

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Natan Koraj

**Razvoj kromatografske metode i optimizacija pripreme
biološkog uzorka kao preduvjet terapijskom praćenju
lijekova za rak dojke**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

Rad je financiran sredstvima projekta UIP-2019-04-8461 Hrvatske zaklade za znanost.



KRATICE

ACN	acetonitril
CDK	ciklin-ovisna kinaza (engl. <i>cyclin-dependent kinase</i>)
CLF	kloroform (engl. <i>chloroform</i>)
DAD	detektor niza dioda (engl. <i>diode array detector</i>)
DCM	diklormetan (engl. <i>dichloromethane</i>)
DLLME	disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće (engl. <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
ER	estrogenski receptor (engl. <i>estrogene receptor</i>)
FLD	detektor fluorescencije (engl. <i>fluorescence detector</i>)
HER2	receptor epidermalnog faktora rasta 2 (engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HR	hormonski receptor (engl. <i>hormone receptor</i>)
LLE	ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. <i>liquid-liquid extraction</i>)
LOD	granica detekcije (engl. <i>limit of detection</i>)
LOQ	granica određivanja (engl. <i>limit of quantification</i>)
MeOH	metanol
MS	maseni spektrometar
PPT	proteinska precipitacija (engl. <i>protein precipitation</i>)
RPM	okretaji u minuti (engl. <i>revolutions per minute</i>)
SA-DLLME	disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće potpomognuta korištenjem soli (engl. <i>salt-assisted dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>solid phase extraction</i>)
TBME	terc-butilmetileter

TDM	terapijsko praćenje lijekova (engl. <i>therapeutic drug monitoring</i>)
UA-DLLME	disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće potpomognuta soniciranjem (engl. <i>ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
UV-Vis	ultraljubičasto-vidljivo područje elektromagnetskog zračenja (engl. <i>ultraviolet-visible</i>)
V_d	volumen disperzivnog sredstva
V_e	volumen ekstrakcijskog sredstva
V_u	volumen uzorka

SADRŽAJ RADA

1	UVOD	1
1.1	Rak dojke	2
1.1.1	Podjela raka dojke kao polazište za terapiju	2
1.1.2	Ribociklib, anastrozol i letrozol u terapiji raka dojke	4
1.2	Terapijsko praćenje lijekova u svrhu unaprjeđenja terapije raka dojke	6
1.3	Bioanalitika – preduvjet za uspješno terapijsko praćenje lijekova	7
1.3.1	Moderne tehnike pripreme uzorka	8
1.4	Pregled postojećih bioanalitičkih metoda	9
1.4.1	Uvjeti razdvajanja i detekcije odabranih lijekova iz znanstvene literature	10
1.4.2	Priprema bioloških uzoraka s odabranim lijekovima iz znanstvene literature ...	11
1.4.3	Primjena disperzivne mikroekstrakcije u pripremi bioloških uzoraka	12
2	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	14
3	MATERIJALI I METODE	16
3.1	Materijali	17
3.1.1	Kemikalije	17
3.1.2	Radni instrumenti i pribor	17
3.1.3	Programski paketi	18
3.2	Metode	18
3.2.1	Uvjeti metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	18
3.2.2	Priprema otopina	19
3.2.3	Sakupljanje i obrada plazme	20
3.2.4	Precipitacija proteina iz uzorka plazme	21
3.2.5	Postupak disperzivne mikroekstrakcije u ispitivanju polazišnih uvjeta	21
3.2.6	Postupci disperzivne mikroekstrakcije u ispitivanju pomoćnih uvjeta	22
3.2.7	Postupci disperzivne mikroekstrakcije u određivanju graničnih uvjeta	23
3.2.8	Postupci disperzivne mikroekstrakcije iz plazme u optimizaciji	24

4	REZULTATI.....	26
4.1	Parametri metode tekućinske kromatografije	27
4.2	Optimalno sredstvo za precipitaciju proteina	28
4.3	Polazišni uvjeti disperzivne mikroekstrakcije	29
4.4	Pomoćni uvjeti u disperzivnoj mikroekstrakciji	29
4.5	Granične vrijednosti uvjeta disperzivne mikroekstrakcije	31
4.6	Optimalni uvjeti disperzivne mikroekstrakcije.....	33
5	RASPRAVA	35
5.1	Određivanje uvjeta kromatografske analize	36
5.1.1	Postavljanje detekcije analita	36
5.1.2	Razvoj metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosit	37
5.1.3	Preliminarno ispitivanje linearnosti metode i granica određivanja spojeva.....	40
5.2	Priprema biološkog uzorka.....	42
5.2.1	Ispitivanje optimalnog sredstva taloženja proteina	42
5.2.2	Određivanje polazišnih uvjeta disperzivne mikroekstrakcije.....	43
5.2.3	Pomoćni uvjeti u disperzivnoj mikroekstrakciji.....	46
5.2.4	Ispitivanje graničnih uvjeta disperzivne mikroekstrakcije.....	48
5.2.5	Optimizacija disperzivne mikroekstrakcije	52
6	ZAKLJUČCI.....	56
7	ZAHVALE.....	59
8	POPIS LITERATURE	61
9	SAŽETAK	69
10	SUMMARY	71

1 UVOD

1.1 Rak dojke

Rak je vodeći uzrok smrti u cijelom svijetu s procijenjenih 19,3 milijuna novih slučajeva i gotovo 10 milijuna smrti u 2020. godini. Rak dojke kod žena je u istoj godini prestigao rak pluća kao najčešće dijagnosticirani rak s procijenjenih 2,3 milijuna novih slučajeva, a ujedno je i peti svjetski vodeći uzrok smrtnosti od raka sa 685 tisuća smrti u 2020. godini [1].

Rak dojke je grupa bolesti u kojima stanice tkiva dojke nekontrolirano proliferiraju te uzrokuju nastanak novotvorina. Većinom nastaje u mliječnim žlijezdama ili odvodnim kanalima koji ih povezuju s bradavicama. Uglavnom ne dolazi do pojave simptoma dok je rak u ranom stadiju i najlakše se liječi, zbog čega je bitna rana detekcija redovitom primjenom mamografije. Najčešći pokazatelj je bezbolna kvrga, koja se ponekad može proširiti po limfnim čvorovima. Manje česti simptomi uključuju bol u grudima i trajne promjene poput oticanja, zadebljanja ili crvenila kože, promjene bradavice te iscjedak [2].

1.1.1 Podjela raka dojke kao polazište za terapiju

Budući da je rak dojke vrlo heterogena skupina bolesti koje pokazuju varijabilne histološke i biološke značajke, kliničke ishode i odgovore na intervencije, u terapijske svrhe ne može se promatrati kao jedna bolest, nego postoji potreba za klasifikacijom. Klasifikacija treba omogućiti jednostavno, ponovljivo i klinički značajno razvrstavanje u skupine [3].

Histološka klasifikacija se temelji na morfološkim razlikama tumora te u trenutnoj verziji podržanoj od Svjetske zdravstvene organizacije obuhvaća dvadesetak glavnih tipova i pripadne podtipove invazivnih karcinoma dojke. Uz invazivne karcinome, uključuje i prekursorske lezije, lezije s malim zloćudnim potencijalom, dobroćudne epitelne proliferacije, različite neoplazme i druge tumore dojke [4, 5]. Klasifikacija je svjetski prihvaćena i ponovljiva u svrstavanju, no glavni nedostatak je da 70-80 % raka dojke bude svrstano u jedan od dva najčešća histološka tipa: invazivni karcinom bez posebnog tipa, ranije poznat kao invazivni duktalni karcinom ne drugačije specificirani, ili invazivni lobularni karcinom. Posljedično tome ova klasifikacija ima slabu sposobnost predviđanja odgovora na terapiju i prognoze bolesti, no u slučajevima takozvanih posebnih tipova tumora i u varijantama glavnih tipova, uz poznavanje stadija olakšava pristup terapiji [3, 5]. Stadij tumora ovisi o veličini i tipu tumora te proširenosti

kroz tkiva dojke. Definirani su stadiji od 0 do 4, gdje stadij 0 označava neinvazivne tumore koji se nisu proširili na okolna tkiva od mjesta nastanka. Stadiji od 1 do 3 podrazumijevaju invazivne karcinome, a razlikuju se po veličini i stupnju proširenosti, dok stadij 4 opisuje napredni i metastatski karcinom s proširenjem na druge organe [6].

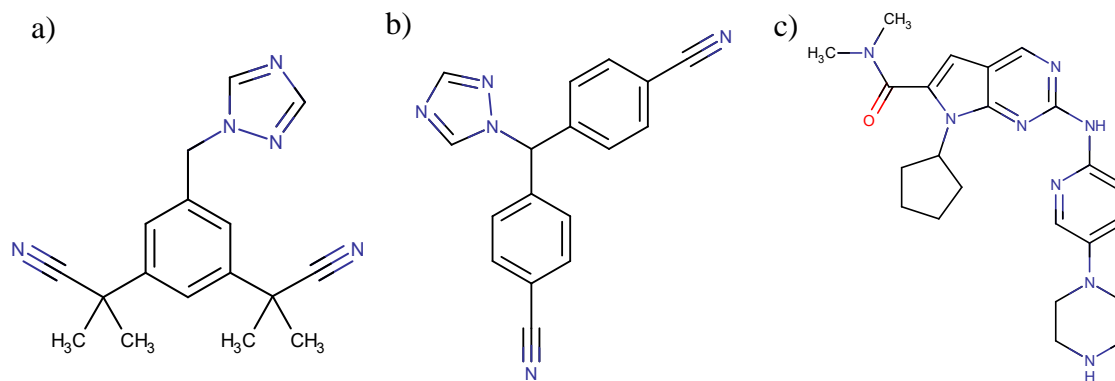
Daljnijim istraživanjima raka dojke otkriveni su biomarkeri koji se mogu koristiti u predviđanju odgovora tumora na terapiju i u postavljanju prognoze bolesti. Dva ključna biomarkera čija se ekspresija na stanicama tumora određuje najčešće imunohistokemijskim metodama su estrogenski receptor, (engl. *estrogen receptor*, ER) i receptor epidermalnog faktora rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2). Ekspresija ER je uspješan pokazatelj odgovora tumora na hormonsku terapiju, tako se pokazalo da primjena hormonske terapije kod ER pozitivnih tumora smanjuje godišnju smrtnost za 31 % u odnosu na ER negativne. Uz ER, značajnu sposobnost predviđanja odgovora na hormonsku terapiju ima i ekspresija progesteronskih receptora, koja je u više od 99 % slučajeva u korelaciji s ekspresijom ER te se zajedno nazivaju hormonski receptori (engl. *hormone receptor*, HR). Povišena ekspresija HER2 u korelaciji je s većom vjerojatnosti relapsa bolesti i kraćim preživljavanjem bolesti. Istovremeno omogućava predviđanje odgovora na terapiju ciljanim protutijelima ili malim molekulama [3, 7]. Prema ekspresiji navedenih biomarkera, rak dojke se može svrstati u tip HER2- s HR+, HER2+ s HR+/HR- ili trostruko negativni tip te ova klasifikacija danas predstavlja glavni predložak za odabir terapije [3, 8].

Prethodna klasifikacija je smisljena velikim dijelom zbog postojanja ciljane terapije. Određivanjem genske ekspresije tumora, rak dojke može se svrstati u molekularno definirane klase diferencirane po ishodu bolesti i staničnom signaliziranju s potencijalom za određivanje ciljane terapije. Do sada su definirane četiri glavne klase: karcinom dojke luminalnog tipa, HER2 pozitivni tip, tip nalik bazalnim stanicama i tip nalik normalnom tkivu dojke. Ove klase ne isključuju nužno prethodnu klasifikaciju te postoje preklapanja između tipova. Na primjer karcinom luminalnog tipa pokazuje sličnosti s ER+ rakom, dok tip nalik bazalnim stanicama pokazuje sličnost s trostruko negativnim tipom. Molekularna klasifikacija nudi mogućnost preciznije stratifikacije, a time i preciznije ciljane terapije, ali zbog nedostatka standardiziranog određivanja klase novih slučajeva raka dojke još uvijek nije česta u kliničkoj primjeni [9, 10].

1.1.2 Ribociklib, anastrozol i letrozol u terapiji raka dojke

U terapiji raka dojke dostupne su raznovrsne opcije, od lokalnih oblika terapije nemetastatskog tumora poput kirurških zahvata i radioterapije pa do sistemskih oblika liječenja metastatskih i nemetastatskih tumora kemoterapijom, hormonskom terapijom i ciljanom terapijom protutijelima. Optimalna sistemska terapija ovisi o podtipu i stadiju tumora. U terapiji nemetastatskih tumora cilj je ukloniti tumor i spriječiti njegovo širenje. Sistemska terapija HR+, HER2- tumora podrazumijeva lijekove s djelovanjem na endokrini sustav, što uključuje antagoniste, selektivne modulatore ER ili inhibitore aromataze, a po potrebi i kemoterapiju. Za liječenje HER2+ tumora kod svih pacijenta se koristi ciljano protutijelo za HER2 ili mala molekula inhibitor tirozin kinaze uz kemoterapiju, a ovisno o HR statusu može se koristiti i hormonska terapija. U terapiji trostruko negativnih tumora lijekovi odabira su tradicionalni citostatici. Kod metastatskih tumora cilj je produljenje života i olakšavanje simptoma bolesti. Terapija odabira je slična terapiji nemetastatskih tumora pa se za HR+, HER2- kao prva linija koristi inhibitor aromataze uz inhibitor ciklin-ovisnih kinaza (engl. *cyclin-dependent kinase*, CDK) 4 i 6. Za HER2+ karcinom se u prvoj liniji koristi HER2 ciljana terapija u kombinaciji s citostatikom, a ovisno o HR statusu i endokrinom terapijom. Trostruko negativni metastatski karcinom se, kao i nemetastatski, liječi kemoterapijom citostaticima. Ovisno o razvoju rezistencije i progresiji bolesti terapiju je potrebno prilagoditi [8].

U proliferaciji stanica ključnu ulogu imaju o ciklinu D ovisne kinaze 4 i 6, koje osiguravaju progresiju stanice kroz stanični ciklus inaktivacijom retinoblastom tumor supresorskog proteina. Kod raka dojke zabilježen je poremećaj u regulaciji ovog staničnog puta pa se stanice neometano dijele, no selektivnom inhibicijom CDK 4 i 6 dolazi do zastoja u staničnom ciklusu [11]. Estrogenski α receptori, pretjerano eksprimirani u HR+ tumorima, reguliraju ekspresiju gena ključnih u staničnoj proliferaciji, što uključuje i gene za ciklin D. Na proliferaciju takvih stanica moguće je utjecati smanjenjem dostupne razine estrogenskih hormona ili antagonističkim djelovanjem na ER. Inhibitori aromataze efektivno smanjuju koncentraciju estradiola i derivata dostupnih u cirkulaciji blokiranjem konverzije androgenih prekursora u estrogene, ali njihova uporaba je ograničena na žene u postmenopauzi. Brojni inhibitori aromataze, uključujući nestereoidne inhibitore anastrozol i letrozol, (Slika 1a i 1b) odobreni su kao prva linija terapije za HR+ rak dojke [12]. Ribociklib, (Slika 1c) inhibitor CDK4/6, je u kombinaciji s inhibitorom aromataze prvi put odobren 2017. godine za terapiju naprednog ili metastatskog HR+, HER2- karcinoma dojka kod žena u postmenopauzi [13].

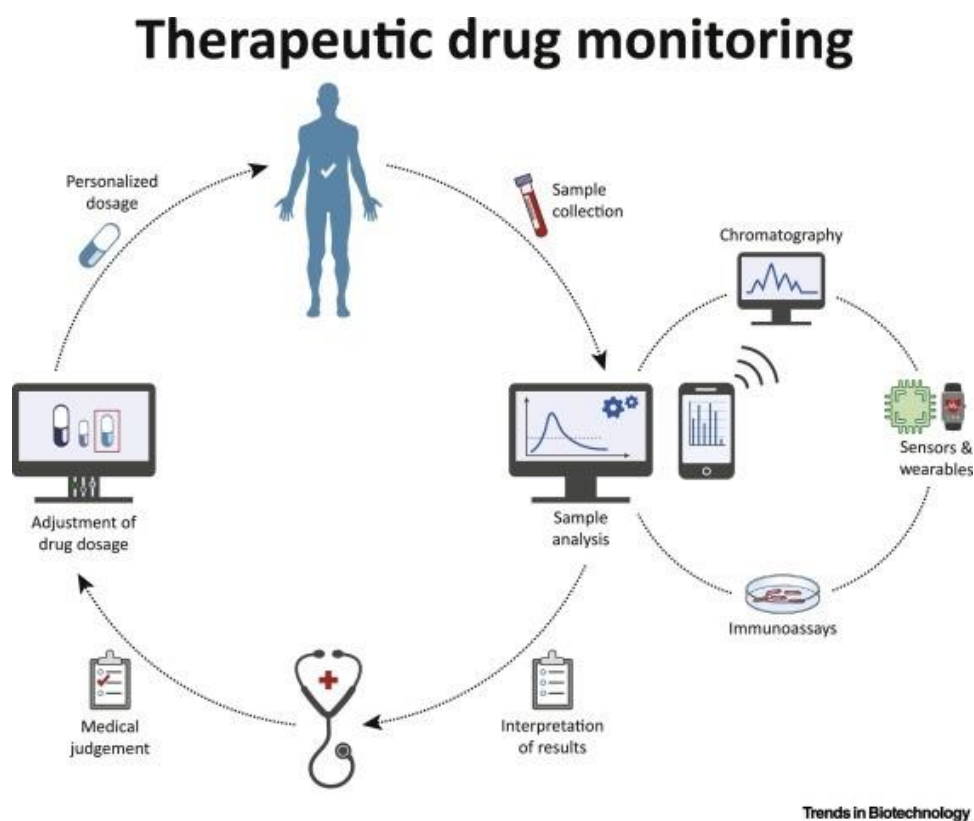


Slika 1. Kemijska struktura a) anastrozola, b) letrozola, c) ribocikliba

Anastrozol i letrozol su prethodno odobreni u monoterapiji ranog odnosno naprednog HR+ raka dojke za žene u postmenopauzi. U kliničkim ispitivanjima pokazuju značajnu prednost u terapiji prema dotadašnjem lijeku odabira, tamoksifenu, uz znatno dulje preživljavanje pacijenata bez progresije bolesti i rekurencije tumora. Oba lijeka su dobro tolerirana, a izazvane nuspojave su tipične za inhibitore aromataze te uključuju mučninu, valove vrućine, iscrpljenost i mišićno koštane poremećaje poput bolova u kostima [14, 15]. Ribociklib je odobren u kombinaciji s letrozolom na temelju rezultata istraživanja „MONALEESA-2“, u kojima pokazuju veliku prednost u odnosu na terapiju placebom i letrozolom. Vjerojatnost za preživljavanje bez progresije nakon 21 mjeseca u grupi tretiranoj ribociklibom bila je tri puta viša od vjerojatnosti u placebo grupi, tj. iznosila je gotovo 60 %. Učinkovitost terapije ribociklibom u kombinaciji s drugom mogućom endokrinom terapijom, poput fulvestranta, tamoksifena, i ostalih nesteroidnih inhibitora aromataze, u različitim stadijima i populacijama HR+ raka dojke ispitivana je u istraživanju „MONALEESA-7“ te su se kombinacije također pokazale boljima od samo endokrine terapije. Rezultati ovih kliničkih ispitivanja pokazuju da liječenjem fiksnom dozom ribocikliba od 600 mg dnevno dolazi do česte pojave ozbiljnih nuspojava. Do nastanka neutropenije dolazi u 63,5 %, hepatotoksičnosti u 11 %, a produljenja QT intervala u 1,8 % pacijenata, dok se kod placebo skupine javljaju redom u 4,5 %, 6,8 % i 1,2 % pacijenata. Smanjenjem doze ili privremenim prekidom terapije kod većine pacijenata dolazi do povlačenja ozbiljnih nuspojava [16, 17].

1.2 Terapijsko praćenje lijekova u svrhu unaprjeđenja terapije raka dojke

Za mnoge lijekove koji se koriste u terapiji tumora utvrđena je povezanost izloženosti lijeku s njegovom učinkovitošću i toksičnošću. Također, kod oralne primjene hormonskih lijekova i inhibitora protein kinaza dokazana je varijabilnost u farmakokinetici između pacijenata, ali se ti lijekovi još uvijek koriste u fiksnim dozama. Posljedično tome postoji veliki rizik poddoziranju i smanjenoj učinkovitosti terapije ili predoziranju i povećanoj toksičnosti. Terapijsko praćenje lijekova (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM), mjerenjem izloženosti pacijenta lijeku, omogućuje optimizaciju terapije za pojedinog pacijenta (Slika 2), [18].



