

# Razvoj kapilarnoelektroforetske metode za istovremeno određivanje gemcitabina i njegovog onečišćenja

---

Hranilović, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:839213>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-31**



Repository / Repozitorij:

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



**Marija Hranilović**

**Razvoj kapilarnoelektroforetske metode za  
istovremeno određivanje gemcitabina i njegovog  
onečišćenja**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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.

**Hvala** mojoj mentorici, doc. dr. sc. Mirandi Sertić, na pruženoj mogućnosti, stručnom vodstvu, ljubaznosti i svakom savjetu koji mi je pružila tijekom pisanja ovog rada.

**Hvala** mojim roditeljima, bez kojih ne bih bila tu gdje jesam, na svakoj velikoj i maloj stvari koju su mi pružili i što su vjerovali u mene.

*Hvala, tata, na svakom godišnjem koji si uzeo jer si me vozio na ispit!*

*Hvala, mama, na svakoj šetnji i pozivu!*

**Hvala** Lovriju za svaki zagrljaj prije Zagreba :) i Luciji što mi je uvijek pomagala oko onoga u čemu je stručnija.

**Hvala** svim mojim prijateljicama, koje su uvijek bile tu za mene.

**Hvala** baki i dedi na svesrdnoj podršci.

Na kraju, **hvala** mom Igoru, za svaki zagrljaj i utjehu, što si bio uz mene i podržavao me u svakom trenutku, za Ljubav.

*Fala Vam sema, imam Vas rada!*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. GEMCITABIN.....	1
1.1.1. Mehanizam djelovanja gemcitabina.....	1
1.1.2. Farmakokinetika gemcitabina .....	2
1.2. KAPILARNA ELEKTROFOREZA .....	3
1.2.1. Uređaj za kapilarnu elektroforezu .....	3
1.2.2. Načelo tehnike kapilarne elektroforeze.....	4
1.2.3. Vrste kapilarne elektroforeze .....	9
1.2.3.1. Micelarna elektrokinetička kromatografija .....	10
1.2.4. Primjena kapilarne elektroforeze u analitici lijekova.....	13
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	14
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	15
3.1. MATERIJALI .....	15
3.1.1. Kemikalije .....	15
3.1.2. Standardi.....	15
3.1.4. Pribor.....	15
3.1.5. Programski paketi.....	16
3.2. METODE .....	16
3.2.1. Priprema standardnih otopina.....	16
3.2.2. Priprema otopina radnog pufera .....	17
3.2.3. Kapilarnoelektroforetski uvjeti analize .....	17
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	19
4.1 Unutarnji standard .....	19
4. 2. Optimizacija sastava radnog pufera .....	20
4.3. Utjecaj primijenjenog napona i optimizacija koncentracije SDS-a .....	26
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	31
<b>6. LITERATURA</b> .....	32
<b>7. SAŽETAK / SUMMARY</b> .....	34
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

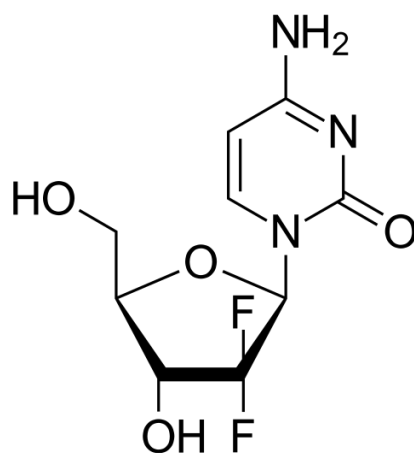
# 1. UVOD

## 1.1. GEMCITABIN

Gemcitabin se kao antineoplastični lijek koristi u liječenju različitih karcinoma. Indiciran je u liječenju lokalno uznapredovalih ili metastatskih karcinoma: mokraćnog mjehura, adenokarcinoma gušterače u odraslih, karcinoma pluća nemalih stanica kao prva linija, epitelnog karcinoma jajnika te karcinoma dojke. Koristi se kao monoterapija (adenokarcinom gušterače), ali češće je u kombinaciji s drugim citostaticima kao što su cisplatin, karboplatin, i paklitaksel, ovisno o indikaciji ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

### 1.1.1. Mehanizam djelovanja gemcitabina

Gemcitabin, 2',2'-difluoro-2'-deoksicitidin, dFdC, je antimetabolit pirimidina. Antimetabolit je spoj koji je strukturno sličan određenom metabolitu u stanici, odnosno njegov je analog, i time inhibira njegovu funkciju. Antimetaboliti kao antineoplastični lijekovi najčešće interferiraju sa receptorima ili enzimima važnima za rast stanice i replikaciju deoksiribonukleinske kiseline, DNA, vrlo često u S fazi staničnog ciklusa. (Francetić i sur., 2015; <http://thefreedictionary.com>). Prema kemijskoj strukturi dijele se na analoge folne kiseline, analoge pirimidina te analoge purina (Francetić i sur., 2015). Struktura gemcitabina prikazana je na Slici 1.



**Slika 1.** Struktura gemcitabina.

Gemcitabin djeluje kao prolijek jer se intracelularno metabolizira pomoću deoksicitidin kinaze, pri čemu nastaju aktivni fosforilirani oblici lijeka: 5'-difosfat (dFdCDP) i 5'-trifosfat (dFdCTP). Pokazalo se da su upravo ovi metaboliti gemcitabina odgovorni za inhibiciju određenih staničnih procesa i induciranje stanične apoptoze (Katzung i sur., 2011; Cerqueira i sur., 2007).

Citotoksični učinak gemcitabin ostvaruje inhibicijom sinteze DNA putem dva mehanizma koji uključuju metabolite dFdCDP i dFdCTP. Prvo, dFdCDP inhibira enzim ribonukleotid reduktazu, koji katalizira reakciju stvaranja deoksiribonukleozid-difosfata iz ribonukleozid-difosfata (Berg i sur., 2013). Posljedično se smanjuje stanična koncentracija svih 4 monomera deoksinukleozid-trifosfata potrebnih za sintezu i popravak DNA molekule, a osobito deoksicitidin 5'-trifosfata (dCTP) (Pereira i sur., 2004). Nadalje, dFdCTP se natječe s dCTP za ugradnju u DNA molekulu u replikaciji tijekom S-faze staničnog ciklusa. Nakon ugradnje gemcitabina kao monofosfata, u rastući DNA lanac ugradi se jedan dodatni deoksiribonukleotid što posljedično sprječava daljnju sintezu DNA zbog maskiranog završetka lanca: DNA epsilon polimeraza nije u mogućnosti eliminirati ugrađeni gemcitabin i time popraviti rastući lanac DNA (Huang i sur., 1991). Stanica u konačnici ulazi u apoptozu (Huang i Plunkett, 1995). Gemcitabin inhibicijom ribonukleotid reduktaze dovodi do smanjene intracelularne koncentracije dCTP što dovodi do tri glavna učinka u stanici: 1) dFdC se brže fosforilira deoksicitidin kinazom u dvije aktivne fosfatne forme, 2) smanjena je eliminacija nukleotida gemcitabina pomoću deoksicitidin monofosfat deaminaze, i 3) potencirana je ugradnja dFdCTP u DNA. Upravo ovaj samopotencirajući mehanizam zajedno sa maskiranom terminacijom lanca DNA i inhibicijom ribonukleotid reduktaze smatraju se odgovornima za visok antitumorski učinak gemcitabina u odnosu na druge antimetabolite nukleozida (Cerqueira i sur. 2007; Plunkett i sur., 1995).

### 1.1.2. Farmakokinetika gemcitabina

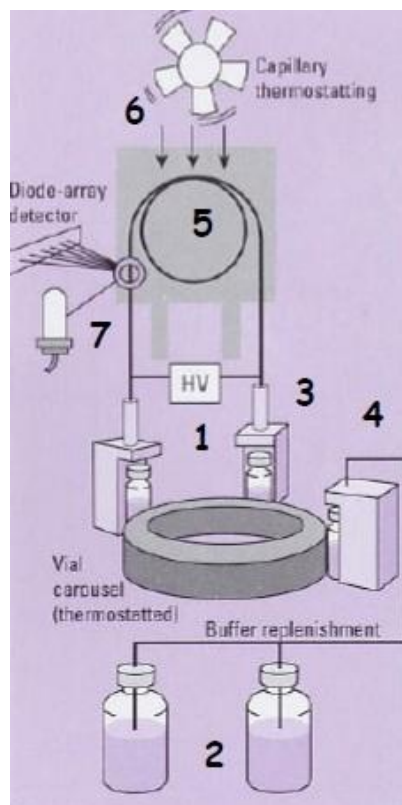
Ispitivanja farmakokinetike gemcitabina pokazala su da se vršna koncentracija u plazmi postiže unutar 5 minuta nakon završetka intravenske primjene infuzijom, a iznosi od 3,2 do 45,5 µg/ml. Vezanje na proteine plazme je zanemarivo, a poluvrijeme eliminacije, ovisno o dobi i spolu, kreće se od 42 do 94 minute. Gemcitabin se u jetri, bubrezima, krvi i drugim tkivima brzo metabolizira putem citidin deaminaze. Unutar stanice metabolizira se u monofosfate, difosfate i trifosfate, od kojih su dFdCDP i dFdCTP oblici lijeka odgovorni za

antitumorski učinak. Unutarstanični metaboliti ne mogu se naći u urinu i plazmi. Primarni metabolit, 2'-deoksi-2',2'-difluorouridin, dFdU, nije aktivan, ali se može naći u plazmi i urinu. Sustavni klirens gemcitabina ovisi o dobi i spolu pa je varijabilnost između osoba 52,2%. Kod žena je klirens oko 25% manji nego u muškaraca, a pretpostavlja se da se smanjuje s dobi. Manje od 10% lijeka izlučuje se urinom u nepromijenjenom obliku. Nakon jednotjedne primjene gemcitabina izluči se 92 do 98 % primijenjene doze gemcitabina, od čega 99% urinom (većinom kao dFdU), a 1% fecesom. U kombiniranoj terapiji sa paklitakselom ili karboplatinom, nije došlo do promjene farmakokinetike gemcitabina ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

## 1.2. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

### 1.2.1. Uređaj za kapilarnu elektroforezu

Kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary electrophoresis*, CE) relativno je nova analitička tehnika koja se brzo razvija, a često upotunjuje ili zamjenjuje tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) (Damić i Nigović, 2010). Kapilarna elektroforeza danas svoju primjenu ima u (bio)farmaceutskoj, forenzičkoj, kliničkoj, kemijskoj i biokemijskoj analizi te analizi hrane i okoliša (Lauer i Rozing, 2014). Instrument je prilično jednostavan (osim visokog napona od 10-30 kV 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 2. Krajevi kapilare (5) uronjeni su u dva spremnika za pufere (2), a preko dviju elektroda (3) se iz visokonaponskog izvora istosmjerne struje (1) uspostavlja električno polje kroz kapilaru. Sam uzorak se automatski injektira pomoću sustava za unošenje uzorka (4). Termostat (6) je vrlo bitan dio uređaja jer o temperaturi ovisi puno parametara u CE koji će biti opisani kasnije. Kao detektori (7) se najčešće koriste UV-Vis detektor (engl. *Diode array detector*, DAD), maseni spektrometar i fluorescencijski detektor. Odabir detektora ovisi o vrsti analita i cilju same analize (Nigović, 2014).



**Slika 2.** Shematski prikaz uređaja za kapilarnu elektroforezu (preuzeto iz: Nigović, 2014).

### 1.2.2. Načelo tehnike kapilarne elektroforeze

Kapilarna elektroforeza je separacijska tehnika koja se temelji na migraciji električki nabijenih čestica pod djelovanjem primijenjenog električnog polja visokog potencijala (10-30 kV) u uskoj kapilari ispunjenoj otopinom elektrolita. Nabijene čestice putuju različitim brzinama prema jednoj od elektroda ovisno o njihovom naboju i polumjeru iona, a neutralne čestice kreću se unutar kolone zahvaljujući elektroosmotskom toku (Nigović, 2014; Ph. Eur. 8.0, 2013; Watson 2012).

Razdvajanje analita u kapilarnoj elektroforezi temelji se na njihovoj različitoj brzini putovanja kroz kapilaru. Brzina čestice dana je sljedećim izrazom:

$$v_{ep} = \mu_{ep}E$$

gdje je  $v_{ep}$  brzina putovanja iona,  $\mu_{ep}$  je elektroforetska pokretljivost čestice, a  $E$  je primijenjeno električno polje.



