

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivor Babić

**Razvoj i validacija prve kapilarnoelektroforetske metode
za analizu novog antitumorskog lijeka alpelisiba – zeleno rješenje**

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirande Sertić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./2023.

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



KRATICE

ACS Američko kemijsko društvo (engl. *American Chemical Society*)

AGREE – (engl. Analytical GREENness Metric Approach and Software)

CZE – kapilarna zonska elektroforeza (engl. *capillary zone electrophoresis*)

DAD detektor s nizom dioda (engl. *diode-array detector*)

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

ER – estrogenski receptor (engl. *estrogen receptor*)

GAPI – indeks zelenosti analitičkog postupka (engl. *green analytical procedure index*)

GHS – Globalno usklađeni sustav razvrstavanja i označavanja kemikalija (engl. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*)

HER2 – humani epidermalni faktor rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor 2*)

HPCE – kapilarna elektroforeza visoke djelotvornosti (engl. *high-performance capillary electrophoresis*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

HR – hormonski receptor (engl. *hormone receptor*)

ICH Međunarodno vijeće za usklađivanje (engl. *International Council for Harmonisation*)

LOQ – granica određivanja (engl. *limit of quantitation*)

MEKC – micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *micellar electrokinetic chromatography*)

PBT – postojanost, bioakumulacija i otrovnost (engl. *persistence, bioaccumulation and toxicity*)

SDS – natrijev dodecilsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*)

TRI – Inventar ispuštanja toksičnih tvari (engl. *Toxic Release Inventory*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rak dojke.....	1
1.2. Klasifikacija raka dojke i predviđanje odgovora na terapiju.....	1
1.3. Alpelisib	3
1.4. Kapilarna elektroforeza	4
1.4.1. Načelo tehnike kapilarne elektroforeze	4
1.4.2. Uređaj za kapilarnu elektroforezu	7
1.4.3. Kapilarna zonska elektroforeza	8
1.4.4. Micelarna elektrokinetička kromatografija	8
1.5. Pregled postojećih metoda za analizu alpelisiba	9
1.6. Zelena kemija	10
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Standardne supstancije i gotovi ljekoviti oblici.....	14
3.1.3. Radni instrumenti i pribor	14
3.1.4. Programski paketi	15
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Priprema radnog pufera za analizu.....	15
3.2.2. Priprema radnih standardnih otopina za analizu	15
3.2.3. Priprema gotovog ljekovitog oblika za analizu	16
3.2.4. Uvjeti kapilarnoelektroforetske analize.....	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. Odabir unutarnjeg standarda	18
4.2. Optimizacija koncentracije boratnog pufera	18
4.3. Utjecaj dodatka surfaktanta.....	20
4.4. Utjecaj dodatka organskog otapala	23
4.5. Utjecaj temperature	24
4.6. Utjecaj primijenjenog napona	25
4.7. Validacija metode.....	27

4.7.1. Specifičnost/selektivnost	27
4.7.2. Linearnost, granica određivanja i granica dokazivanja	27
4.7.3. Preciznost	28
4.7.4. Točnost.....	29
4.7.5. Izdržljivost metode	29
4.8. Primjena novorazvijene metode za analizu gotovog ljekovitog oblika.....	30
4.9. Zelenost metode	31
4.9.1. Procjena zelenosti novorazvijene metode prema smjernicama ACS-a	31
4.9.2. Procjena zelenosti novorazvijene metode prema Eco-Scale metodi	32
4.9.3. Procjena zelenosti novorazvijene metode prema GAPI-ju	32
4.9.4. Procjena zelenosti novorazvijene metode prema AGREE metodi.....	34
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. ZAHVALE.....	37
7. POPIS LITERATURE	38
8. SAŽETAK	41
9. SUMMARY	42
10. ŽIVOTOPIS	43

1. UVOD

1.1. Rak dojke

Rak je vodeći svjetski uzrok smrti s procijenjenih 19,3 milijuna novih slučajeva i gotovo 10 milijuna smrti u 2020. godini. Do kraja 2020. godine 7,8 milijuna žena dobilo je dijagnozu raka dojke u posljednjih 5 godina, a to ga čini najčešće dijagnosticiranim zloćudnim tumorom. Sa 685 000 smrtnih slučajeva u 2020. godini bio je peti vodeći uzrok smrtnosti od raka (Sung i sur., 2021). U Hrvatskoj je učestalost raka dojke kod žena znatno viša od europskog prosjeka (94/100 000, u odnosu na 68/100 000) (Damjanov i sur., 2014).

Karcinom dojke zloćudni je epitelni tumor dojke. Većinom nastaje u mliječnim žlijezdama ili odvodnim kanalima koji ih povezuju s bradavicama, a posljedica je sloma regulacijskih mehanizama koji upravljaju normalnim ponašanjem stanice. U normalnim stanicama proliferacija, diferencijacija i preživljavanje stanice precizno su regulirani. U stanicama raka ta je regulacija narušena i one nekontrolirano rastu, dijele se i šire po čitavom organizmu. Maligni tumor dojke može se proširiti na okolna tkiva ili udaljene dijelove organizma putem krvožilnog ili limfatičkog sustava. Najčešće prvo metastazira u limfne čvorove, stoga se obično kod raka dojke vade limfni čvorovi kako bi se uklonila mogućnost daljnjeg širenja.

Simptomi najčešće nisu prisutni dok je tumor još malen, a u tom je stadiju terapija najučinkovitija. Iz tog je razloga bitna rana detekcija redovitom primjenom mamografije. Najčešći je znak bolesti prisutnost bezbolne kvržice na dojci. U nekim slučajevima tumor se proširi na limfne čvorove ispod pazuha i uzrokuje kvržicu ili oticanje čak i prije nego što tumor u dojci postane dovoljno velik da se osjeti. Manje česti simptomi uključuju bol u grudima i trajne promjene poput oticanja, zadebljanja ili crvenila kože, promjene bradavice te iscjedak (www.cancer.org).

1.2. Klasifikacija raka dojke i predviđanje odgovora na terapiju

Karcinom dojke izrazito je heterogena skupina bolesti, stoga je klasifikacija bolesti neophodna za predviđanje odgovora na terapiju i za odabir najbolje terapijske opcije. Histopatološka klasifikacija temelji se na morfološkim različitostima, a uključuje oko 20 tipova tumora i 18 podtipova. Oko 70-80% svih karcinoma dojke pripada jednoj od 2 najčešće histološke skupine: invazivni duktalni karcinom ili invazivni lobularni karcinom. Histološka klasifikacija nije dovoljna za pouzdano predviđanje odgovora na terapiju i prognozu bolesti jer unutar jedne skupine tumori mogu imati

različite značajke. Međutim, pravilna identifikacija manje zastupljenih tipova tumora i varijanti glavnih tipova olakšava odabir terapije (Viale, 2012).

Istraživanjima raka dojke otkriveni su biomarkeri koji se mogu iskoristiti za odabir terapije. Estrogenski receptor i receptor za epidermalni faktor rasta 2 ključni su biomarkeri, a njihova se ekspresija na tumorskim stanicama određuje imunohistokemijskim metodama.

Estrogenski receptori (engl. *estrogen receptor*, ER) pripadaju steroidnim receptorima, a smješteni su u jezgri stanice, gdje su vezani za sekvencu DNA i inaktivni su. U inaktivnoj konformaciji stabiliziraju ih proteini toplinskog šoka. Kad se veže estrogen, odvoje se proteini toplinskog šoka i dolazi do dimerizacije receptora, pri čemu nastali dimer djeluje kao transkripcijski faktor koji regulira gensku ekspresiju. Neki od gena koji su regulirani steroidnim receptorima nadziru stanični rast i utječu na proliferaciju. Tumore koji su pozitivni na estrogenski receptor ženski spolni hormoni potiču na zloćudno ponašanje i rast. Hormonska terapija kod ER pozitivnih tumora dojke podrazumijeva primjenu lijekova koji inhibiraju utjecaj spolnih hormona na tumorske stanice. Uz ER značajnu sposobnost predviđanja odgovora na hormonsku terapiju ima i ekspresija progesteronskih receptora, koja je u 99% slučajeva u korelaciji s ekspresijom ER, a zajedno se nazivaju hormonski receptori (engl. *hormone receptor* HR). To znači da će gotovo svi ER pozitivni tumori ekspimirati i progesteronske receptore.

