne koncentracija standarda od 1,0 mg/mL.

Sve pripremljene matične standardne otopine su čuvane u frižideru na +4 °C, a iz njih su neposredno prije analize pripremane radne standardne otopine razrjeđivanjem s ultračistom vodom ili sa smjesom otapala H₂O:ACN u različitim omjerima. U svakoj radnoj standardnoj otopini koncentracija supstancija prisutnih u njoj su bile 50 mg/mL.

3.2.4. Uvjeti analize

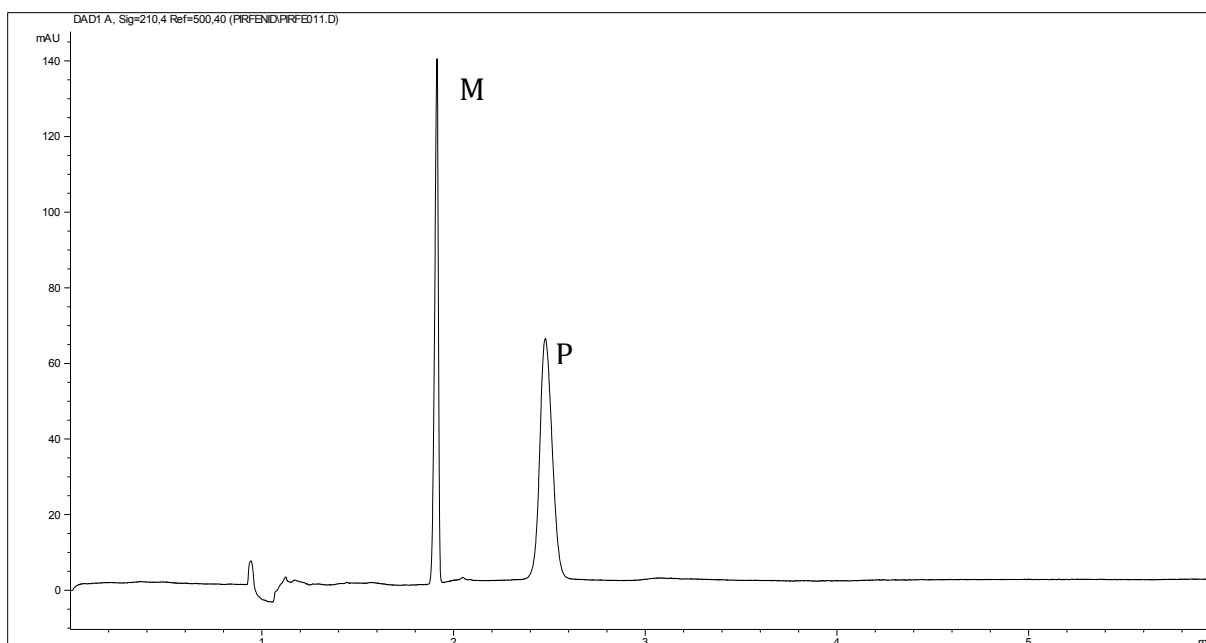
Analiza je provedena na uređaju za kapilarnu elektroforezu s kapilarom od izvučenog kvarca unutrašnjeg promjera 50 μm, proizvođača Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka. Uzorci su injektirani u kapilaru pod tlakom od 50 mbar, pri temperaturi od 25 °C, tijekom 6 sekundi. Analize su provedene pri valnoj duljini detektora od 210 nm i 310 nm. Napon od 25 kV pokazao se optimalnim za analizu, a kao radni pufer korišten je 20 mM boratni pufer uz dodatak 70 mM SDS-a.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Početna ispitivanja

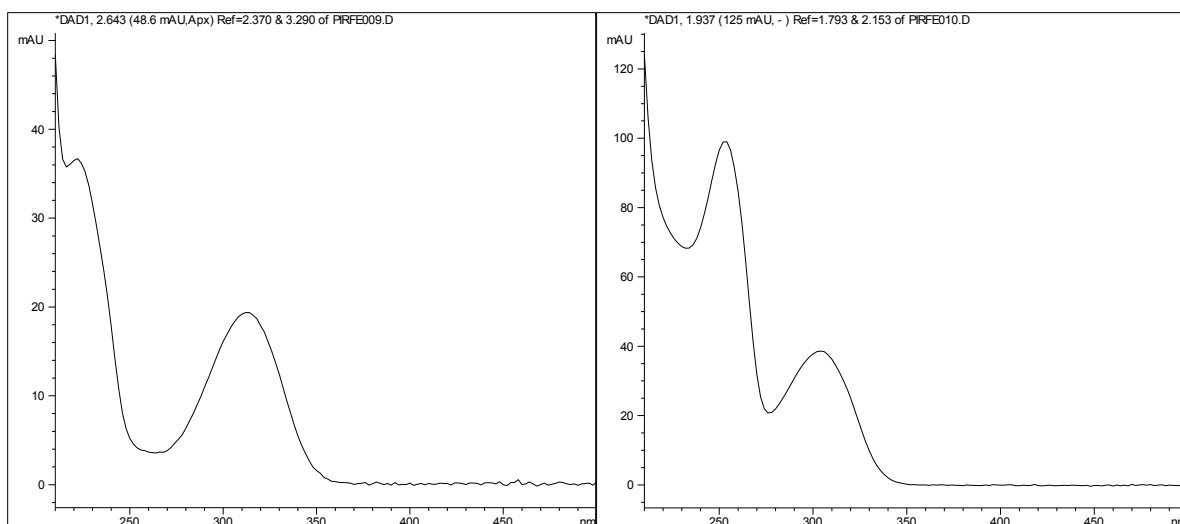
S obzirom na neutralnu narav pirfenidona, nije ga bilo moguće analizirati kapilarnom zonskom elektroforezom. Zbog toga je korištena micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC). Dodatkom surfaktanta natrijevog dodecil sulfata (SDS) u koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije (oko 10 mM) u otopinu radnog pufera postignuto je nastajanje micela koje su djelujući kao pseudostacionarna faza stupale u interakcije s pirfenidonom te omogućile njegovu analizu kapilarnom elektroforezom. Kako micelle zbog svog negativnog naboja putuju prema anodi, bitno je bilo postići dostatno jak elektroosmotski tok koji će osigurati njihovu migraciju prema katodi, na čijoj strani kapilare se nalazi detektor. S obzirom na to da elektroosmotski tok jača deprotonacijom silanolnih skupina na unutrašnjoj stijenci kapilare, a one deprotoniraju pri alkalnim pH vrijednostima, boratni pufer (pH=9,3) se nametnuo kao najbolji izbor.

S ciljem utvrđivanja karaktera ispitivanih tvari, prvo je analizirana otopina standarda pirfenidona i 5-karboksipirfenidona u vodi kao otapalu, uz primjenu radnog pufera sastava 30 mM borat + 50 mM SDS puferu (30 kV, 25 °C). Time su dobivena njihova vremena zadržavanja, koja su iznosila približno 2,6 min za pirfenidon te približno 1,9 min za njegov metabolit (slika 9). Snimljeni su i njihovi UV spektri, potrebni za identifikaciju. Zaključeno je da je 210 nm valna duljina na kojoj i pirfenidon i 5-karboksipirfenidon najbolje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje, a s obzirom da i mnoge druge sastavnice složenog biološkog matriksa također apsorbiraju na 210 nm, za detekciju je tijekom optimizacije analitičke metode odabrana i valna duljina od 310 nm (slika 10).



Slika 9 Elektroferogram otopine standarda pirfenidona (P) i metabolita 5-karboksipirfenidona (M)