Elektroforetska pokretljivost analita,  $\mu_{ep}$ , opisuje se izrazom:

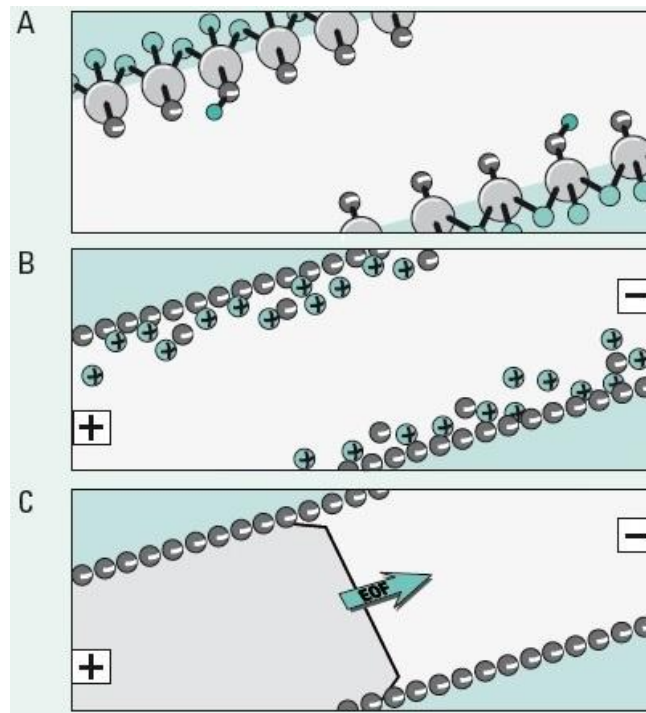
$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

gdje je  $q$  naboj čestice,  $\eta$  predstavlja viskoznost otopine elektrolita, a  $r$  je Stokeov polumjer čestice. Iz formule je vidljivo da se elektroforetska pokretljivost povećava s nabojem iona, a obrnuto je proporcionalna polumjeru čestice. Električno polje,  $E$ , koje se primjenjuje ovisi o duljini kapilare koja se koristi,  $L$ , te o naponu  $V$  koji je kroz nju primijenjen, prema sljedećem izrazu:

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

Kada se primijenjeno električno polje povisi iznad granice u kojem su električno polje i trenje jednaki, ioni se počinju kretati (Watson, 2012).

Ono što razlikuje kapilarnu elektroforezu od već uvriježene gel elektroforeze je upravo postojanje uske kapilare tankih stijenki, unutarnjeg promjera najčešće od 25 do 150  $\mu\text{m}$  (Lauer i Rozing, 2014), koja je najčešće od kvarca. Takva površina unutrašnje stijenke kapilare sadrži brojne silanolne skupine koje mogu disocirati ovisno o pH elektrolita (Nigović, 2014). pKa vrijednost kiselih silanolnih skupina je u rasponu od 4.0 do 9.0 i kako raste pH, raste i količina negativnog naboja na stijenci jer disocira veći broj silanolnih skupina (Watson, 2012). Negativan naboj na unutrašnjoj stijenci kapilare uzrokuje elektrostatsko privlačenje i akumulaciju pozitivno nabijenih iona iz elektrolitske otopine što stvara električni dvostruki sloj (Slika 3). U čvrstom dijelu električnog dvosloja su kationi, a nakon njega slijedi difuzijski sloj u kojem su i anioni i kationi (Nigović, 2014). 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 (engl. *electroosmotic flow*, EOF) (Sertić, 2013). EOF je tok čistog pufera u kapilari i nastaje kao posljedica površinskog naboja unutrašnje stijenke kapilare. Rezultat je efekta dvostrukog električnog sloja nastalog primijenjenim električnim poljem (Lauer i Rozing, 2014).



**Slika 3.** Nastajanje elektroosmotskog toka (EOF): **A**) negativno nabijena unutrašnja stijenka kapilare od izvučenog kvarca ( $\text{Si-O}^-$ ), **B**) kationi privučeni elektrostatskim silama na stijenku kapilare pri čemu se stvara dvostruki električni sloj, **C**) elektroosmotski tok prema katodi.

(preuzeto iz: Lauer i Rozing, 2014)

Brzina elektroosmotskog toka u kapilari (engl. *electro-osmotic velocity*,  $v_{eo}$ ) definirana je elektroosmotskom pokretljivošću pufera (engl. *electro-osmotic mobility*,  $\mu_{eo}$ ) prema sljedećem izrazu:

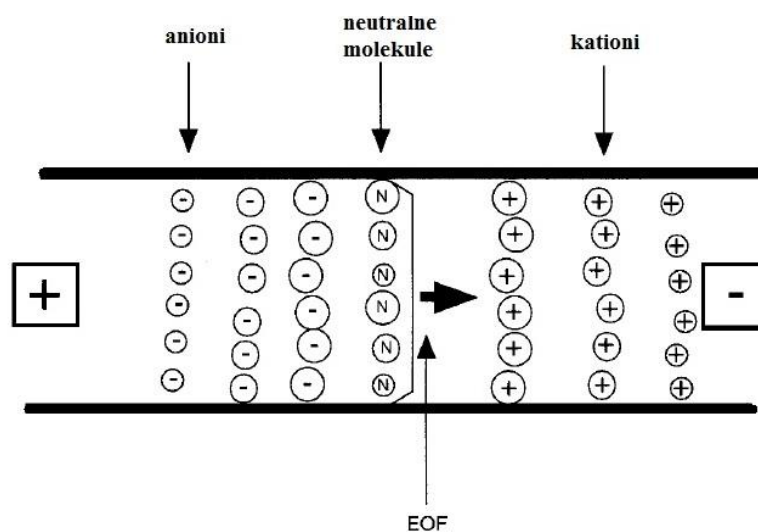
$$v_{eo} = \mu_{eo}E = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \cdot \frac{V}{L}$$

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  $L$  (Ph. Eur. 8.0, 2013).

Postojanje EOF-a omogućuje putovanje svih čestica: aniona, kationa i neutralnih čestica, u istom smjeru. Najčešće se kapilarna elektroforeza izvodi pomoću kapilare s negativno nabijenom unutrašnjom stijenkom što uzrokuje EOF od anode (pozitivne elektrode) prema katodi (negativnoj elektrodi). Konačna brzina kojom analit putuje kapilarom,  $v$ , definirana je izrazom:

$$v = v_{ep} + v_{eo} ,$$

iz čega proizlazi da putovanje ionskih i neutralnih vrsta u CE ovisi o pokretljivosti samih iona i elektroosmotskom toku. Kao što je prikazano na Slici 4, kationi putuju najbrže jer se zbog svoje elektroforetske pokretljivosti kreću u istom smjeru kao i EOF, odnosno prema katodi. Anioni su zbog svog negativnog naboja nošeni prema anodi, ali EOF je veći od njihove elektroforetske pokretljivosti pa u konačnici putuju prema katodi, ali se kreću najsporije. Zbog obrnuto proporcionalne ovisnosti polumjera nabijene čestice i njene elektroforetske pokretljivosti, kationi manjeg polumjera putovat će brže prema katodi od onih većeg polumjera. Također, anioni manjeg polumjera jače su nošeni prema anodi pa će najsporije putovati. Neutralne molekule putuju nošene elektroosmotskim tokom prema katodi kao neovisna zona, bez međusobnog razdvajanja (Lauer i Rozing 2014; Nigović 2014; Watson 2012).



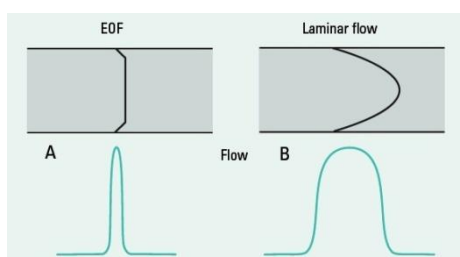
**Slika 4.** Putovanje ionskih i neutralnih vrsta u CE. (Prilagođeno iz: Watson, 2012)

Upravo je zbog elektroosmotskog toka moguće odvajanje svih analita, neovisno o njihovom naboju. Iz tog razloga vrlo je važno tijekom analize u obzir uzeti sve čimbenike koji utječu na EOF (Tablica 1).

**Tablica 1.** Čimbenici koji utječu na elektroosmotski tok.

	elektroosmotski tok
pH pufera	raste s porastom pH
ionska jakost pufera	smanjuje se povećanjem ionske jakosti
električno polje	raste porastom napona
temperatura	raste porastom temperature jer se smanjuje viskoznost
organski modifikatori	najčešće smanjuju EOF
površinski aktivne tvari	anionske ga povećavaju
	kationske ga smanjuju
modificiranje unutrašnje stijenke kapilare	neutralni sloj ga smanjuje
	ionski sloj ga povećava

Druga velika prednost elektroosmotskog toka je njegov ravan profil (Slika 5). Sila koja pokreće tok jednoliko je raspoređena kroz kapilaru pa nema pada tlaka u kapilari, stoga je brzina gotovo izjednačena cijelom širinom kapilare. Iz tog razloga nema disperzije zone analita pa su pikovi na elektroferogramu uski i oštri (Lauer i Rozing, 2014). S druge strane, hidrodinamički protok u HPLC-u, koji nastaje zbog upotrebe vanjske pumpe koja pokreće pokretnu fazu kroz sustav i kolonu pa dolazi do trenja stijenke, dovodi do širih pikova analita na kromatogramu (Sertić, 2013).

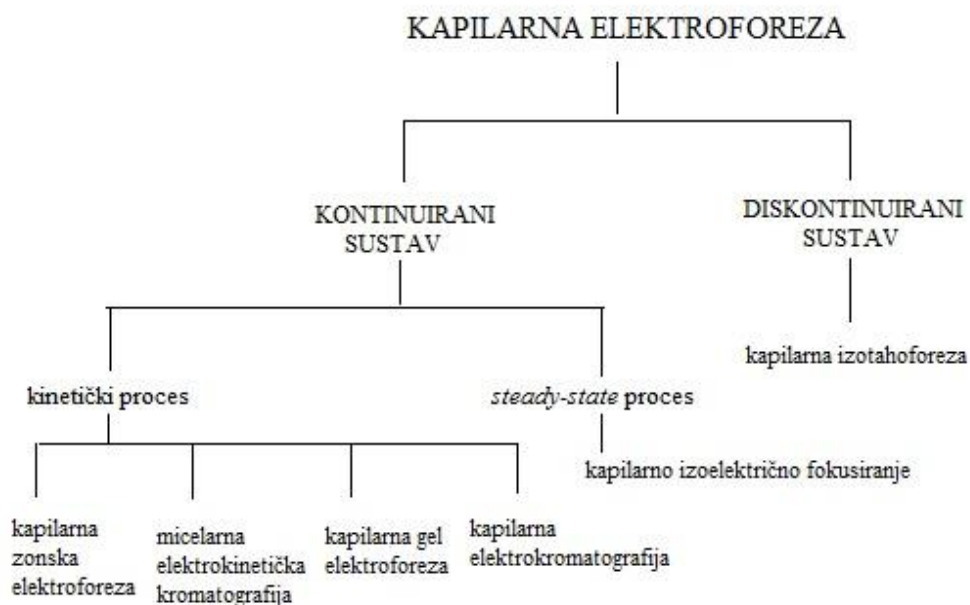


**Slika 5.** Razlika elektroosmotskog toka u CE (A) i laminarnog toka u HPLC (B) te izgled pikova na elektroferogramu, odnosno kromatogramu. (Preuzeto iz: Lauer i Rozing, 2014)

### 1.2.3. Vrste kapilarne elektroforeze

U razvoju tehnika koje se koriste za separaciju molekula na temelju njihove elektroforetske pokretljivosti, kapilarna elektroforeza precizno je optimizirana kako bi se dobili zadovoljavajući rezultati određene analize. Postoji šest glavnih vrsta kapilarne elektroforeze koje mogu biti klasificirane u kontinuirane i diskontinuirane sustave kao što je prikazano na Slici 6.

Kontinuirani sustav znači da postoji elektrolit koji ispunjava unutrašnjost kapilare i ponaša se kao pufer. Takav sustav može djelovati kao kinetički proces (sastav elektrolita je stalan) i *steady-state* proces (sastav elektrolita je promjenjiv). Diskontinuirani sustav stvara oštre granice između sastavnica uzorka zbog primjene dvaju elektrolita različite elektroforetske pokretljivosti. Analiti putuju u zoni između dviju elektrolitskih tekućina: vodeće elektrolitske tekućine veće mobilnosti koja putuje brže od komponenata uzorka i druge elektrolitske tekućine koja putuje najsporije, odnosno eluira zadnja (<https://chem.libretexts.org>).



**Slika 6.** Kategorizacija kapilarnoelektroforetskih tehnika.

Šest glavnih vrsta CE prikazanih na Slici 6 razlikuju se prema mehanizmu razdvajanja analita ovisno o njihovim svojstvima kao što je prikazano u Tablici 2. Mogućnost analize spojeva različitih svojstava ukazuje na široku primjenu CE (Nigović, 2014; Sertić, 2013).