HER2 receptor (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) transmembranski je glikoprotein i uključen je u kontrolu staničnog rasta (Damjanov i sur., 2014). Povišena ekspresija HER2 receptora u korelaciji je s većom vjerojatnosti relapsa bolesti i kraćim preživljavanjem bolesti, a u isto vrijeme omogućuje predviđanje odgovora na terapiju protutijelima. HER2 pretjerano je ekspimiran u 15 – 20 % karcinoma dojke i to ga čini dobrom metom lijekova (Damjanov i sur., 2014). Normalne stanice slabo ekspimiraju HER2 receptore, što omogućuje selektivno djelovanje lijekova koji se koriste kod HER2 pozitivnog karcinoma dojke.

S obzirom na ekspresiju navedenih biomarkera rak dojke može biti HER2- s HR+, HER2+ s HR+/HR- ili trostruko negativni tip. Trostruko negativni tip je onaj kod kojeg stanice nemaju ni hormonske receptore ni povećanu ekspresiju HER2. Javlja se u oko šestine svih bolesnica s rakom dojke, s najagresivnijim ponašanjem i najgorom prognozom od svih podtipova raka dojke. (Tečić Vuger i sur., 2020).

1.3. Alpelisib

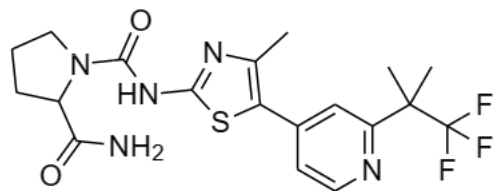
U terapiji raka dojke razlikujemo lokalne i sistemske oblike terapije. Lokalni oblici terapije nemetastatskog tumora podrazumijevaju kirurške zahvate i radioterapiju, koja se provodi 4 – 8 tjedana nakon operacije ako nije indicirana kemoterapija. Kirurški zahvati dijele se na one s očuvanjem tkiva dojke i na zahvate bez očuvanja tkiva dojke (mastektomija). Sustavno liječenje metastatskih i nemetastatskih tumora uključuje primjenu kemoterapije, terapije protutijelima i hormonske terapije, a odabir terapije ovisi o tumorskom fenotipu, stadiju bolesti i o parametrima kao što su dob i komorbiditeti pacijentice (Šeparović i sur., 2015).

Hormonska terapija indicirana je u liječenju svih ER i PR pozitivnih tumora dojke, neovisno o razini ekspresije hormonskih receptora. Izbor hormonske terapije temelji se prije svega na menopausalnom statusu pacijentica. Uključuje antagoniste i selektivne modulatore ER ili inhibitore aromataze, a po potrebi i kemoterapiju. Za liječenje HER2 pozitivnih tumora imamo ciljane protutijela za HER2 i inhibitore tirozin-kinaze, a ako je tumor i HR pozitivan, može se uključiti i hormonska terapija. U terapiji trostruko negativnih tumora zbog nedostatka biomarkera temelj liječenja i dalje je klasična citotoksična kemoterapija (Šeparović i sur., 2015).

Alpelisib je noviji lijek za tumor dojke (Slika 1). Odobren je 2019. od strane FDA-a za liječenje žena u postmenopauzi i muškaraca s rakom dojke koji je lokalno napredovao ili je metastazirao u druge dijelove tijela. Može se koristiti kod raka dojke koji je HR pozitivan i HER2 negativan, a koji ima PIK3CA mutaciju. Kod pacijenata čije tumorske stanice imaju tu mutaciju stvara se abnormalni oblik enzima PI3K, koji stimulira diobu i nekontroliran rast tumorskih stanica. Alpelisib je dizajniran da inhibira aktivnost abnormalnog enzima PI3K, tako smanjuje nekontrolirani rast i širenje raka. Primjenjuje se u kombinaciji s fulvestrantom (antagonist ER) ukoliko se samostalna hormonska terapija pokaže neuspješnom (www.ema.europa.eu)

U fazi III kliničkih ispitivanja napravljena je studija s ukupno 572 bolesnika, pri čemu su neki imali rak dojke s PIK3CA mutacijom, a drugi bez te mutacije. Za 85.6% bolesnika uključenih u ispitivanje smatralo se da imaju bolest rezistentnu na hormonsku terapiju. Tijekom ispitivanja jedan dio bolesnika primao je alpelisib s fulvestrantom, a ostali su primali placebo u kombinaciji s fulvestrantom. Rezultati su ukazali na kliničku učinkovitost alpelisiba jer je ukupna stopa odgovora u skupini koja je primala alpelisib s fulvestrantom bila 35.7%, a 16.2% u skupini koja je primala placebo s fulvestrantom (www.ema.europa.eu)

Alpelisib ima molekulska masu 441,5 g/mol. On je bazična molekula, a pKa vrijednosti konjugiranih kiselina iznose 3,3 i 9,4. Ima malu topljivost u vodi, najveću pri pH 1 (3,42 mg/mL) jer pri tako niskoj pH-vrijednosti ima 2 pozitivno nabijene skupine. Ukoliko je pH 3 ili više, praktički je netopljiv (0,02 mg/mL) u vodi (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alpelisib).



Slika 1. Alpelisib

1.4. Kapilarna elektroforeza

1.4.1. Načelo tehnike kapilarne elektroforeze

Kapilarna elektroforeza visoke djelotvornosti (engl. *high-performance capillary electrophoresis*, HPCE) relativno je nova separacijska i kvantifikacijska analitička tehnika. Elektroforeza je razdvajanje nabijenih čestica na temelju različite brzine kretanja u vanjskom električnom polju. Prvi elektroforetski eksperimenti provedeni su još u 18. stoljeću. Arne Tiselius 1948. godine dobio je Nobelovu nagradu za upotrebu elektroforeze u razdvajanju proteina u otopini, a 1981. godine znanstvenici Mikkers, Jorgenson i Tsud razvili su instrument kapilarne elektroforeze kakvim se i danas koristimo. Primjenom kapilarne elektroforeze uklonili su se neki problemi klasične elektroforeze, npr. smanjilo se pregrijavanje pri visokim naponima (chem.libretexts.org). To je dovelo do većeg interesa znanstvenika za daljnjim razvojem tehnike. Tehnika je 2002. godine uvrštena u 4. izdanje Europske farmakopeje. Iako ima brojne prednosti u odnosu na tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC), za razliku od nje rijetko se koristi u rutinskim analizama (Sertić, 2013). Prednosti kapilarne elektroforeze nad HPLC tehnikom jesu kraće vrijeme analize i potreba za manjim volumenima otapala i uzorka, zbog čega je financijski i ekološki prihvatljivija. Iako se ne koristi u rutinskim svakodnevnim analizama, ima vrlo široku primjenu u farmaciji jer omogućuje analizu svih vrsta

analita: proteina, peptida, nukleinskih kiselina, ali i malih organskih molekula kao što su molekule lijekova, anorganskih iona i dr. (Damić i Nigović, 2010).

Osnovni je princip tehnike putovanje električki nabijenih čestica prema jednoj od elektroda pod djelovanjem električnog polja visokog potencijala (10-30 kV). Analiti se u kapilari ispunjenoj otopinom elektrolita razdvajaju na temelju brzine kojom putuju kroz kapilaru zbog različite elektroforetske pokretljivosti. Taj se odnos može prikazati sljedećim izrazom:

$$v = \mu E \quad (1)$$

gdje je v brzina kretanja čestice u kapilari, μ je elektroforetska pokretljivost čestice, a E je jakost primijenjenog električnog polja.