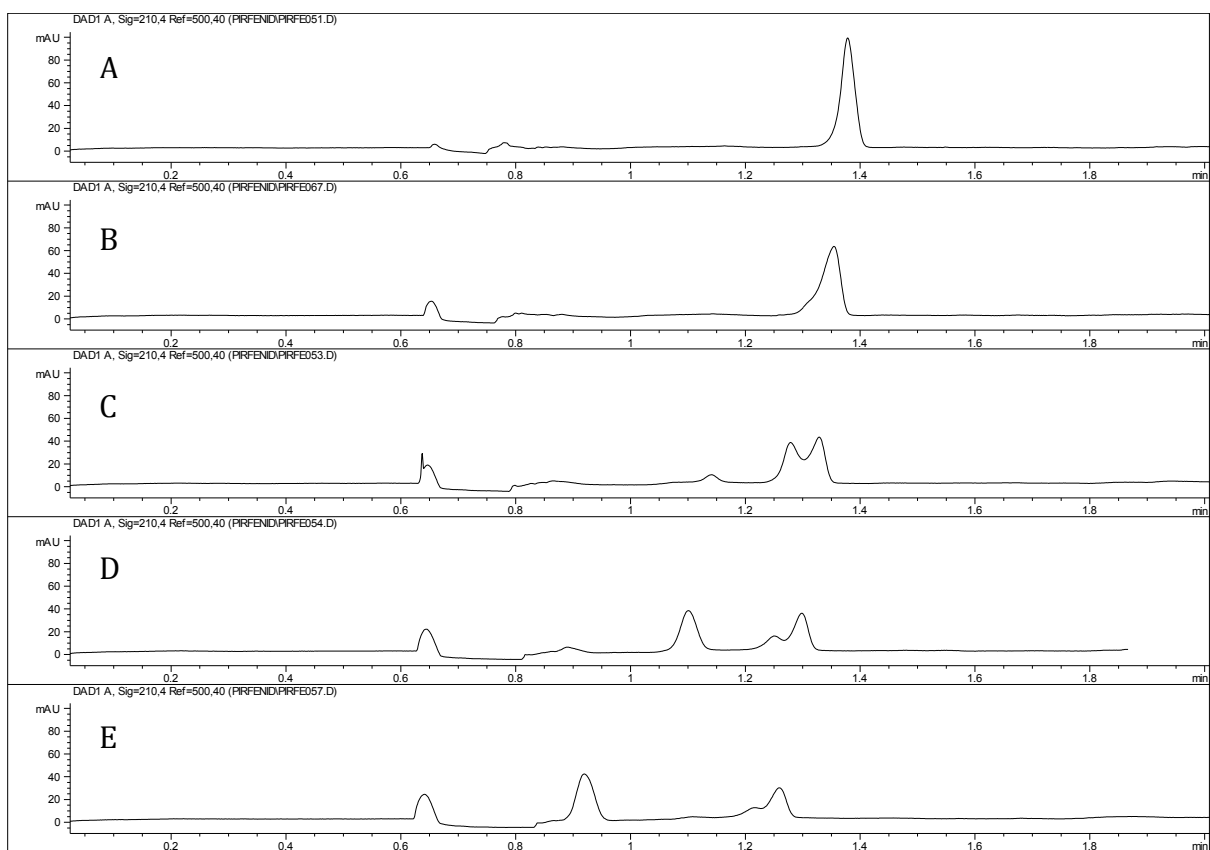
UVJETI ANALIZE: 30 mM boratni pufer pH 9,1, 50 mM SDS, 30 kV, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona, i standardne otopine 5-karboksipirfenidona



Slika 10 UV-spektri pirfenidona (lijevo) i 5-karboksipirfenidona (desno)

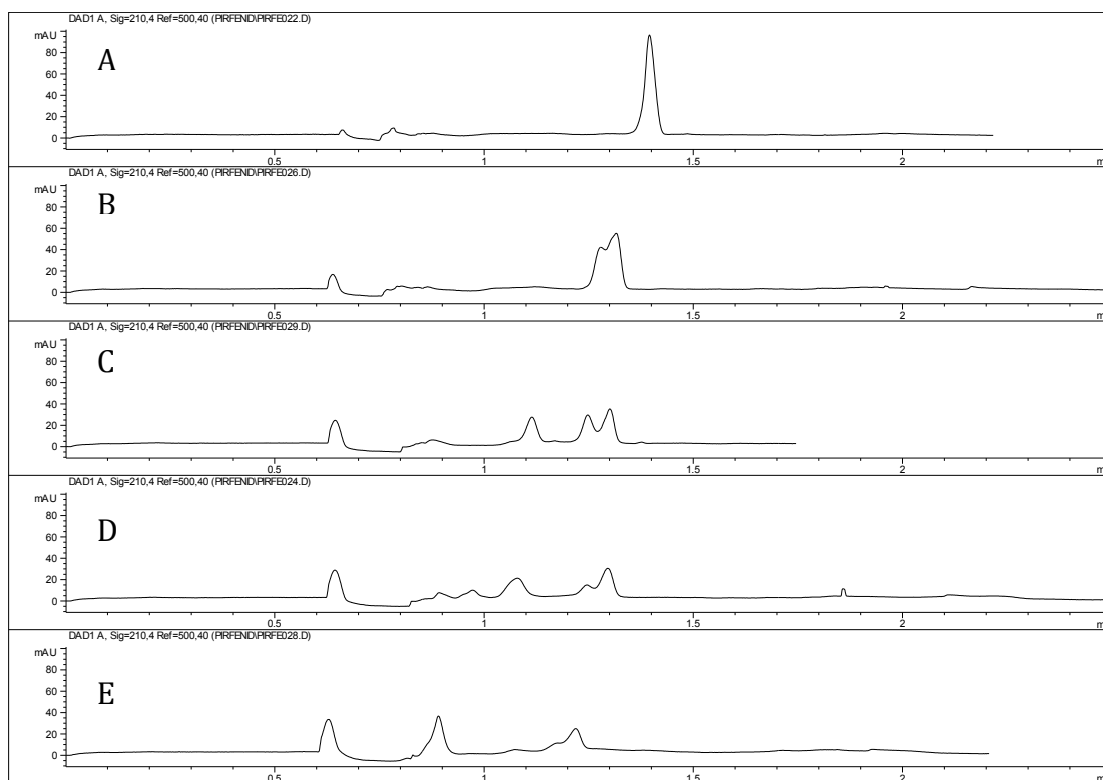
UVJETI ANALIZE: 30 mM boratni pufer pH 9,1, 50 mM SDS, 30 kV, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona (P) i standardne otopine 5-karboksipirfenidona (M)

Isprobana su i druga otapala poput smjese vode i metanola te smjese vode i acetonitrila u različitim omjerima. Povećanjem udjela metanola pik pirfenidona je prvo izgubio simetriju, da bi se zatim potpuno razdvojio na više manjih pikova (slika 11). Kao ni metanol, ni acetonitril nije pokazao obećavajuće rezultate. Povećanjem udjela acetonitrila pikovi su se također počeli širiti te su se na kraju i razdvojili na više manjih pikova (slika 12). Kada je pokušana analiza u 100% acetonitrilu kao otapalu za standardne otopine, došlo je do pada struje. Iz tih razloga metanol i acetonitril su odbačeni kao moguća otapala te su sve daljnje analize provedene u čistoj vodi.



Slika 11 Elektroferogrami otopine standarda pirfenidona u različitim otapalima: (A) čista voda, (B) voda:metanol = 90:10, (C) voda:metanol = 80:20, (D) voda:metanol = 70:30, (E) voda:metanol = 50:50

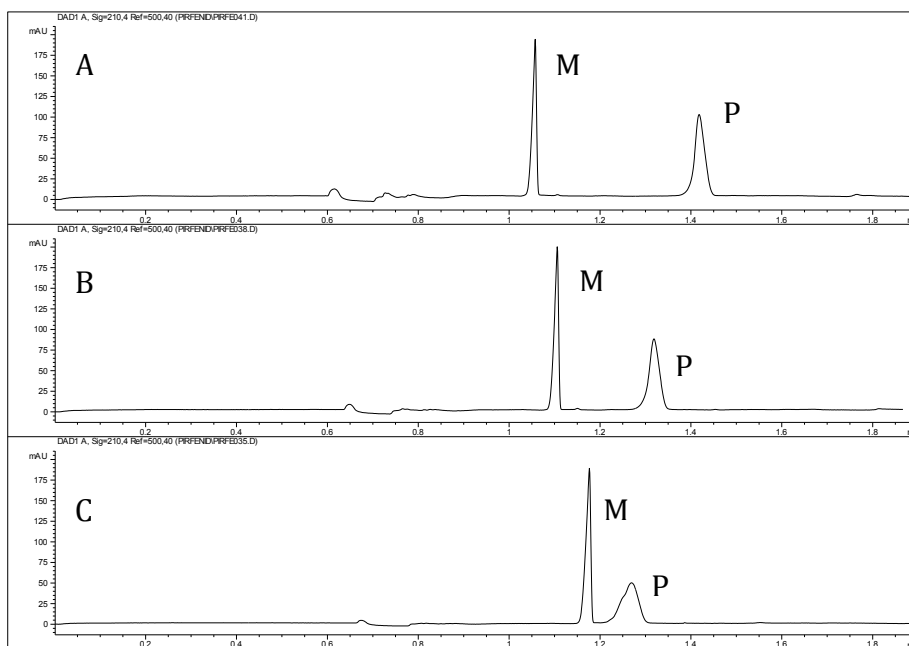
UVJETI ANALIZE: 30 mM boratni pufer pH 9,1, 50 mM SDS, 30 kV, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona (P), i standardne otopine 5-karboksipirfenidona (M)



Slika 12 Elektroferogrami otopine standarda pirfenidona u različitim otapalima: (A) čista voda, (B) voda:ACN = 90:10, (C) voda:ACN = 80:20, (D) voda:ACN = 70:30, (E) voda:ACN = 50:50

UVJETI ANALIZE: 30 mM boratni pufer pH 9,1, 50 mM SDS, 30 kV, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona (P), i standardne otopine 5-karboksipirfenidona (M)

Nakon što je voda odabrana kao prikladno otapalo za uzorke, sljedeći korak bio je ispitivanje utjecaja sastava radnog pufera na vremena migracije standardnih otopina ispitivanih tvari. Odabran je boratni pufer koji je jedan od najčešće korištenih pufera u kapilarnoj elektroforezi. Zbog njegove pH vrijednosti od 9,1 – 9,3 silanolne skupine na unutrašnjoj stijenci kapilare su u potpunosti ionizirane što uzrokuje povećanje brzine elektroosmotskog toka, a time i kraće vrijeme analize. Uz njega, u radni pufer je dodavan i SDS u koncentracijama iznad kritične micelarne koncentracije pri čemu su nastajale micelle koje su omogućile pokretanje pirfenidona kao neutralne molekule. Početna ispitivanja s 20 mM boratnim puferom i različitim koncentracijama SDS-a pokazala su da vrijeme migracije pirfenidona uvelike ovisi o koncentraciji SDS-a, što je i bilo očekivano s obzirom na neutralnu narav same molekule pirfenidona (slika 13). Unatoč najduljem vremenu analize oblik pika i razlučivanje bili su najbolji pri koncentraciji SDS-a od 70 mM, pa je ona korištena u daljnjim analizama.