**Tablica 2.** Vrste tvari analizirane pojedinim tehnikama CE.

VRSTA KAPILARNE ELEKTROFOREZE	SVOJSTVA ANALIZIRANIH TVARI
Kapilarna zonska elektroforeza (engl. <i>Capillary zone electrophoresis</i> , CZE)	nabijeni analiti
Micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. <i>Micellar electrokinetic capillary</i> , MEKC)	neutralni i nabijeni analiti
Kapilarna gel elektroforeza (engl. <i>Capillary gel electrophoresis</i> , CGE)	biološke makromolekule (peptidi, proteini, DNA, RNA)
Kapilarno izoelektrično fokusiranje (engl. <i>Capillary isoelectric focusing</i> , CIEF)	proteini i peptidi
Kapilarna izotahoforeza (engl. <i>Capillary isotachopheresis</i> , CITP)	ioni
Kapilarna elektrokromatografija (engl. <i>Capillary electrochromatography</i> , CEC)	male molekule

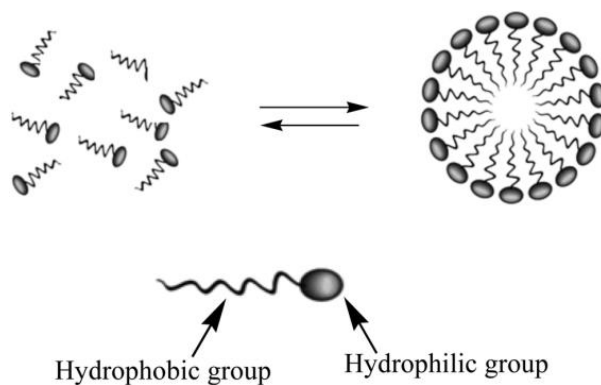
#### 1.2.3.1. Micelarna elektrokinetička kromatografija

Od kad je predstavljena, CE je pokazala veliki potencijal u farmaceutskoj analizi. No kako je većina aktivnih ljekovitih tvari neutralna, to je otežavalo njihovo razdvajanje klasičnom kapilarnom zonskom elektroforezom, gdje se razdvajanje temelji na razlici elektroforetske pokretljivosti pojedinih analita (Hancu i sur., 2013).

1984. godine Shigeru Terabe predstavio je novu vrstu kapilarne elektroforeze i nazvao je micelarna elektrokinetička kromatografija. MEKC predstavlja proširenje osnovne CE tehnike, a ujedinjuje svojstva elektroforeze i kromatografije. U današnje vrijeme, MEKC je

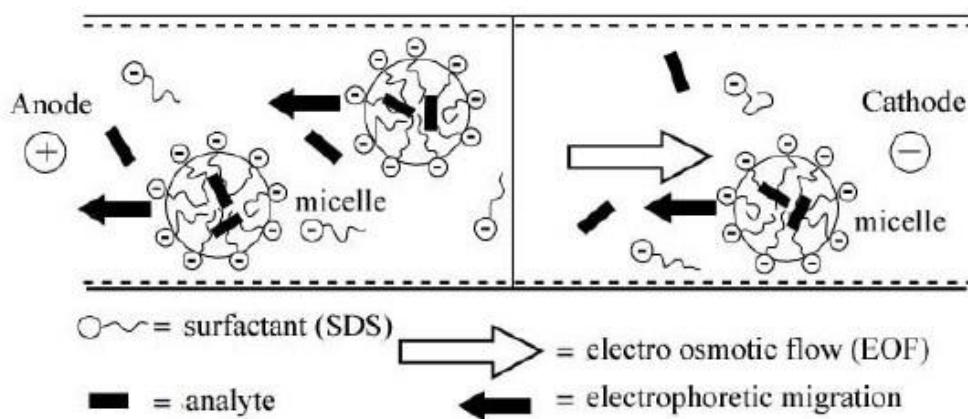
široko prihvaćen oblik CE u (bio)farmaceutskim analizama, a sve više i u kliničkim analizama te analizama hrane i okoliša (Lauer i Rozing, 2014; Hancu i sur., 2013).

Za razliku od klasične kapilarne zonske elektroforeze, MEKC je tehnika koja omogućuje razdvajanje i neutralnih molekula. Od CZE ju razlikuje to što se u otopinu radnog pufera dodaju površinski aktivne tvari (surfaktanti). Surfaktanti su tvari koje imaju polarnu glavu koja može sadržavati kationske, anionske, neutralne ili *zwitterion* skupine te hidrofoban rep ugljikovodičnog lanca. Molekule surfaktanta će formirati nakupine koje nazivamo micelle, kada im se koncentracija poveća iznad kritične micelarne koncentracije. Hidrofobni repovi surfaktanta orijentirani su prema unutrašnjosti, a polarne glave prema okolnom puferu tvoreći micelle sferičnog oblika kao što je prikazano na Slici 7 (Terabe, 1992).



**Slika 7.** Građa micela.

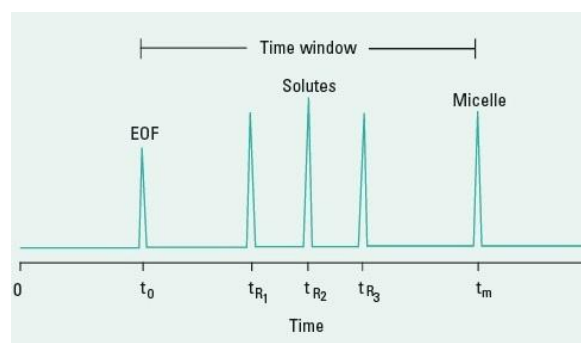
Najčešće korišten surfaktant je natrijev dodecil-sulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS). SDS je anionski surfaktant pa je elektrostatski privučen prema pozitivno nabijenoj elektrodi (anodi) kao što je prikazano na Slici 8. Suprotno tome, EOF nosi mobilnu fazu prema negativno nabijenoj elektrodi (katodi) zbog negativnog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare. Kako je EOF jači od elektroforetske pokretljivosti SDS-a, njegove micelle u konačnici se kreću prema katodi (Hancu i sur., 2013). Analiti stupaju u hidrofobne i elektrostatske interakcije s micelama pa zapravo dolazi do njihove raspodjele između micela i radnog pufera, analogno kao u kromatografiji. Micelle se nazivaju pseudostacionarnom fazom, a raspodjela analita između micela i okolnog pufera opisuje se koeficijentom razdjeljenja (Lauer i Rozing, 2014; Nigović, 2014).



**Slika 8.** Shematski prikaz principa razdvajanja u MEKC-u (Terabe, 1992).

Obzirom da neutralni analiti nemaju svoju elektroforetsku pokretljivost jer nemaju naboj, brzina kretanja im ovisi samo o konstanti raspodjele između micide i vodene otopine (Nigović, 2014; Hancu i sur., 2013). Frakcija injektiranog neutralnog analita iz uzorka inkorporira se u micelu SDS-a, a ostatak putuje elektroosmotskim tokom. Posljedično, anionske micide SDS-a selektivno usporavaju migraciju neutralnih molekula s kojima su u interakciji (Hancu i sur., 2013). Što je molekula hidrofobnija, jače se veže za micide i vrijeme zadržavanja je dulje (Slika 9) (Lauer i Rozing, 2014; Hancu i sur., 2013). I nabijeni analiti stupaju u interakcije sa micelama pa njihova brzina putovanja ovisi i o elektroforetskoj pokretljivosti samih iona i o koeficijentu distribucije između micela i vodene otopine pufera (Nigović, 2014).

Anioni uglavnom ostaju u otopini pufera zbog elektrostatskog odbijanja sa negativno nabijenom micelom SDS-a i putuju najbrže; neutralne molekule međusobno se razdvajaju isključivo ovisno o njihovoj hidrofobnosti; kationi eluiraju zadnji zbog jakih elektrostatskih interakcija sa micelom (Hancu i sur., 2013).



**Slika 9.** Raspon vremena eluiranja (engl. *elution time window*) neutralnih molekula u MEKC (Lauer i Rozing, 2014).



#### 1.2.4. Primjena kapilarne elektroforeze u analitici lijekova

Kapilarna elektroforeza ima široku primjenu u farmaciji upravo zbog različitih mehanizama odjeljivanja u pojedinim CE tehnikama, stoga se koristi u analizi velikih molekula kao što su proteini i nukleinske kiseline, malih organskih molekula (lijekovi, hormoni, metaboliti biljaka, sastojci hrane itd.), iona i neutralnih molekula (Damić i Nigović, 2010). Kombinira mehanizam razdvajanja analita karakterističan za elektroforezu i kromatografiju pa se često navodi kako se kapilarna elektroforeza nadopunjuje sa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti ili ju zamjenjuje (Li, 1992).

Kada je potrebno dobiti brze rezultate analize, CE je metoda izbora. Točna je i precizna tehnika za kvantitativnu analizu lijekova u svim vrstama ljekovitih oblika. Zbog visoke moći razlučivanja koristi se u određivanju profila čistoće lijekova. Također se koristi u analizi peptidnih lijekova, odjeljivanju enantiomera, te analizi lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama. Kao tehnika ima visoku moć odjeljivanja, kraće vrijeme analize, jeftiniju kolonu i manju potrošnju otapala u odnosu na HPLC, ali je manje izdržljiva i precizna nego HPLC (Nigović, 2014). Kao dodatan nedostatak u odnosu na HPLC ističe se veća kompleksnost parametara koje je potrebno optimizirati kako bi se postiglo razdvajanje (Watson, 2012). Prednostak je svakako minimalan volumen uzorka potreban za analizu primjenom tehnike kapilarne elektroforeze, kao i manja količina organskog otpada koja se stvara u odnosu na primjerice HPLC tehniku (Lauer i Rozing, 2014).

Unatoč brojnim prednostima i mogućnostima primjene, kapilarna elektroforeza još uvijek nije dovoljno istražena i korištena u rutinskim analizama (Damić i Nigović, 2010).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Za svaki lijek nužno je da, osim što je djelotvoran, bude i siguran za primjenu. Upravo je zbog toga ispitivanje onečišćenja sastavni dio kontrole kakvoće svakog lijeka jer ona mogu biti farmakološki aktivna, toksična, izazivati neželjene učinke, mijenjati aktivnost i stabilnost same ljekovite tvari i mijenjati njezinu bioraspoloživost u organizmu, a osim toga mogu utjecati i na rezultate laboratorijske analize. Onečišćenja u lijekovima su neželjene tvari koje mogu zaostati iz proizvodnog postupka, nastati tijekom izrade ili stajanja ljekovitog oblika ili aktivne supstancije, nastati kao produkt reakcije lijeka sa spremnikom ili pomoćnim tvarima ili su zaostale iz polaznih sirovina (Nigović, 2014).

Uz sve složenije zahtjeve zakonske regulative te neprestana nova saznanja o potencijalnim neželjenim učincima onečišćenja i niz sofisticiranih analitičkih metoda na raspolaganju, ispitivanje čistoće farmaceutskih tvari sve više dobiva na važnosti (Nigović, 2014). Analiza onečišćenja predstavlja jedan od ključnih procesa u industrijskoj proizvodnji aktivnih farmaceutskih supstancija i ljekovitih oblika pa je razvoj novih analitičkih metoda od velikog značaja.

Monografija antineoplastičnog lijeka gemcitabina uvrštena je u 8. izdanje Europske farmakopeje. Za određivanje sadržaja gemcitabina te određivanje onečišćenja koristi se metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, uz primjenu gradijenta u trajanju od 20 minuta (Ph. Eur. 8.3, 2015). Osim što je kontrola kvalitete jedan od ključnih koraka prije stavljanja lijeka u promet, ona se i rutinski provodi u industrijskoj proizvodnji lijekova. Stoga je cilj ovog istraživanja bio razviti novu, brzu, jednostavnu i ekološki prihvatljivu kapilarnoelektroforetsku metodu za istovremenu identifikaciju i određivanje sadržaja gemcitabina i njegovog onečišćenja cizotina. Kao prikladna tehnika odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija. U odnosu na HPLC tehniku, CE ima jeftiniju kapilaru, kraće vrijeme analize i manju potrošnju otapala što uz visoku moć odjeljivanja predstavlja "zelenu" alternativu već razvijenoj HPLC metodi.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Kemikalije

- Dinatrijev hidrogenfosfat, (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Ledena octena kiselina, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev acetat, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev dihidrogenfosfat, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev dodecil sulfat, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- Natrijev tetraborat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Otopina natrijeva hidroksida, 1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

#### 3.1.2. Standardi

- Gemcitabin (European Pharmacopoeia Reference Standard)
- Gemcitabin impurity A (European Pharmacopoeia Reference Standard)
- Pravastatin (Pliva, Zagreb, Hrvatska)

#### 3.1.3. Radni instrument

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

#### 3.1.4. Pribor

- Analitička vaga, model AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Bočice za uzorkovanje sustavom za kapilarnu elektroforezu (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

- Digitalni pH-metar (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Injekcijski membranski Acrodisc GHP filteri, veličina pora 0,2  $\mu\text{m}$  (Gelman, Ann Arbor, SAD)
- Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 35 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)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)

### 3.1.5. Programski paketi

- Program 3DCE/MSD ChemStation, ver A 10.02 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Microsoft® Office Excel 2003 (Microsoft, Seattle, SAD)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema standardnih otopina

Matična standardna otopina gemcitabina i njegovog onečišćenja citozina pripremljene su vaganjem odgovarajuće količine standarda i otapanjem u odmjerne tikvici od 5,0 mL u ultračistoj vodi kako bi se postigla koncentracija 1 mg/mL. Kao unutarnji standard korišten je pravastatin. Njegova matična standardna otopina pripremljena je vaganjem odgovarajuće količine standarda i otapanjem u odmjerne tikvici od 5,0 mL u ultračistoj vodi kako bi se postigla koncentracija 0,5 mg/mL. Sve matične standardne otopine čuvale su se u hladnjaku na + 4°C.