Jakost primijenjenog električnog polja (E) ovisi o naponu koji se primijeni i duljini kapilare:

$$E = \frac{V}{L} \quad (2)$$

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

Elektroforetska pokretljivost dana je sljedećim izrazom:

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

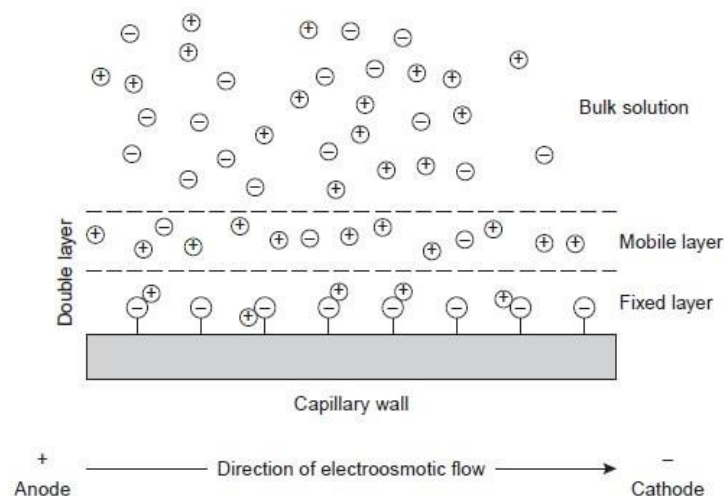
gdje je q naboj čestice koja putuje kroz kapilaru, r je hidrodinamički polumjer čestice (Stokesov polumjer), a η je viskoznost otopine elektrolita.

Ako se povežu jednažbe (1), (2) i (3), dobije se izraz za brzinu putovanja analita kroz kapilaru:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \frac{q}{6\pi\eta r} \cdot \frac{V}{L} \quad (4)$$

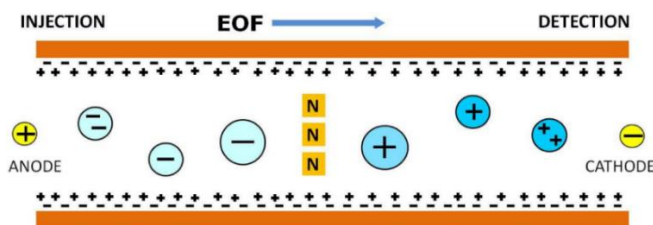
Dakle, brzina putovanja analita u kapilari duljine L , ispunjenoj otopinom elektrolita viskoznosti η i uz primijenjen napon V , ovisi o njihovom naboju i hidrodinamičkom radijusu. Iz jednažbe (4) je jasno da je brzina migracije veća što je radijus manji, a naboj čestice veći. Na radijus ne možemo utjecati, ali na naboj čestice možemo odabirom pH vrijednosti otopine elektrolita. Primjerice, ukoliko je analit kiselog karaktera, povišenjem pH vrijednosti povećat će se udio ioniziranog oblika analita, a time će se povećati i njegova elektroforetska pokretljivost.

Gledajući izraz za brzinu putovanja čestice, čini se kao da se samo nabijeni analiti mogu kretati kroz kapilaru. Međutim, neutralni analiti također putuju kapilaram zbog elektroosmotskog toka. Elektroosmotski tok (engl. *electroosmotic flow*, EOF) jest tok čistog pufera u kapilari, a posljedica je površinskog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare (Sertić, 2013). Unutrašnja površina stijenke kapilare ima na sebi velik broj silanolnih skupina. Silanolne grupe mogu biti negativno nabijene, a udio silanolnih grupa u anionskoj formi povećava se s povišenjem pH vrijednosti otopine elektrolita zbog deprotoniranja. Elektroosmotski tok javlja se kad je pH otopine pufera veći od 3 jer tad SiOH grupe postaju SiO⁻ ioni. EOF je najjači kad je pH veći od 9 jer su tad sve silanolne grupe ionizirane (chem.libretexts.org). Na te negativno nabijene silanolne grupe na unutarnjoj površini stijenke privučeni su pozitivno nabijeni ioni iz elektrolitske otopine kojom je kapilara ispunjena. Na taj način nastaje električni dvosloj koji se sastoji od čvrstog dijela i difuzijskog/mobilnog dijela. Čvrsti dio čine kationi privučeni uz negativno nabijene silanolne skupine, a u difuzijskom dijelu javljaju se kationi i anioni. Kad se na krajevima kapilare primijeni napon, kationi u difuzijskom dijelu dvostrukog sloja bivaju privučeni prema katodi koja je negativno nabijena (Slika 2). S obzirom na to da su kationi u difuzijskom sloju otopljeni, oni kretanjem prema katodi povlače za sobom i okolnu tekućinu. Kretanje okolne tekućine osigurava da se i neutralni i negativno nabijeni analiti kreću prema katodi (Damić i Nigović 2010).



Slika 2. Pojednostavljeni prikaz elektroosmotskog toka (www.brainkart.com)

Velika prednost elektroosmotskog toka je to da se zbog njega svi analiti, neovisno o naboju, kreću u istom smjeru, odnosno prema katodi. Kationi prvi dolaze do detektora, nakon toga slijede neutralne čestice, a najsporije putuju anioni (Slika 3). Iako je elektroforetska pokretljivost aniona usmjerena prema anodi (pozitivno nabijena elektroda), oni putuju kao i ostale čestice prema katodi. To se događa zbog toga što je elektroosmotski tok jači od elektroforetske pokretljivosti, tj. više pridonosi kretanju čestice u kapilari, a uvijek je usmjeren prema katodi. Kationi putuju najbrže jer su EOF i njihova elektroforetska pokretljivost u istom smjeru, tj. prema katodi. Neutralne molekule različitih promjera ne razdvajaju se u kapilari za razliku od nabijenih čestica.



Slika 3. Razlika u brzini putovanja analita kroz kapilaru (Kizilkaya, 2012)

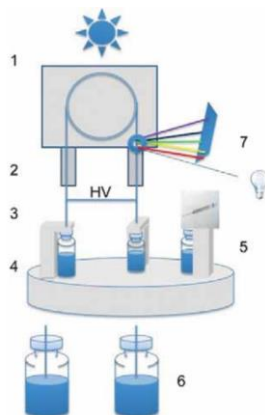
Tijekom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode provodi se optimizacija parametara koji utječu na elektroosmotski tok i elektroforetsku pokretljivost. To su vrsta i koncentracija pufera, pH pufera, dodatak organskih otapala, vrsta i koncentracija surfaktanta, napon i temperatura pri kojima se odvija analiza.

1.4.2. Uređaj za kapilarnu elektroforezu

Uređaj za kapilarnu elektroforezu sastoji se od termostatisane kapilare, visokonaponskog izvora istosmjerne struje, dvije elektrode, ulaznog i izlaznog spremnika (vijalice) za pufer, sustava za unošenje uzorka, sustava za izmjenu pufera i detektora (Slika 4).

Iz ulaznog spremnika pufer ulazi u kapilaru, a nakon izlaska iz kapilare skuplja se u izlaznom spremniku. Sustav za unošenje uzorka odgovoran je za injektiranje uzorka s analitima koje želimo razdvojiti i odrediti. Krajevi kapilare uronjeni su u otopine pufera, a preko elektroda se uspostavlja električni napon koji uzrokuje električno polje kroz kapilaru. Nakon razdvajanja dolazi do detekcije analita. U kapilarnoj elektroforezi može se koristiti nekoliko vrsta detektora, ovisno o vrsti analita. Najčešće se koriste UV-Vis detektor, fluorescencijski detektor, maseni spektrometar

ili površinski poboljšana raman spektroskopija. Kapilare mogu biti duljine od 10 do 110 cm, a unutarnji promjer može biti od 50 do 300 μm . Najčešće se koriste kvarcne kapilare tankih stijenki, a kapilare mogu biti izrađene i od fluorirane ugljikovodične smole (Sertić, 2013).



Slika 4. Shema uređaja za kapilarnu elektroforezu: termostatisana kapilara (1), visokonaponski izvor istosmjerne struje (2), dvije elektrode (3), ulazni i izlazni spremnik za pufer (4), sustav za unošenje uzorka (5), sustav za izmjenu pufera (6) i detektor (7) (Damić i Nigović, 2010).

1.4.3. Kapilarna zonska elektroforeza

Postoji više vrsta kapilarne elektroforeze, a najzastupljenije su kapilarna zonska elektroforeza (engl. *capillary zone electrophoresis*, CZE) i micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *micellar electrokinetic chromatography*, MEKC).

Kapilarna zonska elektroforeza najjednostavniji je oblik kapilarne elektroforeze. Kapilara je ispunjena samo otopinom pufera određene koncentracije i pH vrijednosti, a analiti se razdvajaju zbog različite elektroforetske pokretljivosti u otopini. Brzina kojom se analiti kreću kroz kapilaru ovisi o elektroforetskoj pokretljivosti analita i o brzini elektroosmotskog toka otopine pufera. Ovom tehnikom mogu se odijeliti samo električki nabijene čestice. Neutralni analiti ne mogu se razdvojiti ovom metodom niti se mogu detektirati.