Slika 2. Izloženost pacijenta lijeku najčešće se mjeri određivanjem koncentracije lijeka u plazmi, koja je povezana s njegovom učinkovitošću. Mjerenje se vrši validiranom bioanalitičkom metodom poput kromatografije, imunokemijskih tehnika ili modernih senzora. Potrebna je pravilna interpretacija rezultata u kontekstu zdravstvenog stanja pacijenta na temelju koje se može donijeti odluka o korekciji doze. Nakon prilagodbe doze ponovno se mjeri izloženost i po potrebi korigira doziranje [18].

Anastrozol pokazuje dobru podnošljivost u do deset puta višim ponovljenim dozama od korištene, no pokazano je da niže koncentracije anastrozola u krvi pacijenata značajno slabije utječu na koncentraciju estradiola u krvi. S dnevnom dozom od 1 mg, gotovo 50 % pacijenata će imati koncentraciju anastrozola u krvi nižu od 34,2 ng/mL, za koju postoje indikacije da je granična učinkovita koncentracija. Letrozol pokazuje slično ponašanje s dobrim podnošenjem do 5 mg dnevno, a s korištenom dnevnom dozom od 2,5 mg oko 50 % pacijenata neće postići razinu od 85,6 ng/mL, iznad koje je primijećeno dulje vrijeme bez progresije bolesti [19, 20]. Za ribociklib još uvijek ne postoji određena ciljana koncentracija u krvi za optimalno djelovanje, ali zbog već navedenog poboljšanja profila podnošljivosti smanjenjem doze, razvoj metode za TDM obećava napredak u terapijskim ishodima [21].

1.3 Bioanalitika – preduvjet za uspješno terapijsko praćenje lijekova

Pojam bioanalitika se odnosi na točnu i pouzdanu identifikaciju i određivanje analita poput lijekova, metabolita i biomarkera u složenim biološkim uzorcima kao što su krv, plazma, serum, slina, urin ili ekstrakti organskih tkiva. Analiza bioloških uzoraka je ključna u razvoju novih lijekova u toksikološkim i farmakokinetičkim ispitivanjima, terapijskom praćenju lijekova i forenzici. Na uspješnost bioanalitičke metode utječu svi koraci od uzimanja uzorka, njegove pripreme, kromatografske separacije do detekcije i obrade podataka. Priprema uzorka zahtjevan je i važan dio bioanalitičke metode čiji je cilj ukloniti interferencije matriksa uzorka te poboljšati selektivnost i osjetljivost postupka. Često pripremu uzorka čini velik broj uzastopnih koraka sklonih pogreškama, zbog čega je proces dugotrajan te može uzimati 60-80 % ukupnog vremena analize [22, 23].

Redovito korištene tehnike u pripremi uzorka su taloženje proteina (engl. *protein precipitation*, PPT), ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid extraction*, LLE) i ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, SPE). PPT se ekstenzivno koristi kod izdvajanja proteina iz uzoraka plazme ili krvi u analizi biomolekula, kao i pročišćavanju uzorka od proteina u analizi lijekova te njihovih metabolita brzim kromatografskim tehnikama. Induciranje precipitacije postignuto je dodatkom organskog otapala koje se miješa s vodom, soli, metalnih iona ili promjenom pH uzorka. Glavni nedostatak PPT je slabo pročišćavanje i neselektivnost, no zbog jednostavnosti postupka i brze optimizacije zadržava se u praksi [22, 23].

Danas najraširenija tehnika pripreme uzorka je SPE. Temelji se na različitom afinitetu analita prema tekućoj fazi i čvrstom adsorbensu. Postupak SPE čine četiri koraka: kondicioniranje kolone, nanošenje uzorka, ispiranje nečistoća i elucija analita. Selektivnost ovisi o vrsti korištene stacionarne faze, koja može biti normalna, reverzna ili ionska, u različitim izvedbama od kolona do diskova. Odgovarajuće eluirajuće sredstvo potrebno je za optimalne prinose. SPE omogućava učinkovito pročišćavanje i ukoncentriravanje analita, no potreba za određenom vrstom jednokratnog adsorbensa i uparavanjem organskog otapala te varijabilnost kolona od serije do serije uvelike ograničava metodu. Ipak, mogućnost automatizacije, jednostavnost rukovanja, korištenje manje količine toksičnih otapala i visoki prinosi zasjenjuju nedostatke tehnike [22–24].

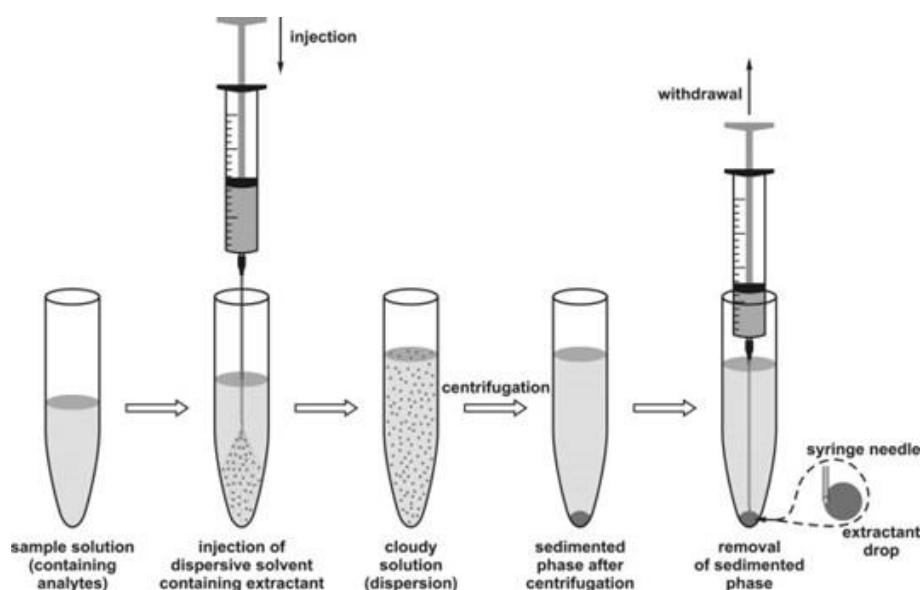
Unatoč napretku u tehnikama pripreme uzorka, LLE je još uvijek široko korištena za ekstrakciju analita iz vodenih i bioloških uzoraka. Miješanjem vodenog uzorka s nemješljivim organskim otapalom dolazi do ekstrakcije analita u organsku fazu. LLE omogućava dobre prinose ekstrakcija, pročišćavanje uzorka i mogućnost ukoncentriravanja analita. Korištenje velikih volumena toksičnih otapala, neprikladnost za ekstrakciju polarnih spojeva i potreba uparavanja otapala ograničavaju ovu tehniku. Kako LLE ne zahtjeva specifičnu opremu i jednostavna je za rukovanje, široko je dostupna [22, 23].

1.3.1 Moderne tehnike pripreme uzorka

Zahtjevi za razvijanje modernih tehnika pripreme uzorka uključuju skraćivanje trajanja postupka i smanjenje broja koraka, smanjenje utroška uzorka i otapala te mogućnost automatizacije i ekološku prihvatljivost. Mikroekstrakcije temeljene na SPE ili LLE, „*on-line*“ priprema i pristupi za povećanje selektivnosti temeljeni na imunokemijskim reakcijama su neke od predloženih alternativa. Nove tehnike zadovoljavaju visoke standarde i rješavaju mane klasičnih tehnika, ali svojom složenosti i potrebom za posebnom opremom doprinose smanjenju pristupačnosti te zahtjevnijem razvoju i optimizaciji [22].

Disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) je moderna tehnika razvijena u 2006. godini. Glavna prednost DLLME u odnosu na LLE je smanjena količina utrošenog ekstrakcijskog sredstva, zbog čega je ekološki prihvatljivija i jeftinija. U DLLME, ekstrakcija se odvija u disperziji organskog otapala u vodenom uzorku, za čiji nastanak je potrebno koristiti dodatno organsko otapalo koje

se miješa s vodom, disperzivno sredstvo. Smjesa ekstrakcijskog i disperzivnog sredstva se brzo injektira u vodenu fazu, što dovodi do nastanka emulzije i brze ekstrakcije analita u organsku fazu. Ekstrakcijsko sredstvo koje sadrži analite se centrifugiranjem odvoji od sloja vodene faze i koristi za analizu (Slika 3). Odabir ekstrakcijskog sredstva, disperzivnog sredstva, pripadni volumeni, prilagodba pH i ostali pomoćni uvjeti trebaju biti optimizirani za učinkovitiju ekstrakciju pojedinih analita. Od pomoćnih uvjeta dodatak soli povećava ionsku jakost otapala i time smanjuje topljivost analita u vodenoj fazi uz dodatni učinak istiskivanja organskog otapala. Korištenje ultrazvučne kupelji pomaže u nastanku sitnih kapljica organske faze čime se povećava površina dodira između faza, a time i učinkovitost ekstrakcije [25].



Slika 3. Shematski prikaz izvedbe DLLME [25].

1.4 Pregled postojećih bioanalitičkih metoda

U vrijeme pretraživanja literature postoji tek jedna predložena bioanalitička metoda za simultano određivanje ribocikliba, anastrozola i letrozola u krvnoj plazmi. Metoda uključuje i druge lijekove te razdvajanje navedenih lijekova nije potpuno, a obrada plazme je provedena samo najjednostavnijom i najmanje selektivnom tehnikom – PPT [26]. Kako bi razvoj bioanalitičke metode za lijekove od interesa analite bio olakšan, iz objavljenih znanstvenih radova proučeni su uvjeti kromatografskih metoda te primijenjene tehnike pripreme bioloških uzoraka.

1.4.1 Uvjeti razdvajanja i detekcije odabranih lijekova iz znanstvene literature

Budući da postoji ograničen broj dostupnih metoda za određivanje ribocikliba, anastrozola i letrozola u krvnoj plazmi, metode koje još sadržavaju relevantne podatke za kromatografske uvjete su one koje uključuju barem parove analita. Posocco i suradnici su opisali metodu za određivanje ribocikliba, palbocikliba i letrozola u ljudskoj plazmi u kojoj su koristili kolonu sa stacionarnom fazom C18 termostatiranu na 50 °C, te su gradijentnom eluacijom s dva otapala razdvajali analite [27]. Kao vodena sastavnica mobilne faze korištena je 0,1 %-tna vodena otopina octene kiseline, a organsku sastavnicu je činila smjesa metanola i izopropanola u volumnim omjerima 9:1. Simultanoj analizi anastrozola i letrozola u nekoliko radova zajednička je primjena kolone C18 stacionarne faze i gradijentne eluacije, no korištene su različite mobilne faze. U jednom slučaju vodenu sastavnicu mobilne faze čini 0,05 % heptafluoromaslačne kiseline, dok organsku sastavnicu čini aceton. U drugom slučaju je u vodenoj sastavnici korišten fosfatni pufer, dok je organska sastavnica acetonitril. Locatelli i suradnici dodatno ističu kako pokušaji izokratične eluacije nisu donosili zadovoljavajuće rezultate [28, 29]. U metodi koja uključuje sve lijekove od interesa, razdvajanje je provedeno na C18 stacionarnoj fazi uz gradijentnu eluciju mobilnom fazom koju čini 20 mM amonijevog formijata u vodi i 20 mM amonijevog formijata u metanolu, a pH je podešen na 3,6 [26]. U analizama pojedinačnih analita ili u kombinaciji sa spojevima koji nisu od interesa također je primijećen trend korištenja C18 kolone uz metanol ili acetonitril kao najčešće organske sastavnice mobilne faze i korištenje gradijentne eluacije [27, 30–35]. U nekim slučajevima korištene su kolone modificirane amidnom ili cijano skupinom [36, 37].

U većini analiza provedenih na ljudskoj plazmi glavna tehnika detekcije je masena spektrometrija zbog ograničene osjetljivosti ultraljubičasto-vidljivo (engl. *ultraviolet-visible*, UV-Vis) detektora. Zarghi i suradnici objavljuju metodu određivanja letrozola u plazmi detekcijom fluorescencije (engl. *fluorescence detector*, FLD), s ekscitacijom na valnoj duljini od 230 nm, a emisijom na valnoj duljini od 295 nm [34]. Anastrozol je u plazmi detektiran i na detektoru niza dioda (engl. *diode array detector*, DAD) na valnoj duljini od 217 nm, a letrozol na valnim duljinama od 240 i 244 nm [28, 38]. UV-Vis detekcija letrozola korištena je i kod određivanja u ljekovitim oblicima na valnoj duljini od 265 nm, a FLD u urinu na ekscitacijskoj valnoj duljini od 230 i emisijskoj od 295 nm [39, 40]. Za određivanje anastrozola u ljekovitim oblicima uglavnom je korišten DAD na valnoj duljini od 215 nm [41, 42].

1.4.2 Priprema bioloških uzoraka s odabranim lijekovima iz znanstvene literature

U pregledanim radovima za pripremu uzorka korištene su tehnike PPT, SPE i LLE bilo na mišjoj, štakorskoj ili ljudskoj plazmi. Uz lijekove od interesa, metode često uključuju i druge lijekove. U nekoliko radova koji uključuju ribociklib PPT je izvršena bez dodatne ekstrakcije, a postignuta je dodatkom acetonitrila (ACN) u volumenu 3-5 puta većem od volumena plazme [36, 43]. ACN kao sredstvo precipitacije je korišten i u manjim volumenima, ukoliko je slijedila daljnja obrada. U obradi uzorka s letrozolom taloženje proteina je dodatno potpomognuto dodatkom natrijevog klorida, dok je u obradi uzorka s anastrozom dodatno izvršena LLE [34, 37]. Kao sredstvo za precipitaciju bez naknadne ekstrakcije u pripremi uzorka s ribociklibom i letrozolom korišten je i metanol (MeOH) u 8 puta većem volumenu od volumena plazme [27]. Uzorak koji sadrži ribociklib, anastrozol i letrozol je obrađen dodatkom 80 μ L smjese ACN i MeOH (9:1, V/V) u 40 μ L uzorka plazme [26]. Ukoliko nije slijedila ekstrakcija, alikvot supernatanta je korišten direktno u analizi.

Podjednako često korištena je SPE, no objavljena je i jedna modifikacija tehnike. Zajednički uvjeti u SPE su kondicioniranje kolone metanolom i vodom, ispiranje nečistoća vodom i elucija analita metanolom. Korištene su različite čvrste faze adsorbensa uključujući C18 i hidrofilno-lipofilno balansirane modifikacije u obradi uzoraka s ribociklibom. Kod obrade plazme koja sadrži anastrozol i letrozol čvrsta faza sadrži kationske modifikacije [29, 30, 33]. Nakon usporedbe učinkovitosti LLE i SPE tehnike u ekstrakciji ribocikliba, zbog viših ekstrakcijskih prinosa, pripremu uzorka pomoću SPE koriste još Leenardt i suradnici [31]. U kondicioniranju i ispiranju te ekstrakciji koriste već navedena otapala. Ekstrakcija adsorpcijom na vlaknastu fazu kao modifikacija SPE s ciljem poboljšanja tehnike, korištena je na uzorku s anastrozom i letrozolom [28]. Dobiveni ekstrakti su prije analize upareni i otopljeni u otapalu sličnog sastava mobilnoj fazi u kromatografiji.

U nekoliko radova letrozol je ekstrahiran direktno iz plazme tehnikom LLE. U ekstrakcijama je korišteno 2-3 mL organskog otapala terc-butil metil etera (TBME), što je 10-20 puta veći volumen od volumena plazme korištenog za analizu [32, 38]. Mendes i suradnici u ekstrakciji anastrozola koriste 16 puta veći volumen otapala od početnog uzorka, tj. 4mL smjese dietiletera i dikormetana [44]. Radi dodatnog pročišćavanja kombinirana je PPT s LLE, gdje je u ekstrakciji anastrozola korišten nešto manji volumen TBME [37]. U svim LLE, ekstrakt je uparen i otopljen u otapalu sastava sličnog sastavu odgovarajuće mobilne faze u kromatografiji.

Tehnike pripreme plazme u literaturi za odabrane lijekove su raznovrsne što upućuje na njihovu podjednaku prikladnost u pročišćavanju plazme i kompatibilnost sa spojevima od interesa.

1.4.3 Primjena disperzivne mikroekstrakcije u pripremi bioloških uzoraka

DLLME pruža odlične rezultate u ekstrakcijama spojeva različitih svojstava iz vodenih uzoraka i kompatibilna je s tekućinskom i plinskom kromatografijom uz detekciju pomoću masene spektroskopije, detekciju plamenom ionizacijom, DAD, FLD i drugim detektorima. U pregledima radova s početka prošlog desetljeća opisana je primjena DLLME uglavnom na vodenim uzorcima poput vodovodne vode, vode iz rijeka, otpadnih voda i tek nekolicina na biološkim uzorcima. Ekstrakcije su izvedene injektiranjem organske smjese u vodeni uzorak, a najčešće korištena disperzivna sredstva su aceton, acetonitril i metanol u volumenima od 85 μL do 10 mL. Kao ekstrakcijska sredstva su većinom korišteni klorirani ugljikovodici (kloroform (engl. *chloroform*, CLF), tetraklormetan, diklormetan (engl. *dichloromethane*, DCM), klorbenzen) ili pak ionske tekućine u volumenima od 15 μL do 600 μL . Zbog slabe prikladnosti DLLME u ekstrakciji iz bioloških uzoraka bilo je potrebno daljnje istraživanje u pripremi uzoraka i mogućnostima tehnike [45, 46].

Do daljnjeg razvoja pa tako i primjene tehnike na biološkim uzorcima dolazi sredinom prošlog desetljeća. Samo letrozol je kao analit od interesa ekstrahiran pomoću DLLME iz plazme. Ekstrakcija je provedena nakon taloženja proteina acetonitrilom u volumenu jednakom volumenu plazme, filtriranja i razrjeđivanja 1 mL filtrata do 10 mL vodom. Smjesa organskih sastavnica korištenih za DLLME se sastojala od 2 mL acetona i 142 μL CLF, a postupak je donosio ekstrakcijske prinose od 87 %. U optimizaciji volumena ekstrakcijskog i disperzivnog sredstva pokazalo se da postoje optimalni volumeni ispod i iznad kojih se učinkovitost ekstrakcije smanjuje. Vrijeme ekstrakcije, tj. vrijeme između injektiranja i centrifugiranja nije pokazalo utjecaj na prinose, kao ni potpomognuta ekstrakcija isoljavanjem [47]. Sličan postupak je opisan u određivanju melatonina iz plazme. Plazma je filtrirana i razrijeđena 10 puta kako bi se smanjio utjecaj matriksa, no PPT nije provedena. Iz 10 mL takvog uzorka je smjesom od 1,5 mL ACN i 140 μL tetraklormetana ekstrahiran analit postupkom DLLME. Glavni utjecaj na učinkovitost ekstrakcije imali su ekstrakcijsko sredstvo, zatim disperzivno

sredstvo i pH polazne otopine. Isoljavanje, vrijeme ekstrakcije i vrijeme centrifugiranja nisu pokazali učinak na učinkovitost ekstrakcije [48].

Opisane su i drugačije izvedbe DLLME na biološkim uzorcima i jedan takav primjer pruža ekstrakcija gliflozina iz plazme. U 500 μ L plazme obogaćene standardima dodan je 1 mL MeOH za precipitaciju, uzorak je zatim centrifugiran, 500 μ L supernatanta je razrijeđeno do 5 mL vodom, a DLLME je izveden injektiranjem 100 μ L 1-dodekanola direktno u smjesu. Metanol već dodan u uzorak služi kao disperzivno sredstvo, a nastanak disperzije potpomognut je soniciranjem smjese 1 minutu (engl. *ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction*, UA-DLLME) [49]. Fernandez i suradnici razvili su čak tri metode bazirane na modificiranoj izvedbi DLLME [50–52]. U alikvot supernatanta koji nastaje nakon PPT plazme direktno su dodali ekstrakcijsko sredstvo, a taložni agens dodan je u suvišku pa ujedno služi i kao disperzivno sredstvo. Dobivena homogena smjesa je zatim injektirana u vodu uz primjenu potpomognute ekstrakcije prilagodbom pH, izoljavanjem ili korištenjem ultrazvučne kupelji, nakon čega je organski sloj odvojen. Ekstrakciju benzodiazepina vršili su dodatkom 2 mL MeOH u 500 μ L plazme, zatim su supernatantu dobivenom nakon centrifugiranja dodali 250 μ L CLF te homogenu smjesu injektirali u 4,5 mL vode pH 9 koja sadrži 0,2 g natrijevog klorida za poboljšanu ekstrakciju izoljavanjem. Smjesa je sonicirana 2 minute, a nakon centrifugiranja organski sloj je odvojen. Proteine iz uzorka sa šest različitih antidepresiva taložili su s 2,5 mL ACN, dodali 200 μ L CLF supernatantu i smjesu injektirali u 4,5 mL vode pH 9. Ekstrakcija je potpomognuta soniciranjem 3 minute. Naglašeno je da dulje vrijeme soniciranja smanjuje prinose. Također su ekstrahirali droge zlouporabe jednakom izvedbom uz izmijenjene uvjete kako bi postigli optimalne ekstrakcijske prinose analita.