Radne standardne otopine korištene za razvoj i optimizaciju metode pripremane su svježije svaki dan prije analize dodatkom odgovarajuće količine matične standardne otopine gemcitabina i citozina te unutarnjeg standarda pravastatina i razrjeđivanjem do odgovarajuće koncentracije ultračistom vodom.

### 3.2.2. Priprema otopina radnog pufera

Boratni pufer pripremljen je otapanjem odgovarajuće količine natrijevog tetraborata u odmjerne tikvici od 50,0 ml nadopunjavanjem do oznake ultračistom vodom kako bi konačna koncentracija bila 100 mM. Kako bi se pospješilo otapanje krutog tetraborata, otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 10 min.

Acetatni pufer u koncentraciji 100 mM pripremljen je u odmjerne tikvici od 50,0 mL otapanjem odgovarajuće količine natrijeva acetata u ultračistoj vodi i dodatkom odgovarajućeg volumena ledene octene kiseline kojim se podesi pH vrijednost na pH metru na 3,0. Otopina je stavljena na ultrazvučnu kupelj na 5 minuta radi boljeg otapanja, a tikvica je nakon toga nadopunjena do oznake ultračistom vodom.

Otopina fosfatnog pufera koncentracije 100 mM i  $\text{pH} = 7,0$  pripremljena je vaganjem odgovarajuće količine natrijeva dihidrogenfosfata i dinatrijeva hidrogenfosfata u odmjerne tikvici od 50,0 mL te otapanjem u ultračistoj vodi. Otopina je stavljena na ultrazvučnu kupelj na 5 minuta radi boljeg otapanja. Izmjerena pH vrijednost na pH metru iznosila je 7,0.

Otopina surfaktanta SDS-a u koncentraciji 100 mM pripremljena je u odmjerne tikvici od 50,0 mL otapanjem odgovarajuće količine natrijeva dodecil sulfata u ultračistoj vodi. Otopina je stavljena na ultrazvučnu kupelj na 10 minuta radi boljeg otapanja.

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

### 3.2.3. Kapilarnoelektroforetski uvjeti analize

Prije prvog korištenja kapilara je aktivirana ispiranjem 5 min sa metanolom, 15 min sa 1M NaOH, vodom 10 minuta i otopinom radnog pufera 20 minuta. Na početku svakog radnog dana kapilara je ispirana 10 minuta sa 0,1 M NaOH, 10 minuta vodom te 10 minuta otopinom radnog pufera. Između analiza ispiralo se 10 minuta otopinom radnog pufera.

Analiza je provedena na uređaju za kapilarnu elektroforezu (G1600A Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka), a korištena kapilara bila je ukupne duljine 35 cm, duljine do detektora 27 cm i unutrašnjeg promjera od 50  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies,

Waldbronn, Njemačka). Uzorci su injektirani u kapilaru pod tlakom od 50 mbara, pri temperaturi od 25°C tijekom 6 s. Analize su provođene pri naponu od 10-30 kV ovisno o mjerenju, a valne duljine detektora podešene su na 237 nm i 275 nm. Na kraju radnog dana kapilara je 15 minuta ispirana vodom, a elektrode su na kraju uronjene u bočice za uzorkovanje sa ultračistom vodom.

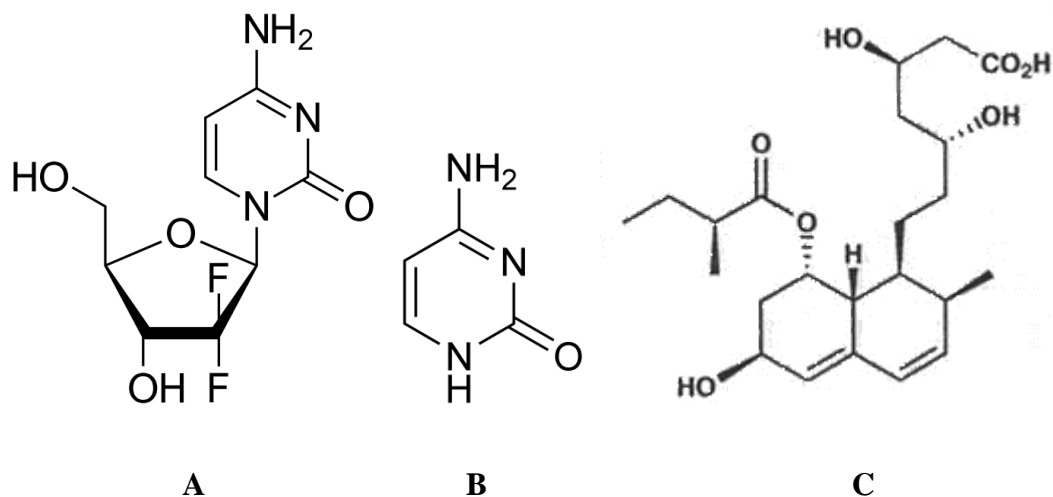
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Unutarnji standard

Identifikacija i kvantitativno određivanje onečišćenja jedan su od ključnih koraka prije stavljanja lijeka u promet, ali i u rutinskoj analizi tijekom industrijske proizvodnje aktivnih farmaceutskih supstancija i ljekovitih oblika. Onečišćenja mogu imati neželjeni farmakološki, čak i toksični učinak na organizam, izazvati nuspojave, utjecati na stabilnost i aktivnost ljekovite tvari te njezinu bioraspoloživost. Velik problem također predstavlja njihov utjecaj na rezultat analize lijekova (Nigović, 2014). Upravo je zato cilj bio započeti razvoj nove kapilarnoelektroforetske metode za analizu gemcitabina i njegovog onečišćenja citozina, 4-aminopirimidin-2(1H)-ona (Slika 10) kako bi osim postojeće HPLC metode u 8. izdanju Europske farmakopeje, postojala i brža, ekološki prihvatljivija metoda jeftinija za izvedbu.

U kapilarnoj elektroforezi često mogu nastati pogreške zbog vrlo malih volumena uzoraka koji se injektiraju u kapilaru, varijacija u primijenjenom naponu, razlika u elektroosmotskom toku i drugim promjenama koje mogu utjecati na rezultat analize. Kako bi se izbjegle ovakve pogreške, koristi se unutarnji standard. Kao unutarnji standard koristi se molekula dovoljno slične strukture ispitivanom analitu kako bi im vrijeme elucije bilo približno jednako, odnosno kako unutarnji standard ne bi nepotrebno produljivao vrijeme analize, ali uz uvjet da su pikovi razdvojeni.

Za analizu gemcitabina i njegovog onečišćenja citozina kao unutarnji standard izabran je pravastatin (Slika 10 C). On posjeduje karboksilnu skupinu čija je pKa vrijednost 4,2 ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)), stoga je u neutralnom i lužnatom mediju ona potpuno disocirana u anionski oblik. Koji će analit prvi biti detektiran kod katode, ovisi o brzini putovanja čestice kroz kapilaru što ovisi o njezinoj elektroforetskoj pokretljivosti i primijenjenom električnom polju. S obzirom da polje jednako djeluje na sve čestice koje prolaze kapilarom, razliku u brzini određuju samo promjer čestice i njezin naboj o kojima posljedično ovisi njezina elektroforetska pokretljivost.



**Slika 10.** Kemijske strukture gemcitabina (A), njegovog onečišćenja citozina (B) i unutarnjeg standarda pravastatina (C).

#### 4. 2. Optimizacija sastava radnog pufera

U razvoju nove kapilarnoelektroforetske metode prvi ispitivani parametar je vrsta i pH radnog pufera. O pH pufera ovisi elektroosmotski tok jer promjenom pH mijenja se i naboj na površini unutrašnje stijenke kapilare. EOF je znatno veći kada su silanolne skupine deprotonirane ( $\text{SiO}^-$ ), a takvi uvjeti postižu se pri visokim pH vrijednostima. Promjenom pH mijenja se i stupanj ionizacije analita što će izravno utjecati na njegovu elektroforetsku pokretljivost. Kada se promatra struktura gemcitabina i citozina, može se očekivati da će oni u vrlo širokom rasponu pH vrijednosti biti neutralni. Stoga se nameće zaključak kako je logičan odabir tehnike micelarna elektrokinetička kromatografija.

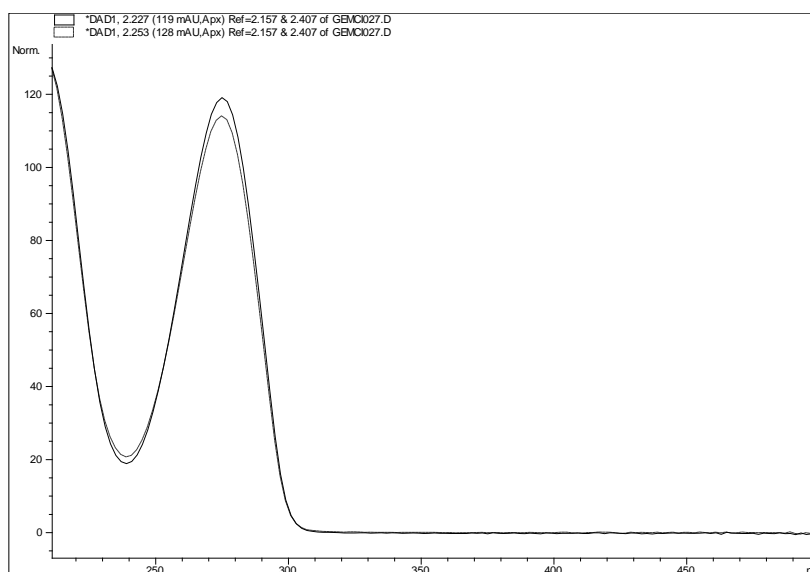
Kao surfaktant u MEKC metodi korišten je SDS, kao najdostupniji, i cijenom vrlo prihvatljiv surfaktat. SDS iznad kritične micelarne koncentracije (oko 10 mM) stvara micide koje djeluju kao pseudostacionarna faza. Micide zbog svog negativnog naboja putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi, odnosno u smjeru injektorskog dijela kapilare. Kako bi micide bile nošene prema negativno nabijenoj elektrodi, s čije strane se nalazi detektor, ključno je osigurati uvjete u kojima će brzina EOF-a biti veća od brzine kojom micide SDS-a putuju prema anodi. Iz tog je razloga vrlo važno odabrati radni pufer prikladne pH vrijednosti.

U kapilarnoj zonskoj elektroforezi brzina EOF-a snažno ovisi o promjeni pH pa se pri nižim pH vrijednostima značajno smanji, a u alkalnim uvjetima je puno veća. U MEKC metodi je ovisnost nešto drugačija, posebice u pH području 5,5-7,0. U ovim slabo kiselim



uvjetima brzina EOF-a se neznatno smanjuje kako pH vrijednost pada jer dolazi do adsorpcije molekula SDS-a koje tvore pseudostacionarnu fazu na unutrašnju stijenkku kapilare. Ispod pH od 5,5 EOF opet značajno ovisi o pH vrijednosti jer su silanolne skupine na unutrašnjoj stijenci sve manje disocirane u ovim kiselim uvjetima pa se smanjuje i zeta potencijal (Sertić, 2013).