1.4.4. Micelarna elektrokinetička kromatografija

Micelarna elektrokinetička kromatografija tehnika je koja se može iskoristiti i za analizu neutralnih molekula jer omogućava i njihovo razdvajanje. U otopinu pufera dodaju se površinski aktivne tvari (surfaktanti) u koncentraciji koja je veća od kritične micelarne koncentracije (CMC). Kad je

koncentracija surfaktanta veća od kritične micelarne koncentracije, nastaju micelle u koje se analiti mogu uklopiti na različite načine. Micelle su kuglične tvorbe koje se sastoje od hidrofilnog i hidrofobnog dijela. Hidrofilni dio u kontaktu je s okolnom vodom, a hidrofobni dio čine hidrofobni repovi molekula surfaktanta koji su usmjereni prema unutrašnjosti micelle (Slika 5). U MEKC-u dolazi do razdvajanja neutralnih analita zbog različite interakcije neutralnih molekula s micelama. Natrijev dodecilsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) često je korišten anionski surfaktant. Kad se koriste anionski surfaktanti, formiraju se micelle koje imaju negativan naboj na površini. Zbog negativnog naboja elektroforetska pokretljivost takvih micela usmjerena je prema anodi, ali ipak putuju prema katodi i detektoru zahvaljujući djelovanju elektroosmotskog toka. Brzina kojom se neutralni analiti kreću u MEKC-u ovisi o konstanti raspodjele između micelle i okolne vodene otopine. Različite konstante raspodjele uvjetuju i različite brzine kretanja neutralnih molekula. Nabijeni analiti također stupaju u interakcije s micelama (hidrofobne i elektrostatske), stoga njihova brzina putovanja kroz kapilaru ovisi ne samo o elektroforetskoj pokretljivosti, već i o konstanti raspodjele između micela i otopine pufera.

1.5. Pregled postojećih metoda za analizu alpelisiba

Otkad je alpelisib službeno registriran, objavljen je vrlo mali broj analitičkih metoda za njegovu analizu, svega tri metode tekućinske kromatografije i sve su primijenjene na biološkim uzorcima u različitim pretkliničkim eksperimentima. Razvijena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s fluorescentnim detektorom (eng. *High-performance liquid chromatography with fluorescence detection*, HPLC-FLD), koja je poslužila za određivanje alpelisiba u biološkim uzorcima miševa te za praćenje *in vivo* farmakokinetike alpelisiba (Seo i sur., 2021). Zatim je razvijena metoda tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrijom masa (eng. *Ultrapformance liquid chromatography tandem mass spectrometry*, UPLC-MS/MS) za analizu sadržaja alpelisiba u plazmi štakora, što je znanstvenicima poslužilo za praćenje interakcije alpelisiba i ketokonazola, odnosno utjecaja ketokonazola na plazmatsku koncentraciju alpelisiba (Wang i sur., 2021). Treća do sada objavljena analitička metoda je metoda tekućinske kromatografije u sprezi sa spektrometrijom masa za analizu alpelisiba u uzorku plazme miša i čovjeka, a poslužila je za proučavanje metaboličkog profila lijeka u *in vitro* uvjetima i *in vivo* farmakokinetike u miševima (Lee i sur.).

Do sada nije razvijena nijedna kapilarnoelektroforetska metoda za analizu alpelisiba niti je objavljena ijedna analitička metoda koja se primjenjuje za kontrolu kvalitete i kvantitativno određivanje alpelisiba u gotovim ljekovitim oblicima.

1.6. Zelena kemija

Zelena kemija podrazumijeva osmišljavanje, razvoj i primjenu kemijskih tvari i tehnika koje smanjuju ili u potpunosti eliminiraju uporabu kemikalija opasnih za ljudsko zdravlje i okoliš. Opasne kemikalije mogu biti supstancije mutagenih i kancerogenih svojstava, zapaljive, eksplozivne i korozivne tvari, tvari koje uzrokuju akutnu i kroničnu toksičnost te one koje zagađuju okoliš, negativno utječu na globalno zatopljenje i klimatske promjene. Prednost u zelenoj kemiji imaju analitički postupci u kojima se koriste vodena otapala i što manji broj reagensa (Keith i sur., 2007).

Postoji nekoliko smjernica za procjenu zelenosti analitičke metode, a jednu od njih razvio je Institut za zelenu kemiju Američkog kemijskog društva (engl. *American chemical society*, ACS). Prema smjernicama ACS-a četiri kriterija smanjuju zelenost metode:

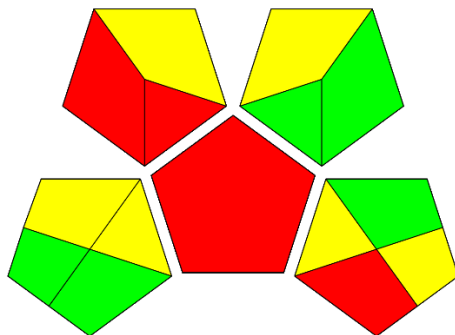
- 1) uporaba toksičnih tvari koje se teško razgrađuju i akumuliraju u živim organizmima (engl. *persistence, bioaccumulation and toxicity*, PBT)
- 2) uporaba opasnih tvari, prisutnih na TRI listi (*Toxics Release Inventory*)
- 3) uporaba korozivnih tvari (ako je pH manji od 2 ili veći od 12 tijekom analize)
- 4) količina otpada veća od 50 grama u jednoj analizi.

Uzimajući u obzir ta četiri kriterija, zelenost metode može se vizualno prikazati korištenjem simbola kruga koji se sastoji od četiri kvadranta: *waste, hazardous, corrosive*, PBT. Ukoliko je kriterij u skladu sa smjernicama zelene kemije, boja pripadajućeg kvadranta je zelena, a ako nije, kvadrant nije obojan.

Sljedeća metoda za procjenu zelenosti jest Eco-Scale. Ta metoda koristi podatke iz Globalno usklađenog sustava razvrstavanja i označivanja kemikalija (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*, GHS). Idealan zeleni analitički postupak ima rezultat od 100 bodova, a bodovi se oduzimaju za kemikalije i procese koji odstupaju od idealne zelene analitičke metode. Rezultat od 100 može dobiti analitička metoda u kojoj se ne koriste opasne kemikalije (za okoliš ili ljude), u kojoj je potrošnja energije manja od 0,1 kWh po analizi i u kojoj

nema proizvodnje otpada. Rezultat veći od 75 odličnu zelenost, a veći od 50 označava prihvatljivu zelenost (Gałuszka i sur., 2012). Kemikalije korištene u analizi ocjenjuju se s obzirom na opasnost za zdravlje i okoliš, odnosno prema broju piktograma koji označavaju različite opasnosti. Za svaki se piktogram ispitivanoj analitičkoj metodi oduzimaju bodovi.

Za procjenu zelenosti analitičke metode može se koristiti i indeks zelene analitičke procedure (engl. *green analytical procedure index*, GAPI). GAPI procjenjuje zeleni karakter cijele analitičke metodologije, od prikupljanja uzorka do konačnog određivanja. Za prikaz zelenosti svakog koraka u analitičkom procesu koristi se piktogram koji se sastoji od pet pentagrama (Slika 5). Takav vizualni prikaz vrlo je prikladan zbog toga što omogućava brzu usporedbu zelenosti različitih analitičkih metoda – što je metoda zelenija, to je zeleniji i piktogram (Mlinarić i sur., 2022; Płotka-Wasyłka, 2018.).