U literaturi se još javlja disperzivna ekstrakcija uz korištenje soli umjesto organskog otapala kao disperzivno sredstvo (engl. *salt-assisted dispersive liquid-liquid microextraction*, SA-DLLME) [53–55]. SA-DLLME je korištena u određivanju spojeva iz složenih bioloških uzoraka, no u ovom slučaju analiti su ekstrahirani iz uzoraka hrane. Kako su razne izvedbe DLLME primjerene za obradu krvne plazme, vrijedno je ispitati i ovakvu izvedbu.

Prikazani primjeri pokazuju raznovrsnost izvedbi DLLME u pripremi uzorka krvne plazme te mogu poslužiti kao polazište u razvoju tehnike za ekstrakciju lijekova od interesa. Vidljivo je da je ključno smanjiti utjecaj matriksa uklanjanjem proteina ili razrjeđivanjem uzorka prije početka DLLME, dok se optimizacija bazira na odabiru ekstrakcijskog i disperzivnog sredstva, pripadnih volumena, podešavanju pH te pomoćnim uvjetima – vrsti i količini soli u izoljavanju te trajanju soniciranja.

2 OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Zbog česte pojavnosti i visokih stopa smrtnosti izražena je potreba za novim rješenjima u optimizaciji terapije raka dojke. Terapijsko praćenje lijekova omogućava poboljšanje ishoda već postojećih režima liječenja osiguravajući adekvatnu izloženost lijeku. Uz bolju učinkovitost, također se smanjuju toksičnost i incidencija nuspojava, posebice pazeći na maksimalnu dozu lijekova uske terapijske širine.

Ribociklib je novi lijek, inhibitor o ciklinu ovisnih kinaza 4 i 6, odobren u kombinaciji s inhibitorom aromataze, anastrozom ili letrozolom, za ciljanu terapiju metastatskog HR+, HER2- raka dojke. Ovi lijekovi su zbog ovisnosti profila nuspojava i učinkovitosti o dozi te varijabilnosti u bioraspoloživosti prikladni kandidati za terapijsko praćenje. Razvoj pristupačne bioanalitičke metode za njihovo istovremeno određivanje u krvnoj plazmi poslužio bi kao temelj za terapijsko praćenje, što bi rezultiralo prikladnijom personaliziranom terapijom.

Opći ciljevi ovog rada uključuju postavljanje temelja za razvoj osjetljive, selektivne, precizne i točne bioanalitičke metode kao osnove za terapijsko praćenje i unaprjeđenje terapije metastatskog HR+, HER2- raka dojke ribociklibom u kombinaciji s anastrozom ili letrozolom.

Specifične ciljeve ovog rada pak čini razvoj HPLC metode koja omogućuje adekvatno razdvajanje navedenih lijekova i njihovo određivanje te pripreme biološkog uzorka krvne plazme kako bi analiza bila ponovljiva i pouzdana. U svrhu pripreme uzorka krvne plazme bit će ispitana obrada uzorka precipitacijom proteina, a radi dodatnog pročišćavanja i postupkom DLLME. Stoga će se istražiti:

1. Optimalna izvedba precipitacije proteina, što uključuje određivanje optimalnog sredstva i potrebnu količinu za zadovoljavajuće taloženje proteina.
2. Prikladan način izvedbe DLLME za primjenu na biološkom uzorku, najprikladnije ekstrakcijsko i disperzivno sredstvo te njihovi volumeni.
3. Utjecaj pomoćnih uvjeta poput prilagodbe pH, isoljavanja i soniciranja na ekstrakcijske prinose u simultanoj ekstrakciji lijekova od interesa.
4. Optimizacija uvjeta DLLME u istovremenoj ekstrakciji navedenih lijekova za primjenu na maloj količini biološkog uzorka s korištenom minimalnom količinom organskih otapala.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

- Acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju – J.T. Baker
- Amonij sulfat – Kemika
- Boratni pufer 50 mM – Agilent technologies
- Diklormetan – T.T.T.
- Kloroform – Carlo Erba
- Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju – J.T. Baker
- Mravlja kiselina – Kemika
- Natrij citrat – Galenski laboratorij Gradske ljekarne Zagreb
- Natrijev klorid – Merck
- Perklorna kiselina – Fluka
- Standard anastrozol – Tokyo Research Chemicals
- Standard letrozol – Tokyo Research Chemicals
- Standard ribociklib – BioVision

3.1.2 Radni instrumenti i pribor

- Analitička vaga AG245 – Mettler Toledo
- Bočice za uzorkovanje – Agilent Technologies
- Centrifuga – IKA mini G
- Kromatografska kolona Phenomenex Kinetex Biphenyl (150x4,6 mm, 2,6 µm)
- Kromatografska kolona Waters XBridge C18 (150x4,6 mm, 3,5 µm)
- Kromatografska kolona Waters XBridge Phenyl (150x4,6 mm, 3,5 µm)
- Mikropipete – Rainin pipet lite
- Nastavci za mikropipete – Rainin
- Plastične epruvete – Eppendorf
- Sustav za pročišćavanje vode Waterpro – Labonco
- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti spregnut s detektorom niza dioda i fluorescencijskim detektorom – Agilent 1100 Series – Agilent Technologies
- Ultrazvučna kupelj – Elma xtra TT Elmasonic
- Uparivač – Eppendorf Concentrator Plus

- Vorteks – IKA vortex 2

3.1.3 Programski paketi

- Programski paket za obradu podataka ChemStation for LC 3D – Agilent Technologies
- Računalni program Microsoft Office 365 Excel – Microsoft
- Računalni program Microsoft Office 365 Word – Microsoft

3.2 Metode

3.2.1 Uvjeti metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

U kromatografskoj analizi korištene su kolone Phenomenex Kinetex Biphenyl (150x4,6 mm, 2,6 μm) i Waters XBridge Phenyl (150x4,6 mm, 3,5 μm), termostahirane na 25°C. U analizi na Phenomenex Kinetex Biphenyl koloni mobilna faza se sastoji od 0,1 % (V/V) mravlje kiseline u vodi čistoće za tekućinsku kromatografiju (otapalo A) i 0,1 % (V/V) mravlje kiseline u ACN čistoće za tekućinsku kromatografiju (otapalo B). Korištena je gradijentna elucija opisana u Tablici 1. Ova metoda je metoda odabira i prijedlog za daljnju uporabu. Prihvatljivo razdvajanje dobiveno je i na Waters XBridge Phenyl koloni s pokretnom fazom koja se sastoji od 0,1 % (V/V) mravlje kiseline u vodi čistoće za tekućinsku kromatografiju (otapalo A) i 0,1 % (V/V) mravlje kiseline u MeOH čistoće za tekućinsku kromatografiju (otapalo C). Korištena je gradijentna elucija opisana u Tablici 2, ali zbog dugotrajnosti analize nije primarna metoda analize.

Tablica 1. Uvjeti gradijentne elucije za metodu na Phenomenex Kinetex Biphenyl koloni

t (min)	ϕA (%)	ϕB (%)
0	85	15
0-8,5	85→0	15→100
8,5	0	100

Tablica 2. Uvjeti gradijentne elucije za metodu na Waters XBridge Phenyl koloni

t (min)	φA (%)	φC (%)
0	70	30
0-15	70→0	30→100
15	0	100

Protok mobilne faze kroz kolonu u obje metode iznosi 0,5 mL/min, a za analizu je injektirano po 10 µL uzorka. Određivanje i detekcija analita su provedeni pomoću DAD postavljenog na valne duljine od 210, 270 i 360 nm te FLD uz ekscitacijsku valnu duljinu od 210 nm i emisijsku valnu duljinu od 310 nm.

3.2.2 Priprema otopina

3.2.2.1 Izrada matičnih otopine standarda

Po 10 mg standarda ribocikliba, anastrozola i letrozola otopljeno je u metanolu čistoće za tekućinsku kromatografiju, na sobnoj temperaturi, u tikvici od 10 mL, tako da konačna koncentracija iznosi 1 mg/mL. Za potpuno otapanje spojeva tikvice su 5-10 minuta sonicirane u ultrazvučnoj kupelji na temperaturi od 25 °C. Tako pripremljene otopine čuvane su u hladnjaku na 4°C.

3.2.2.2 Priprema radnih otopina standarda

Radne otopine standarda su pripremljene kao pojedini standardi ili smjesa sva tri analita. Otopine standarda odgovarajuće koncentracije (5-200 µg/mL) korištene direktno u analizi za razvoj kromatografske metode dobivene su razrjeđivanjem matičnih otopina u odgovarajućem volumenu vode i metanola do konačnog udjela MeOH od 65 % (V/V).

Radne otopine standarda korištene za obogaćivanje plazme pripremljene su razrjeđivanjem smjese matičnih otopina u 100 % (V/V) MeOH do odgovarajuće koncentracije analita (5-200 µg/mL).

3.2.2.3 Izrada otopina korištenih u obradi uzoraka plazme

a) Otopina natrijevog klorida

Otopina 20 % (w/V) natrijevog klorida pripravljena je otapanjem 2 g soli u 10 mL vode čistoće za tekućinsku kromatografiju uz korištenje ultrazvučne kupelji do potpunog otapanja. Otopina od 10 % (w/V) pripravljena je razrjeđivanjem otopine od 20 % (w/V) jednakim volumenom ultračiste vode.

b) Otopina natrijevog citrata

Otopina 30 % (w/V) natrijevog citrata pripravljena je otapanjem 1,5042 g krutine u 5 mL vode čistoće za tekućinsku kromatografiju uz korištenje ultrazvučne kupelji do potpunog otapanja.

c) Otopina amonijevog sulfata

Otopina 4 M amonijevog sulfata pripravljena je otapanjem 5,2860 g krutine u 10 mL vode čistoće za tekućinsku kromatografiju uz korištenje ultrazvučne kupelji do potpunog otapanja.

d) Otopina boratnog pufera

Otopina boratnog pufera koncentracije 25 mM priređena je razrjeđivanjem komercijalno dostupnog pufera koncentracije 50 mM vodom čistoće za kromatografiju u jednakom volumenu.

3.2.3 Sakupljanje i obrada plazme

Krv dobrovoljaca sakupljena je u epruvete Vacutainer K2-EDTA. Neposredno nakon uzorkovanja krv je centrifugirana 10 minuta na 18000 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, RPM), a dobiveni supernatant je još jednom centrifugiran 10 minuta na 6000 RPM. Plazma je pohranjena u zamrzivaču na -18 °C.

Prije uporabe plazma je 30 minuta termostatirana na sobnoj temperaturi te je alikvot u potrebnom volumenu prebačen u Eppendorf epruvetu. Alikvotu plazme je dodan odgovarajući volumen radnih otopina standarda kako bi se postigla ciljana koncentracija. U slijepe uzorke plazme dodan je jednak volumen otapala korištenog u otopini standarda. Plazma je za potrebe analize obrađena tehnikama PPT i DLLME.

3.2.4 Precipitacija proteina iz uzorka plazme

U 100 μL plazme dodano je 20 μL otopine standarda do konačne koncentracije 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nakon vorteksiranja od nekoliko sekundi dodano je sredstvo za taloženje. U uzorak taložen perklornom kiselinom dodano je 5 μL kiseline, a u uzorak taložen acetonitriplom 480 μL ACN. Uzorci su vorteksirani desetak sekundi i centrifugirani 20 minuta na 6000 RPM. Supernatant taloženja s perklornom kiselinom prenesen je u vijalu i direktno analiziran. Zbog velikog razrjeđenja uzorka u taloženju pomoću ACN, supernatant je odvojen, uparen i suhi ostatak je otopljen u 120 μL 65 % (V/V) MeOH kako bi koncentracija analita bila usporediva s početnom. Uzorci su analizirani metodom za fenilnu kolonu.

Prethodno dobiveni talozi su sačuvani i resuspendirani u 120 μL ACN. Nakon desetak sekundi vorteksiranja i 15 minuta centrifugiranja na 6000 RPM, alikvoti supernatanata su preneseni u vijale i analizirani HPLC metodom za fenilnu kolonu.

3.2.5 Postupak disperzivne mikroekstrakcije u ispitivanju polazišnih uvjeta

U preliminarnim ispitivanjima u 50 μL krvne plazme su dodane radne otopine standarda do konačne koncentracije 41,67 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Proteini su taloženi s 240 μL ACN, a 90 % volumena supernatanta je upareno do suha i resuspendirano u 54 μL vode kako bi koncentracija analita odgovarala početnoj. Pripremljene su zasebne smjese organskih sastavnica ACN i CLF, ACN i DCM, MeOH i CLF. Volumen uzorka plazme (V_u), volumen ekstrakcijskog sredstva (V_e) i volumen disperzivnog sredstva (V_d) u ekstrakciji odnose se u omjeru $V_u:V_e:V_d = 1:2:1$, tj. organske smjese za ekstrakciju se sastoje od 108 μL ekstrakcijskog i 54 μL disperzivnog sredstva. Brzim injektiranjem smjese organskih sastavnica u vodenu frakciju i vorteksiranjem od desetak sekundi izvršena je DLLME. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 6000 RPM, čitava organska frakcija je odvojena, uparena do suha i kruti ostatak je otopljen u 54 μL 65 % (V/V) MeOH. Analiza je provedena predloženom HPLC metodom za fenilnu kolonu.

3.2.6 Postupci disperzivne mikroekstrakcije u ispitivanju pomoćnih uvjeta

3.2.6.1 *Isoljavanje u disperzivnoj mikroekstrakciji iz otopine standarda*

U preliminarnom ispitivanju razlike u učinkovitosti izoljavanja prije i poslije DLLME, korištene su otopine standarda u ACN koje oponašaju supernatant nakon PPT. Pripremljeno je 60 μL uzoraka koncentracije analita 41,67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i upareno. Suhi ostaci su otopljeni u 60 μL vode odnosno 5 %-tnoj (w/V) otopini natrijevog klorida te je provedena DLLME smjesom 120 μL CLF i 60 μL ACN. Nakon vorteksiranja prvom uzorku je dodano još 60 μL 10 %-tne (w/V) otopine natrijevog klorida. Uzorci su vorteksirani desetak sekundi, centrifugirani 10 minuta na 6000 RPM, organski sloj je odvojen i uparen, a suhi ostatak otopljen u 60 μL 65 % (V/V) MeOH. Uzorci su analizirani HPLC metodom za fenilnu kolonu.

3.2.6.2 *Pomoćni uvjeti disperzivne mikroekstrakcije na uzorcima plazme*

U kasnijim fazama istraživanja pomoćnih uvjeta, 50 μL plazme je obogaćeno radnom otopinom standarda, odnosno dodan je jednak volumen MeOH za slijepu probu, i razrijeđeno vodom do 100 μL , konačne koncentracije analita 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. PPT je izvedena dodatkom 200 μL ACN, a 240 μL supernatanta, što odgovara 80 % ukupnog uzorka, je nakon centrifugiranja od 10 minuta na 6000 RPM odvojeno, upareno do suha te je primijenjena modifikacija DLLME.

U prvoj izvedbi suhi ostatak je otopljen u 100 μL vode. U tu vodenu otopinu je injektirana smjesa od 200 μL ACN i 200 μL CLF te je uzorak desetak sekundi vorteksiran. Uzorak je soniciran 20 minuta u svrhu UA-DLLME.

U drugoj izvedbi suhi ostatak je otopljen u 50 μL vode, u vodenu otopinu je injektirana smjesa od 200 μL ACN i 200 μL CLF te je uzorak desetak sekundi vorteksiran. Nakon vorteksiranja dodano mu je još 50 μL 10 %-tne (w/V) otopine natrijevog klorida.

U posljednjoj izvedbi suhi ostatak je otopljen u 50 μL 50 mM boratnog pufera. U otopinu je injektirana smjesa od 200 μL ACN i 200 μL CLF te je uzorak desetak sekundi vorteksiran. Uzorku je zatim dodano 50 μL 10 %-tne (w/V) otopine natrijevog klorida.

Uzorci su vorteksirani još desetak sekundi, centrifugirani 10 minuta na 6000 RPM i organski slojevi su odvojeni. Dobiveni organski slojevi su upareni do suha i otopljeni u 40 μL 65 % (V/V) MeOH te analizirani prema HPLC metodi za bifenilnu kolonu.

3.2.7 Postupci disperzivne mikroekstrakcije u određivanju graničnih uvjeta

3.2.7.1 Ispitivanje utjecaja volumena sastavnica na učinkovitost DLLME iz vodene otopine standarda

U ispitivanju utjecaja apsolutnih volumena na učinkovitost ekstrakcije pripremljene su vodene otopine standarda koncentracije 20 $\mu\text{g/mL}$ u 50, 250 i 500 μL vode. U ovom eksperimentu DLLME je izvedena na sljedeće načine: a) 100 μL smjese ACN i CLF = 1:1 (V/V) injektirano je u 50 ili 250 μL vodene otopine standarda; b) 500 μL smjese ACN i CLF = 1:1 (V/V) injektirano je u 50, 250 ili 500 μL vodene otopine standarda otopine. Dobivene smjese su vorteksirane desetak sekundi, centrifugirane 10 minuta na 6000 RPM, a organski sloj je odvojen i uparen do suha. Ostatak je otopljen u 65 % (V/V) MeOH, volumena jednakog polaznom volumenu vodene otopine i analiziran HPLC metodom za bifenilnu kolonu.

3.2.7.2 Ispitivanje zajedničkog utjecaja pomoćnih uvjeta na učinkovitost DLLME iz vodene otopine standarda

U ispitivanju graničnih uvjeta pripremljene su otopine standarda (20 $\mu\text{g/mL}$) u boratnom puferu koncentracije 50 mM. DLLME je izvršena injektiranjem 400 μL smjese različitih volumnih udjela ACN i CLF u 50 μL zalužene otopine standarda uz različite kombinacije dodatnih uvjeta. Isprobano je dodavanje 50 μL 0, 10 ili 20 %-tne (w/V) vodene otopine natrijevog klorida te soniciranje uzorka 0, 10 ili 20 minuta nakon provođenja DLLME (Tablica 3). U uzorke u koje nije dodan natrijev klorid, dodan je jednak volumen 50 mM boratnog pufera. Smjese su vorteksirane desetak sekundi, centrifugirane 10 minuta na 6000 RPM i organski sloj je odvojen i uparen. Ostatak je otopljen u 100 μL 65 % (V/V) MeOH i analiziran HPLC metodom za bifenilnu kolonu.

Tablica 3. Volumni udio CLF u 400 μ L smjese organskih sastavnica za DLLME te pomoćni uvjeti primijenjeni na uzorke.

Uzorak broj	ϕ CLF / %	NaCl / % (w/V)	t (soniciranje) / min
1	66,75	10	0
2	40,50	0	20
3	40,50	10	10
4	40,50	10	10
5	66,75	20	10
6	14,25	10	20
7	66,75	0	10
8	40,50	10	10
9	40,50	20	0
10	14,25	10	0
11	66,75	10	20
12	14,25	0	10
13	40,50	20	20
14	14,25	20	10
15	40,50	10	10
16	40,50	0	0

3.2.8 Postupci disperzivne mikroekstrakcije iz plazme u optimizaciji

3.2.8.1 Usporedba utjecaja načina izvedbe DLLME na učinkovitost ekstrakcije

50 μ L plazme je obogaćeno radnom otopinom standarda, odnosno dodan je jednak volumen MeOH za slijepu probu, i razrijeđeno vodom do 100 μ L, do konačne koncentracije analita 20 μ g/mL. PPT je izvedena dodatkom 200 μ L ACN, a 240 μ L supernatanta je nakon centrifugiranja od 10 minuta na 6000 RPM odvojeno te je primijenjena odgovarajuća izvedba DLLME.

U prvoj izvedbi odvojeni supernatant je uparen do suha, a ostatak je otopljen u 700 μ L ultračiste vode. DLLME je izvedena injektiranjem smjese od 500 μ L ACN i 150 μ L CLF u

dobivenu otopinu, smjesa je vorteksirana 15 sekundi i centrifugirana 10 minuta na 6000 RPM. Dobiveni organski sloj je odvojen, uparen do suha i otopljen u 40 μL 65 % (V/V) MeOH. U drugoj izvedbi odvojenom supernatantu je dodano 340 μL ACN (do ukupne količine ACN od 500 μL) i 150 μL CLF, smjesa je vorteksirana desetak sekundi te brzo prebačena u 700 μL vode, vorteksirana još desetak sekundi i centrifugirana 10 minuta na 6000 RPM. Organski sloj je odvojen, uparen do suha i otopljen u 40 μL 65 % (V/V) MeOH te su oba uzorka analizirana HPLC metodom za bifenilnu kolonu.