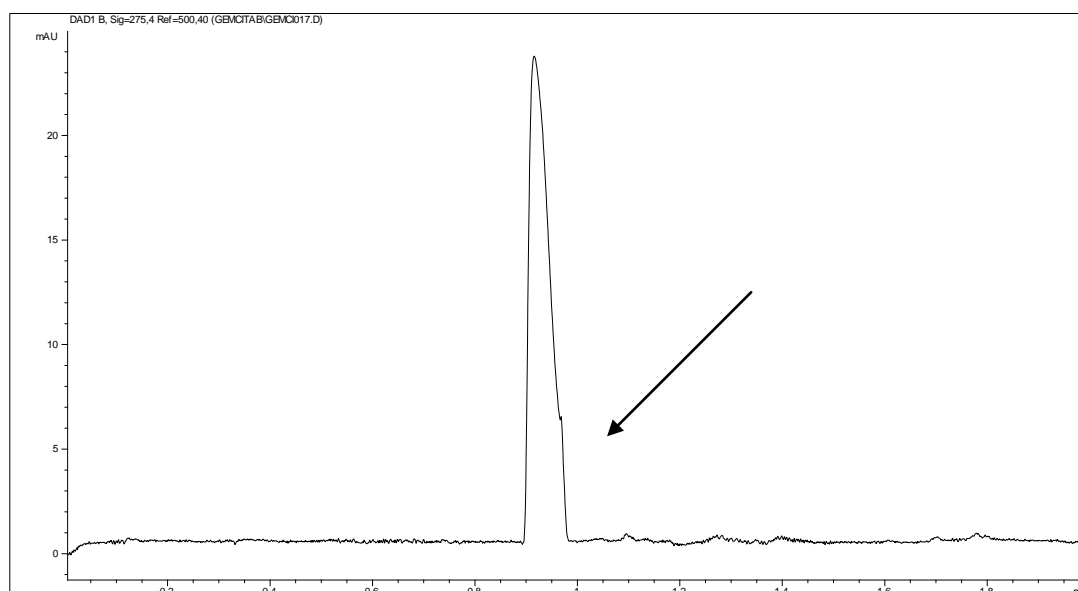
U razvoju kapilarnoelektroforetske metode za analizu gemcitabina i citozina odabrane su dvije valne duljine detekcije. Gemcitabin ima apsorpcijski maksimum na 275 nm (Singh i sur., 2015). Gemcitabin i njegovo onečišćenje citozin zbog slične strukture imaju vrlo sličan UV spektar i oba se detektiraju na valnoj duljini od 275 nm. Razlog odabira i druge valne duljine detekcije je svojstvo pravastatina da ne apsorbira elektromagnetsko zračenje na 275 nm. Kako je pravastatin odabran kao unutarnji standard, vrlo je bitna njegova detekcija kako bi se izbjegle sve pogreške navedene ranije. S obzirom da svi statini, pa i pravastatin, imaju snažnu UV-apsorbanciju na 237 nm (Sertić, 2013), upravo je ta valna duljina odabrana za detekciju. Na Slici 11 prikazan je karakterističan UV-Vis spektar gemcitabina dobiven iz vrha pika od značaja. Vidljiv je karakteristični apsorpcijski maksimum na 275 nm.



**Slika 11.** UV-Vis spektar gemcitabina.

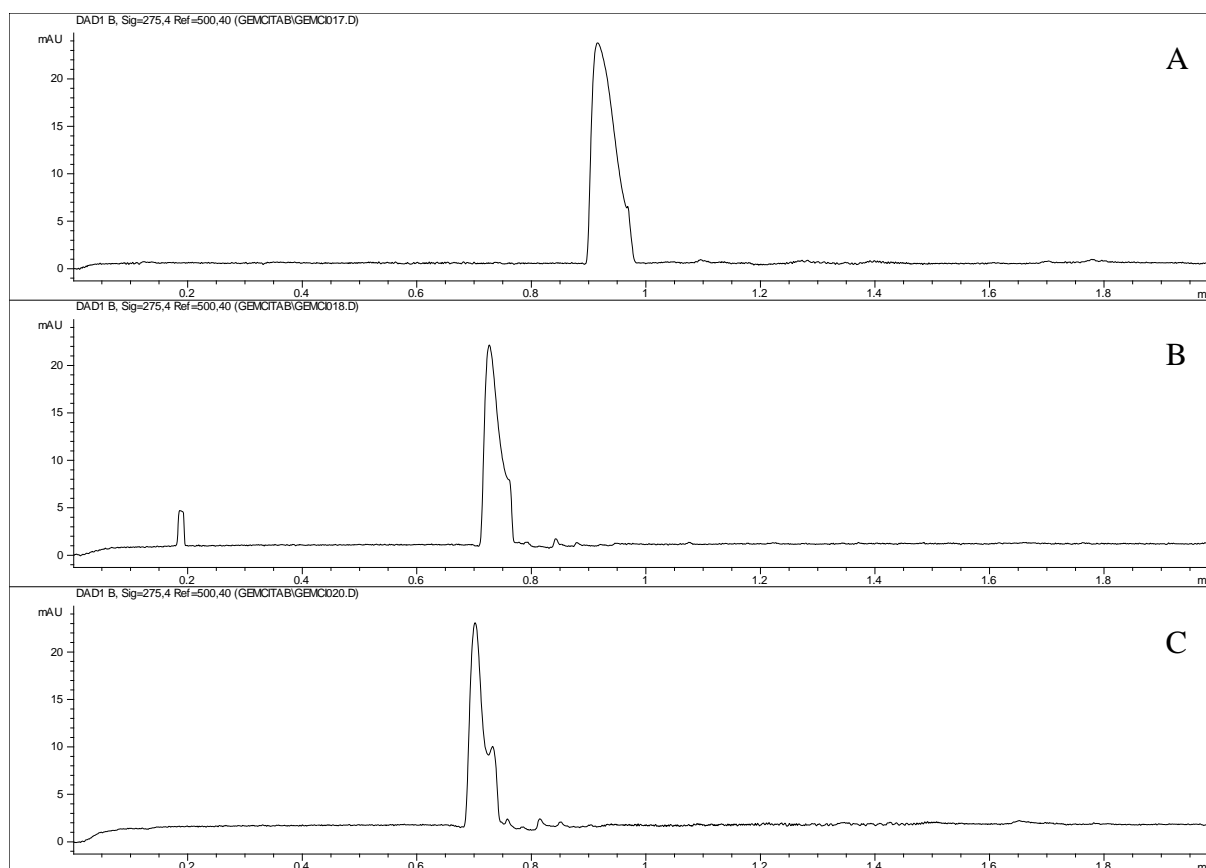
Svi elektroferogrami u daljnjim ispitivanjima prikazani su na valnoj duljini detekcije od 275 nm na kojoj pravastatin ne apsorbira dok analiti od interesa, gemcitabin i citozin, puno bolje apsorbiraju UV zračenje nego na 237 nm. Stoga je radi praćenja uspješnosti njihova odjeljivanja odabrana ta valna duljina iako su elektroferogrami u svim mjerenjima bili snimljeni na obje valne duljine detekcije.

Tijekom optimizacije metode ispitana su tri različita pufera - boratni, acetatni i fosfatni pufer u rasponu pH = 3,0-9,3. Prvi preliminarni pokusi bili su s 20 mM boratnim puferom pH 9,3 sa 50 mM SDS-om (Slika 12). Boratni pufer je najčešće korišteni pufer u kapilarnoj elektroforezi jer su pri njegovom visokom pH silanolne skupine na unutrašnjoj stijenci kapilare u potpunosti ionizirane što rezultira vrlo snažnim elektroosmotskim tokom, a to za posljedicu najčešće ima brže analize. Ispitano je nekoliko različitih kombinacija boratnog pufera i SDS-a u različitim koncentracijama kako bi se vidjele razlike u elektroferogramima: 50 mM borat i 20 mM SDS te 20 mM borat i 70 mM SDS. Obje kombinacije uspoređene sa prvom u kojoj se koristio 20 mM boratni pufer i 50 mM SDS. Kao što se može vidjeti na Slici 13, veća koncentracija SDS-a doprinosi boljem odjeljivanju pikova gemcitabina i citozina što će kasnije biti detaljnije objašnjeno.



**Slika 12.** Elektroferogram smjese standardnih otopina gemcitabina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) i njegovog onečišćenja citozina (70  $\mu\text{g/ml}$ ), na valnoj duljini 275 nm.

*Uvjeti analize: 20 mM boratni pufer pH 9,1-9,3, 50 mM SDS, 30 kV, 25 °C, valna duljina detekcije: 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.*

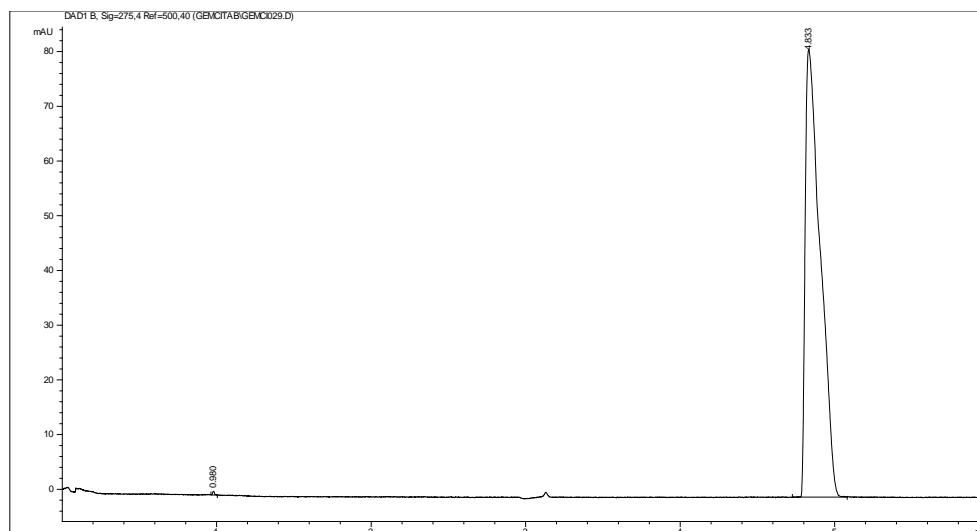


**Slika 13.** Elektroferogrami smjese standardnih otopina gemcitabina (50 µg/ml) i njegovog onečišćenja citozina (70 µg/ml), na valnoj duljini 275 nm.

*Uvjeti analize: (A) 50 mM boratni pufer pH 9,3 + 20 mM SDS, (B) 20 mM boratni pufer pH 9,3 + 50 mM SDS, (C) 20 mM boratni pufer pH 9,3 + 70 mM SDS, 30 kV, 25 °C, valna duljina detekcije: 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.*

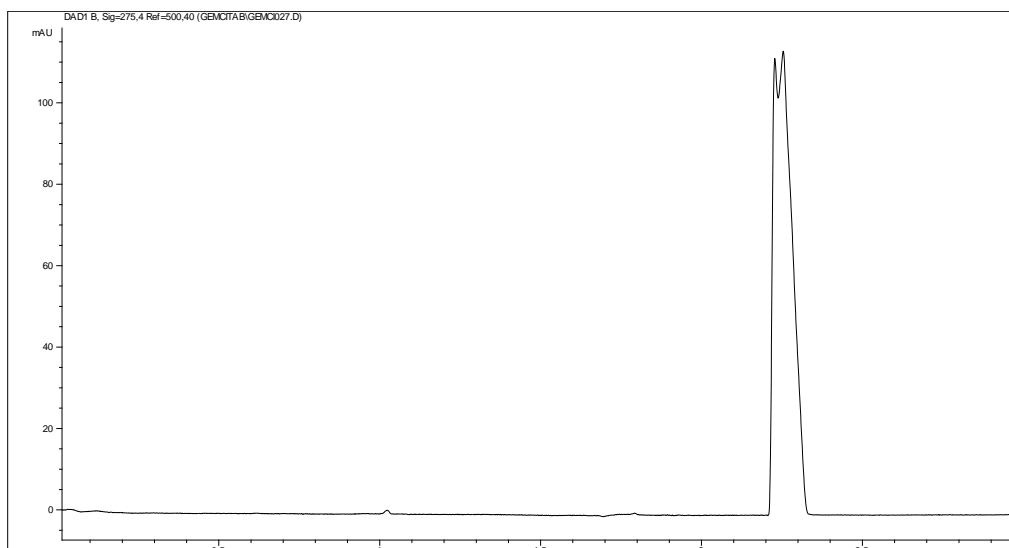
Drugi pufer koji je preliminarno ispitan kako bi se vidjelo ponašanje analita jest acetatni pufer, pH 3,0. Ispitan je acetat u koncentraciji od 30 mM sa 50 mM SDS-om pri naponu od 30kV i 25kV. Na elektroferogramu na Slici 14 vidljiv je jedan široki pik što indicira da do razdvajanja pikova gemcitabina i citozina uopće nije došlo. Kod većeg napona (30 kV) pikovi su se počeli razdvajati jer je porasla elektroforetska pokretljivost čestica pa je i vrijeme analize kraće (Slika 15). Sljedeći korak mogao je biti povećanje koncentracije SDS-a kako bi se postiglo bolje razdvajanje analita, ali time bi gemcitabin i citozin promijenili redoslijed elucije jer brzina kretanja analita u MEKC metodi ovisi i o elektroforetskoj pokretljivosti čestice, ali i o koeficijentu distribucije između micela i vodene otopine. Što je koncentracija SDS-a veća, analiti stupaju u snažnije interakcije s micelama i dulje se zadržavaju u njima. Osim toga, u kiselom pH acetatnog pufera od 3,0 EOF značajno pada zbog slabe disocijacije silanolnih skupina na unutrašnjoj stijenci kapilare. Pravastatin uopće

nije vidljiv na elektroferogramu (valna duljina detekcije = 237 nm) unatoč produljenju vremena analize sa 6 na 8 minuta pri 25 kV. Budući da je vrijeme analize i ovako dugo, nije se išlo u smjeru povećanja koncentracije SDS-a.