Slika 5. Primjer piktograma metode GAPI

AGREE metoda (engl. *Analytical GREENness Metric Approach and Software*) četvrta je metoda koja omogućuje procjenu zelenosti analitičke metode. Metoda AGREE uzima u obzir 12 kriterija zelene analitičke kemije. Neki od njih su prikupljanje uzorka, udaljenost analitičkog instrumenta od mjesta prikupljanja uzorka, količina generiranog otpada, tehnike pripreme uzorka za analizu, potrošnja električne energije po analizi, broj analiza koje se mogu izvršiti u sat vremena, porijeklo i toksičnost reagensa. Prednost AGREE metode naspram drugih je što omogućava analitičaru da sam procijeni važnost pojedinog kriterija pridavanjem određenog težinskog faktora (Pena-Pereira i sur., 2020). Kao rezultat ispitivanja zelenosti dobiva se piktogram (Slika 6) koji prikazuje

brojčani rezultat zelenosti ispitivane analitičke metode, zelenost svakog od 12 ispitanih kriterija i pripadajuću težinu svakog kriterija koju je procijenio analitičar.



Slika 6. Primjer piktograma metode AGREE (Pena-Pereira i sur., 2020)

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Rak dojke jedan je od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu. Postoji nekoliko skupina lijekova koji se koriste kod karcinoma dojke, a jedan od novijih je apelisib, koji je odobren 2019. godine od strane Američke agencije za hranu i lijekove.

S obzirom na to da je apelisib registriran tek nedavno, postoji potreba za razvojem analitičkih metoda za analizu njegova sadržaja u gotovim ljekovitim oblicima. Da bi lijek udovoljio zahtjevima farmaceutske kakvoće, sadržaj djelatnih i pomoćnih tvari u lijeku mora biti unutar propisanih granica (Nigović i sur., 2022). Otkad je apelisib registriran, objavljene su tek tri validirane metode za analizu apelisiba. Radi se o bioanalitičkim metodama koje su razvijene za analizu apelisiba u uzorcima mišje i ljudske plazme, a poslužile su za praćenje farmakokinetike i metabolizma lijeka. Nije objavljena nijedna metoda za određivanje apelisiba u gotovom farmaceutskom obliku niti je objavljena ijedna kapilarnoelektroforetska metoda. U okviru ovog istraživačkog rada prvi put će se razviti, optimizirati i validirati kapilarnoelektroforetska metoda za identifikaciju i kvantitativno određivanje apelisiba u gotovom farmaceutskom obliku. Kapilarna elektroforeza odabrana je jer je učinkovita, brza i ekološki prihvatljiva analitička metoda.

Specifični ciljevi ovog rada u svrhu optimizacije nove kapilarnoelektroforetske metode obuhvaćaju ispitivanje utjecaja koncentracije pufera, dodatka i koncentracije surfaktanta, dodatka organskog otapala, temperature i primijenjenog napona na brzinu analize, razlučivanje, oblik i simetriju pikova. Nakon optimizacije cilj je napraviti validaciju metode u skladu sa smjernicama Međunarodnog vijeća za usklađivanje (engl. *International Council for Harmonisation*, ICH). Validacija uključuje ispitivanje linearnosti, granice određivanja i dokazivanja, preciznosti, točnosti i izdržljivosti. Nakon što se optimizira i validira metoda, cilj je još ispitati i zelenost metode prema objavljenim smjernicama.

Konačni je cilj primijeniti razvijenu, optimiziranu i validiranu metodu za analizu sadržaja apelisiba u gotovom ljekovitom obliku, odnosno u tableti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (CARLO ERBA Reagents)
- acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju (CARLO ERBA Reagents)
- ultračista deionizirana voda provodljivosti 0,055 $\mu\text{S/cm}$
- natrijev tetraborat dekahidrat (Kemika)
- natrijev dodecilsulfat (SIGMA)
- otopina natrijeva hidroksida koncentracije 1 mol/L (Agilent Technologies)

3.1.2. Standarne supstancije i gotovi ljekoviti oblici

- 4-aminobenzojeva kiselina (Fluka)
- alpelisib (MedChemExpress)
- Piqray 50 mg filmom obložene tablete alpelisiba (Novartis)

3.1.3. Radni instrumenti i pribor

- sustav za kapilarnu elektroforezu (G100A) s integriranim detektorom niza dioda (Agilent Technologies)
- kapilara od izvučenog kvarca, unutarnjeg promjera 50 μm (Agilent Technologies)
- CE Capillary Burner EK 1,2 (Electro-kinetic Technologies)
- vijalice/bočice za otopine radnog pufera i otopine standarda; plastične od 1 mL, staklene od 1,5 mL (Agilent Technologies)
- sustav za pročišćavanje vode (Waterpro – Labonco)
- ultrazvučna kupelj (Elma xtra TT Elmasonic)
- vortex mješalica (IKA vortex 2)
- analitička vaga AG245 na četiri decimale (Mettler Toledo)
- odmjerne tikvice od 50 i 100 mL
- Eppendorf plastične epruvete od 1,5 mL (Eppendorf)
- politetrafluoroetilenski filteri za šprice, veličina pora 0,2 μm (VWR®)
- šprice od 10 mL (Becton Dickinson)

- mikropipete (automatske pipete), promjenjivi volumen 0,5 – 10, 20 – 200 i 100 – 1000 μL (Rainin)
- nastavci za mikropipete od 10, 200 i 1000 μL (Rainin)

3.1.4. Programski paketi

- program 3D CE/MSD ChemStation, ver. A 10.02 (Agilent Technologies)
- Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema radnog pufera za analizu

Za izradu radnog pufera prethodno su pripravljene dvije otopine: otopina boratnog pufera i otopina surfaktanta SDS-a (natrijeva dodecilsulfata). Otopina boratnog pufera koncentracije 100 mM pripravljena je u odmjerne tikvici od 50 mL otapanjem odgovarajuće mase natrijeva tetraborata dekahidrata u ultračistoj vodi. Tako pripravljena otopina čuvana je na sobnoj temperaturi i bila je stabilna tijekom razvoja, optimizacije i validacije metode. Otopina SDS-a koncentracije 100 mM također je pripravljena u odmjerne tikvici od 50 mL otapanjem odgovarajuće količine SDS-a u ultračistoj vodi. Otopina SDS-a isto je čuvana na sobnoj temperaturi i bila je stabilna za vrijeme izvođenja rada. Kako bi se ubrzao proces otapanja natrijeva tetraborata dekahidrata i SDS-a, tikvice su stavljene u ultrazvučnu kupelj na pola sata. Otopine boratnog pufera i SDS-a svaki su dan prije pripreme radnog pufera podvrgnute sonifikaciji u ultrazvučnoj kupelji te su nakon toga profiltrirane kroz injekcijske filtere s porama veličine 0,2 μm . Otopine radnih pufera pripravljene su miješanjem odgovarajućih volumena otopine boratnog pufera, otopine surfaktanta, ultračiste vode i metanola. Za uzimanje odgovarajućih volumena korištene su automatske pipete.

3.2.2. Priprema radnih standardnih otopina za analizu

Prije pripreme radnih standardnih otopina pripravljene su matične standardne otopine alpelisiba i 4-aminobenzojeve kiseline u metanolu. Matična standardna otopina alpelisiba pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase alpelisiba u metanolu u odmjerne tikvici volumena 10 mL te je tako dobivena metanolna otopina alpelisiba koncentracije 0,5 mg/mL. Matična standardna otopina 4-aminobenzojeve kiseline pripravljena je na isti način kako bi se dobila metanolna otopina 4-aminobenzojeve kiseline koncentracije 0,5 mg/mL. Matične standardne otopine čuvane su u hladnjaku na temperaturi od 4 do 8 °C i bile su stabilne mjesec dana. Radne standardne otopine

pripremane su svaki dan neposredno prije početka mjerenja miješanjem odgovarajućih volumena matičnih standardnih otopina s metanolom, ultračistom vodom i acetonitrilom, pri čemu je omjer metanola, acetonitrila i vode u radnoj standardnoj otopini bio 49:11:40. Matične standardne otopine i korištena otapala profiltrirani su kroz injekcijske filtre s porama veličine 0,2 μm prije izrade radne otopine. Za uzimanje odgovarajućih volumena matičnih standardnih otopina i otapala korištene su automatske pipete.