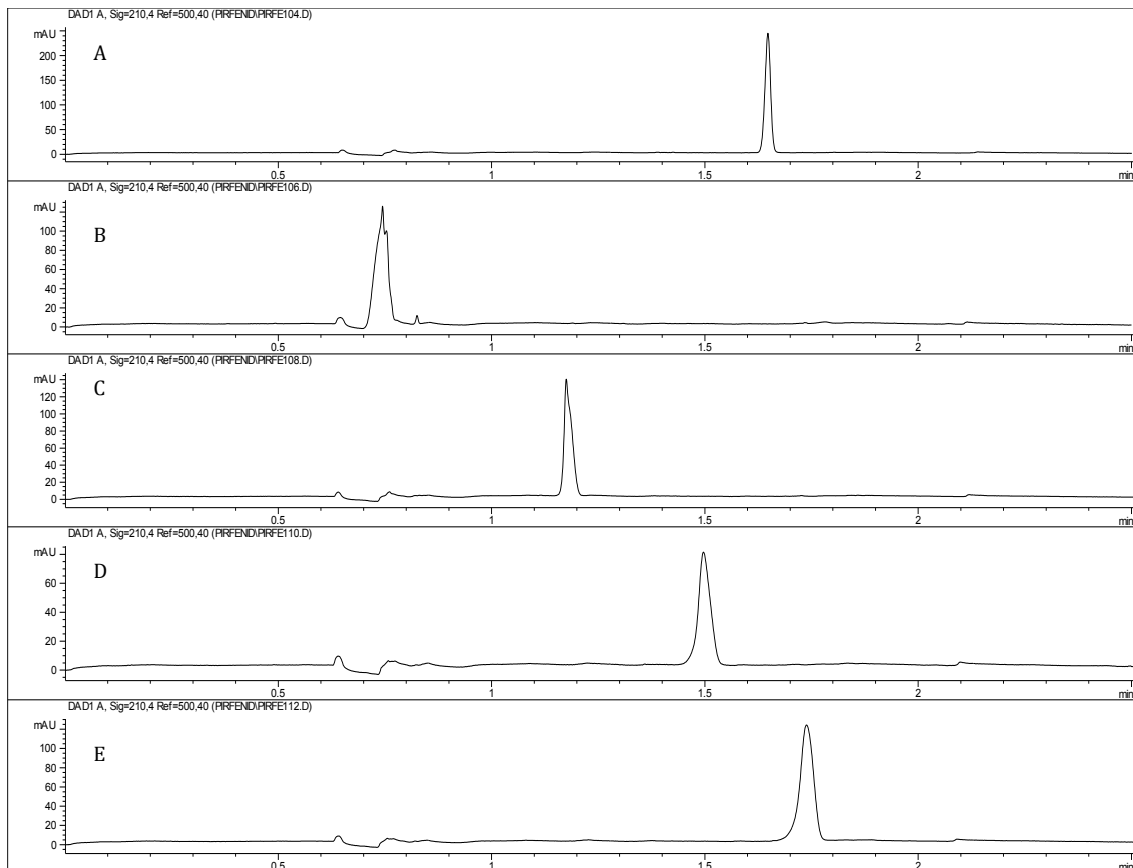
Slika 13 Ovisnost vremena migracije standarda pirfenidona (P) i 5-karboksipirfenidona (M) o koncentraciji SDS: (A) 70 mM SDS, (B) 50 mM SDS, (C) 30 mM SDS
UVJETI ANALIZE: 30 mM boratni pufer pH 9,1, 30 kV, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona (P) i standardne otopine 5-karboksipirfenidona (M)

4.2. Odabir unutarnjeg standarda

Već je rečeno da razdvajanje analita u kapilarnoj elektroforezi ovisi o brojnim čimbenicima. Čak i mala promjena jednog ili više tih čimbenika može utjecati na rezultat analize. Jedan od najčešćih uzročnika pogrešaka u analizama provedenim kapilarnom elektroforezom je vrlo mali volumen analita koji se injektira u kapilaru. U svrhu izbjegavanja takvih pogrešaka, u analizu se uvodi unutarnji standard. Unutarnji standard je molekula sličnih svojstava kao ispitivani analit koja se dodaje u otopinu analita prije analize te prolazi kroz cijelu analizu skupa s analitom. Poželjno je da ima slično vrijeme elucije kao i sam analit, ali da su im pikovi dobro razdvojeni te da zadovoljavajuće apsorbira na valnoj duljini na kojoj analit ima maksimum apsorpcije.

U ovoj analizi isprobano je pet potencijalnih unutarnjih standarda: ketoprofen, kodein kofein, propifenazon i salicilna kiselina. Preliminarno su standardne otopine tih lijekova analizirane samostalno, a cilj tih ispitivanja je bio utvrđivanje njihovih vremena migracije te izgleda njihovih pikova u uvjetima koji su se pokazali najboljima za analizu pirfenidona i 5-

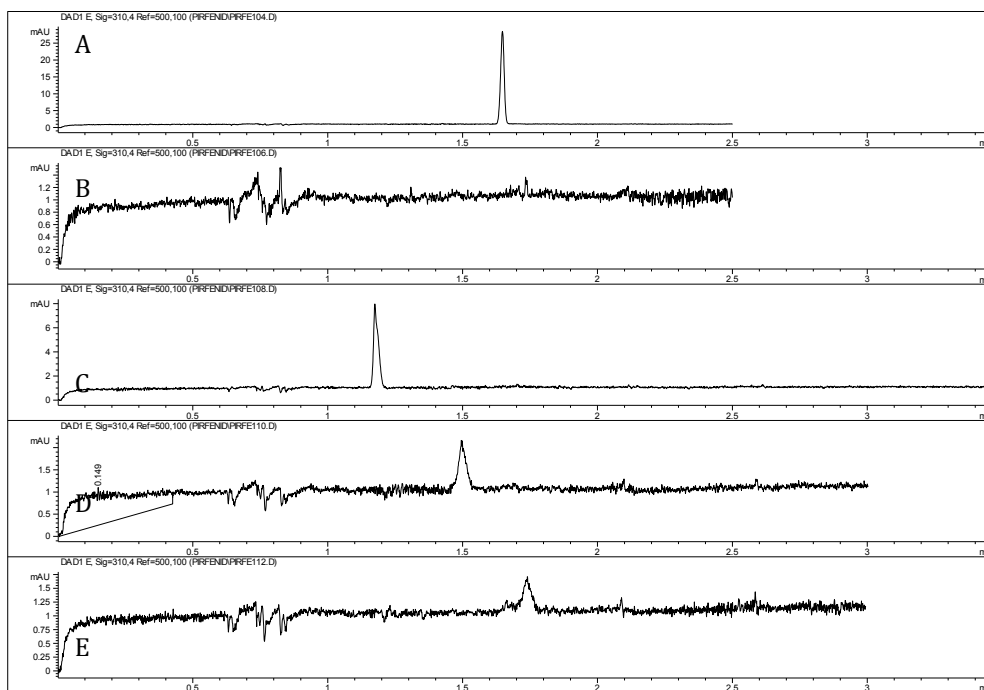
karboksipirfenidona (*30mM borat + 50 mM SDS pufer, 30kV, 25°C, valna duljina detekcije 210 i 310 nm*). U tim uvjetima se kao najbolja opcija pokazala salicilna kiselina koja je pokazala oštar, simetričan pik na obje ispitivane valne duljine, (slika 17) dok joj istovremeno vrijeme zadržavanja nije značajno produljivalo analizu (slike 14, 15 i 16).



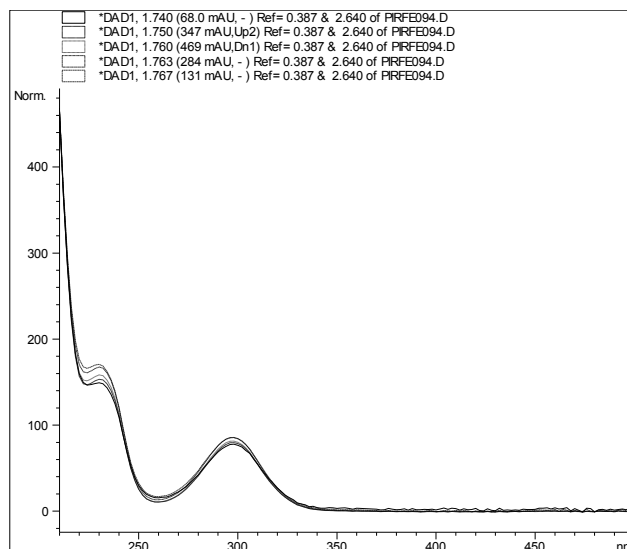
Slika 14 Elektroferogrami potencijalnih unutarnjih standarda snimljeno na 210 nm.