**Slika 14.** Elektroferogram smjese standardnih otopina gemcitabina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) i njegovog onečišćenja citozina (190  $\mu\text{g/ml}$ ), na valnoj duljini 275 nm.

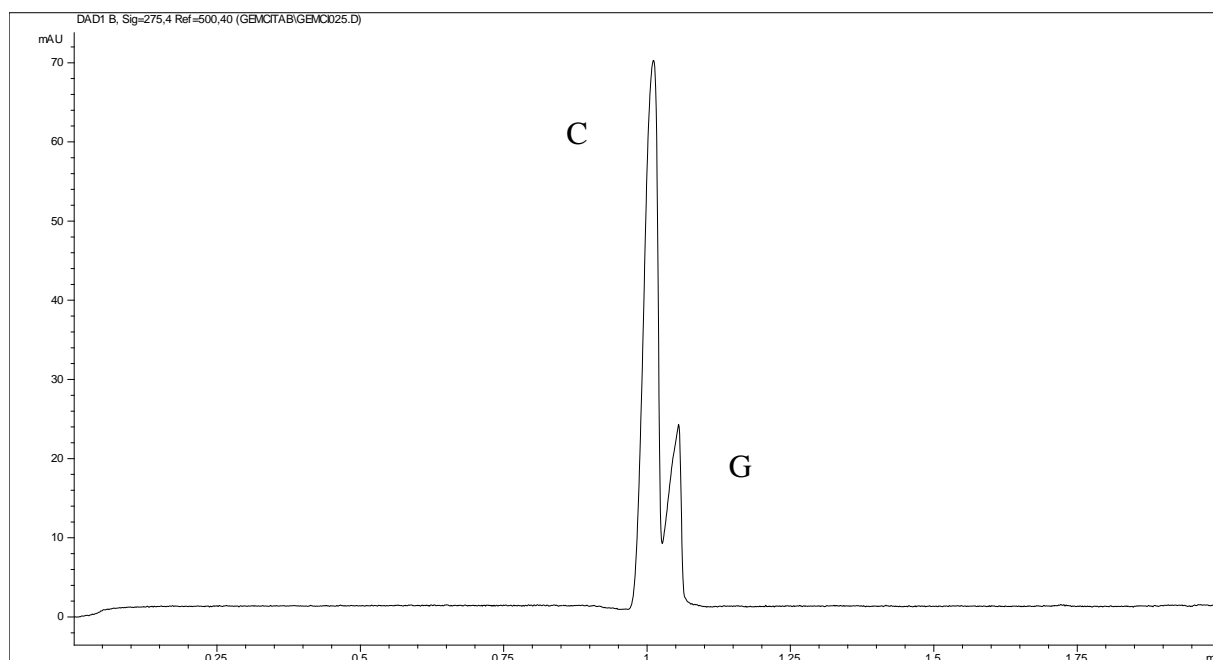
*Uvjeti analize: 30 mM acetatni pufer pH 3,0, 50 mM SDS, 25 kV, 25 °C, valna duljina detekcije: 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.*



**Slika 15.** Elektroferogram smjese standardnih otopina gemcitabina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) i njegovog onečišćenja citozina (190  $\mu\text{g/ml}$ ), na valnoj duljini 275 nm.

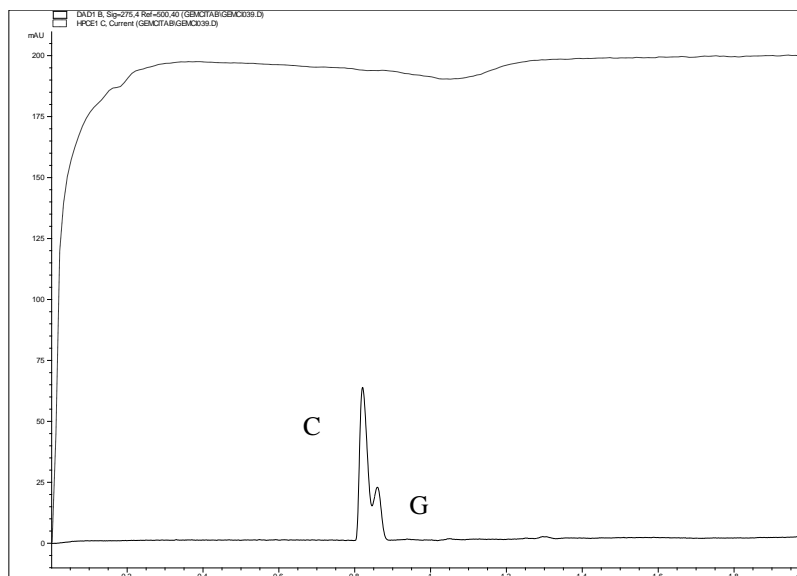
*Uvjeti analize: 30 mM acetatni pufer pH 3,0, 50 mM SDS, 30 kV, 25 °C, valna duljina detekcije: 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.*

Kao najbolji radni pufer pokazao se fosfatni pufer, pH = 7,0. Najprije je provedena analiza sa 20 mM fosfatom i 70 mM SDS-om i pri tim uvjetima pikovi su se počeli dobro odvajati (Slika 16). Prva ispitana koncentracija SDS-a bila je 70 mM zato što se u prethodnim ispitivanjima sa boratnim puferom vidjelo da se pri većoj koncentraciji surfaktanta postiže bolje razdvajanje. Međutim, pri ovako visokoj koncentraciji SDS-a jako je porasla ionska jakost. Izmjerena je visoka struja od 200  $\mu$ A (Slika 17) i došlo je do neželjenog Jouleovog zagrijavanja u kapilari. Ovaj efekt želi se izbjeći kako ne bi došlo do promjena u viskoznosti i razvijanja nejednolikog temperaturnog gradijenta kroz kapilaru koji dovode do promjene EOF-a i širenja zona analita.



**Slika 16.** Elektroferogram smjese standardnih otopina gemcitabina (100  $\mu$ g/ml) i njegovog onečišćenja citozina (190  $\mu$ g/ml), na valnoj duljini 275 nm.

*Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 70 mM SDS, 25 kV, 25 °C, valna duljina detekcije: 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Pikovi: G = gemcitabin, C = citozin.*



**Slika 17.** Elektroferogram smjese standardnih otopina gemcitabina (70  $\mu\text{g/ml}$ ) i njegovog onečišćenja citozina (90  $\mu\text{g/ml}$ ), na valnoj duljini 275 nm te prikaz povišenja jakosti struje (200  $\mu\text{A}$ ).

*Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 70 mM SDS, 30 kV, 25 °C, valna duljina detekcije: 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Pikovi: G = gemcitabin, C = citozin.*

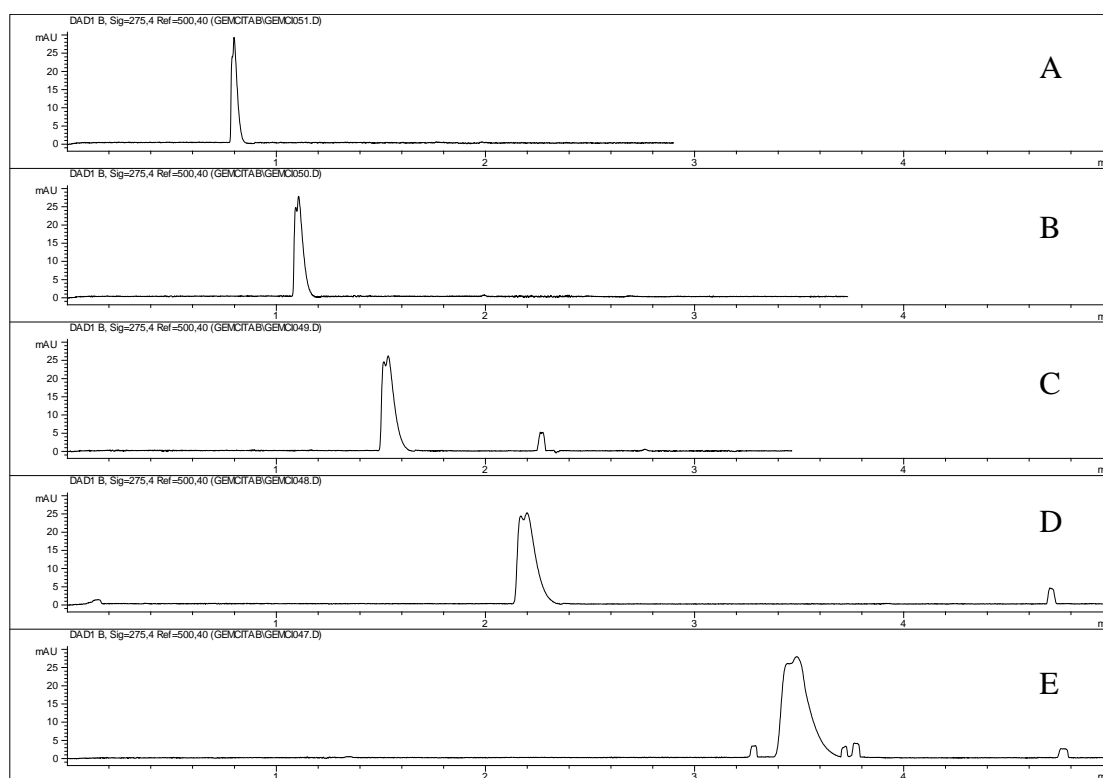
#### 4.3. Utjecaj primijenjenog napona i optimizacija koncentracije SDS-a

Napon je vrlo važan parametar koji se treba optimizirati u razvoju nove kapilarnoelektroforetske metode. Povećanjem napona povećava se i električno polje što u konačnici povećava elektroforetsku pokretljivost analita, ali i elektroosmotsku pokretljivost pufera u kapilari. Veći napon stoga daje veću brzinu EOF-a i brže vrijeme analize.

Nadalje, koncentracija SDS-a kao surfaktanta koji tvori micelle pseudostacionarne faze snažno utječe na selektivnost metode pa ju je vrlo važno optimizirati. Usporedbom Slike 18 i Slike 19 uočava se ovisnost koncentracije SDS-a o vremenu migracije analita: što je ona veća, dulje je vrijeme migracije jer se analiti dulje zadržavaju u micelama. Svaki analit ima određenu lipofilnost koja posljedično daje različit koeficijent raspodjele između micelle i radnog pufera u kapilari. Povećanjem koncentracije SDS-a raste udio analita u micelama i on posljedično dulje prolazi kapilalom do katode. Kao što je ranije napomenuto, koncentracija SDS-a od 70 mM izazivala je porast struje u kapilari što dovodi do Jouleova zagrijavanja pa su stoga analizirane koncentracije bile 20 mM i 50 mM. Koncentracije niže od 20 mM nisu ispitivane jer su blizu kritične micelarne koncentracije SDS-a. Drugi važni čimbenici pri odabiru optimalne koncentracije SDS-a o kojima je potrebno voditi računa su oblik i simetrija

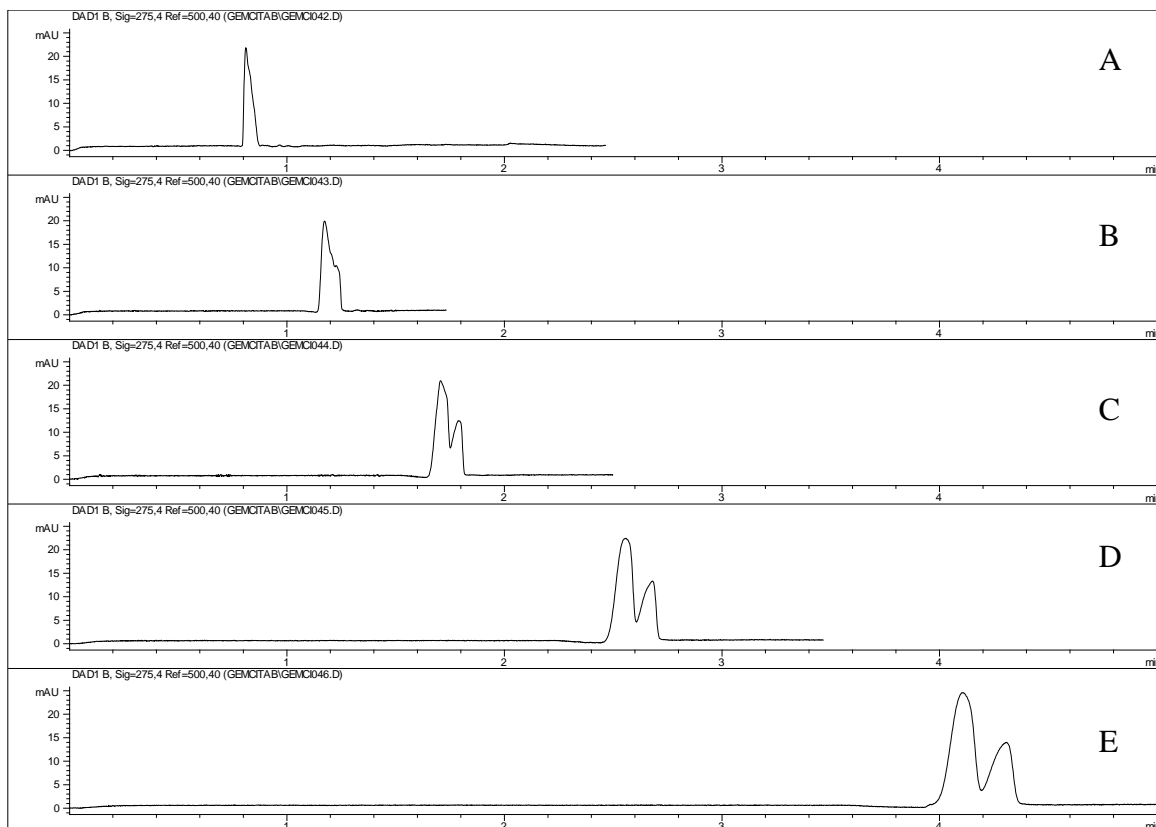
pika te razlučivanje između pikova gemcitabina i citozina kao njegovog onečišćenja, a u trenutnim uvjetima analize oni koeluiraju.