3.2.3. Priprema gotovog ljeovitog oblika za analizu

Jedna tableta alpelisiba sadržavala je dozu od 50 mg alpelisiba u ukupnoj masi tablete od 126,87 mg. Tableta je prvo usitnjena u tarioniku do nastanka finog praha, a zatim je u odmjernu tikvicu od 25,0 mL prebačena odgovarajuća količina praha koja sadrži 12,5 mg alpelisiba. U istu je tikvicu dodano 12,5 mg 4-aminobenzojeve kiseline. U tikvicu je zatim dodano 10 mL metanola, nakon čega je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 30 minuta kako bi se pospješila ekstrakcija alpelisiba iz usitnjenog praha i otapanje 4-aminobenzojeve kiseline u metanolu. Nakon toga je odmjerna tikvica nadopunjena metanolom do oznake i tako je dobivena otopina alpelisiba i 4-aminobenzojeve kiseline, pri čemu je koncentracija i jedne i druge supstancije u otopini bila 0,5 mg/mL. Naposljetku je još provedena filtracija kroz injekcijske filtere s porama veličine 0,2 μm kako bi se uklonile pomoćne tvari iz tablete koje se ne otapaju u metanolu.

3.2.4. Uvjeti kapilarnoelektroforetske analize

Korištena je kapilara od izvučenog kvarca, duljine 37 cm i unutarnjeg promjera 50 μm . Put od početka kapilare do detektora iznosio je 28,5 cm te je na toj udaljenosti odstranjen dio vanjskog sloja kapilare kako bi se omogućio prolazak elektromagnetskog zračenja iz detektora s nizom dioda (eng. *diode-array detector*, DAD) kroz otopinu u kapilari. Optimalna temperatura u kapilari i optimalni napon odabrani su tijekom razvoja metode. Injektiranje standardne radne otopine u kapilaru vršilo se pod tlakom od 50 mbar u trajanju od 6 sekundi. Detekcija se vršila uz DAD na valnoj duljini od 216 nm. Sva su mjerenja provedena u triplikatima.

Prije prvog korištenja nova je kapilara isprana metanolom 10 minuta, otopinom natrijeva hidroksida koncentracije 1 M 10 minuta, ultračistom vodom 10 minuta i na kraju radnim puferom 20 minuta. Na početku svakog dana kapilara je isprana otopinom NaOH koncentracije 0,1 M, ultračistom vodom i radnim puferom, pri čemu je svako ispiranje trajalo 10 minuta. Prije svake nove analize kapilara se ispirala otopinom radnog pufera u trajanju od 5 minuta kako bi se osigurala

ponovljivost rezultata analize, odnosno ponovljivost migracijskih vremena analita i razlučivanja između pikova tijekom uzastopnih analiza s istim sastavom pufera. U slučaju promjene sastava radnog pufera kapilara je prije nove analize isprana 15 minuta novom otopinom radnog pufera. Na kraju svakog dana kapilara je isprana 20 minuta ultračistom vodom, a nakon ispiranja krajevi kapilare uronjeni su u vijalice s ultračistom vodom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Odabir unutarnjeg standarda

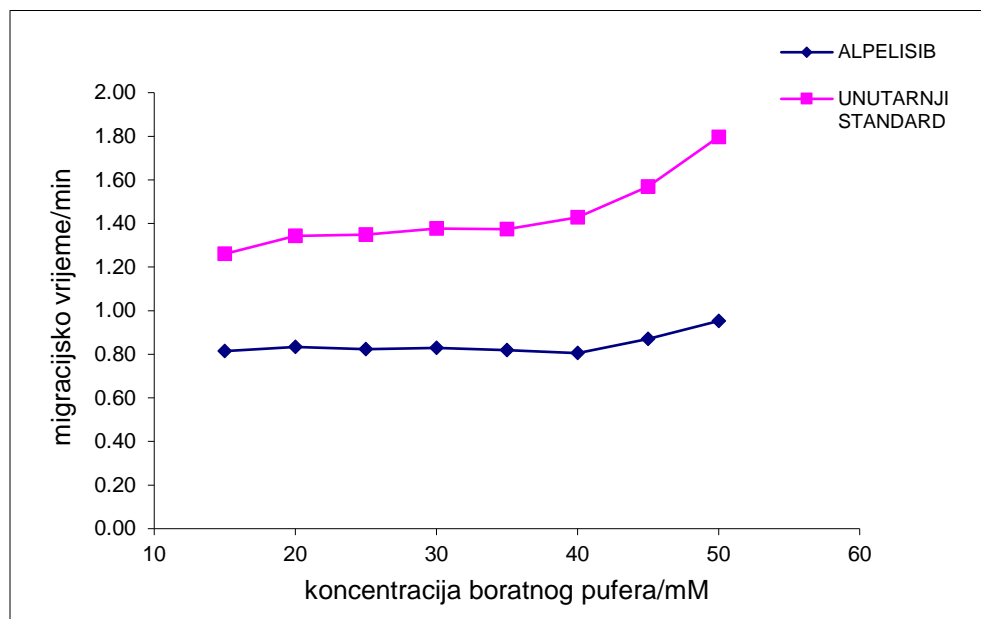
Unutarnji standard supstancija je koja je prisutna u svakom uzorku zajedno s analitima koji se određuju, a prisutna je uvijek u istoj koncentraciji. Koristi se kako bi se povećala preciznost kvantitativnog određivanja, odnosno kako bi se smanjile greške analize koje mogu nastati uslijed oscilacija napona mreže, isparavanja organskog otapala u uzorku, promjene u volumenu injektiranja i ostalih čimbenika koji mogu utjecati na rezultat analize. U metodi kapilarne elektroforeze injektiraju se nanolitarske količine uzorka, stoga jako mala promjena volumena injektiranja može znatno utjecati na rezultat analize. Idealni unutarnji standard bio bi onaj na čiji bi signal navedeni čimbenici jednako utjecali kao i na signal analita koji se određuju. U ovom je radu kao unutarnji standard odabrana 4-aminobenzojeva kiselina jer je riječ o maloj molekuli s dvije funkcionalne skupine, koja ima kratko vrijeme migracije.

4.2. Optimizacija koncentracije boratnog pufera

Za razvoj metode odabran je boratni pufer pH vrijednosti 9,3. Odabran je jer su pri tako visokoj pH-vrijednosti silanolne skupine na unutrašnjoj stijenci kapilare deprotonirane, a to pojačava elektroosmotski tok i čini analizu bržom (chem.libretexts.org).

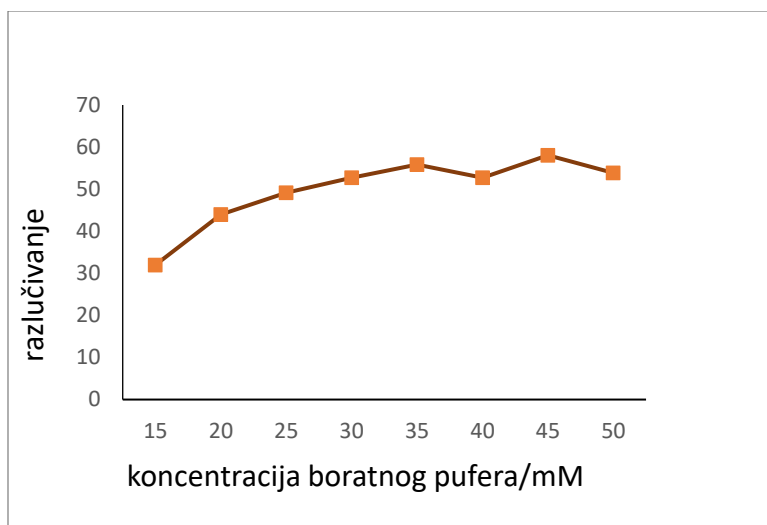
Prvi ispitivani parametar tijekom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode bila je koncentracija boratnog pufera. Koncentracija boratnog pufera utječe na elektroosmotski tok u kapilari na način da se njenim povećanjem smanjuje elektroosmotski tok te se posljedično produžuju vrijeme migracije analita i trajanje analize. Iako je jedan od ciljeva analitičke metode da bude što kraća, potrebna je dovoljno visoka koncentracija pufera jer primjenom preniske koncentracije pufera može doći do adsorpcije uzorka na stijenu kapilare, što može onda dovesti do širenja pikova, netočnog određivanja sadržaja i propadanja kapilare (Sertić, 2013). Zbog toga je najmanja ispitivana koncentracija boratnog pufera u ovom radu bila 15 mM. S druge strane, ako se primjenjuju previsoke koncentracije pufera, povećava se jakost struje i može doći do Jouleova zagrijavanja kapilare. Jouleovo zagrijavanje povećava temperaturu i uzrokuje temperaturne gradijente u kapilari. Zbog toga elektroosmotski tok nije više ujednačen u kapilari, a to se odražava na rezultate analize (Xuan i Li, 2004).