(A) salicilna kiselina, (B) kofein, (C) ketoprofen, (D) propifenazon, (E) kodein

UVJETI ANALIZE: 30 mM boratni pufer pH 9,1, 50 mM SDS, 30 kV, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine salicilne kiseline, kofeina, ketoprofena, propifenazona i kodeina



Slika 15 Elektroferogrami potencijalnih unutarnjih standarda snimljeno na 310 nm. (A) salicilna kiselina, (B) kofein, (C) ketoprofen, (D) propifenazon, (E) kodein
UVJETI ANALIZE: 30 mM boratni pufer pH 9,1, 50 mM SDS, 30 kV, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine salicilne kiseline, kofeina, ketopropfena, propifenazona i kodeina



Slika 16 UV-Vis spektar salicilne kiseline
UVJETI ANALIZE: 30 mM boratni pufer pH 9,1, 50 mM SDS, 30 kV, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine salicilne kiseline

4.3. Optimizacija uvjeta metode

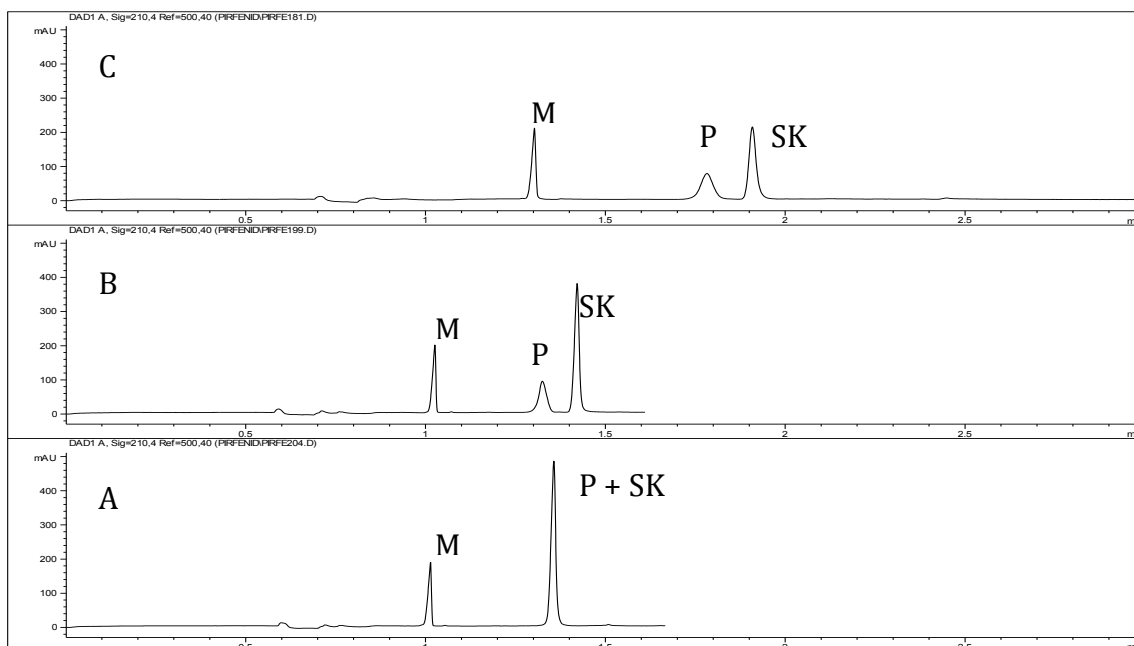
4.3.1. Odabir koncentracije boratnog pufera

Kvantitativna mjera koja izražava sposobnost metode da odvoji dva analita zove se razlučivanje (R_s), a može se izračunati iz elektroferograma, odnosno vremena zadržavanja dva pika te njihovih širina. Dva susjedna pika na elektroferogramu se smatraju razdvojenima kada je na baznoj liniji razlučivanje veće od 1,5 (Nigović B, 2014., Watson 2012.). Cilj optimizacije metode upravo je pronalazak uvjeta u kojima će svi analiti, unutarnji standard, kao i interferencije prisutne u biološkom uzorku dati razdvojene pikove kako bi ih se moglo jednoznačno identificirati.

Kako je već spomenuto, na elektroosmotski tok utječu brojni čimbenici koje analitičar može mijenjati kako bi postigao željenu razinu separacije analita. Na pH i ionsku jakost pufera te na jačinu električnog polja je najlakše utjecati, stoga su upravo to parametri koji se najčešće optimiziraju pri razvoju kapilarnoelektroforetske metode. Parametar koji se najčešće prvi optimizira je vrsta i pH radnog pufera. Kako je već rečeno, boratni pufer je odabran kao najprikladniji za ovu analizu, međutim kako u toj fazi nije bio odabran unutarnji standard, nisu provedena ispitivanja utjecaja koncentracije boratnog pufera na vremena migracije.

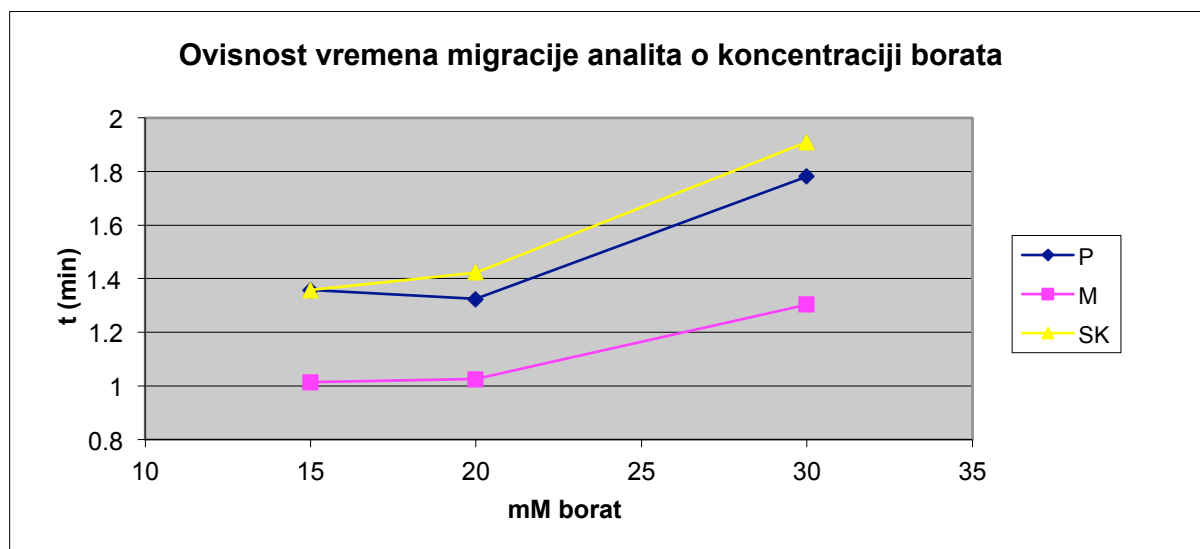
Na slici 17 prikazani su elektroferogrami analize smjese standarda pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline pri koncentraciji boratnog pufera od 30 mM, 20 mM i 15 mM, uz stalnu koncentraciju SDS-a od 70 mM pri naponu od 30 kV. Iz dobivenih elektroferograma dalo se zaključiti kako povećanje koncentracije boratnog pufera produžuje vrijeme migracije pirfenidona. Na slici 17 A vidljiv je elektroferogram analize provedene uz koncentraciju boratnog pufera od 15 mM i koncentraciju SDS od 70 mM na 30 kV. Na njemu su vidljiva samo dva pika, a očekivana su tri. Razlog tome je što su pirfenidon i salicilna kiselina izašli iz kapilare istovremeno. Povećanjem koncentracije boratnog pufera na 20 mM (elektroferogram B slike 17), pikovi su se razdvojili, pa je vidljiv pik s vremenom oko 1,35 min, za kojeg je analizom UV-Vis spektra zaključeno da odgovara pirfenidonu. Dodatnim povećanjem koncentracije boratnog pufera na 30 mM još se produljilo vrijeme migracije pirfenidona, ali i 5-karboksipirfenidona te salicilne kiseline, što je vidljivo na elektroferogramu C slike 17. Nameće se zaključak da se povećanjem koncentracije boratnog

pufera usporava migracija analiziranih tvari kroz kapilaru, a naročito pirfenidona (Slika 18), što je u skladu s teorijom kapilarne elektroforeze.