3.2.8.2 Usporedba utjecaja volumena kloroforma na učinkovitost ekstrakcije

50 μL plazme je obogaćeno radnom otopinom standarda i razrijeđeno vodom do 100 μL , konačne koncentracije analita 20 $\mu\text{g/mL}$. PPT je izvedena dodatkom 200 μL ACN, a 240 μL supernatanta je nakon centrifugiranja od 10 minuta na 6000 RPM odvojeno te je primijenjena prilagođena DLLME.

U tri različita uzorka odvojenog supernatanta dodani su CLF u volumenu i ACN (uzevši u obzir 160 μL ACN prisutnog u odvojenom supernatantu): 1) 240 μL CLF i 0 μL ACN, 2) 162 μL CLF i 78 μL ACN, 3) 120 μL CLF i 120 μL ACN. Dobivene smjese su injektirane u 50 μL 25 mM boratnog pufera, vorteksirane desetak sekundi te je dodano 50 μL 10 %-tne (w/V) vodene otopine natrijevog klorida za isoljavanje. Nakon ponovnog vorteksiranja i centrifugiranja 10 min na 6000 RPM, organski slojevi su odvojeni i upareni, a suhi ostaci su otopljeni u 40 μL 65 % (V/V) MeOH i analizirani HPLC metodom za bifenilnu kolonu.

4 REZULTATI

4.1 Parametri metode tekućinske kromatografije

Parametri HPLC analize određeni su u optimiziranim uvjetima na dvije kolone. Analiti su detektirani i određeni pomoću DAD na valnoj duljini od 210 nm, a analizirana je radna otopina standarda koncentracije 50 µg/mL u 65 % (V/V) MeOH. U Tablici 4 prikazani su relevantni parametri dobiveni na Phenomenex Kinetex Biphenyl koloni, dok su u Tablici 5 prikazani oni dobiveni na Waters XBridge Phenyl koloni.

Tablica 4. Parametri HPLC analize na Phenomenex Kinetex Biphenyl koloni.

Spoj	Vrijeme retencije / min	Faktor simetrije	Razlučivanje
Ribociklib	6,23	0,55	
Anastrozol	9,17	1,01	28,43
Letrozol	9,44	0,91	2,67

Tablica 5. Parametri HPLC analize na Waters XBridge Phenyl koloni.

Spoj	Vrijeme retencije / min	Faktor simetrije	Razlučivanje
Ribociklib	9,58	0,36	
Anastrozol	13,63	0,89	16,83
Letrozol	14,33	0,73	3,71

4.2 Optimalno sredstvo za precipitaciju proteina

U Tablici 6 su prikazane površine kromatografskih pikova analita iz plazme koja je obrađena tehnikom PPT. Kao sredstva taloženja korištena su perklorna kiselina i ACN. Supernatant dobiven perklornom kiselinom je analiziran direktno, dok je supernatant dobiven pomoću ACN uparen i otopljen u 65 % (V/V) MeOH. Nastali talog nakon odvajanja supernatanta je resuspendiran u ACN te nakon centrifugiranja analiziran. Koncentracija analita u uzorcima iznosi 40 µg/mL, a analiza je izvršena HPLC metodom za Waters XBridge Phenyl kolonu. Ribociklib je određen pomoću DAD na 270 nm, a anastrozol i letrozol pomoću FLD na ekscitacijskoj valnoj duljini od 210 nm i emisijskoj od 310 nm.

Tablica 6. Površine kromatografskih pikova analita iz supernatanta i taloga obogaćene plazme dobivene nakon PPT odabranim sredstvom taloženja.

Sredstvo taloženja	Frakcija	Ribociklib	Anastrozol	Letrozol
Perklorna kiselina	Supernatant	2229	120	5111
	Talog	1521	90	5902
ACN	Supernatant	2896	167	8797
	Talog	15	6	433

4.3 Polazišni uvjeti disperzivne mikroekstrakcije

Rezultati ispitivanja utjecaja različitih sastavnica smjese korištene u DLLME na ekstrakcijske prinose analita prikazani su u Tablici 7. Korišteno je 54 μL disperzivnog sredstva (ACN, MeOH) u kombinaciji sa 108 μL ekstrakcijskog sredstva (CLF, DCM) te je smjesa injektirana u 54 μL uzorka plazme. Obogaćena plazma sadrži spojeve u koncentraciji od 41,67 $\mu\text{g/mL}$, a prije provedbe DLLME obrađena je PPT tehnikom pomoću ACN. Analiza je izvršena HPLC metodom za Waters XBridge Phenyl kolonu. Poredbena otopina sadrži analite u koncentraciji 41,67 $\mu\text{g/mL}$. Analiti su određeni pomoću DAD na valnoj duljini od 210 nm.

Tablica 7. Površine kromatografskih pikova analita za različite kombinacije ekstrakcijskog i disperzivnog sredstva korištene u DLLME.

Sredstvo za ekstrakciju	Ribociklib	Anastrozol	Letrozol
CLF/ACN	1570	1431	2553
CLF/MeOH	1151	922	1975
DCM/ACN	1227	1032	2073
Poredbena otopina*	2916	2454	3949

*Otopina standarda (41,67 $\mu\text{g/mL}$) u 65 % (V/V) MeOH.

4.4 Pomoćni uvjeti u disperzivnoj mikroekstrakciji

Utjecaj dodatka soli prije i poslije DLLME ispitan je na acetonitrilnim otopinama standarda koncentracije analita 41,67 $\mu\text{g/mL}$, a rezultati su prikazani u Tablici 8. U prvom uzorku ostatak nakon uparavanja otopljen je u 5 %-tnoj (w/V) otopini natrijevog klorida te je smjesa CLF i ACN injektirana u tu otopinu. U drugom uzorku suhi ostatak je otopljen u vodi i u otopinu je injektirana smjesa CLF i ACN. Na kraju je u tu smjesu dodana 10 %-tna (w/V) otopina natrijevog klorida. Organski slojevi su odvojeni, upareni i otopljeni u 65 % (V/V) MeOH. Uzorci su analizirani HPLC metodom za Waters XBridge Phenyl kolonu, a analiti su određeni pomoću DAD na valnoj duljini od 210 nm.

Tablica 8. Površine kromatografskih pikova su dobivene dodavanjem otopine natrijevog klorida za izoliranje u različitim koracima u DLLME.

Isoljavanje	Ribociklib	Anastrozol	Letrozol
Prije DLLME	1335	1237	2324
Poslije DLLME	1663	1544	2884

Utjecaj pomoćnih uvjeta na učinkovitost DLLME prikazan je u Tablici 9. Plazma je obogaćena standardima u koncentraciji 20 µg/mL, PPT je postignuta pomoću ACN, supernatant je uparen i otopljen u vodi, a DLLME postupak je uz određenu prilagodbu proveden smjesom od 200 µL ACN i 200 µL CLF. Prvi uzorak je nakon DLLME soniciran 15 minuta. Drugom uzorku je nakon DLLME dodana 10 %-tna (w/V) otopina natrijevog klorida. Suhi ostatak trećeg uzorka je umjesto u vodi otopljen u 50 mM boratnom puferu, a nakon DLLME je dodana 10 %-tna (w/V) otopine natrijevog klorida. Slijepa proba je obrađena bez pomoćnih uvjeta te su standardi dodani nakon obrade u koncentraciji od 20 µg/mL. Uzorci su analizirani HPLC metodom za Phenomenex Kinetex Biphenyl kolonu. Ribociklib je određen pomoću DAD na 360 nm, a anastrozol i letrozol pomoću FLD na ekscitacijskoj valnoj duljini od 210 nm i emisijskoj od 310 nm.

Tablica 9. Prosječne površine kromatografskih pikova analita dobivene obradom plazme uz pomoćne uvjete; n=2.

Uzorak	Pomoćni uvjeti ekstrakcije	Ribociklib	Anastrozol	Letrozol
1	Vrijeme soniciranja	178	34	1918
2	Isoljavanje	434	56	3403
3	Isoljavanje i prilagodba pH	558	70	4171
Slijepa proba*	/	820	102	5853

*Uzorak plazme na kojem su provedeni postupci PPT i DLLME bez primjene pomoćnih uvjeta, obogaćen standardima (20 µg/mL) nakon obrade uzorka..

4.5 Granične vrijednosti uvjeta disperzivne mikroekstrakcije

U Tablici 10 prikazan je utjecaj polaznog volumena vodene frakcije i volumena smjese organskih sastavnica na učinkovitost ekstrakcije iz vodenih otopina standarda. Injektiranjem određenog volumena smjese ACN i CLF u odgovarajući volumen vodene otopine standarda izvršena je DLLME. U smjesi organskih sastavnica volumni omjer ACN i CLF je 1:1. Uzorci su analizirani prema metodi za Phenomenex Kinetex Biphenyl kolonu. Ribociklib je određen pomoću DAD na 360 nm, a anastrozol i letrozol pomoću FLD na ekscitacijskoj valnoj duljini od 210 nm i emisijskoj od 310 nm.

Tablica 10. Površine kromatografskih pikova analita dobivene u DLLME iz vodenih otopina standarda koncentracije 20 µg/mL različitih volumena.

V(otopina standarda): V(smjesa ACN i CLF) / µL:µL	V(organska frakcija) / µL	Ribociklib	Anastrozol	Letrozol
50:100	96	550	83	4855
50:500	495	578	87	5026
250:100	50	207	59	3512
250:500	245	371	77	4453
500:500	245	333	75	4329

Rezultati ispitivanja pomoćnih uvjeta, koji uključuju 0, 10 ili 20 minuta korištenja ultrazvučne kupelji i dodavanje 0, 10 ili 20 %-tne (w/V) otopine natrijevog klorida uz različite volumne udjele CLF u 400 μ L smjese s ACN, prikazani su u Tablici 11. DLLME je izvedena iz vodenih otopina 50 mM boratnog pufera i koncentracije analita 20 μ g/mL, uzorci su analizirani HPLC metodom za Phenomenex Kinetex Biphenyl kolonu. Ribociklib je određen pomoću DAD na 360 nm, a anastrozol i letrozol pomoću FLD na ekscitacijskoj valnoj duljini od 210 nm i emisijskoj od 310 nm.

Tablica 11. Prosječne površine kromatografskih pikova u ispitivanju utjecaja različitih udjela CLF u ekstrakcijskoj smjesi, vremena korištenja ultrazvučne kupelji i koncentracije natrijevog klorida; n=2.

Uzorak broj; uvjeti*	Ribociklib	Anastrozol	Letrozol
1 (66,75; 10; 0)	648	86	4891
2 (40,50; 0; 20)	329	81	4782
3 (40,50; 10; 10)	567	79	4702
4 (40,50; 10; 10)	575	83	4823
5 (66,75; 20; 10)	637	78	4620
6 (14,25; 10; 20)	536	58	3605
7 (66,75; 0; 10)	686	71	4358
8 (40,50; 10; 10)	556	59	3679
9 (40,50; 20; 0)	699	78	4467
10 (14,25; 10; 0)	578	62	3659
11 (66,75; 10; 20)	220	79	4606
12 (14,25; 0; 10)	568	71	4130
13 (40,50; 20; 20)	612	82	4700
14 (14,25; 20; 10)	479	76	4418
15 (40,50; 10; 10)	640	87	4931
16 (40,50; 0; 0)	630	82	4728

*(volumni udio CLF u smjesi s ACN; maseni udio NaCl u otopini za izoliranje; trajanje soniciranja / min)

4.6 Optimalni uvjeti disperzivne mikroekstrakcije

Tablica 12 prikazuje rezultate usporedbe različitih načina izvedbe DLLME. DLLME je izvršena iz plazme obogaćene standardima u koncentraciji 20 µg/mL, nakon PPT pomoću ACN. DLLME je izvedena na dva načina, tj. ekstrakcijom iz vodene otopine i ekstrakcijom iz acetonitrilne smjese. U izvedbi iz vodene otopine, supernatant je uparen i otopljen u odgovarajućem volumenu vode te je DLLME izvršena smjesom ACN i CLF, a analiziran je dobiveni organski sloj. U ekstrakciji iz acetonitrilne smjese, supernatantu nastalom nakon taloženja proteina su dodani ACN i CLF. Ta smjesa je injektirana u vodu kako bi došlo do razdvajanja na slojeve. Analiziran je organski sloj dobiven nakon centrifugiranja. Uzorci su analizirani HPLC metodom za Phenomenex Kinetex Biphenyl kolonu. Ribociklib je određen pomoću DAD na 360 nm, a anastrozol i letrozol pomoću FLD na ekscitacijskoj valnoj duljini od 210 nm i emisijskoj od 310 nm.

Tablica 12. Prosječne površine kromatografskih pikova analita dobivene različitim načinima izvedbe DLLME s jednakim sastavom smjesa ACN, CLF i vode; n=2.

Izvedba DLLME	Ribociklib	Anastrozol	Letrozol
Iz vodene otopine	253	51	3305
Iz acetonitrilne smjese	397	70	4149
Slijepa proba*	784	91	5390

* Uzorak plazme na kojem su provedeni postupci PPT i DLLME bez modifikacija, obogaćen standardima (20 µg/mL) nakon obrade uzorka.

Rezultati analize obrađene plazme obogaćene standardima u koncentraciji 20 µg/mL različitim volumenom CLF korištenim u DLLME prikazani su u Tablici 13. DLLME je izvršena nakon PPT te dodatka ACN i CLF u supernatant, injektiranjem smjese u 50 µL 25 mM boratnog pufera uz dodatak 50 µL 10 %-tne (w/V) otopine natrijevog klorida. Ukupni volumen ACN i CLF u smjesi za DLLME iznosi 400 µL, a volumen CLF za pojedini uzorak prikazan je u Tablici 13. Uzorci su analizirani HPLC metodom za Phenomenex Kinetex Biphenyl kolonu. Ribociklib je određen pomoću DAD na 360 nm, a anastrozol i letrozol pomoću FLD na ekscitacijskoj valnoj duljini od 210 nm i emisijskoj od 310 nm.

Tablica 13. Prosječne površine kromatografskih pikova analita dobivene primjenom različitih volumena CLF korištenima u DLLME.

V_e / µL	Ribociklib	Anastrozol	Letrozol
240	526	56	3850
162	475	51	3464
120	492	53	3648
Slijepa proba*	784	91	5390

*Uzorak plazme na kojem su provedeni postupci PPT i DLLME bez modifikacija, obogaćen standardima (20 µg/mL) nakon obrade uzorka.

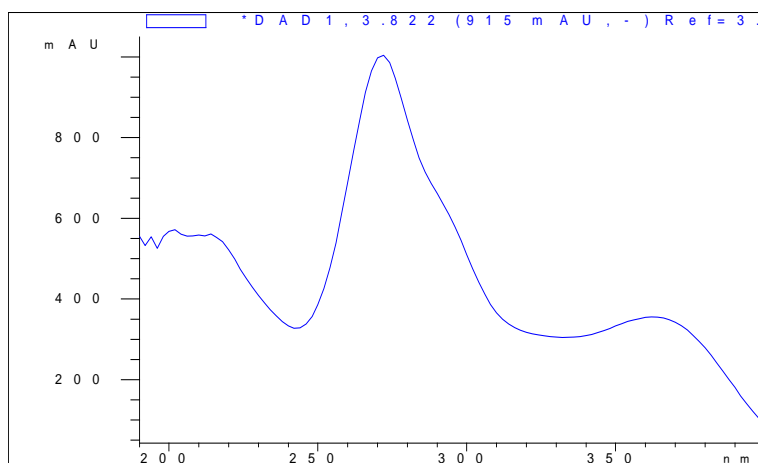
5 RASPRAVA

5.1 Određivanje uvjeta kromatografske analize

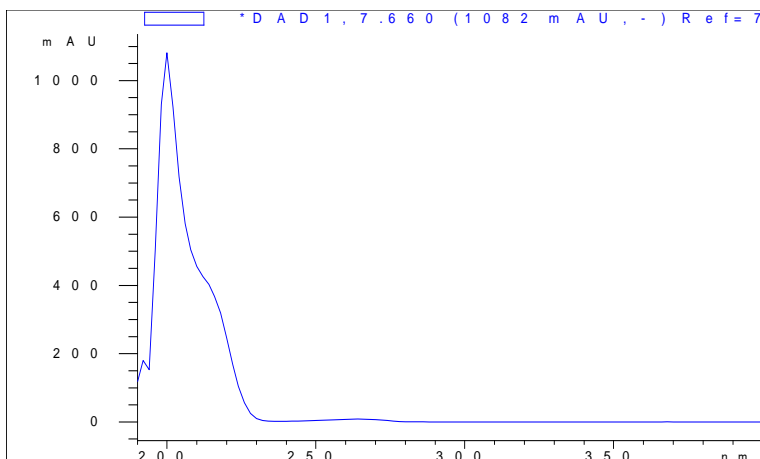
5.1.1 Postavljanje detekcije analita

U svrhu detekcije analita odabrani su DAD i FLD zbog svoje pristupačnosti i jednostavnosti. Iako su plazmatske koncentracije analita u terapiji niske te je potrebna osjetljivija tehnika detekcije za rad na stvarnim uzorcima, za potrebe određivanja kromatografskih uvjeta i pripremu uzorka mogu se koristiti i više radne koncentracije pa su ovi detektori dostatni. Uvjeti detekcije u literaturi variraju te su valne duljine odabrane prema apsorpcijskim spektrima za pojedine analite.

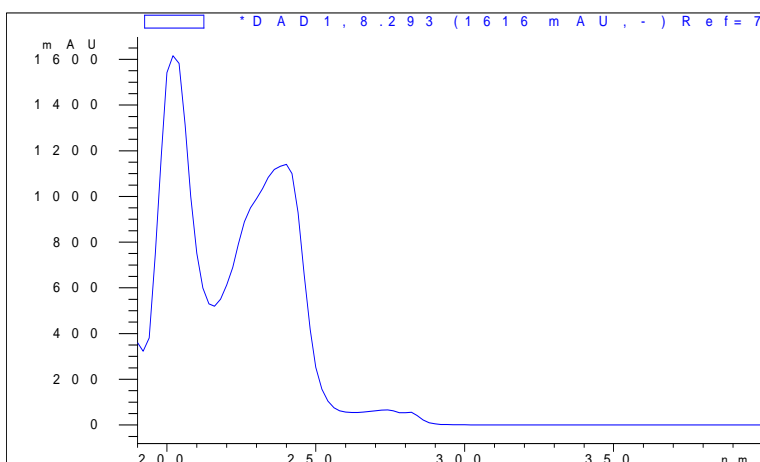
Ribociklib pokazuje maksimume apsorpcije na valnim duljinama 210, 270 i 360 nm (Slika 4), no na valnoj dulji od 210 nm su prisutne interferencije otapala pa se određuje na 270 ili 360 nm. Anastrozol svoje apsorpcijske maksimume pokazuje na 200 i 210 nm (Slika 5), dok ih letrozol pokazuje na valnim duljinama od 200 i 240 nm (Slika 6). Letrozol i anastrozol također pokazuju fluorescenciju. Empirijski su određene optimalne valne duljine ekscitacije i emisije za simultano određivanje oba analita te iznose 210 nm za ekscitacijsku i 310 nm za emisijsku valnu duljinu. U određivanju analita FLD je postavljen na navedene valne duljine, a DAD na valne duljine 210, 240, 270 i 360 nm. DAD nije postavljen na valnu duljinu nižu od 210 nm zbog potencijalnih interferencija iz plazme i mobilne faze.



Slika 4. Apsorpcijski spektar standarda ribocikliba koncentracije 104 µg/ml u MeOH. Kromatografija je provedena na C18 koloni izokratnom eluacijom (MeOH i 0,1 % (V/V) mravlje kiseline u vodi u volumnom omjeru 40:60).



Slika 5. Apsorpcijski spektar standarda anastrozola koncentracije 99 $\mu\text{g/ml}$ u MeOH. Kromatografija je provedena na C18 koloni izokratnom eluacijom (MeOH i 0,1 % (V/V) mravlje kiseline u vodi u volumnom omjeru 50:50).



Slika 6. Apsorpcijski spektar standarda letrozola koncentracije 98 $\mu\text{g/ml}$ u MeOH. Kromatografija je provedena na C18 koloni izokratnom eluacijom (MeOH i 0,1 % (V/V) mravlje kiseline u vodi u volumnom omjeru 50:50).