Ispitivan je boratni pufer u koncentracijama od 15 mM do 50 mM. Računalnim softverom Chemstation određena su migracijska vremena alpelisiba i 4-aminobenzojeve kiseline te razlučivanje među njima. U rasponu koncentracije pufera od 15 mM do 40 nije bilo značajnih promjena u migracijskim vremenima. Tek se pri koncentraciji pufera od 45 mM vidi značajno povećanje vremena migracije i alpelisiba i 4-aminobenzojeve kiseline kao unutarnjeg standarda, čime je produljeno i vrijeme trajanja analize (Slika 7).



Slika 7. Grafički prikaz ovisnosti vremena migracije o koncentraciji boratnog pufera

Osim migracijskog vremena, ključan je čimbenik pri odabiru optimalne koncentracije pufera razlučivanje između pikova, odnosno učinkovitost njihova razdvajanja. Ukoliko je razlučivanje veće od 1,5, pikovi analita smatraju se uspješno razdvojenima. Na Slici 8 može se vidjeti da je jako dobro razlučivanje alpelisiba i 4-aminobenzojeve kiseline postignuto pri svim ispitanim koncentracijama boratnog pufera. Oblik i simetrija pikova također su bili odgovarajući pri svim ispitanim koncentracijama.



Slika 8. Grafički prikaz ovisnosti razlučivanja pikova o koncentraciji boratnog pufera

S obzirom na to da je razlučivanje alpelisiba i 4-aminobenzojeve kiseline pri svim ispitanim koncentracijama pufera bilo jako veliko ($R_s > 10$), odabir bilo koje koncentracije pufera u rasponu od 15 mM do 40 mM bio bi prihvatljiva opcija. Pri koncentraciji pufera od 45 mM i 50 mM produljeno je vrijeme analize, stoga te koncentracije nisu optimalne. Odabrana je koncentracija boratnog pufera od 25 mM. Ta je koncentracija znatno veća od onih pri kojima može doći do adsorpcije uzorka na stijenku kapilare, a pri višim koncentracijama vidi se veći porast struje u kapilari, pa je povećan rizik od Jouleova zagrijavanja.

4.3. Utjecaj dodatka surfaktanta

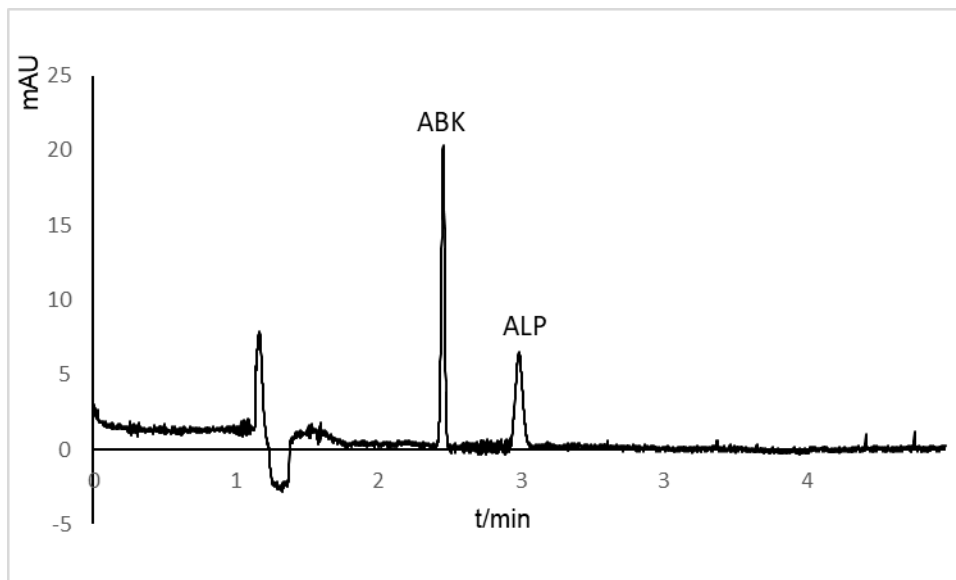
Nakon optimizacije koncentracije boratnog pufera ispitan je utjecaj dodatka surfaktanta SDS-a na oblik i simetriju pikova, migracijska vremena alpelisiba i unutarnjeg standarda te na razlučivanje među njima.

SDS je anionski surfaktant, a u otopinu se dodaje u koncentraciji koja je veća od kritične micelarne koncentracije jer tek tada nastaju micelle u koje se analiti mogu uklopiti. Kod SDS-a kritična micelarna koncentracija iznosi oko 8,2 mM (Markarian i sur., 2005). Površina formiranih micela SDS-a negativno je nabijena i njihova je elektroforetska pokretljivost usmjerena prema anodi. Međutim, micelle putuju prema katodi i detektoru kao i sve druge čestice jer je u bazičnom radnom puferu koji je korišten elektroosmotski tok prema katodi jači od elektroforetske pokretljivosti.

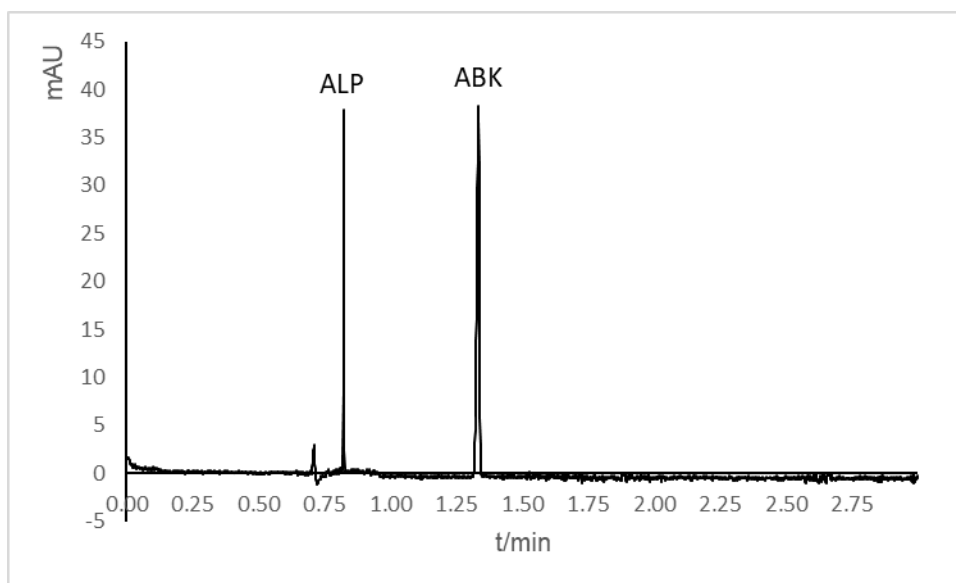
Uklapanjem čestica u micelle mijenja se njihova brzina kretanja i vrijeme zadržavanja u kapilari. Razlog tomu je što sad brzina kretanja ne ovisi više samo o elektroforetskoj pokretljivosti pojedinih čestica i jačini elektroosmotskog toka u kapilari, već i o konstanti raspodjele čestica između micela i okolne vodene faze. Korist primjene surfaktanta najveća je u slučaju kada se u uzorku nalaze neutralni analiti, koji se ne mogu ni razdvojiti ni detektirati u kapilarnoj zonskoj elektroforezi, ili kad nije postignuto zadovoljavajuće razdvajanje nabijenih čestica u otopini pufera. No dodatak surfaktanta u otopinu radnog pufera i njegov utjecaj korisno je ispitati i kod nabijenih analita koji se mogu analizirati kapilarnom zonskom elektroforezom, upravo zbog činjenice da pokretljivost analita više ne ovisi samo o njihovom naboju, odnosno o njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti, već je kombinacija oba utjecaja, i elektroforetske pokretljivosti nabijenog analita i njegova afiniteta za micelu. Utjecaj dodatka surfaktanta u otopinu radnog pufera često može poboljšati topljivost analita, oblik i simetriju pika analita te promijeniti selektivnost metode.