Ispitan je utjecaj napona od 10, 15, 20, 25 i 30 kV na razdvajanje analita u 20 mM fosfatnom puferu kod dvije različite koncentracije SDS-a: 20 mM i 50 mM. Utjecaj napona kod 70 mM SDS-a nije ispitan zbog prethodno opisanog porasta struje i opasnosti od Jouleova zagrijavanja. Prvo je ispitana koncentracija SDS-a od 20 mM (Slika 18) pri čemu nije došlo do razdvajanja pikova pa je daljnja analiza bila u smjeru povećanja koncentracije SDS-a. Izabrana je 50 mM koncentracija (Slika 19). Na slikama je jasno vidljivo da se porastom napona skraćuje vrijeme migracije gemcitabina i citozina. Bolje razdvajanje pikova postiglo se uz veću koncentraciju SDS-a jer analiti ulaze u jače interakcije sa micelama i dulje se u njima zadržavaju. Smanjenjem napona površina se pika povećava, čime je osjetljivost metode veća. Međutim, primjenom manjeg napona produljuje se vrijeme putovanja analita kroz kapilaru pa je potrebno voditi računa o tome da se postigne dobro razlučivanje, ali uz što je moguće kraće vrijeme analize. Gledajući općenito, to je još uvijek relativno kratko vrijeme migracije pa odlučujući faktor neće biti vrijeme analize, već oblik pika i razlučivanje.



**Slika 18.** Elektroferogrami smjese standardnih otopina gemcitabina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) i njegovog onečišćenja citozina (50  $\mu\text{g/ml}$ ), na valnoj duljini 275 nm, uz promjenu napona: (A) 30 kV, (B) 25 kV, (C) 20 kV, (D) 15 kV, (E) 10 kV.

*Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 9,1-9,3, 20 mM SDS, 10-30 kV, 25 °C, valna duljina detekcije: 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.*

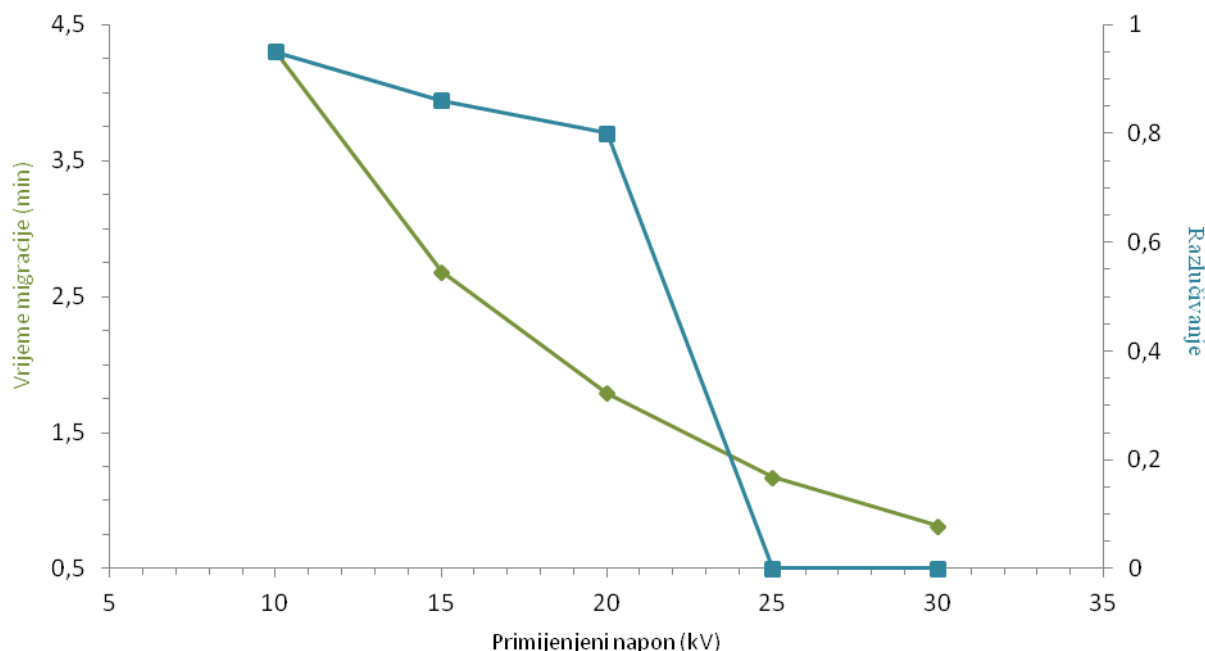


**Slika 19.** Elektroferogrami smjese standardnih otopina gemcitabina (50 µg/ml) i njegovog onečišćenja citozina (50 µg/ml), na valnoj duljini 275 nm, uz promjenu napona: (A) 30 kV, (B) 25 kV, (C) 20 kV, (D) 15 kV, (E) 10 kV.

*Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 9,1-9,3, 50 mM SDS, 10-30 kV, 25 °C, valna duljina detekcije: 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.*

Razlučivanje ( $R_s$ ) je kvantitativna mjera koja izražava sposobnost odjeljivanja dvaju sastojaka, a može se izračunati iz kromatograma, odnosno elektroferograma. Kako bi se dva susjedna pika na elektroferogramu smatrala razdvojenima na baznoj liniji, razlučivanje mora biti veće od 1,5 (Nigović, 2014). Na Slici 20 vidi se da je povećanjem napona razlučivanje između gemcitabina i citozina manje ili razlučivanja niti nema. Kod nižih napona, iako je vrijeme migracije analita dulje, razlučivanje raste pa je stoga najbolje razdvajanje pikova postignuto kod najnižeg primijenjenog napona od 10 kV. Kod ovog napona  $R_s$  je bio 0.95, što znači da je potrebna daljnja optimizacija drugih parametara analize kako bi se postiglo razlučivanje od barem 1.5.





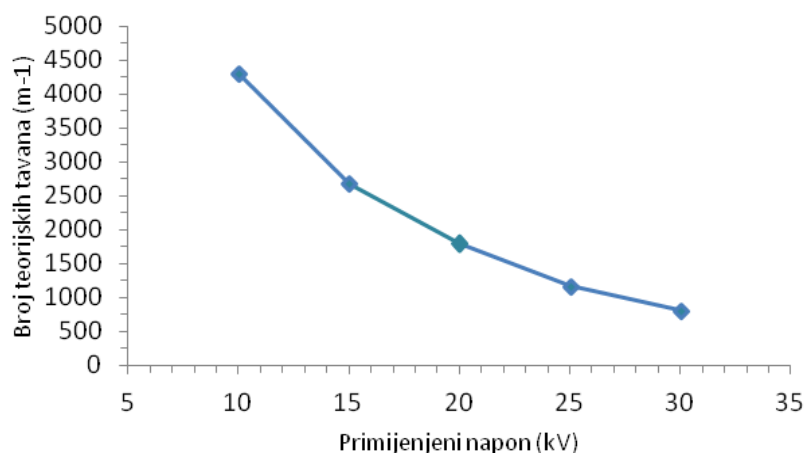
**Slika 20.** Utjecaj primijenjenog napona na vrijeme migracije (♦) gemcitabina (50 µg/ml) te na razlučivanje (■) između gemcitabina (50 µg/ml) i citozina (50 µg/ml).

*Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 9,1-9,3, 50 mM SDS, 10-30 kV, 25 °C, valna duljina detekcije: 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.*

Broj teorijskih tavana,  $N$ , koristan je kao kvantitativni pokazatelj učinkovitosti kapilare ili kromatografske kolone pa je u razvoju nove kapilarnoelektroforetske metode poželjno prikazati njegovu ovisnost o različitim parametrima. Broj teorijskih tavana je matematički koncept, odnosno hipotetska zona ili stanje u kojem se uspostavlja ravnoteža između dviju faza. U ovoj metodi to su pokretna faza, odnosno radni pufer i nepokretna faza, odnosno kolona. Što je broj teorijskih tavana veći, kolona ili kapilara smatraju se učinkovitijima. Broj teorijskih tavana jednostavno se može odrediti iz elektroferograma prema izrazu:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

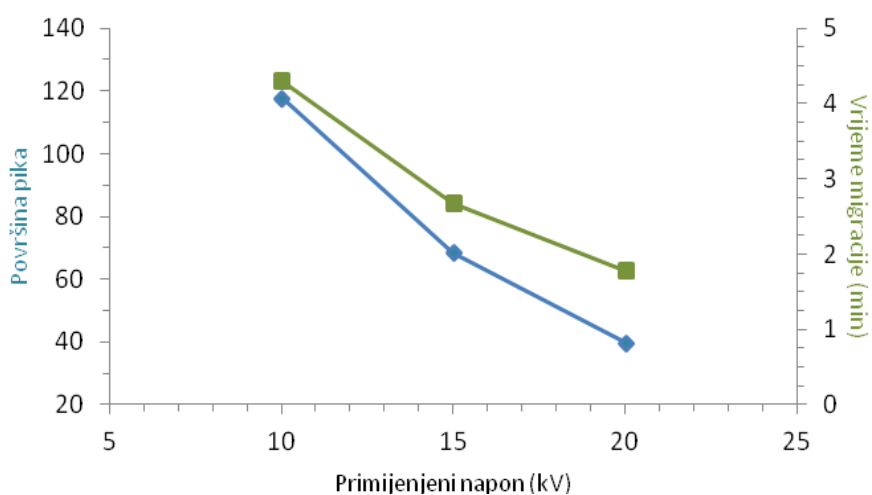
gdje je  $t_r$  migracijsko vrijeme tvari, a  $W_{1/2}$  širina pika na elektroferogramu na polovici njegove visine (Sertić, 2013). U razvoju metode za analizu gemcitabina i onečišćenja citozina ispitan je utjecaj napona na broj teorijskih tavana. Slika 21 pokazuje da učinkovitost kapilare raste smanjenjem primijenjenog napona.



**Slika 21.** Utjecaj primijenjenog napona na učinkovitost metode za gemcitabin (50 µg/ml).

*Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 9,1-9,3, 50 mM SDS, 10-30 kV, 25 °C, valna duljina detekcije: 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.*

Smanjenjem napona dolazi i do širenja pikova (Slika 19). Što je napon manji, površina pika je veća i to omogućuje bolju osjetljivost metode, što je ključno kod kvantitativnog određivanja onečišćenja. Dakle, niži napon dao je bolje razlučivanje, veći broj teorijskih tavana i veću površinu pika, iako se vrijeme analize produjilo, a pikovi su se proširili. Slika 22 pokazuje ovisnost površine pika gemcitabina o naponu dobivenu sa tri vrijednosti (C, D, E) jer u prva dva slučaja (A, B) nije došlo do razdvajanja pikova.