5.1.2 Razvoj metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Odabir stacionarne faze prvi je korak u učinkovitom razdjeljivanju analita te ima najveći utjecaj na selektivnost metode. Uvidom u kemijsku strukturu i poznavanjem log P vrijednosti molekula (ribociklib – 2,4; anastrozol – 3,0; letrozol – 2,9) odabrana je reverzno fazna

kromatografija, a zbog velike prisutnosti fenilnih skupina u strukturama lijekova odabrane su i takve stacionarne faze [56–58]. Isprobane su kolone s modificiranom stacionarnom fazom:

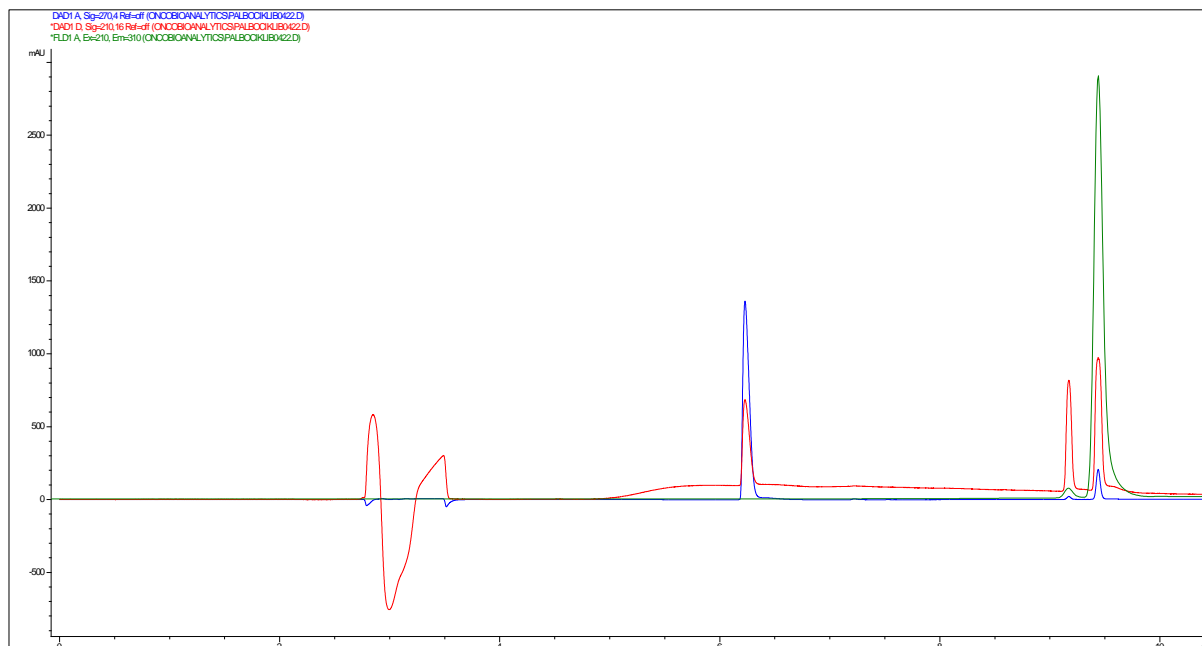
- Waters XBridge C18 (150x4,6 mm, 3,5 μm)
- Waters XBridge Phenyl (150x4,6 mm, 3,5 μm)
- Phenomenex Kinetex Biphenyl (150x4,6 mm, 2,6 μm)

U određivanju optimalnih uvjeta kromatografije korištene su radne otopine standarda u 65 % (V/V) MeOH u koncentracijskom rasponu od 5 do 80 $\mu\text{g/mL}$. 65 %-tni MeOH je korišten kao otapalo kako bi se osigurala topljivost analita, no kako se s višim udjelom MeOH javlja cijepanje pika ribocikliba uslijed nejednakog zadržavanja na koloni, bitno je koristiti niži udio MeOH. U optimizaciji mobilne faze kao polarna sastavnica je korištena 0,1 % (V/V) vodena otopina mravlje kiseline (otapalo A). Napolarnu sastavnicu čini 0,1 % (V/V) otopina mravlje kiseline u ACN (otapalo B) ili 0,1 % (V/V) otopina mravlje kiseline u MeOH (otapalo C). Dodatak mravlje kiseline u sastavnice poboljšava simetriju pikova promjenom pH. Variranjem sastava mobilne faze i uvjeta gradijentne elucije određeni su optimalni uvjeti kromatografije na pojedinoj koloni.

Iako je kolona C18 najčešći tip korišten u analizi spojeva od interesa, ovdje ne omogućava zadovoljavajuće razdvajanje. Ribociklib eluira blizu mrtvog vremena, razlučivost između anastrozola i letrozola je mala ili analiza traje predugo.

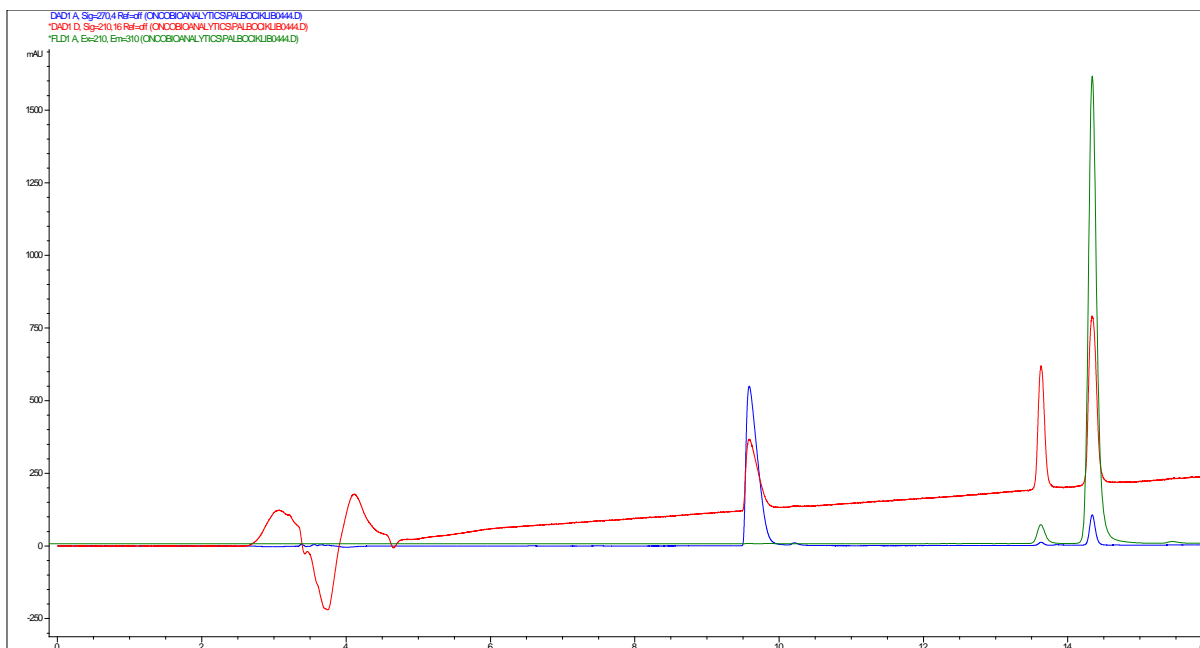
Kolona Phenomenex Kinetex Biphenyl pruža najbolje razdvajanje u najkraćem vremenu analize (Slika 7). Mobilna faza se sastoji od otapala A i B te se primjenjuje gradijentna elucija opisana u Tablici 1 koja se pokazala optimalnom. Brza analiza s trajanjem kraćim od 10 minuta pruža zadovoljavajuće razlučivanje između bližih pikova anastrozola i letrozola u koncentraciji 50 $\mu\text{g/mL}$ s faktorom razlučivanja 2,67, čija vrijednost za potpuno razlučivanje treba iznositi više od 1,5 (Tablica 4). Faktori simetrije anastrozola i letrozola iznose približno 1, dakle pikovi jesu simetrični, ali zato pik ribocikliba pokazuje blagi „*tailing*“. Vjerojatni razlog je prisutnost različitih skupina u strukturi zbog čega stvara različite vrste interakcija sa stacionarnom fazom. Dodatak mravlje kiseline u mobilnu fazu i podešavanje pH na 2,8 pokazuju pozitivan utjecaj na simetričnost. Spora promjena sastava mobilne faze ključna je u optimalnom razdvajanju anastrozola i letrozola, dok brža promjena, koja bi omogućila kraće trajanje analize, dovodi do nezadovoljavajućeg faktora razlučivanja. Ispitan je i potencijal otapala B kao organske sastavnice, no kromatografski pikovi su veće širine zbog slabije eluirajuće snage MeOH, a analiza dulje traje. S ciljem djelovanja na razdvajanje anastrozola i letrozola uz zadržavanje

povoljnog vremena zadržavanja ribocikliba ispitane su i složene kombinacije otapala A, B i C u mobilnoj fazi, ali ne pokazuju bolje rezultate.



Slika 7. Kromatogram radne otopine standarda anastrozola, letrozola i ribocikliba (50 $\mu\text{g/mL}$) u 65 % (V/V) MeOH dobiven predloženom kromatografskom metodom na Phenomenex Kinetex Biphenyl koloni. Detekcija je provedena na valnim duljinama od 270 nm (plavo), 210 nm (crveno) i FLD ekscitacijskoj valnoj duljini od 210 nm, a emisijskoj od 310 nm (zeleno).

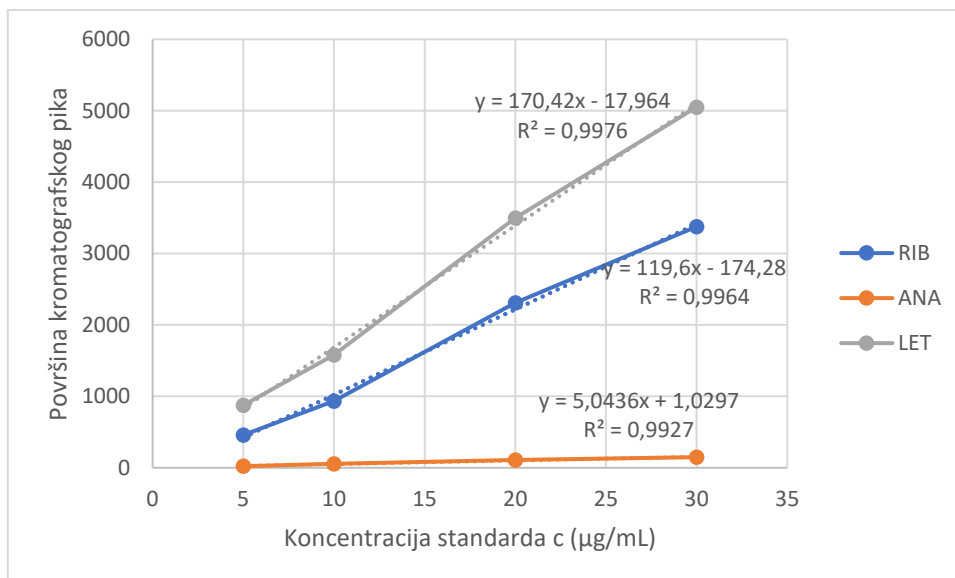
Waters XBridge Phenyl kolona također omogućava prihvatljivo razdvajanje (Slika 8), uz neke nedostatke (Tablica 5). Vrijeme analize je nešto dulje od trajanja analize na prethodnoj koloni, a dodatan problem predstavlja smanjena simetričnost pikova. Pokušaji skraćivanja analize promjenom sastava mobilne faze dovode do lošije simetrije pikova analita. U ovom slučaju organsku sastavnicu optimalne mobilne faze čini 0,1 % (V/V) otopina mravlje kiseline u MeOH umjesto u ACN, a gradijentna elucija je izvršena prema uvjetima opisanima u Tablici 2. Prednost analize na koloni s fenilnom stacionarnom fazom je bolje razlučivanje između anastrozola i letrozola.



Slika 8. Kromatogram radne otopine standarda anastrozola, letrozola i ribocikliba (50 $\mu\text{g/mL}$) u 65 % (V/V) MeOH dobiven predloženom kromatografskom metodom na Waters XBridge Phenyl koloni. Detekcija je provedena na valnim duljinama od 270 nm (plavo), 210 nm (crveno) i FLD ekscitacijskoj valnoj duljini od 210 nm, a emisijskoj od 310 nm (zeleno).

5.1.3 Preliminarno ispitivanje linearnosti metode i granica određivanja spojeva

Kako bi se utvrdilo radno područje metode u svrhu razvoja pripreme uzorka, preliminarno su ispitane granice određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ) i granice detekcije (engl. *limit of detection*, LOD), odnosno najniže koncentracije u kojima su analiti još uvijek mjerljivi ili se mogu detektirati. Uz to je na četiri koncentracije u kojima se očekuju analiti tokom razvoja ispitana linearnost, tj. odgovaranje grafa ovisnosti analitičkog odgovora o koncentraciji analita idealnom pravcu. Linearnost je ispitana na radnim otopinama smjesa standarda u 65 % (V/V) MeOH u koncentracijskom rasponu od 5 do 30 $\mu\text{g/mL}$ prema HPLC metodi za fenilnu kolonu. Dobivena R^2 vrijednost za svaki analit je veća od 0,99, dakle linearnost je prihvatljiva (Slika 9). LOD i LOQ vrijednosti određene su pomoću omjera signala i šuma razrjeđivanjem vodenih otopina standarda. Kao takve predstavljaju okvirne vrijednosti radnog područja metode u svrhu daljnjeg razvoja metode, a prikazane su u Tablici 14 i Tablici 15.



Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti površine ispod pika o koncentraciji analita. Analizirane su radne otopine pojedinih standarda u koncentracijama 5, 10, 20 i 30 µg/ml u 65 % (V/V) MeOH HPLC metodom na Waters XBridge Phenyl koloni. Ribociklib je određen pomoću DAD na valnoj duljini od 270 nm, dok su letrozol i anastrozol određeni pomoću FLD na valnim duljinama ekscitacije 210 nm i emisije 310 nm.

Tablica 14. LOD i LOQ za DAD na navedenim valnim duljinama određeni HPLC metodom za Waters XBridge Phenyl kolonu iz radnih otopina standarda u 65 % (V/V) MeOH.

Analit	Valna duljina detekcije / nm	LOD µg/ml	LOQ µg/ml
RIB	270	0,03	0,10
ANA	210	1,24	3,62
LET	240	0,10	0,22

Tablica 15. LOD i LOQ za FLD na navedenim valnim duljinama određeni HPLC metodom za Waters XBridge Phenyl kolonu iz radnih otopina standarda u 65 % (V/V) MeOH.

Analit	Valna duljina ekscitacije / nm	Valna duljina emisije / nm	LOD / µg/ml	LOQ / µg/ml
ANA	210	310	0,91	3,13
LET	210	310	0,03	0,04

5.2 Priprema biološkog uzorka

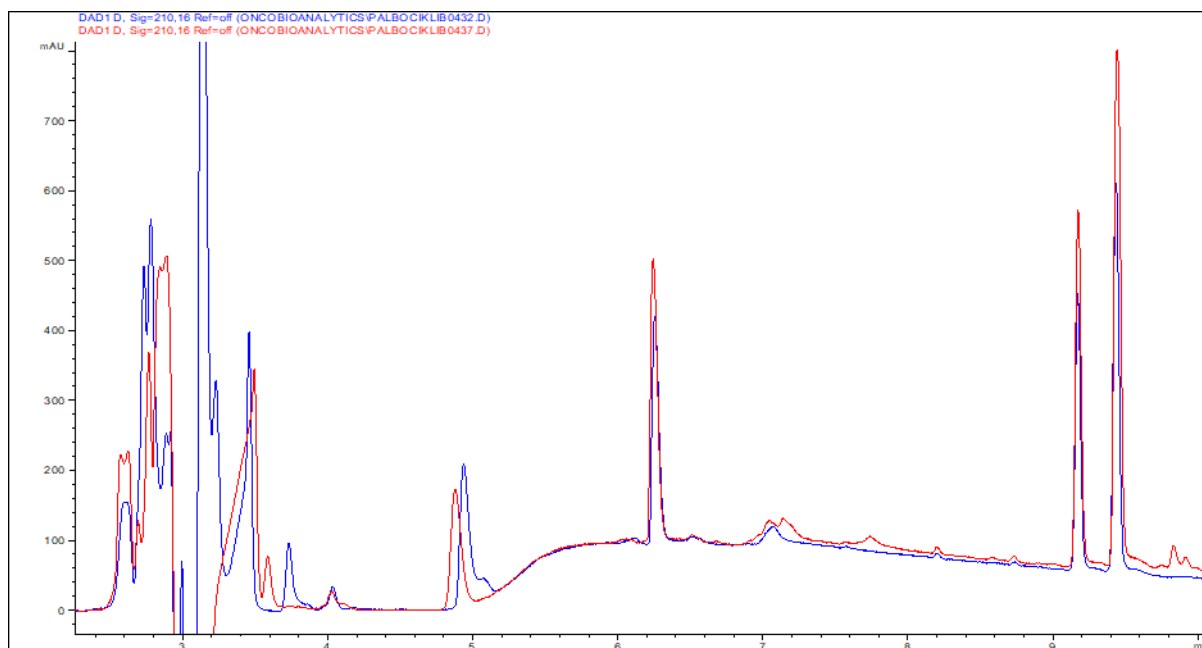
U pripremi krvne plazme za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti ispitane su opcije taloženja proteina i ekstrakcije. Ponavljanje postupka DLLME za ekstrakciju letrozola iz literature ne daje očekivane rezultate pa su ispitane temeljne postavke ekstrakcije. Zbog ograničene dostupnosti plazme u razvoju DLLME dio ekstrakcija proveden je iz vodenog uzorka, tj. vodene otopine standarda koja služi kao polazište za ekstrakciju. Dobiveni rezultati su provjereni na plazmi obogaćenju standardima.

5.2.1 Ispitivanje optimalnog sredstva taloženja proteina

U odabiru sredstva za PPT isprobani su ACN, 70 % (w/V) vodena otopina perklorne kiseline, 4 M vodena otopina amonijevog sulfata i 30 % (w/V) vodena otopina natrijevog citrata. Količina potrebnog sredstva za kvantitativno taloženje je određena dodatkom sredstva u obrocima do prestanka zamućenja. Pokazalo se da kod nekih sredstava, npr. amonijevog sulfata precipitacija ipak nije potpuna. Dodatkom male količine acetonitrila kapi supernatanta dobivenog pomoću amonijevog sulfata na satnom staklu još uvijek nastaje talog. Korištenje otopine natrijevog citrata zbog slabe topljivosti soli zahtijeva korištenje velikog volumena otopine i dovodi do velikog razrjeđenja uzorka. Uzorak je potrebno upariti ili ekstrahirati analite organskim otapalom, no uparavanje je dugotrajno, a dodatak organskih otapala izaziva daljnji nastanak taloga. Radi očuvanja radnog vijeka kolone analizirani su uzorci taloženi pomoću ACN i perklorne kiseline.

U 100 μL plazme do 120 μL dodane su radne otopine standarda do konačne koncentracije 40 $\mu\text{g/mL}$. Uzorcima je dodan taložni agens u volumenu od 5 μL za perklornu kiselinu te 480 μL za ACN te su vorteksirani i centrifugirani. Supernatant nakon taloženja perklornom kiselinom je prenesen u vijalu i direktno analiziran. U supernatantu nakon taloženja acetonitriliom prisutno je veliko razrjeđenje analita. Stoga je uparen i otopljen u odgovarajućem volumenu 65 % (V/V) MeOH kako bi koncentracija analita odgovarala početnoj koncentraciji. Nastali talozi su resuspendirani i analiti ekstrahirani pomoću ACN te analizirani kako bi se procijenili gubici taloženjem. Analiza je izvršena na fenilnoj koloni prema predloženoj metodi. Prinosi i zaostatak u talogu su prikazani u Tablici 6, a kromatogram koji prikazuje utjecaj pojedinog sredstva na pročišćavanje od nečistoća u matriksu prikazan je na Slici 10.

Iz dobivenih podataka je vidljivo kako se u talogu nastalom pomoću perklorne kiseline zadržava velik udio analita pa je u tom pogledu ACN bolje sredstvo taloženja. Nedostatak ACN je potreba uparavanja zbog velikog razrjeđivanja, ali ima potencijal koristiti se kao disperzivno sredstvo u DLLME. Ukupna površina pikova analita iz supernatanta i iz taloga je manja kod PPT korištenjem ACN vjerojatno uslijed gubitaka prenošenjem supernatanta. Smanjenje efekta matriksa je podjednako korištenjem obaju sredstava za taloženje (Slika 10). Zbog svojih prednosti ACN je odabran za PPT u daljnjim fazama istraživanja u volumenu barem četiri puta većem od volumena uzorka plazme.



Slika 10. Preklopljeni kromatogrami dobiveni analizom supernatanta korištenjem različitog sredstva taloženja u obradi plazme obogaćene standardima (plavo – perklorna kiselina, crveno – ACN).