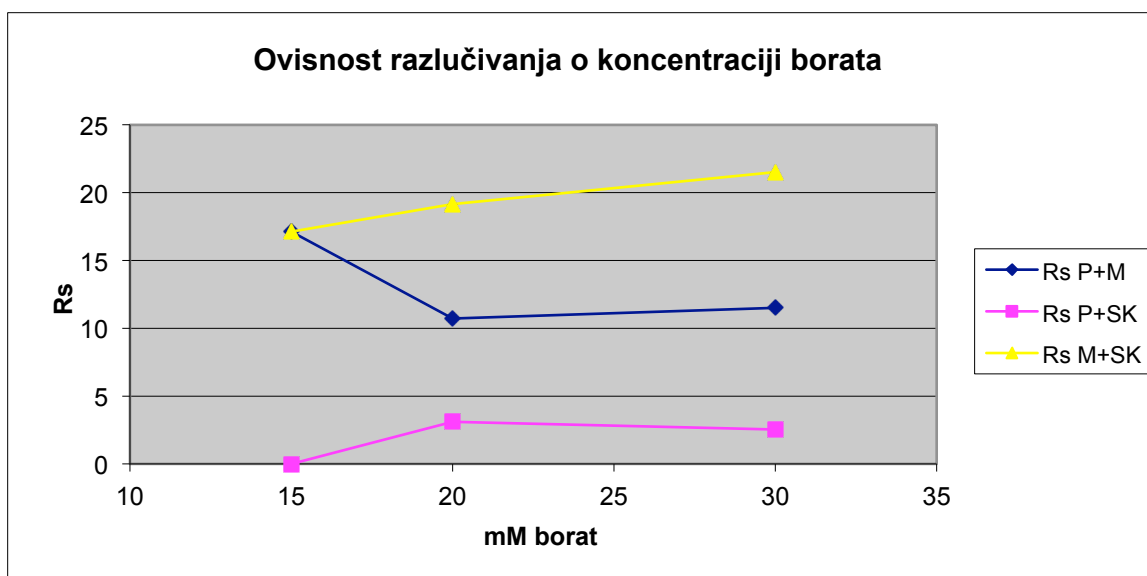
Slika 17 Elektroferogrami standardnih otopina pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i salicilne kiseline (SK) pri koncentracijama boratnog pufera od (A) 15 mM, (B) 20 mM, (C) 30 mM

UVJETI ANALIZE: 70 mM SDS, 30 kV, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline



Slika 18 Graf ovisnosti vremena migracije standarda pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i salicilne kiseline (SK) o koncentraciji boratnog pufera.

UVJETI ANALIZE: 70 mM SDS, 30 kV, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline



Slika 19 Graf ovisnosti razlučivanja o koncentraciji borata

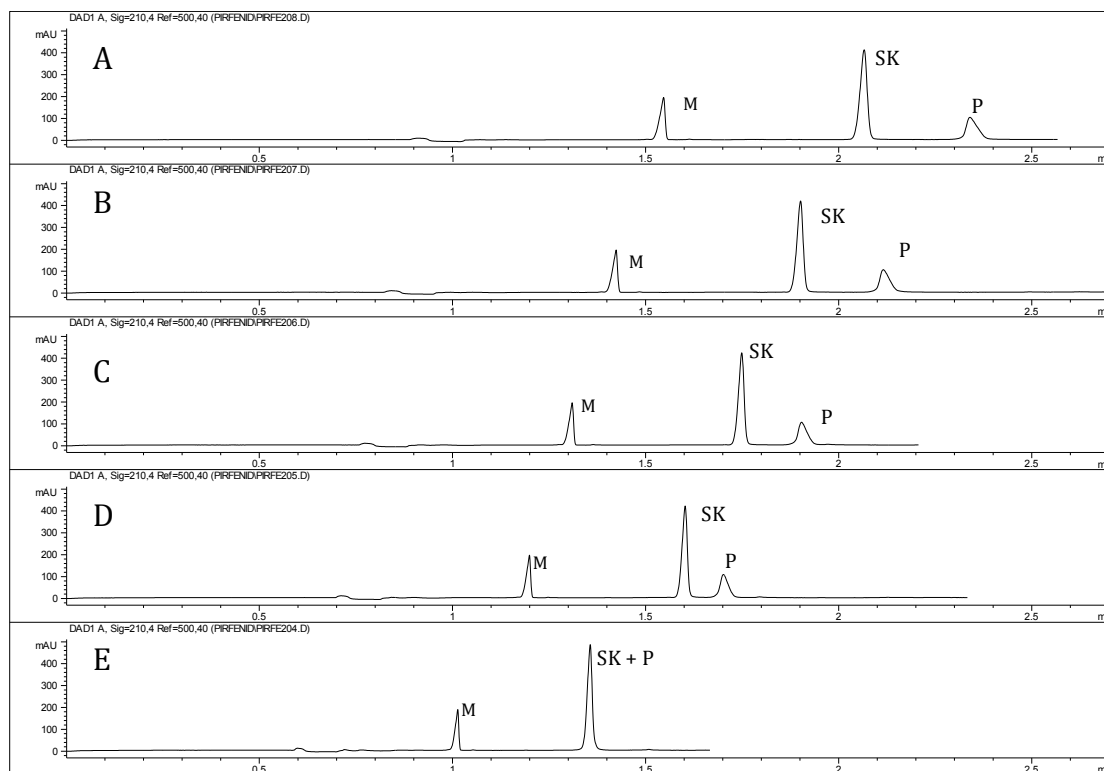
UVJETI ANALIZE: 70 mM SDS, 30 kV, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i salicilne kiseline (SK)

Na slici 19 prikazana je ovisnost razlučivanja (R_s) o koncentraciji boratnog pufera. 5-karboksipirfenidon je negativno nabijena molekula pri pH 9,3 zbog čega uvijek izlazi prvi te mu se vrijeme migracije ne mijenja značajno promjenom koncentracije boratnog pufera. On je također i dovoljno razdvojen od pikova pirfenidona i salicilne kiseline da bi ih se moglo identificirati te kvantificirati. U grafu je također vidljivo kako salicilna kiselina i pirfenidon pri koncentraciji boratnog pufera od 15 mM koeluiraju – R_s je jednak nuli. Na kraju je povećanjem koncentracije boratnog pufera do 30 mM, dobiven zadovoljavajuć R_s ($>2,55$) za sve analite.

4.3.2. Odabir prikladnog napona

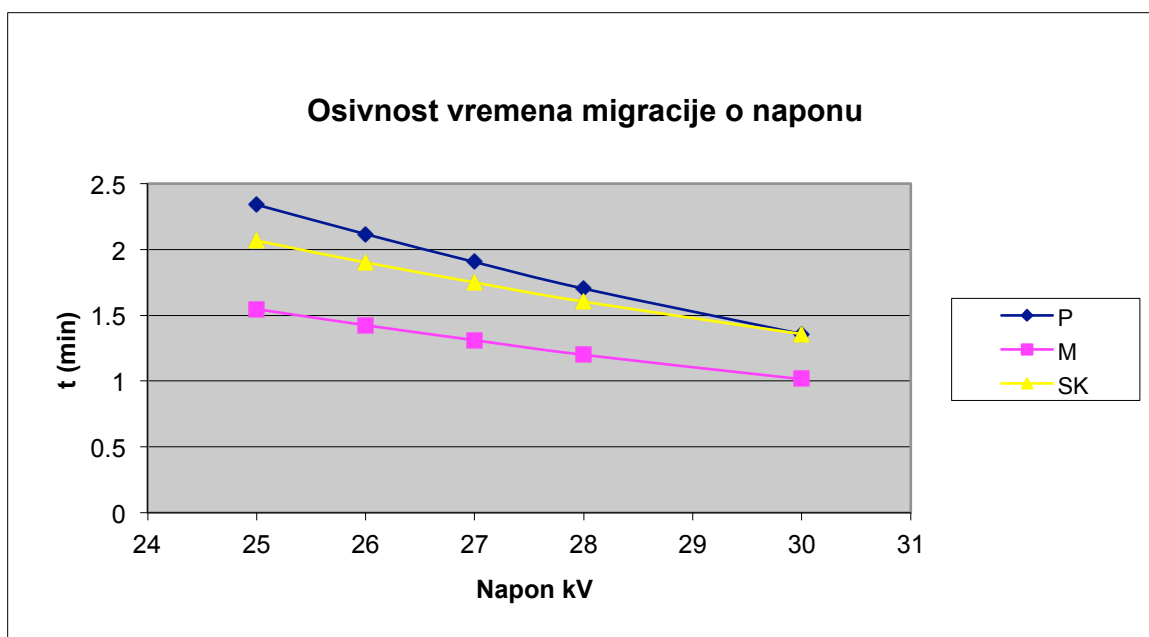
Napon je ključan parametar u kapilarnoj elektroforezi. Bez uspostave električnog polja nema kretanja analita kroz kapilaru. Povećanjem napona povećava se jakost električnog polja u kapilari što ubrzava elektroosmotski tok, kao i elektroforetsku pokretljivost analita. Budući da se teži što kraćem vremenu analize, poželjan je što viši mogući napon. No, pri optimizaciji napona potreban je oprez jer visok napon može dovesti do Jouleovog zagrijavanja u kapilari, koje može imati problematične posljedice za analizu. Povišenjem temperature može doći do promjena u viskoznosti te razvoja nejednolikog temperaturnog gradijenta u kapilari koji rezultiraju širenjem zone analita (Hranilović M, 2017). S ciljem ispitivanja utjecaja napona na

vremena migracije provedene su analize na 25, 26, 27, 28 i 30 kV, pri prethodno odabranoj koncentraciji borata od 15 mM, i SDS-a od 70 mM. Dobiveni elektroferogrami prikazani su na slici 20, a ovisnosti vremena migracije o naponu su grafički prikazane na slici 21. Vidljivo je kako porast napona skraćuje vremena migracije analita kroz kapilaru, posebice u slučaju pirfenidona, čije se vrijeme migracije smanjilo sa oko 2,35 min pri 25 kV, na oko 1,35 min pri 30 kV. No, porast napona je uzrokovao i smanjenje površine pikova (slika 22), što je smanjilo osjetljivost metode. Kako je općeniti problem kapilarne elektroforeze osjetljivost, a prednost kratkotrajnost analize, nije bilo od interesa smanjivati već ionako malu osjetljivost metode nauštrb vremena analize. Stoga je odlučeno da napon od 25 kV daje optimalno vrijeme analize uz dobar oblik i veličinu pika te dobro razlučivanje ($R_s > 6,21$) (slika 23).