**Slika 22.** Utjecaj primijenjenog napona na vrijeme migracije (■) i površinu pika (●) gemcitabina (50 µg/ml).

*Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 9,1-9,3, 50 mM SDS, 10-20 kV, 25 °C, valna duljina detekcije: 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.*

## 5. ZAKLJUČAK

Zbog sve strožih zahtjeva i regulative za kvalitetom lijekova te uz sve brži razvoj analitičkih tehnika, postoji potreba za razvojem što bržih, osjetljivijih, jednostavnijih, jeftinijih i ekološki prihvatljivijih metoda za istovremenu identifikaciju i određivanje sadržaja ljekovite supstancije i njezinih onečišćenja.

Analiza gemcitabina i njegovog onečišćenja citozina vršena je u kapilari duljine 35 cm (27 cm do detektora) i unutrašnjeg promjera 50  $\mu\text{m}$  te pri temperaturi od 25 °C, a detekcija je vršena primjenom detektora s nizom dioda na valnoj duljini 275 nm. Tijekom razvoja nove metode ispitane su različite vrste radnih pufera: boratni (pH 9,3), fosfatni (pH 7,0) i acetatni (pH 3,0).

Optimalnim puferom pokazao se fosfatni pufer (pH 7,0), dok je bolje razdvajanje i oblik pikova postignuto dodatkom veće koncentracije SDS-a. Kao optimalna koncentracija izabrana je 50 mM, jer kod viših je vrijednosti u ispitivanim uvjetima dolazi do Jouleova zagrijavanja. Tijekom optimizacije metode također je ispitan i utjecaj napona na vrijeme analize, kao i na razlučivanje između analita. Pokazalo se da je kod napona od 10 kV postignuto bolje razdvajanje gemcitabina i citozina. Smanjenjem napona površina se pikova povećava, čime je osjetljivost metode veća. Međutim, primjenom nižeg napona produljuje se vrijeme putovanja analita kroz kapilaru pa je potrebno voditi računa o tome da se postigne dobro razlučivanje, ali uz što je moguće kraće vrijeme analize. Gledajući općenito, to je još uvijek relativno kratko vrijeme migracije pa odlučujući faktor u razvoju metode nije vrijeme analize, već oblik pika i razlučivanje.

Razvoj ove MEKC metode pokazao je veću kompleksnost parametara tehnike kapilarne elektroforeze koje je potrebno optimizirati u odnosu na HPLC tehniku kako bi se postiglo razdvajanje analita. Predlaže se daljnji razvoj metode optimizacijom uvjeta analize kako bi se postiglo prikladno razlučivanje pikova gemcitabina i citozina te odgovarajući oblik i simetrija oba pika uz što kraće vrijeme analize. U nastavku optimizacije uvjeta potrebno je izabrati optimalnu koncentraciju fosfatnog pufera i SDS-a pri kojoj će se uz modifikaciju ostalih neispitanih parametara metoda biti najučinkovitija. Kao sljedeći korak stoga se predlaže ispitivanje utjecaja organskih otapala na odjeljivanje analita.

## 6. LITERATURA

Antimetabolite. Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health, 7th Edition, 2003., Medical Dictionary, <http://thefreedictionary.com>, pristupljeno: 15.3.2017.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija, 6. englesko izdanje. Zagreb, Školska knjiga, 2013, str. 718.

Capillary electrophoresis, 2015., <https://chem.libretexts.org>, pristupljeno 21.03.2017.

Cerqueira NMFS, Fernandes PA, Ramos MJ. Understanding Ribonucleotide Reductase Inactivation by Gemcitabine. *Chem Eur J*, 2007, 13(30), 8507-8515.

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

European Pharmacopoeia 8.0 edition. Strasbourg, Council of Europe, 2013, str. 79-84.

European Pharmacopoeia 8.3 edition. Strasbourg, Council of Europe, 2015, str. 2324-2325.

Francetić, I i sur. Farmakoterapijski priručnik, 7. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 491.-496.

Gemcitabine, 2017., <https://www.drugbank.ca>, pristupljeno 08.05.2017.

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), str. 1-8.

Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 1991, 51, 6110.-6117.

Huang P, Plunkett W. Induction of apoptosis by gemcitabine. *Semin Oncol*, 1995, 22 (4 Suppl 11), str. 19-25.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija, 11. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 947-948.

Lauer HH, Rozing GP. High performance capillary electrophoresis: A Primer. Germany, Agilent Technologies, 2014.

Li, SFY. Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications. Amsterdam, Elsevier, 1992, str. 24-25.

Nigović B. Kapilarna elektroforeza. U: Analitika lijekova. Zagreb, 2014.

Pereira S, Fernandes PA, Ramos MJ. Mechanism for ribonucleotide reductase inactivation by the anticancer drug gemcitabine. *J Comput Chem*, 2004, 25(10), str. 1286-1294.

Plunkett W, Huang P, Gandhi V. Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anti-cancer Drugs*, 1995, 6 (6), 7-13.

Pravastatin, 2017., <https://www.drugbank.ca>, pristupljeno 11.05.2017.

Sažetak opisa svojstava lijeka Gemcitabin Sandoz (gemcitabin), 2017., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 13.3.2017.

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

Singh R, Shakya AK, Naik R, Shalan N. Stability-indicating HPLC determination of gemcitabine in pharmaceutical formulations. *Int J Anal Chem*, 2015, 2015, str. 1-12.

Terabe S. Micellar Electrokinetic Chromatography. Hyogo, Beckman, 1992, str. 1-5.

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

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

Gemcitabin, 2',2'-difluoro-2'-deoksicitidin, antimetabolit pirimidina, je antineoplastični lijek koji se koristi u liječenju brojnih uznapredovalih ili metastatskih karcinoma kao monoterapija ili u kombinaciji s drugim citostaticima, ovisno o indikaciji.

Cilj je ovog istraživanja bio razviti novu, brzu, jednostavnu i ekološki prihvatljivu kapilarnoelektroforetsku metodu za istovremenu analizu gemcitabina i njegovog onečišćenja cizotina. Kao prikladna tehnika odabrana je kapilarna elektroforeza kao "zeleni" alternativa već razvijenoj HPLC metodi za određivanje sadržaja gemcitabina i određivanje onečišćenja uvrštenoj u 8. izdanje Europske farmakopeje.

Analiza je vršena u kapilari duljine 35 cm (27 cm) pri temperaturi od 25 °C, na valnoj duljini detekcije od 275 i 237 nm. Tijekom razvoja nove metode ispitane su različite vrste radnih pufera: boratni (pH 9,3), fosfatni (pH 7,0) i acetatni (pH 3,0). Na temelju rezultata eksperimenata najboljim puferom pokazao se fosfatni pufer (pH 7,0), dok je bolje razdvajanje i oblik pikova postignut dodatkom veće koncentracije SDS-a. Optimalnim se pokazala 50 mM koncentracija SDS-a. Ispitan je i utjecaj napona na vrijeme analize te razlučivanje između analita. Kod napona od 10 kV postignuto je bolje razdvajanje gemcitabina i citozina. Međutim, primjenom nižeg napona produkuje se vrijeme putovanja analita kroz kapilaru pa je potrebno voditi računa o tome da je razlučivanje između analita što bolje, no istovremeno uz što kraće vrijeme analize.

Predlaže se daljnja optimizacija metode kako bi se postiglo prikladno razlučivanje pikova te njihov odgovarajući oblik i simetrija uz što kraće vrijeme analize.

Gemcitabine, 2', 2'-difluoro-2'-deoxycytidine, pyrimidine antimetabolite, is an antineoplastic drug used to treat many advanced or metastatic cancers as monotherapy or in combination with other cytostatics, depending on the indication.

The aim of this study was to develop a new, fast, simple and environmentally friendly capillary electrophoretic method for simultaneous identification and determination of gemcitabine and its impurity cytosine. Capillary electrophoresis was chosen as a suitable "green" alternative to an already developed HPLC method for the determination of gemcitabine and its impurities included in the 8th edition of European Pharmacopoeia.

The analysis was carried out in 35 cm (27 cm) capillary at a temperature of 25 ° C and detection was at 275 i 237 nm. Three different buffers were studied while developing the method: borate (pH 9.3), phosphate (pH 7.0) and acetate (pH 3.0). Based on the experimental results, best buffer was shown to be the phosphate buffer (pH 7.0), while a better separation and peak shape were achieved by adding a higher concentration of SDS. 50 mM SDS was chosen as the optimal concentration. The effect of voltage on the analysis time and resolution between the analytes was investigated. It has been shown that a better separation of gemcitabine and cytosine was achieved at 10 kV. However, applying a lower voltage is prolonging the migration time of the analytes through the capillary. Therefore, it is necessary to take into account that a good resolution is achieved but that the analysis time is not too long.

Further method optimization is required to achieve the appropriate peak separation, shape and symmetry with as short analysis time as possible.

## 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

### RAZVOJ KAPILARNOELEKTROFORESKE METODE ZA ISTOVREMENO ODREĐIVANJE GEMCITABINA I NJEGOVOG ONEČIŠĆENJA

Marija Hranilović

#### SAŽETAK

Gemcitabin, 2',2'-difluoro-2'-deoksicitidin, antimetabolit pirimidina, je antineoplastični lijek koji se koristi u liječenju brojnih uznapredovalih ili metastatskih karcinoma kao monoterapija ili u kombinaciji s drugim citostaticima, ovisno o indikaciji.

Cilj je ovog istraživanja bio razviti novu, brzu, jednostavnu i ekološki prihvatljivu kapilarnoelektroforetsku metodu za istovremenu analizu gemcitabina i njegovog onečišćenja cizotina. Kao prikladna tehnika odabrana je kapilarna elektroforeza kao "zelena" alternativa već razvijenoj HPLC metodi za određivanje sadržaja gemcitabina i određivanje onečišćenja uvrštenoj u 8. izdanje Europske farmakopeje.

Analiza je vršena u kapilari duljine 35 cm (27 cm) pri temperaturi od 25 °C, na valnoj duljini detekcije od 275 i 237 nm. Tijekom razvoja nove metode ispitane su različite vrste radnih pufera: boratni (pH 9,3), fosfatni (pH 7,0) i acetatni (pH 3,0). Na temelju rezultata eksperimenata najbolji puferom pokazao se fosfatni pufer (pH 7,0), dok je bolje razdvajanje i oblik pikova postignut dodatkom veće koncentracije SDS-a. Optimalnim se pokazala 50 mM koncentracija SDS-a. Ispitan je i utjecaj napona na vrijeme analize te razlučivanje između analita. Kod napona od 10 kV postignuto je bolje razdvajanje gemcitabina i citozina. Međutim, primjenom nižeg napona produljuje se vrijeme putovanja analita kroz kapilaru pa je potrebno voditi računa o tome da je razlučivanje između analita što bolje, no istovremeno uz što kraće vrijeme analize.

Predlaže se daljnja optimizacija metode kako bi se postiglo prikladno razlučivanje pikova te njihov odgovarajući oblik i simetrija uz što kraće vrijeme analize.

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

Rad sadrži: 35 stranica, 22 grafičkih prikaza, 2 tablice i 24 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: gemcitabin, onečišćenja u lijekovima, kapilarna elektroforeza, micelarna elektrokinetička kromatografija

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. Zrinka Rajić Džolić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2017.



## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### DEVELOPMENT OF A CAPILLARY ELECTROPHORETIC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF GEMCITABINE AND ITS IMPURITY

**Marija Hranilović**

#### SUMMARY

Gemcitabine, 2', 2'-difluoro-2'-deoxycytidine, pyrimidine antimetabolite, is an antineoplastic drug used to treat many advanced or metastatic cancers as monotherapy or in combination with other cytostatics, depending on the indication.

The aim of this study was to develop a new, fast, simple and environmentally friendly capillary electrophoretic method for simultaneous identification and determination of gemcitabine and its impurity cytosine. Capillary electrophoresis was chosen as a suitable "green" alternative to an already developed HPLC method for the determination of gemcitabine and its impurities included in the 8th edition of European Pharmacopoeia.

The analysis was carried out in 35 cm (27 cm) capillary at a temperature of 25 ° C and detection was at 275 i 237 nm. Three different buffers were studied while developing the method: borate (pH 9.3), phosphate (pH 7.0) and acetate (pH 3.0). Based on the experimental results, best buffer was shown to be the phosphate buffer (pH 7.0), while a better separation and peak shape were achieved by adding a higher concentration of SDS. 50 mM SDS was chosen as the optimal concentration. The effect of voltage on the analysis time and resolution between the analytes was investigated. It has been shown that a better separation of gemcitabine and cytosine was achieved at 10 kV. However, applying a lower voltage is prolonging the migration time of the analytes through the capillary. Therefore, it is necessary to take into account that a good resolution is achieved but that the analysis time is not too long.

Further method optimization is required to achieve the appropriate peak separation, shape and symmetry with as short analysis time as possible.

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

Thesis includes: 35 pages, 22 figures, 2 tables and 24 references. Original is in Croatian language.

Keywords: gemcitabine, drug impurities, capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography

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  
**Zrinka Rajić Džolić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2017