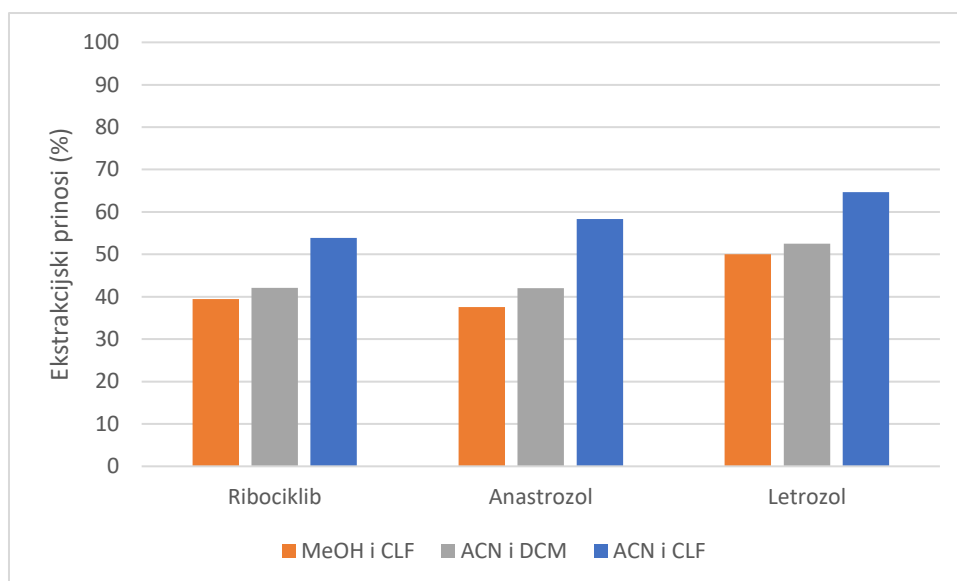
5.2.2 Određivanje polazišnih uvjeta disperzivne mikroekstrakcije

U literaturi su u DLLME iz uzorka plazme uglavnom korištene dvije izvedbe: a) razrjeđivanje uzorka vodom te injektiranje smjese organskih sastavnica i b) priprema smjese uzorka, dispergera i ekstrakcijskog sredstva koja se razdvaja na dva sloja injektiranjem u određenu količinu vode [47, 49]. Primjena ovih izvedbi u uvjetima opisanima u literaturi nije dala zadovoljavajuće rezultate pa se pristupilo razvoju tehnike iz temeljnih pretpostavki. Do odstupanja je vjerojatno došlo zbog neodgovaranja optimalnim uvjetima ekstrakcije analita od

interesa. Također, negativni utjecaj na ekstrakcijske prinose moglo je imati i veliko razrjeđenje korištenjem velikih volumena disperzivnog sredstva ili polazne vodene otopine za ekstrakciju. Uz navedeno bitno je i prilagoditi tehniku ekstrakciji iz biološkog uzorka.

Budući da je u principu DLLME nastanak disperzije koja se centrifugiranjem razdvaja na dva sloja, ispitani su okvirni volumeni vode, disperzivnog sredstva i ekstrakcijskog sredstva potrebni kako bi se zadovoljio princip. Pripremljene su smjese ACN ili MeOH kao disperzivnog sredstva te CLF ili DCM kao ekstrakcijskog sredstva u volumnom omjeru $V_e:V_d = 2:1, 1:0,5, 1:1$ i $1:2$. Smjesa organskih sastavnica za pojedinu kombinaciju i omjer volumena je injektirana u jedan volumni dio vode te je praćen nastanak disperzije i razdvajanje faza. Omjer volumena $V_u:V_e:V_d = 1:2:1$, tj. smjesa od 100 μL ekstrakcijskog sredstva i 50 μL disperzivnog sredstva injektirana u 50 μL vode, zadovoljava uvjete nastajanja disperzije i razdvajanja na slojeve kod svih kombinacija s podjednakim svojstvima. Smjesa u omjeru volumena $V_u:V_e:V_d = 1:1:1$ također zadovoljava uvjete, ali je ponašanje smjesa različitih sastavnica varijabilnije pa se omjer volumena $V_u:V_e:V_d = 1:2:1$ koristi u ispitivanju učinkovitosti ekstrakcije. Zanimljivo je da se različite smjese ponašaju različito u istim omjerima otapala, npr. u omjeru $2:2:1$ smjesa vode s ACN i DCM stvara stabilniju disperziju, nastale kapljice se talože u donji sloj puno sporije nego u smjesi s ACN i CLF.

Kako bi se usporedio utjecaj sastava organske smjese na ekstrakciju, isprobana je ekstrakcija analita iz plazme obogaćene standardima. U 50 μL plazme su dodane radne otopine standarda do koncentracije 41,67 $\mu\text{g/mL}$, odnosno odgovarajući volumen MeOH za slijepu probu. Proteini su taloženi pomoću ACN, a dio supernatanta je uparen do suha i resuspendiran u odgovarajućem volumenu vode kako bi koncentracija analita odgovarala početnoj. Pripremljene su zasebne smjese organskih sastavnica ACN i CLF, ACN i DCM, MeOH i CLF u omjeru volumena $V_u:V_e:V_d=1:2:1$. Brzim injektiranjem smjese organskih sastavnica u vodenu frakciju i vorteksiranjem od desetak sekundi izvršena je DLLME. Nakon centrifugiranja, čitava organska frakcija je odvojena, uparena do suha i kruti ostatak je otopljen u 54 μL 65 % MeOH kako bi se korigiralo za gubitke u prijenosu supernatanta. Analiza je provedena predloženom HPLC metodom za fenilnu kolonu. Dobiveni rezultati grafički su prikazani na Slici 11, na kojoj je vidljivo da smjesa ACN i CLF najviše pogoduje ekstrakciji svih lijekova od interesa pa je na toj smjesi nastavljena optimizacija tehnike.

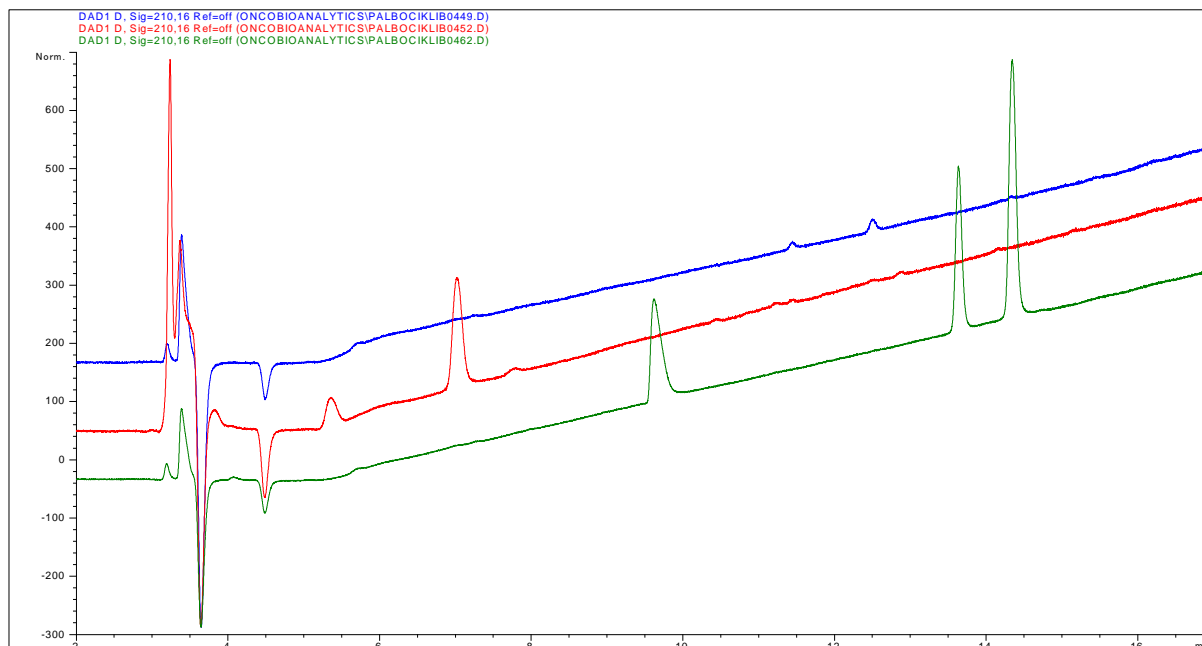


Slika 11. Utjecaj različitih kombinacija disperzivnog (MeOH, ACN) i ekstrakcijskog (CLF, DCM) sredstva korištenih u DLLME na ekstrakcijske prinose analita. Prinosi su izraženi u postotku iz omjera površina pikova analita obrađenog uzorka obogaćene plazme i površina pikova analita otopine standarda jednake koncentracije (41,67 $\mu\text{g/mL}$, prema podacima iz Tablice 7).

Ispitana je i razlika u prinosima i učinkovitosti uklanjanja smetnji matriksa između samo taloženja proteina i taloženja uz naknadnu ekstrakciju. Preklopljeni kromatogrami dobiveni analizom uzoraka HPLC metodom za fenilnu kolonu na Slici 12 pokazuju kako primjena DLLME smanjuje prisutnost nečistoća iz matriksa. Prinosi su pritom prihvatljivo manji s obzirom da se ne radi o optimiziranim uvjetima, no bitnije je da budu reproducibilni. Dodatno pročišćavanje od ionskih smetnji je posebno bitno za kasniji razvoj HPLC-MS metode čime je opravdan razvoj DLLME tehnike u obradi uzorka [22].

Kao dodatne opcije istražene su uzastopne ekstrakcije i SA-DLLME. Po uzoru na klasičnu LLE isprobana je modifikacija DLLME s višekratnim ekstrakcijama. U uzorak je injektirana smjesa ekstrakcijskog i disperzivnog sredstva te je nakon odvajanja organske frakcije postupak ponovljen. Frakcije su spojene, uparane, otopljene u odgovarajućem volumenu i analizirane, no ekstrakcijski prinosi su bili manji od jednostruke ekstrakcije. SA-DLLME je izvedena korištenjem otopine natrijevog citrata umjesto organskog disperzivnog sredstva. Ekstrakcijski prinosi su bili niži od korištenja ACN kao dispergera. Ispitana je i mogućnost ukoncentriravanja ekstrakcijom iz većeg volumena uzorka i otapanjem organske frakcije dobivene u DLLME postupku u manjem volumenu MeOH prije analize. Takav pristup

se pokazao obećavajućim te može poslužiti za razvoj DLLME postupka u određivanju vrlo niskih koncentracija analita.



Slika 12. Usporedba matriksa plazme obradom samo PPT (crveno), kombinacijom PPT i DLLME (plavo) i otopine standarda (zeleno) kao potvrda izostanka interferencija na vremenima zadržavanja analita.

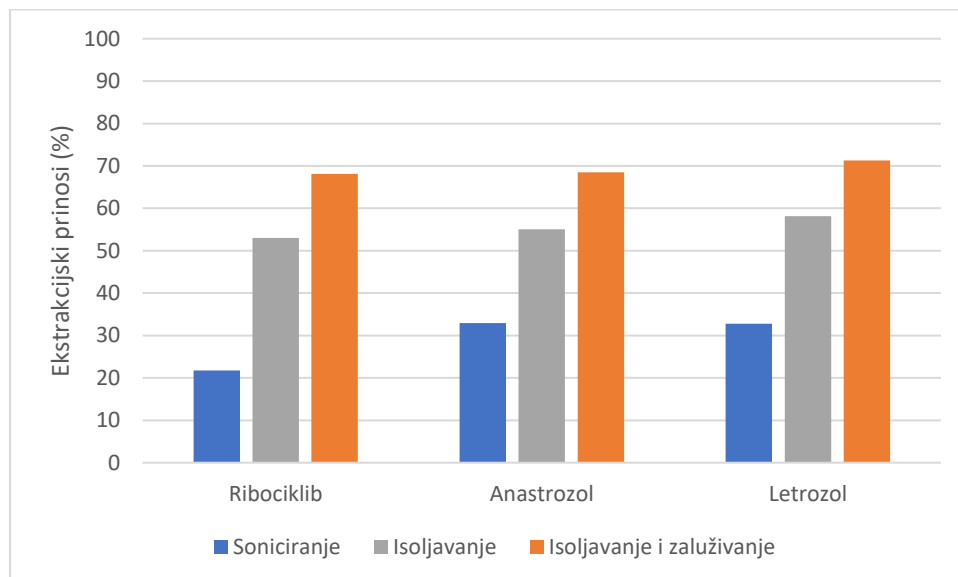
5.2.3 Pomoćni uvjeti u disperzivnoj mikroekstrakciji

DLLME može biti poboljšana pomoćnim sredstvima. U literaturi su najčešći postupci povećanja učinkovitosti DLLME dodatak soli za isoljavanje te ekstrakcija uz korištenje ultrazvučne kupelji. Utjecaj dodatnih postupaka na učinkovitost ekstrakcije varira ovisno o analitima pa ga je potrebno ispitati. Bitan nedostatak LLE pa tako i DLLME je nemogućnost ekstrakcije polarnih i ioniziranih analita, stoga je bitno podesiti pH u ekstrakciji kako bi se smanjila ionizacija analita i time povećala njihova razdioba u organsko otapalo. U fiziološkom i neutralnom pH anastrozol i letrozol nisu ionizirani, dok je ribociklib s pKa vrijednost baze 8,87 ioniziran [56].

UA-DLLME je ispitana soniciranjem uzorka nakon injektiranja smjese ACN i CLF u vodenu otopinu dobivenu obradom plazme. Slika 13 prikazuje rezultate (Tablica 9) analize plazme, gdje je učinkovitost ekstrakcije manja nego inače, dok su ekstrakcije iz vodenih otopina

standarda pokazivale neutralni utjecaj. Efekt isoljavanja predstavlja zanimljivu situaciju zbog različitog utjecaja ovisno o trenutku dodavanja soli. Otapanje suhog ostatka iz obrađene plazme u otopini natrijevog klorida prije ekstrakcije smjesom ACN i CLF pokazalo je manji pozitivni utjecaj na ekstrakciju u odnosu na dodavanje otopine natrijevog klorida nakon ekstrakcije (Tablica 8). Rezaee i suradnici objašnjavaju dvojak utjecaj dodatka soli na ekstrakcijske prinose [47]. Dodatak soli može negativno djelovati na nastanak disperzije, a time i na ekstrakciju analita, dok s druge strane ima pozitivan utjecaj efektom isoljavanja. Stoga je moguće da se dodatkom soli u smjesu nakon prvotnog nastanka disperzije izbjegne negativan utjecaj na prinose, a još uvijek zadrži efekt isoljavanja. U oba slučaja ekstrakcija se pokazala učinkovitijom, a na Slici 13 prikazani su prinosi uz dodavanje otopine natrijevog klorida prethodno odvajanju organske faze.

U ispitivanju utjecaja pH, umjesto otapanja suhog ostatka u vodi prije ekstrakcije, ostatak je otopljen u boratnom puferu 9,3 uz isoljavanje nakon ekstrakcije, što je ujedno i poslužilo u određivanju interferencija pufera u nastanku emulzije. Dobiveni rezultati na Slici 13 pokazuju velik pozitivan utjecaj dodatka pufera na ekstrakciju ribocikliba u odnosu na samo isoljavanje. Vidljivo je da dodatak pufera ima pozitivan utjecaj i na preostale analite, što je vjerojatno posljedica povećane ionske jakosti otopine.



Slika 13. Utjecaj soniciranja (15 minuta), isoljavanja (10 %-tna (w/V) otopina natrijevog klorida) i zaluživanja (boratni pufer koncentracije 50 mM) na ekstrakcijske prinose analita u potpomognutoj DLLME. Prinosi su izraženi u postotku iz omjera površina pikova analita obrađenog uzorka obogaćene plazme i površina pikova analita uzorka plazme obogaćene standardima nakon obrade (20 µg/mL, prema podacima iz Tablice 9).

5.2.4 Ispitivanje graničnih uvjeta disperzivne mikroekstrakcije

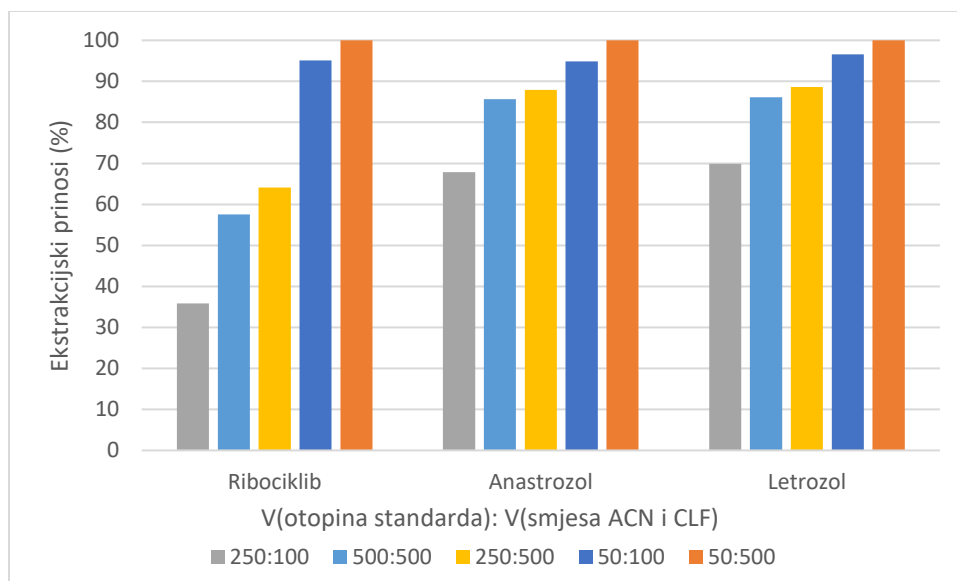
Tijekom ispitivanja potencijalnih uvjeta DLLME primijećeno je da malom promjenom sastava smjese, volumen organskog sloja i prinosi variraju. Kako bi se odredio optimalan omjer volumena uzorka i volumen smjese organskih sastavnica ispitana je učinkovitost ekstrakcije analita iz vodenih otopina standarda u različitim odnosima volumena. Pripremljene su vodene otopine standarda različitih volumena pri čemu je konačna koncentracija svakog analita iznosila 20 µg/mL. Smjesa ACN i CLF odgovarajućih volumena injektirana je u otopine standarda (Tablica 16) čime je izvršena DLLME. Organski sloj je odvojen pomoću mikropipeta u obrocima kako bi mu se okvirno odredio volumen te je uparen. Dobiveni kruti ostatak otopljen je u 50, 250 i 500 µL 65 % (V/V) MeOH, ovisno o početnom volumenu vode i analiziran predloženom HPLC metodom za bifenilnu kolonu.

Tablica 16. Prikaz sastava smjesa u DLLME i nastalog volumena organskog sloja koji je analiziran. U smjesi organskih sastavnica volumni omjer ACN i CLF je 1:1.

V (otopina standarda) / µL	V(smjesa ACN i CLF) / µL	V (organska frakcija) / µL
50	100	96
50	500	495
250	100	50
250	500	245
500	500	245

Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 10 te grafički predloženi na Slici 14. Vidljivo je da najbolje ekstrakcijske prinose donosi onaj sastav smjese kod kojeg je volumen nastalog organskog sloja nakon DLLME najbliži volumenu smjese CLF i ACN korištenom u ekstrakciji. Takav omjer volumena je postignut samo s manjim početnim volumenom vodene otopine. Pretpostavka je da ekstrakcijom manjim volumenom ACN i CLF iz većeg volumena polazne vodene otopine standarda veći dio ACN zaostaje u vodenoj frakciji. Kako su analiti topljivi u ACN, viši udio zaostaje u vodenoj frakciji pa su prinosi manji. Takav zaključak donose i Chen i suradnici primjećujući isti učinak u DLLME [59]. Ipak iznimku predstavlja smjesa 250:500 koja donosi manje ekstrakcijske prinose, a sastavnice su u jednakom omjeru kao i u smjesi

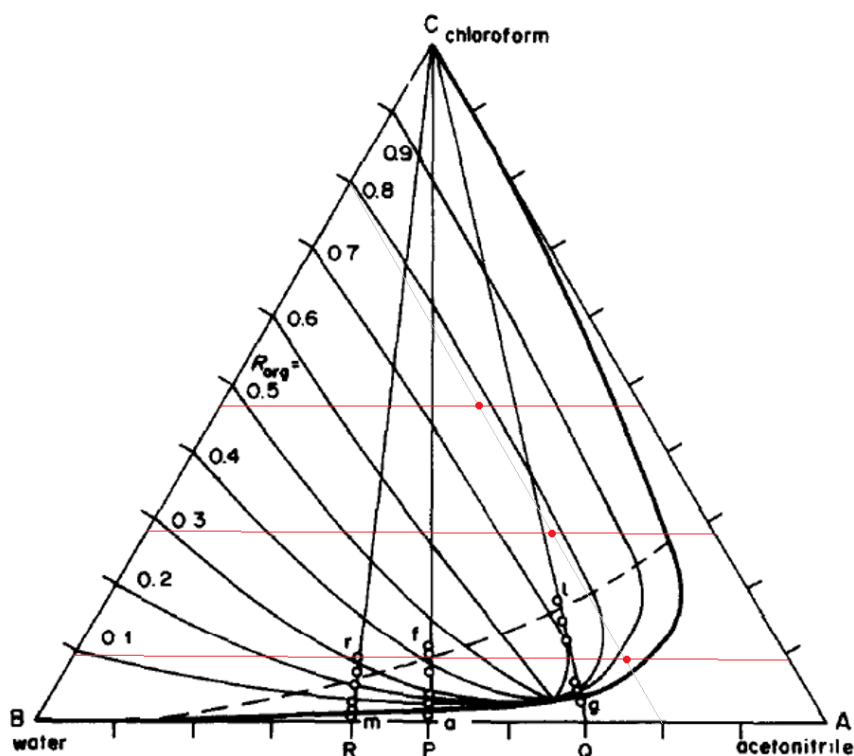
50:100. Ova pojava upućuje na postojanje dodatnih faktora. Iako rezultati ukazuju na postojanje optimalnih udjela, granice im nisu potpuno jasne. Sigurno je da nije poželjno DLLME izvoditi smjesom ACN i CLF volumena puno manjeg od volumena uzorka iz kojeg se analite ekstrahira.