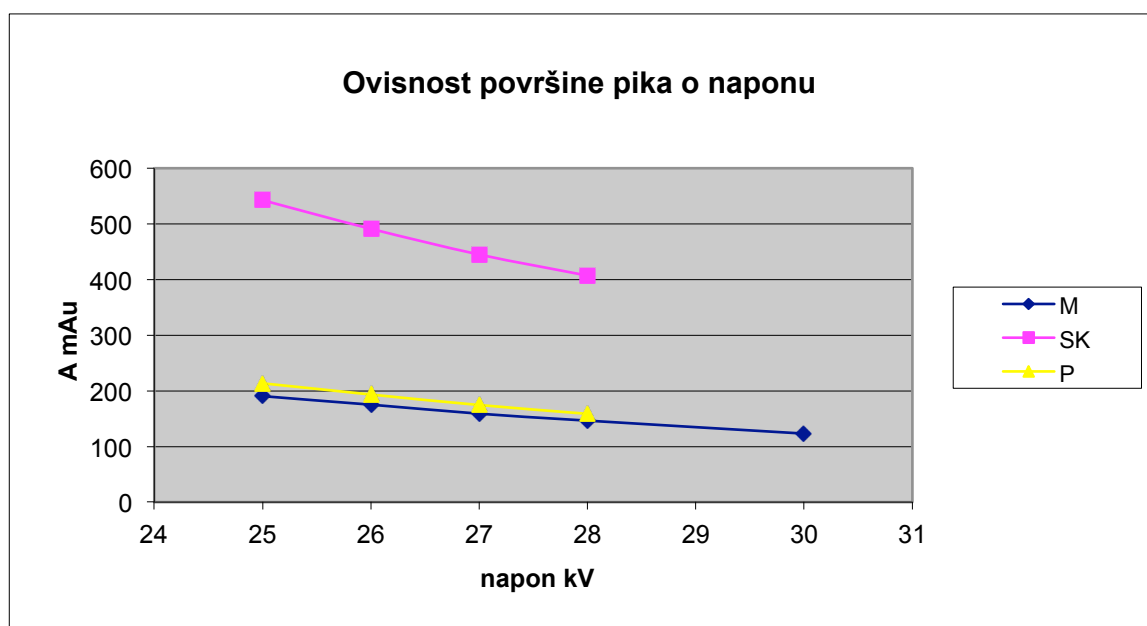
Slika 20 Elektroferogrami standardnih otopina pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i salicilne kiseline (SK) u ovisnosti o naponu (A) 25 kV, (B) 26 kV, (C) 27 kV, (D) 28 kV, (E) 30 kV

UVJETI ANALIZE: 15 mM boratni pufer, 70 mM SDS, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline



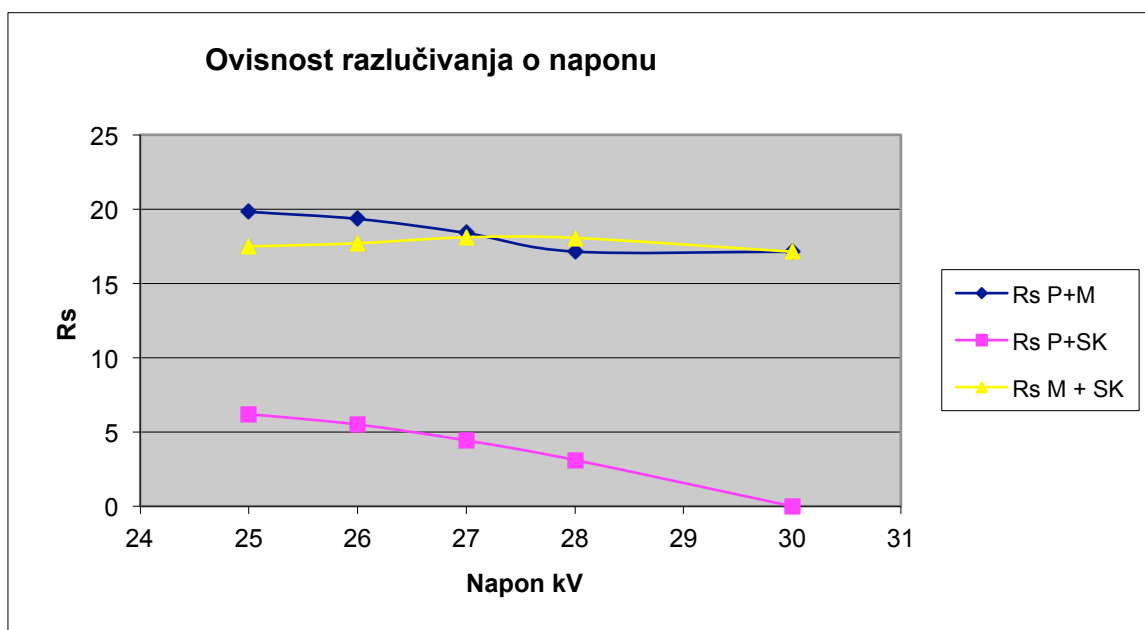
Slika 21 Graf ovisnosti vremena migracije analita o naponu

UVJETI ANALIZE: 15 mM boratni pufer, 70 mM SDS, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i salicilne kiseline (SK)



Slika 22 Graf ovisnosti površine pikova analita o naponu

* Površine pikova salicilne kiseline i pirfenidona na 30 kV nisu prikazane zbog ko-elucije
 UVJETI ANALIZE: 15 mM boratni pufer, 70 mM SDS, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona (P), 5-karboksipirfenidona (M) i salicilne kiseline (SK)



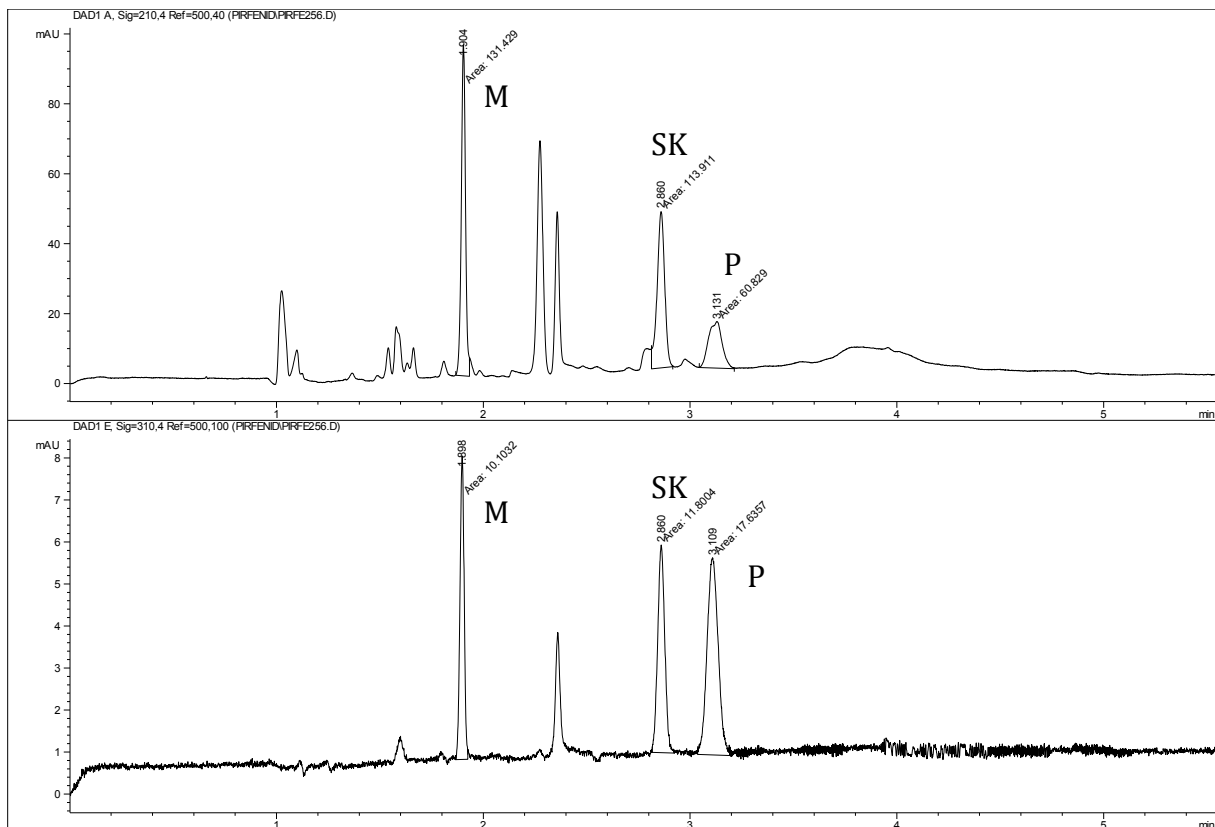
Slika 23 Graf ovisnosti razlučivanja o naponu – (P) pirfenidon, (M) 5-karboksipirfenidon, (SK) salicilna kiselina

UVJETI ANALIZE: 15 mM boratni pufer, 70 mM SDS, 25 °C, uzorak: 50 µg/ml standardne otopine pirfenidona, 5-karboksipirfenidona i salicilne kiseline

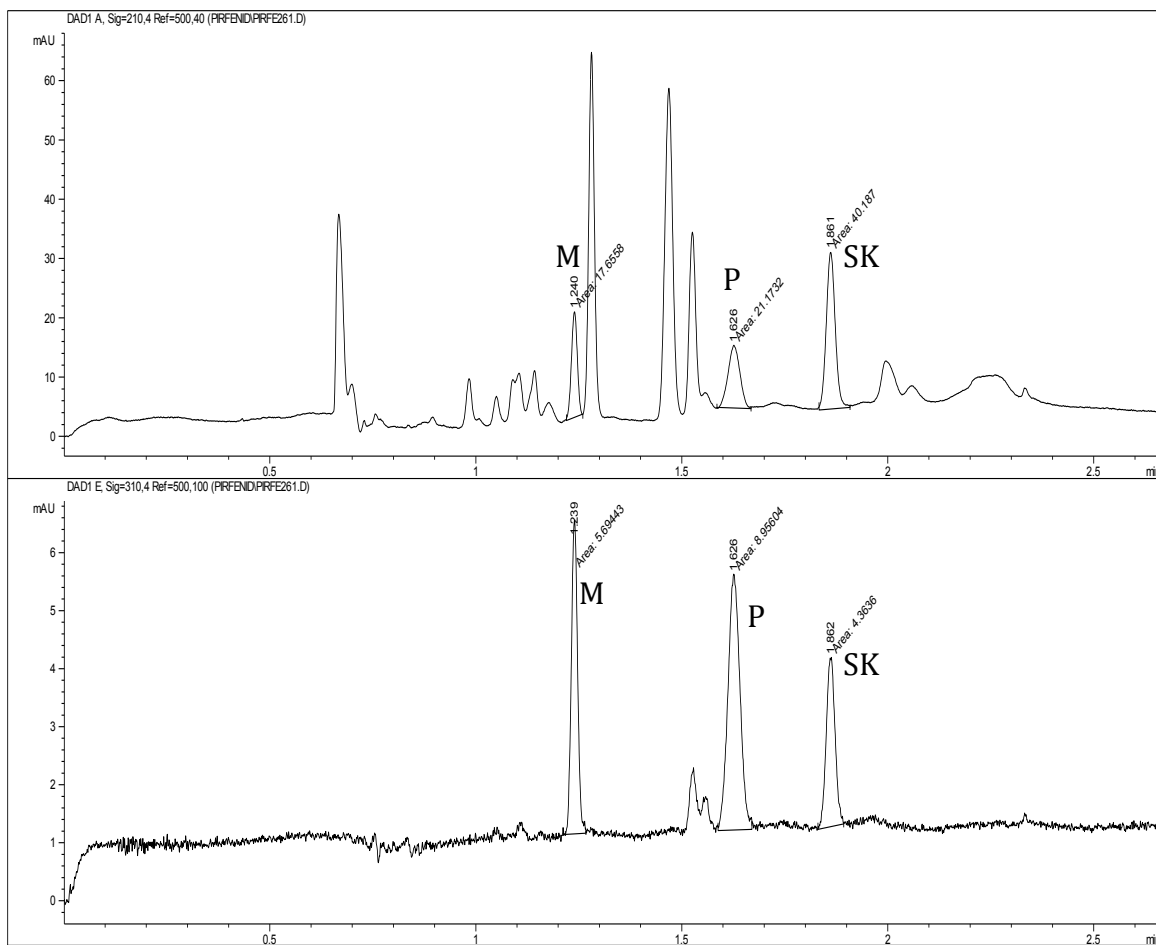
4.3.3. Primjena metode na biološkim uzorcima

Pri analizi standardnih otopina nisu prisutne interferencije koje se normalno nalaze u složenom biološkom matriksu. Stoga je jednostavno odrediti pikove analiziranih tvari. U biološkim uzorcima plazme i seruma prisutne su različite molekule poput proteina i drugih makromolekula. Njihova prisutnost značajno otežava analizu i kvantitativno određivanje željenih analita. S obzirom na nisku koncentraciju pirfenidona i 5-karboksipirfenidona u odnosu na makromolekule iz plazme i seruma, glavni izazov pri razvoju kapilarnoelektroforetske metode za njihovu detekciju je postići dostatnu osjetljivost metode. Svi biološki uzorci obuhvaćeni ovim diplomskim radom bili su “obogaćeni” (spiked) – u njihovu otopinu dodane su odgovarajuće količine standardnih otopina pirfenidona i 5-karboksipirfenidona – zato jer je cilj bio pronaći optimalne uvjete za njihovo razdvajanje. Uzorak tkiva koji je korišten je prvo ekstrahiran u metanolu, koji je zatim uparen do suha u struji dušika te ponovo otopljen u vodi. U tu otopinu je dodano 2,5 µL pirfenidona (konc. 1,0 µg/ml) i salicilne kiseline (konc. 1,0 µg/ml) te 5µL 5-karboksipirfenidona. (konc. 0,5 µg/ml) Na slici 24 prikazani su elektroferogrami analize gore opisanog biološkog uzorka tkiva u 20 mM boratnom puferu uz dodatak 70 mM SDS-a na 25 kV. Kao i kod analize standardnih otopina, 5-karboksipirfenidon je najbrže izašao iz kapilare. Njegov pik vidljiv je na oko 1,6

min, međutim problematično je što koeluiraju s nekom nepoznatom sastavnicom složenog matriksa. Poželjno bi bilo da se njegova brzina migracije uspori ili ubrza tako da se njegov pik odvoji od pika onečišćenja. Pirfenidonov pik nalazi se na oko 3,1 min ali također koeluiraju s nepoznatom tvari iz uzorka, dok pik salicilne kiseline nije u potpunosti odvojen od pika nepoznate tvari koja daje pik neposredno prije nje. Na slici 25 prikazani su elektroferogrami istog biološkog uzorka, međutim uz napon od 30 kV. Povećanje napona je dalo željeni učinak. Analiza je ubrzana, a sve tri analizirane tvari više ne koeluiraju s interferencijama iz uzorka. Elektroferogram snimljen na valnoj duljini 310 nm koristimo kao kontrolu - na njemu apsorbiraju analiti, ali ne i brojne interferencije iz biološkog uzorka. Postignuto je zadovoljavajuće ukupno vrijeme analize i razlučivanje.



Slika 24 Elektroferogram obogaćenog biološkog uzorka, snimljeno UV-Vis detektorom na: (A) 210 nm (B) 310 nm – (P) pirfenidon, (M) 5-karboxypirfenidon, (SK) salicilna kiselina
UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer, 70 mM SDS, 25 kV, 25 °C, uzorak: uzorak tkiva tretiranog pirfenidonom koji je obogaćen (spiked) s 2,5 µL otopine standarda pirfenidona (konc. 1 mg/ml) i 5 µL otopine standarda 5-karboxypirfenidona (konc. 0,5 mg/ml)



Slika 25 Elektroferogram obogaćenog biološkog uzorka tkiva, snimljeno UV-Vis detektorom na: (A) 210 nm (B) 310 nm – (P) pirfenidon, (M) 5-karboksipirfenidon, (SK) salicilna kiselina

UVJETI ANALIZE: 20 mM boratni pufer, 70 mM SDS, 30 kV, 25 °C, uzorak: uzorak tkiva tretiranog pirfenidonom koji je obogaćen (spiked) s 2,5 µL otopine standarda pirfenidona (konc. 1 mg/ml) i 5 µL otopine standarda 5-karboksipirfenidona (konc. 0,5 mg/ml)

5. ZAKLJUČAK

Pirfenidon je relativno nov lijek i još uvijek nisu razvijene različite brze i pouzdane analitičke metode njegove detekcije i kvantifikacije. U ovom diplomskom radu razvijena je nova micelarna elektrokinetička kapilarnoelektroforetska metoda za istovremenu analizu pirfenidona i njegovog glavnog metabolita, 5-karboksipirfenidona, u složenim biološkim uzorcima. U analizama obuhvaćenim ovim diplomskim radom postignuti su optimalni uvjeti razdvajanja analita i njegovog glavnog metabolita.

Optimizacija je prvo provedena na standardnim otopinama, pri čemu se postiglo dobro razdvajanje analita. Međutim, kako je biološki uzorak složen i sadrži interferencije, potrebna je bila dodatna optimizacija uvjeta kako bi se postiglo dobro razdvajanje analita kao u standardnim otopinama.

Kao najbolji radni pufer pokazala se smjesa 20 mM boratnog pufera i 70 mM SDS-a. Kao najbolje otapalo za uzorke pokazala se čista voda. Isprobani su i acetonitril i metanol u različitim omjerima, međutim tada je dolazilo do širenja pikova i pada struje te nisu korišteni u daljnjim analizama. Napon od 30 kV i temperatura od 25°C su osigurali najbolje razdvajanje analita. Za analizu je korištena *bubble* kapilara s UV-Vis detektorom uz detekciju na 210 i 310 nm. Prilikom optimizacije metode ispitani su razni potencijalni unutarnji standardi, od kojih se salicilna kiselina pokazala kao najbolja.