Slika 14. Utjecaj apsolutnih volumena polazne vodene otopine i volumena smjese organskih sastavnica na ekstrakcijske prinose analita u DLLME. U smjesi organskih sastavnica volumni omjer ACN i CLF je 1:1. Prinosi su izraženi kao postotak u odnosu na uzorak s najvećim prinosima ($V(\text{otopina standarda}): V(\text{smjesa ACN i CLF}) = 50:500$) prema podacima iz Tablice 10.

Dosadašnji podaci upućuju na optimalne uvjete pa kako bi se isti točnije utvrdili, ispitan je niz uvjeta i njihov utjecaj na ekstrakcijske prinose, no, kako su dostupne količine plazme ograničene, ispitan su u ekstrakcijama iz vodenih otopina standarda. DLLME je izvedena iz 100 μL otopine standarda koncentracije 20 $\mu\text{g/mL}$, a kako se pokazalo da je visok pH ključan za učinkovitu ekstrakciju ribocikliba, otopina je zaluzena 50 mM boratnim puferom na pH 9,3. Za injektiranje u navedenu otopinu korištene su smjese ACN i CLF od ukupno 400 μL . Za uspješno razdvajanje faza bitan je udio CLF, a te vrijednosti su određene iz literature. Hori i suradnici opisuju ekstrakcije korištenjem ternarnih sustava ACN, CLF i vode s fokusom na svojstvima smjese [60]. Slika 15 prikazuje u kojim sastavima smjese se može očekivati razdvajanje ili homogena smjesa te obrat slojeva. Kako bi se ispitaio širi raspon sastava smjese organskih sastavnica, a da još uvijek odgovara uvjetima ternarnog sustava, volumen organskih sastavnica prilagođen je s 500 na 400 μL , a volumen uzorka s 50 na 100 μL . U navedenim

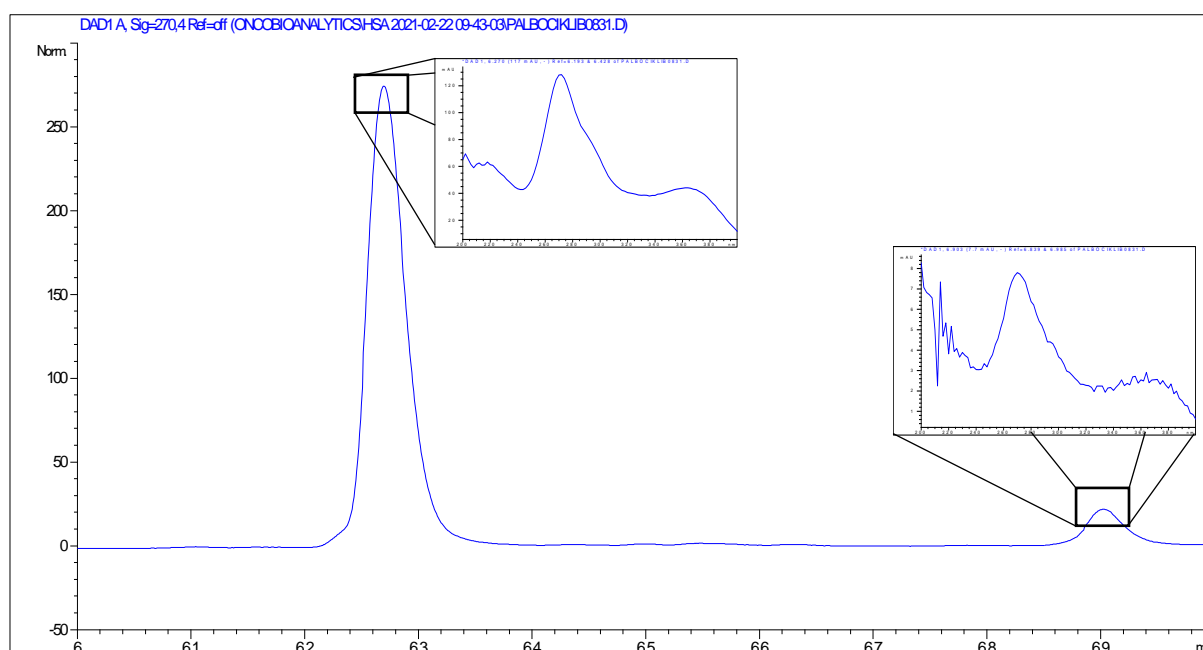
uvjetima volumena uzorka i organskih sastavnica određeni je minimalni volumeni CLF od 57 μL potreban za razdvajanje faza. Volumen od 257 μL odabran je kako bi nastala relativno stabilna disperzija, a volumen od 162 μL odgovara aritmetičkoj sredini. Pripremljen je niz takvih smjesa organskih sastavnica i izvedena je DLLME. Istovremeno je praćen i utjecaj dodatnih faktora – soniciranja u trajanju od 10 ili 20 min, te dodatka 10 ili 20 %-tne (w/V) vodene otopine natrijevog klorida nakon postupka ekstrakcije (Tablica 3). Uzorci su analizirani prema HPLC metodi za bifenilnu kolonu.



Slika 15. Utjecaj sastava smjese u volumnim udjelima na razdvajanje faza prikazan pomoću ternarnog dijagrama sustava ACN, CLF i vode. Podebljana linija odvaja sastave smjesa koji se razdvajaju na dva sloja od onih koji se ne razdvajaju. Sastav smjese ispod isprekidane crte, a lijevo od podebljane označava smjese koje se razdvajaju na dva sloja, ali dolazi do obrata faza, tj. organski sloj se nalazi iznad vodenog sloja. Crvene točke predstavljaju granične sastave smjese nakon izvođenja DLLME u iznad opisanim uvjetima. Prilagođeno prema [60].

Rezultati dobiveni ekstrakcijom analita iz vodene otopine standarda u različitim uvjetima (Tablica 11) daju uvid u granične uvjete koje treba izbjegavati te njihov kumulativni utjecaj bez nepotrebnog trošenja ograničene količine krvne plazme. Također olakšavaju uočavanje nekih događaja poput raspada analita bez interferencija iz matriksa. Smanjenje

površine pika ribocikliba uslijed korištenja ultrazvučne kupelji može se objasniti raspadom analita. Naime, soniciranjem uzorka u svrhe UA-DLLME dolazi do pojave dodatnog pika u kromatogramima, a apsorpcijski spektar tog pika sličan je spektru ribocikliba (Slika 16). Najniži ekstrakcijski prinosi dobiveni su u pokusima s manjim volumenom CLF. Osim toga, promjena volumena CLF ne ukazuje na jasnu pravilnost u promjeni ekstrakcijskih prinosa. U ekstrakcijama s manjim udjelom CLF dolazi do obrata slojeva. Kod manjeg i srednjeg udjela CLF i dodane 20 %-tne (w/V) otopine natrijevog klorida gustoća organske i vodene faze je podjednaka pa je granica između faza teško uočljiva, ali su ekstrakcije s dodatkom soli uspješnije. Dakle, korištenje ultrazvučne kupelji se ne preporuča, dok je zalučivanje poželjno, kao i pomoć isoljavanjem dodatkom 10 %-tne (w/V) otopine natrijevog klorida. Volumen CLF u ovim uvjetima treba biti veći od 162 μ L.

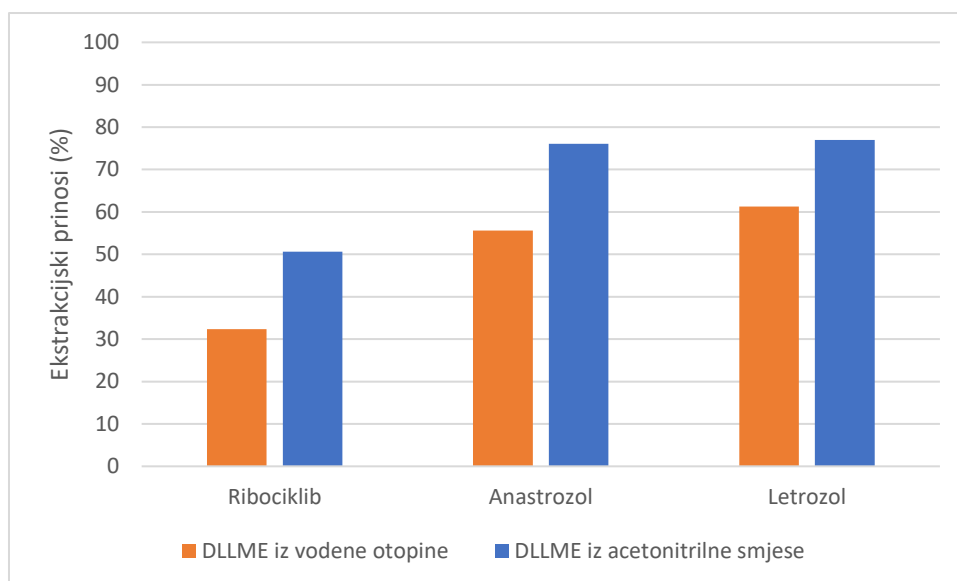


Slika 16. Odabrani kromatogram dobiven iz niza pokusa. Vidljiva je pojava dodatnog pika ($t_r=6,9$ min) apsorpcijskog spektra sličnog apsorpcijskom spektru ribocikliba ($t_r=6,3$ min).

5.2.5 Optimizacija disperzivne mikroekstrakcije

Dosadašnja saznanja upućuju da jedan od glavnih načina izvedbe DLLME koja uključuje razrjeđivanje uzorka u vodi, nije prikladan zbog potrebnog velikog volumena vode i posljedičnog smanjenja prinosa analita. Kao alternativni pristup DLLME iz bioloških uzoraka poput plazme, dodatno je stoga isprobano direktno injektiranje smjese CLF i acetonitrilnog supernatanta uzorka dobivenog taloženjem proteina u vodu, imajući na umu ograničenja nametnuta ponašanjem ternarne smjese vode, ACN i CLF. Uspoređeni su ekstrakcijski prinosi dobiveni injektiranjem smjese acetonitrilnog supernatanta i CLF u ultračistu vodu s ekstrakcijskim prinosima postupka u kojem se smjesa ACN i CLF injektira u vodenu otopinu pripremljenu iz suhog ostatka uparenog supernatanta. Korišteni su ekvivalentni volumeni svih sastavnica u DLLME kako bi se usporedio samo utjecaj načina izvedbe na ekstrakcijske prinose.

Uzorak plazme je obogaćen radnom otopinom standarda u konačnoj koncentraciji 20 µg/mL. PPT je izveden pomoću ACN, a dobiveni supernatant je odvojen. U prvoj izvedbi supernatant je uparen, kruti ostatak otopljen u 700 µL vode i izvršena je DLLME smjesom 150 µL CLF i 500 µL ACN. U drugoj izvedbi DLLME, u dobiveni supernatant dodano je 340 µL ACN i 150 µL CLF te je ta smjesa injektirana u 700 µL vode. Organski slojevi su nakon vorteksiranja i centrifugiranja smjese odvojeni, upareni i otopljeni u 65 % (V/V) MeOH. Uzorci su analizirani predloženom HPLC metodom za bifenilnu kolonu. DLLME izvršena injektiranjem ukupne smjese u vodu donosi više prinose uz isti sastav smjese (Slika 17). Uz prinose, prednost ove izvedbe je izostanak uparavanja supernatanta, što skraćuje trajanje pripreme uzorka za više od sat vremena.

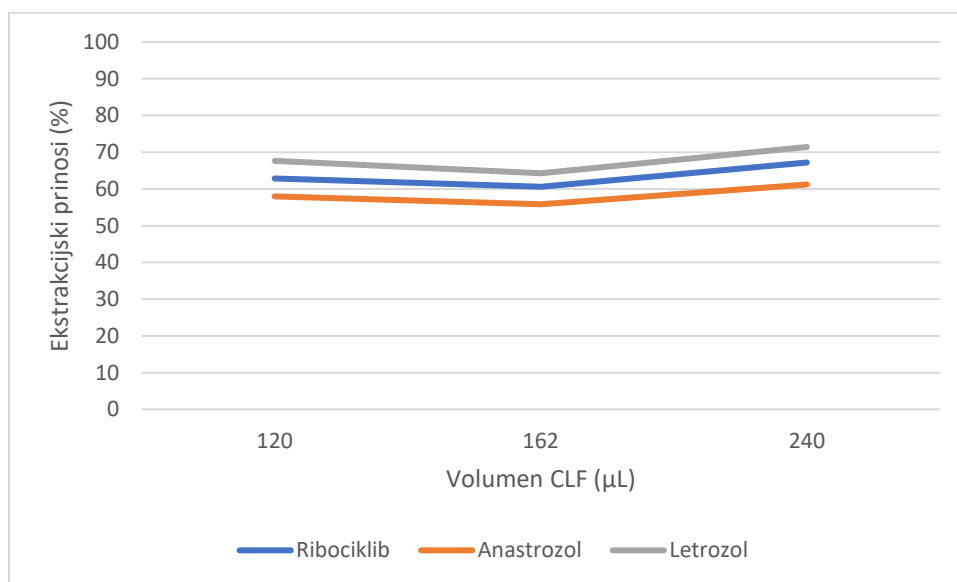


Slika 17. Utjecaj načina izvedbe DLLME na ekstrakcijske prinose. Prinosi su izraženi u postotku iz omjera površina pikova analita obrađenog uzorka obogaćene plazme i površina pikova analita plazme obogaćene standardima nakon obrade (20 µg/mL, prema podacima iz Tablice 12).

Iako se pokazalo da viša koncentracija natrijevog klorida ima bolji utjecaj na prinose, zbog praktičnih razloga, tj. lakšeg odvajanja organskog sloja ipak je odabrana manja koncentracija od 5 % (w/V). Također je moguće da dolazi do taloženja boratnog pufera u prisustvu ACN pa je u obzir uzeta manja koncentracija boratnog pufera od 25 mM. Bitno je još bilo provjeriti utjecaj male varijacije u volumnom udjelu CLF u ekstrakcijskoj smjesi na učinkovitost DLLME u kombinaciji s navedenim pomoćnim uvjetima i povoljnijom izvedbom. Prema dijagramu iz Slike 15 određeni su granični volumeni CLF za DLLME s 400 µL smjese ACN i CLF te 100 µL uzorka kako bi došlo do nastanka stabilne emulzije koja se razdvaja na dva sloja injektiranjem u 50 µL vodene otopine pufera. Minimalni volumen CLF kako bi se organska frakcija nalazila u donjem sloju iznosi 120 µL, dok je 240 µL maksimalni mogući volumen s obzirom na ACN već prisutan u supernatantu. Srednja vrijednost od 162 µL uzeta je iz optimalnih uvjeta dobivenih prethodno.

U uzorke od 50 µL plazme dodani su standardi do konačne koncentracije 20 µg/mL i razrijeđeno je vodom do 100 µL. PPT je izveden pomoću ACN, a frakcija supernatanta u kojoj je prisutno 160 µL ACN je odvojena. Zatim su dodani CLF u volumenu i ACN do konačnog volumena: a) 240 µL CLF i 160 µL ACN, b) 162 µL CLF i 238 µL ACN, c) 120 µL CLF i 280

μL ACN. Svaka dobivena smjesa je injektirana u $50 \mu\text{L}$ 25 mM boratnog pufera, vorteksirana te je dodano $50 \mu\text{L}$ 10% -tne (w/V) vodene otopine natrijevog klorida za isoljavanje. Nakon ponovnog vorteksiranja i centrifugiranja, organski slojevi su odvojeni i upareni, a suhi ostaci su otopljeni u $40 \mu\text{L}$ 65% (V/V) MeOH i analizirani HPLC metodom za bifenilnu kolonu. Dobiveni rezultati (Tablica 13) predočeni su na Slici 18 kao ovisnost ekstrakcijskih prinosa o korištenom volumenu CLF.



Slika 18. Ovisnost ekstrakcijskih prinosa za pojedini analit o volumenu CLF (μL) korištenom u pretpostavljenim optimalnim uvjetima DLLME. Prinosi su izraženi u postotku iz omjera površina pikova analita obrađenog uzorka obogaćene plazme i površina pikova analita plazme obogaćene standardima nakon obrade ($20 \mu\text{g}/\text{mL}$, prema podacima iz Tablice 13).

Rezultati ukazuju na postojanje raspona udjela CLF u ekstrakcijskoj smjesi koji donosi slične, zadovoljavajuće prinose. Kako je ACN ujedno sredstvo taloženja i disperzivno sredstvo, moguće je dodati ga odmah u suvišku, zatim odvojiti supernatant i dodati potreban volumen CLF da bi se dobila smjesa istog sastava. Ovakav pristup ekstrakciji uz izostanak uparavanja supernatanta ujedno pojednostavljuje i bitno skraćuje postupak obrade uzorka uz korištenje minimalnih volumena organskih otapala i uzorka. Ekstrakcijski prinosi u ovim uvjetima su podjednaki ili manji od prinosa u optimalnim uvjetima izvedbe DLLME koja zahtijeva uparavanje supernatanta te korištenje viših koncentracija soli i pufera (Tablica 9). Ekstrakcijski prinosi su podjednaki za letrozol, a nešto manji za anastrozol i ribociklib, što je vjerojatno posljedica značajnijeg efekta isoljavanja. Navedeni gubici su prihvatljivi s obzirom na kraće

trajanje pripreme uzorka i jednostavnije, a time i robusnije odvajanje organskog sloja. U usporedbi s podacima iz Tablice 12 prinosi letrozola i anastrozola su za oko 5 % manji. Kako se radi o graničnim volumenima ACN i CLF za uspješnu izvedbu DLLME, manji prinosi su vjerojatno posljedica nastanka manje stabilne emulzije. Injektiranje u veći volumen pufera omogućilo bi korištenje većeg udjela disperzivnog sredstva čime bi nastala stabilnija emulzija, no prinosi bi istovremeno pali uslijed povećanja topljivosti analita u vodenoj fazi. Prinosi analita u literaturi kod primjene DLLME na biološkom uzorku su u rasponu od 33 do 110 % pa su ovdje dobiveni prinosi od okvirno 60 % za anastrozol, 65 % za ribociklib i 70 % za letrozol prihvatljivi u cijelom rasponu volumena CLF korištenom u DLLME. Budući da je odvajanje organskog sloja kod ekstrakcije sa 120 μL CLF otežano, kao optimalni uvjeti mogu se uzeti oni sa 160-240 μL CLF.

6 ZAKLJUČCI

U ovom radu uspješno je razvijena nova HPLC metoda za istovremenu analizu ribocikliba, anastrozola i letrozola kao temelj određivanju navedenih lijekova u plazmi. Od ispitanih kolona najbolje razdvajanje s kratkim vremenom analize i prihvatljivom simetrijom pikova pruža analiza na Phenomenex Kinetex Biphenyl koloni. U razvijenoj metodi korištena je gradijentna elucija mobilnom fazom koja se sastoji od 0,1 % (V/V) vodene otopine mravlje kiseline i 0,1 % (V/V) otopine mravlje kiseline u acetonitrilu.

U ovom radu ispitani su pristupačni načini pripreme uzorka krvne plazme, što uključuje taloženje proteina i disperzivnu mikroekstrakciju tekuće-tekuće. Ispitana je učinkovitost različitih sredstava (acetonitril, amonijev sulfat, natrijev citrat, perklorna kiselina) u taloženju proteina i potrebna količina dodanog agensa za zadovoljavajuću precipitaciju. Također je ispitan utjecaj dodanog sredstva na zaostatak analita u nastalom talogu. Acetonitril je određen kao optimalno sredstvo za taloženje u volumenu barem četiri puta većem od volumena plazme. Omogućuje kvantitativno taloženje proteina uz zadovoljavajuće prinose i minimalni zaostatak analita u talogu. Jednostavnost i brzina izvedbe su glavne prednosti ove tehnike, no nije selektivna te u uzorku zaostaju onečišćenja matriksa.