Kako je već rečeno, glavni izazov razvoja bioanalitičkih metoda je pronalazak optimalnih uvjeta analize bioloških uzoraka. Stoga je potrebno daljnjim istraživanjima optimizirati uvjete metode do kraja s ciljem postizanja odgovarajuće osjetljivosti i razdvajanja pikova analita od interferencija prisutnih u složenom biološkom uzorku.

6. LITERATURA

Begum SS, Sushmaa BS, Vijayaraja S. Bioanalytical Techniques – An Overview. *PharmaTutor*, 2015, 3(9), 14-24

Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farm glas*, 2010, 66, 195- 207.

Heiger D. High performance capillary electrophoresis, An introduction. Agilent Technologies, 2000.

Hranilović M. Razvoj kapilarnoelektroforetske metode za istovremeno određivanje gemcitabina i njegovog onečišćenja. diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2017.

Idiopathic pulmonary fibrosis, <https://www.nhlbi.nih.gov>, pristupljeno 31.1.2019.

King TE Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*, 2011, 378, 1949–61

Nigović B. Kapilarna elektroforeza. U: Analitika lijekova, Zagreb, 2017.

Novakova L. Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography-mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *J Chromatogr A*, 2013, 1292, 25–37.

Pathuri R, Muthukumaran M, Krishnamoorthy B, Amreen Nishat B. A review on analytical method development and validation of pharmaceutical technology. *PharmaTutor*, PHARMATUTOR-ART-1691

Piljac I. Elektroforeza. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Media print, 2006, str 139 – 158.

Sažetak opisa svojstava lijeka Esbriet 267 mg tvrde kapsule Roche (pirfenidon), 2018, <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 31.1.2019.

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

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

Shintani H. Handbook of Capillary Electrophoresis Applications. Springer Netherlands, 1997, str. 1-3.

Taniguchi H, Ebina M, Kondoh Y, Ogura T, Azuma A, Suga M, Taguchi Y, Takahashi H, Nakata K, Sato A, Takeuchi M, Raghu G, Kudoh S and Nukiwa T, and the Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 2010, 35, 821–829.

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

Xue YJ, Gao H, Ji QC, Lam Z, Fang X, Lin ZJ, Hoffman M, Schulz-Jander D, Weng N. Bioanalysis of drug in tissue: current status and challenges. *Bioanalysis*, 2012, 4, 21.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Pirfenidon je relativno nov lijek registriran za terapiju idiopatske plućne fibroze te je jedan od samo dva koja se trenutačno koriste za ovu dijagnozu. Iako ima službenu farmakopejsku metodu, kao novi lijek na tržištu koji je uključen u brojna klinička istraživanja, postoji velika potreba za razvojem osjetljivih, preciznih, brzih i jednostavnih analitičkih metoda za analizu pirfenidona i njegovog metabolita u složenim biološkim uzorcima.

Cilj ovog istraživanja je bio razviti novu, jednostavnu kapilarnoelektroforetsku metodu za analizu pirfenidona i njegovog glavnog metabolita, 5-karboksipirfenidona. S obzirom na neutralnu narav pirfenidona odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC), uz dodatak unutarnjeg standarda – salicilne kiseline.

Analiza je provedena u kapilari unutrašnjeg promjera 50 μm i ukupne duljine 32 cm (23,5 cm) pri temperaturi od 25°C. Za detekciju je korišten detektor s nizom fotodioda, na valnim duljinama 210 nm i 310 nm. Tijekom optimizacije parametara napon je mijenjan u rasponu od 25 do 30 kV, a na kraju je kao optimalan napon odabran onaj od 30 kV. Pri analizi standardnih otopina najboljim se pokazao boratni pufer (pH 9,3) u koncentraciji od 20 mM uz dodatak visoke koncentracije SDS-a (70 mM) kako bi se osigurali bolji izgled i simetrije pikova. Metoda je uspješno primjenjena na obogaćenom biološkom uzorku. Prilikom analize bioloških uzoraka životinja tretiranih pirfenidonom, izazov je predstavljala osjetljivost metode, što će biti predmet daljnjih istraživanja.

Pirfenidone is a novel drug registered for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, and is one of only two drugs currently in clinical use. Although the official analytic method exists in the European Pharmacopoeia, to this day the methods for its analysis are scarce. Therefore, the development of new bioanalytical methods for its analysis is a necessity.

The goal of this research was to develop a new and simple capillary electrophoretic method for analysis of pirfenidone and its main metabolite 5-carboxypirfenidone. Due to pirfenidone being neutral in charge, a micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was chosen. To minimize the chance of errors, salicylic acid was used as an internal standard.

Analysis was carried out in a fused silica capillary with 50 μm internal diameter and 32 cm total length (23.5 cm) with a diode array detector (DAD) at the end. Detection was performed at 210 nm and 310 nm. The temperature was 25°C. During the analysis applied voltage varied between 25 kV and 30 kV, but 30 kV showed better results. Borate buffer (pH 9.3, 20 mM) gave best preliminary results providing fast analysis due to high electroosmotic flow. Sodium dodecyl sulphate (70 mM) was added to improve peak symmetry and shape. This method showed applicable for the analysis of biological samples treated with pirfenidone. Due to low drug and metabolite concentrations in biological samples, sensitivity of the method was a problem, and will represent a challenge in further research.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Nova bioanalitička kapilarnoelektroforetska metoda za istovremenu analizu pirfenidona i njegovog metabolita

Juraj Parag

SAŽETAK

Pirfenidon je relativno nov lijek registriran za terapiju idiopatske plućne fibroze te je jedan od samo dva koja se trenutačno koriste za ovu dijagnozu. Iako ima službenu farmakopejsku metodu, kao novi lijek na tržištu koji je uključen u brojna klinička istraživanja, postoji velika potreba za razvojem osjetljivih, preciznih, brzih i jednostavnih analitičkih metoda za analizu pirfenidona i njegovog metabolite u složenim biološkim uzorcima.

Cilj ovog istraživanja je bio razviti novu, jednostavnu kapilarnoelektroforetsku metodu za analizu pirfenidona i njegovog glavnog metabolita, 5-karboksipirfenidona. S obzirom na neutralnu narav pirfenidona odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija (MEKC), uz dodatak unutarnjeg standarda – salicilne kiseline.

Analiza je provedena u kapilari unutrašnjeg promjera 50 μm i ukupne duljine 32 cm (23,5 cm) pri temperaturi od 25°C. Za detekciju je korišten detektor s nizom fotodioda, na valnim duljinama 210 nm i 310 nm. Tijekom optimizacije parametara napon je mijenjan u rasponu od 25 do 30 kV, a na kraju je kao optimalan napon odabran onaj od 30 kV. Pri analizi standardnih otopina najboljim se pokazao boratni pufer (pH 9,3) u koncentraciji od 20 mM uz dodatak visoke koncentracije SDS-a (70 mM) kako bi se osigurali bolji izgled i simetrije pikova. Metoda je uspješno primjenjena na obogaćenom biološkom uzorku. Prilikom analize bioloških uzoraka životinja tretiranih pirfenidonom, izazov je predstavljala osjetljivost metode, što će biti predmet daljnjih istraživanja.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 25 grafičkih prikaza, 2 tablice i 17 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: pirfenidon, kapilarna elektroforeza, bioanalitika, biološki uzorak, plućna fibroza

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

Ocjenjivači: **dr. sc. Miranda Sertić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
dr. sc. Biljana Nigović, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
dr. sc. Slaven Crnković, Medical University of Graz

Rad prihvaćen: Srpanj 2019.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

New bioanalytical capillary electroforetic method for simultaneous analysis of pirfenidone and its metabolite

Juraj Parag

SUMMARY

Pirfenidone is a novel drug registered for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis, and is one of only two drugs currently in clinical use. Although the official analytic method exists in the European Pharmacopoeia, to this day the methods for its analysis are scarce. Therefore, the development of new bioanalytical methods for its analysis is a necessity.

The goal of this research was to develop a new and simple capillary electroforetic method for analysis of pirfenidone and its main metabolite 5-carboxypirfenidone. Due to pirfenidone being neutral in charge, a micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was chosen. To minimize the chance of errors, salicylic acid was used as an internal standard.

Analysis was carried out in a fused silica capillary with 50 μm internal diameter and 32 cm total length (23.5 cm) with an diode array detector (DAD) at the end. Detection was performed at 210 nm and 310 nm. The temperature was 25°C. During the analysis applied voltage varied between 25 kV and 30 kV, but 30 kV showed better results. Borate buffer (pH 9.3, 20 mM) gave best preliminary results providing fast analysis due to high electroosmotic flow. Sodium dodecyl sulphate (70 mM) was added to improve peak symmetry and shape. This method showed applicable for the analysis of biological samples treated with pirfenidone. Due to low drug and metabolite concentrations in biological samples, sensitivity of the method was a problem, and will represent a challenge in further research.

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

Thesis includes: 35 pages, 25 figures, 2 tables and 17 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pirfenidone, capillary electroforesis, bioanalytics, biological sample, pulmonary fibrosis

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

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Slaven Crnković, Ph.D. *Medical University of Graz*

The thesis was accepted: July 2019