Stoga su s ciljem boljeg pročišćavanja uzorka u ovom radu ispitani i različiti pristupi DLLME:

1. Primijenjeni su postupci iz literature i ispitani su alternativni pristupi ekstrakcijama poput SA-DLLME i višekratne DLLME.
2. Ispitani su utjecaji različitih kombinacija ekstrakcijskog (kloroform, diklormetan) i disperzivnog sredstva (acetonitril, metanol) i pripadnih volumena na ekstrakcijske prinose te apsolutnih volumena organskih i vodenih sastavnica za uspješnu izvedbu DLLME.
3. Ispitan je utjecaj pH, soniciranja i isoljavanja na ekstrakcijske prinose te njihove granične vrijednosti.
4. Ispitan je najpogodniji način izvođenja DLLME s obzirom na ekstrakcijske prinose analita, vrijeme trajanja postupka i korištenje minimalnih volumena otapala.

Od mogućih izvedbi kao najbolji omjer prinosa, trajanja postupka i jednostavnosti pokazala se priprema smjese uzorka, disperzivnog i ekstrakcijskog sredstva koja se injektira u vodenu otopinu boratnog pufera, a zatim joj se doda otopina natrijevog klorida za isoljavanje. Kao ekstrakcijsko sredstvo najviše ekstrakcijske prinose donosi kloroform u kombinaciji s acetonitrilom kao disperzivnim sredstvom. Od ispitanih uvjeta odnos volumena uzorka i

organskih sastavnica u omjeru 1:4 pokazao se najboljim zbog zadovoljavanja uvjeta ternarne smjese i minimalne topljivosti analita u vodenoj fazi. Unutar tih zahtjeva, volumeni kloroforma i acetonitrila korišteni u DLLME s kojima su prinosi prihvatljivi su u širokom rasponu. Optimalni pomoćni uvjeti isključuju korištenje ultrazvučne kupelji zbog mogućeg raspada ribocikliba. Zaluživanje je nužno kako bi se ribociklib preveo u neionizirani oblik i time se omogućila učinkovita ekstrakcija, a u tu svrhu je korišten boratni pufer pH 9,3 u koncentraciji 25 mM. Dodatak 10 %-tne (w/V) vodene otopine natrijevog klorida nakon provođenja DLLME efektom isoljavanja omogućava veće ekstrakcijske prinose analita. Više koncentracije pufera i natrijevog klorida pokazale su bolje prinose, ali i nepovoljan utjecaj na jednostavnost izvođenja DLLME pa su navedene koncentracije prihvatljiv kompromis. Predložena metoda pripreme biološkog uzorka omogućava relativno kratku i za rukovanje jednostavnu obradu uzorka, a ujedno pruža i prihvatljive ekstrakcijske prinose te značajno pročišćavanje.

Ovaj rad daje prijedlog obrade uzorka krvne plazme s fokusom na istovremenu ekstrakciju ribocikliba, anastrozola i letrozola te prijedlog analitičke metode za istovremenu HPLC analizu navedenih lijekova. Predložen je novi pristup DLLME iz biološkog uzorka primjenom malih volumena uzorka i organskih otapala. Uz optimiziranu tehniku pripreme uzorka krvne plazme, razvijena kromatografska metoda za određivanje lijekova od interesa predstavlja temelje daljnjem razvoju bioanalitičke metode za terapijsko praćenje u liječenju HR+, HER2-metastatskog raka dojke.

7 ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Mirandi Sertić na pruženoj prilici, savjetima i pomoći u izradi ovog rada.

Zahvaljujem asistentici Lu Turković na savjetima, pomoći u provođenju eksperimentalnog dijela i izradi rada, strpljenju i motivaciji za znanstveni rad.

Zahvaljujem članovima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova na društvu u laboratoriju i pruženim savjetima.

Zahvaljujem obitelji i prijateljima na pruženoj podršci.

8 POPIS LITERATURE

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
- [2] American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020. *American Cancer Society, Inc.* 2019.
- [3] Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol.* 2012;23:207-210. doi:10.1093/annonc/mds326
- [4] Sinn H-P, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care.* 2013;8(2):149-154. doi:10.1159/000350774
- [5] Tan PH, Ellis I, Allison K, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology.* 2020;77(2):181-185. doi:https://doi.org/10.1111/his.14091
- [6] Akram M, Iqbal M, Daniyal M, Khan AU. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017;50(1):33. doi:10.1186/s40659-017-0140-9
- [7] Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(4):245-262. doi:10.1677/ERC-10-0136
- [8] Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA.* 2019;321(3):288-300. doi:10.1001/jama.2018.19323
- [9] Puztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular Classification of Breast Cancer: Limitations and Potential internetska stranica. *Oncologist.* 2006;11(8):868-877. doi:10.1634/theoncologist.11-8-868
- [10] Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology (Phila).* 2017;49(2):111-119. doi:10.1016/j.pathol.2016.10.012
- [11] Kwapisz D. Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;166(1):41-54. doi:10.1007/s10549-017-4385-3

- [12] Jameera Begam A, Jubie S, Nanjan MJ. Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: A critical review. *Bioorganic Chem.* 2017;71:257-274. doi:10.1016/j.bioorg.2017.02.011
- [13] Syed YY. Ribociclib: First Global Approval. *Drugs.* 2017;77(7):799-807. doi:10.1007/s40265-017-0742-0
- [14] Wellington K, Faulds DM. Anastrozole. *Drugs.* 2002;62(17):2483-2490. doi:10.2165/00003495-200262170-00010
- [15] Cohen MH, Johnson JR, Li N, Chen G, Pazdur R. Approval Summary: Letrozole in the Treatment of Postmenopausal Women with Advanced Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8(3):665-669.
- [16] Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, et al. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(18):1738-1748. doi:10.1056/NEJMoa1609709
- [17] Im S-A, Lu Y-S, Bardia A, et al. Overall Survival with Ribociclib plus Endocrine Therapy in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(4):307-316. doi:10.1056/NEJMoa1903765
- [18] Ates HC, Roberts JA, Lipman J, Cass AEG, Urban GA, Dincer C. On-Site Therapeutic Drug Monitoring. *Trends Biotechnol.* 2020;38(11):1262-1277. doi:10.1016/j.tibtech.2020.03.001
- [19] Verheijen RB, Yu H, Schellens JHM, Beijnen JH, Steeghs N, Huitema ADR. Practical Recommendations for Therapeutic Drug Monitoring of Kinase Inhibitors in Oncology. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;102(5):765-776. doi:10.1002/cpt.787
- [20] Groenland SL, van Nuland M, Verheijen RB, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Oral Anti-Hormonal Drugs in Oncology. *Clin Pharmacokinet.* 2019;58(3):299-308. doi:10.1007/s40262-018-0683-0
- [21] Braal CL, Jongbloed EM, Wilting SM, Mathijssen RHJ, Koolen SLW, Jager A. Inhibiting CDK4/6 in Breast Cancer with Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib: Similarities and Differences. *Drugs.* 2021;81:317-331. doi:10.1007/s40265-020-01461-2

- [22] Nováková L. Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography–mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *J Chromatogr A*. 2013;1292:25-37. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.087
- [23] Moein MM, El Beqqali A, Abdel-Rehim M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *J Chromatogr B*. 2017;1043:3-11. doi:10.1016/j.jchromb.2016.09.028
- [24] Buszewski B, Szultka M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Crit Rev Anal Chem*. 2012;42(3):198-213. doi:10.1080/07373937.2011.645413
- [25] Zgoła-Grześkowiak A, Grześkowiak T. Dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC Trends Anal Chem*. 2011;30(9):1382-1399. doi:10.1016/j.trac.2011.04.014
- [26] Sato Y, Shigeta K, Hirasawa T, et al. Establishment of an analytical method for simultaneous quantitation of CDK4/6 inhibitors, aromatase inhibitors, and an estrogen receptor antagonist in human plasma using LC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B*. 2021;1173:122655. doi:10.1016/j.jchromb.2021.122655
- [27] Posocco B, Buzzo M, Poetto AS, et al. Simultaneous quantification of palbociclib, ribociclib and letrozole in human plasma by a new LC-MS/MS method for clinical application. *PLOS ONE*. 2020;15(2):e0228822. doi:10.1371/journal.pone.0228822
- [28] Locatelli M, Tinari N, Grassadonia A, et al. FPSE-HPLC-DAD method for the quantification of anticancer drugs in human whole blood, plasma, and urine. *J Chromatogr B*. 2018;1095:204-213. doi:10.1016/j.jchromb.2018.07.042
- [29] Beer B, Schubert B, Oberguggenberger A, Meraner V, Hubalek M, Oberacher H. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of tamoxifen, anastrozole, and letrozole in human plasma and its application to a clinical study. *Anal Bioanal Chem*. 2010;398(4):1791-1800. doi:10.1007/s00216-010-4075-z
- [30] Kala A, Patel YT, Davis A, Stewart CF. Development and validation of LC-MS/MS methods for the measurement of ribociclib, a CDK4/6 inhibitor, in mouse plasma and Ringer's solution and its application to a cerebral microdialysis study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2017;1057:110-117. doi:10.1016/j.jchromb.2017.05.002

- [31] Leenhardt F, Gracia M, Perrin C, et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the quantification of CDK4/6 inhibitors in human plasma in a clinical context of drug-drug interaction. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;188:113438. doi:10.1016/j.jpba.2020.113438
- [32] Dan S, Mandal P, Ghosh B, Das A, Pal T. Bioanalytical Method Development and Validation of Letrozole by LC-ESI-MS/MS in Human Plasma. *J Anal Pharm Res.* 2017;4(1):00093. doi:10.15406/japlr.2017.04.00093
- [33] Precht JC, Ganchev B, Heinkele G, Brauch H, Schwab M, Mürdter TE. Simultaneous quantitative analysis of letrozole, its carbinol metabolite, and carbinol glucuronide in human plasma by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(1):301-308. doi:10.1007/s00216-012-5813-1
- [34] Zarghi A, Foroutan SM, Shafaati A, Khoddam A. HPLC Determination of Letrozole in Plasma Using Fluorescence Detection: Application to Pharmacokinetic Studies. *Chromatographia.* 2007;66(9):747-750. doi:10.1365/s10337-007-0381-9
- [35] Galla VK, Jinka R, Sahu PK. Separate quantification of anastrozole and letrozole by a novel stability-indicating ultra-fast LC method. *Sep Sci PLUS.* 2020;3(7):294-305. doi:https://doi.org/10.1002/sscp.202000018
- [36] Bao X, Wu J, Sanai N, Li J. Determination of total and unbound ribociclib in human plasma and brain tumor tissues using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2019;166:197-204. doi:10.1016/j.jpba.2019.01.017
- [37] Apostolou C, Dotsikas Y, Kousoulos C, Loukas YL. Development and validation of an improved high-throughput method for the determination of anastrozole in human plasma by LC–MS/MS and atmospheric pressure chemical ionization. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;48(3):853-859. doi:10.1016/j.jpba.2008.06.006
- [38] Dhakne P, Sahu AK, Sharma MK, Sengupta P. Simultaneous quantification of abemaciclib and letrozole in rat plasma: method development, validation and pharmacokinetic application. *Biomed Chromatogr.* 2020;34(6):e4825. doi:https://doi.org/10.1002/bmc.4825
- [39] Ganesh M, Rajasekar K, Bhagiyalakshmi M, Vinoba M, Saktimanigandan K, Jang HT. Determination of Letrozole in Tablet Formulations by Reversed Phase High

- Performance Liquid Chromatography. *Trop J Pharm Res.* 2010;9(5). doi:10.4314/tjpr.v9i5.61071
- [40] Rodríguez J, Castañeda G, Muñoz L. Rapid determination of letrozole, citalopram and their metabolites by high performance liquid chromatography-fluorescence detection in urine: Method validation and application to real samples. *J Chromatogr B.* 2013;913-914:12-18. doi:10.1016/j.jchromb.2012.11.015
- [41] Kumar DS, Harani A, Sridhar D, et al. Development and Validation of a HPLC Method for Determination of Anastrozole in Tablet Dosage Form. *E-J Chem.* 2011;8(2):794-797. doi:10.1155/2011/909064
- [42] Daphal VN, Holkar G, Yadav R, Rokade M, Jhabarmal J. Development and Validation of Simultaneous Determination of Anastrozole and Temozolomide in Pharmaceutical Dosage Forms. *International Journal of Theoretical & Applied Sciences.* 2012;4(2):48-55.
- [43] Martínez-Chávez A, Rosing H, Hillebrand M, Tibben M, Schinkel AH, Beijnen JH. Development and validation of a bioanalytical method for the quantification of the CDK4/6 inhibitors abemaciclib, palbociclib, and ribociclib in human and mouse matrices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2019;411(20):5331-5345. doi:10.1007/s00216-019-01932-w
- [44] Mendes GD, Hamamoto D, Ilha J, Pereira A dos S, De Nucci G. Anastrozole quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to photospray tandem mass spectrometry applied to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B.* 2007;850(1):553-559. doi:10.1016/j.jchromb.2006.11.044
- [45] Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *J Chromatogr A.* 2010;1217(16):2342-2357. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.088
- [46] Yan H, Wang H. Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr A.* 2013;1295:1-15. doi:10.1016/j.chroma.2013.04.053
- [47] Rezaee M, Yamini Y, Hojjati M, Faraji M. Novel extraction method based on the dispersion of the extraction solvent for extraction of letrozole from biological fluids. *Anal Methods.* 2010;2(9):1341-1345. doi:10.1039/C0AY00131G

- [48] Talebianpoor MS, Khodadoust S, Rozbehi A, et al. Application of optimized dispersive liquid–liquid microextraction for determination of melatonin by HPLC–UV in plasma samples. *J Chromatogr B*. 2014;960:1-7. doi:10.1016/j.jchromb.2014.04.013
- [49] Mabrouk MM, Soliman SM, El-Agizy HM, Mansour FR. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for determination of three gliflozins in human plasma by HPLC/DAD. *J Chromatogr B*. 2020;1136:121932. doi:10.1016/j.jchromb.2019.121932
- [50] Fernández P, González C, Pena MT, Carro AM, Lorenzo RA. A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples. *Anal Chim Acta*. 2013;767:88-96. doi:10.1016/j.aca.2013.01.016
- [51] Fernández P, Taboada V, Regenjo M, et al. Optimization of ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction of six antidepressants in human plasma using experimental design. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;124:189-197. doi:10.1016/j.jpba.2016.02.041
- [52] Fernández P, Regenjo M, Bermejo AM, Fernández AM, Lorenzo RA, Carro AM. Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *J Appl Toxicol*. 2015;35(4):418-425. doi:https://doi.org/10.1002/jat.3035
- [53] Zhang Y, Chen X, Li J, Hu S, Wang R, Bai X. Salt-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for enhancing the concentration of matrine alkaloids in traditional Chinese medicine and its preparations. *J Sep Sci*. 2018;41(18):3590-3597. doi:https://doi.org/10.1002/jssc.201701504
- [54] Ma H, Li Y, Zhang H, Shah SM, Chen J. Salt-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with programmed temperature vaporization gas chromatography–mass spectrometry for the determination of haloacetonitriles in drinking water. *J Chromatogr A*. 2014;1358:14-19. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.021
- [55] Rashidipour M, Heydari R, Maleki A, Mohammadi E, Davari B. Salt-assisted liquid–liquid extraction coupled with reversed-phase dispersive liquid–liquid microextraction for sensitive HPLC determination of paraquat in environmental and food samples. *J Food Meas Charact*. 2019;13(1):269-276. doi:10.1007/s11694-018-9941-y

- [56] DrugBank Online. Ribociclib: Uses, Interactions, Mechanism of Action internet stranica. Ažurirano 2021. Pristupljeno 12. travnja 2021. <https://go.drugbank.com/drugs/DB11730>
- [57] DrugBank Online. Anastrozole: Uses, Interactions, Mechanism of Action internet stranica. Ažurirano 2021. Pristupljeno 12. travnja 2021. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01217>
- [58] DrugBank Online. Letrozole: Uses, Interactions, Mechanism of Action internet stranica. Ažurirano 2021. Pristupljeno 12. travnja 2021. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01006>
- [59] Chen S-Y, Chen W-C, Chang SY. Cyclodextrin-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the preconcentration of carbamazepine and clobazam with subsequent sweeping micellar electrokinetic chromatography. *J Sep Sci.* 2018;41(8):1871-1879. doi:10.1002/jssc.201701096
- [60] Hori T, Fujinaga T. Analytical use of solvent extraction with acetonitrile/water/chloroform and 1-propanol/water/cyclohexane mixtures. *Talanta.* 1985;32(8, Part 2):735-743. doi:10.1016/0039-9140(85)80176-4

9 SAŽETAK

Natan Koraj

Razvoj kromatografske metode i optimizacija pripreme biološkog uzorka kao preduvjet terapijskom praćenju lijekova za rak dojke

Ribociklib u kombinaciji s letrozolom ili anastrozolom pokazuje veliku učinkovitost u liječenju uznapredovalog HR+, HER2- raka dojke kod žena u menopauzi, no varijabilnost odgovora na terapiju između pacijenata predstavlja nezanemarivi nedostatak. Terapijsko praćenje navedenih lijekova (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM) moglo bi uvelike poboljšati ishode terapije te smanjiti incidenciju nuspojava. Preduvjet za uspješno TDM je postojanje odgovarajuće bioanalitičke metode. U analizi bioloških uzoraka zbog niskih koncentracija analita i složenog matriksa ključna je pravilna priprema uzorka. U ovom radu razvijena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) koja omogućuje simultanu analizu odabranih lijekova te su istražene mogućnosti pripreme biološkog uzorka. Ispitani su najpovoljniji uvjeti taloženja proteina te je razvijena i optimizirana metoda disperzivne mikroekstrakcije tekuće-tekuće (engl. *dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME).

U razvoju HPLC metode određena je najprikladnija stacionarna faza i optimalni sastav pokretne faze te uvjeti gradijentne elucije. U svrhu pripreme uzorka, za taloženje proteina ispitana su različita sredstva i potrebni volumeni s fokusom na učinkovitost pročišćavanja uzorka i dobivanja visokih prinosa. Za daljnju pripremu optimiziran je postupak DLLME. Ispitani su različiti načini izvedbe DLLME uz odabir ekstrakcijskog i disperzivnog sredstva. Kako bi se postupak maksimalno pojednostavnio i očuvali se što viši ekstrakcijski prinosi, ispitani su optimalni volumeni sastavnica za uspješnu DLLME, uzimajući u obzir korištenje što manjih volumena organskih otapala i uzorka. Još su određeni pomoćni uvjeti što uključuje DLLME potpomognutu izoliranjem i soniciranjem te polazni pH. Ispitan je njihov utjecaj na ekstrakcijske prinose, robusnost tehnike i stabilnost analita. Dobiveni rezultati pružaju uvid u utjecaj određenih parametara na učinkovitost DLLME, a zajedno s razvijenom HPLC metodom postavljaju temelje za daljnji razvoj bioanalitičke metode u svrhu TDM, koji prelazi okvire ovog istraživanja.

KLJUČNE RIJEČI: ribociklib, inhibitori aromataze, terapijsko praćenje lijekova, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, priprema biološkog uzorka, disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće

10 SUMMARY

Development of a chromatographic method and optimisation of biological sample preparation as a precondition for therapeutic drug monitoring of breast cancer drugs

Ribociclib in combination with letrozole or anastrozole shows great efficacy in the treatment of advanced HR+, HER2- breast cancer in postmenopausal women, but variability in treatment response represents a significant drawback. Therapeutic drug monitoring (TDM) of the aforementioned drugs could have a positive influence on the treatment outcomes and reduce the incidence of adverse effects. The main precondition for successful TDM is the existence of a suitable bioanalytical method. Due to low analyte concentrations and complex matrix interferences, sample preparation is a key aspect in the analysis of biological samples. In this work, a high performance liquid chromatography (HPLC) method that enables simultaneous determination of said drugs was developed and sample preparation options were investigated. Protein precipitation and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) conditions were optimized for the simultaneous extraction of ribociclib, anastrozole and letrozole.

In the development of the HPLC method the most suitable stationary phase and optimal composition of mobile phase were determined, as well as gradient elution conditions. For sample preparation purposes, different agents in protein precipitation and their required volumes were examined with attention to sample clean-up and high analyte recoveries. In further sample preparation, a DLLME procedure was optimised. Different modes of DLLME execution and combinations of dispersive and extracting solvents were tested. To simplify the process and to achieve high extraction yields, optimal component volumes for a successful DLLME were examined, taking into account the use of minimal volumes of the organic solvents and the sample. Additional parameters including ultrasound assisted DLLME, salting out and pH adjustment were also investigated. The effects of the additional parameters on extraction recoveries, technique robustness and analyte stability were examined. The obtained results offer insight into the effects of the DLLME conditions on extraction efficiency, and, together with the developed HPLC method, set the foundations for further development of TDM as a part of research that goes beyond the scope of this work.

KEYWORDS: ribociclib, aromatase inhibitors, therapeutic drug monitoring, high performance liquid chromatography, biological sample preparation, dispersive liquid-liquid microextraction