U ovom radu ispitane su koncentracije surfaktanta od 20 mM i 30 mM. Pri 30 mM trajanje analize je dulje nego pri koncentraciji od 20 mM jer nastaje veći broj micela koji stupa u interakciju s analitima.

Dobiveni rezultati pokazali su da je SDS produljio vrijeme migracije i alpelisiba i 4-aminobenzojeve kiseline (Slika 9 i Slika 10). To se može objasniti činjenicom da micelle zbog negativnog naboja sporije putuju prema katodi nošene elektroosmotskim tokom, dok ih njihov vlastiti naboj gura prema pozitivno nabijenoj anodi. Samim time usporavaju kretanje analita koji stupaju u interakcije s njima. Može se vidjeti i da je dodatkom SDS-a vrijeme zadržavanja alpelisiba u kapilari bilo dulje nego vrijeme zadržavanja 4-aminobenzojeve kiseline, a to je obrnuto u odnosu na radni pufer bez SDS-a. Iz toga se može zaključiti da je alpelisib stupao u jače interakcije s micelama nego 4-aminobenzojeva kiselina.



Slika 9. Elektroferogram alpelisiba uz dodatak unutarnjeg standarda i uz dodatak 20 mM SDS-a u otopinu radnog pufera; ostali uvjeti analize: 25 mM borat, 30 kV, 30 °C



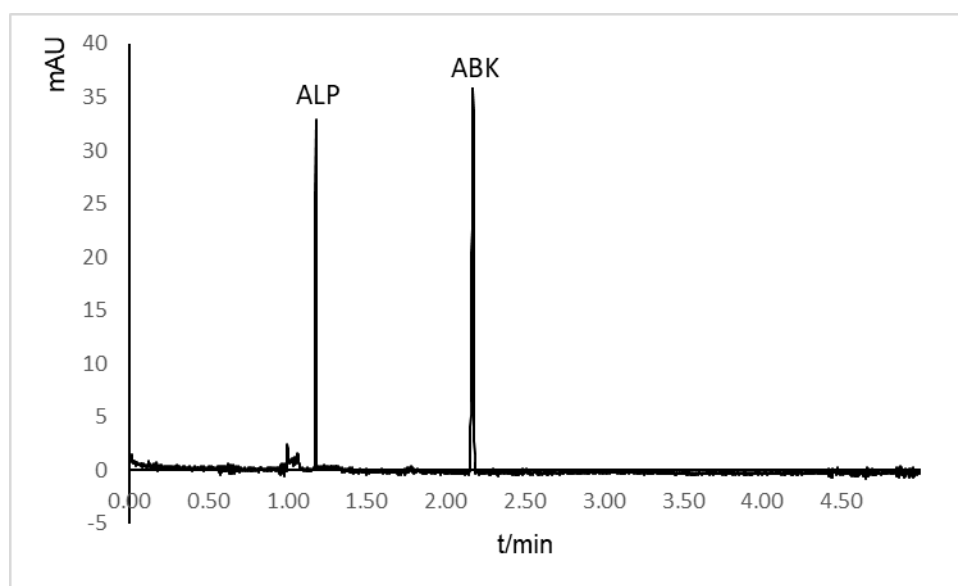
Slika 10. Elektroferogram alpelisiba uz dodatak unutarnjeg standarda, bez dodatka SDS-a u otopinu radnog pufera; ostali uvjeti analize: 25 mM borat, 30 kV, 30 °C

Dodatkom SDS-a u radnu otopinu pufera došlo je do širenja pika i produljilo se vrijeme migracije i trajanje analize. Također, na elektroferogramu analize sa SDS-om vidi se veći šum na baznoj liniji, a to se želi izbjeći ukoliko je moguće. Na temelju dobivenih rezultata SDS nije odabran za daljnju optimizaciju, odnosno nastavilo se s razvojem metode zonske kapilarne elektroforeze, a ne MEKC-a.

4.4. Utjecaj dodatka organskog otapala

Ispitan je utjecaj dodatka metanola u radnu otopinu pufera. Dodatak organskog otapala mijenja migracijsko vrijeme jer se mijenjaju zeta-potencijal, viskoznost i dielektrična konstanta otopine. U većini slučajeva dodatkom organskog otapala u otopinu radnog pufera smanjuje se elektroosmotski tok i povećava se vrijeme migracije.

Razlučivanje, izgled bazne linije, oblik i simetrija pikova bili su jednako dobri u usporedbi s radnim puferom bez metanola, ali dodatkom organskog otapala produljilo se vrijeme migracije alpelisiba i 4-aminobenzojeve kiseline (Slika 11). S obzirom na to da se s povećanjem vremena migracije produljilo i trajanje analize, metanol nije odabran za daljnju optimizaciju.

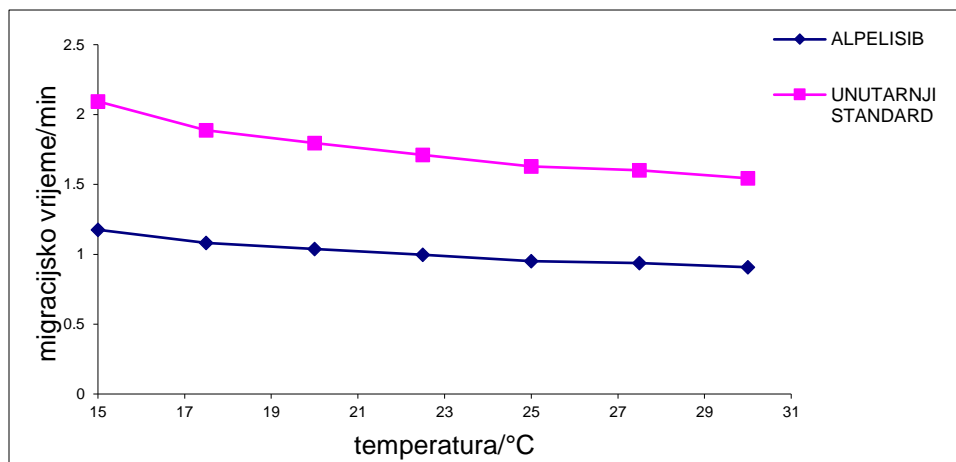


Slika 11. Elektroferogram alpelisiba uz dodatak unutarnjeg standarda, s dodatkom metanola u otopinu radnog pufera; uvjeti analize: 25 mM borat, 30 kV, 30 °C, 10% metanol

4.5. Utjecaj temperature

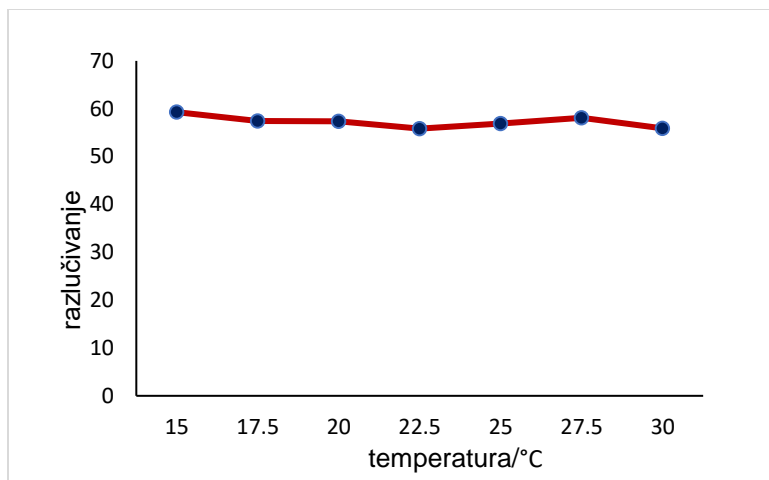
Povišenjem ili smanjenjem temperature mijenja se viskoznost otopine radnog pufera 2 – 3% za svaki Celzijev stupanj (Sertić, 2013). Viskoznost utječe i na elektroforetsku pokretljivost i na brzinu elektroosmotskog toka, stoga ima veliki utjecaj na brzinu kretanja čestica prema katodi.

U ovom radu ispitan je utjecaj temperature na vrijeme trajanja analize, razlučivanje te na oblik i simetriju pikova u rasponu od 15 do 30 °C. Na Slici 12 prikazana je ovisnost vremena migracije alpelisiba i unutarnjeg standarda o temperaturi. Može se uočiti da su se smanjenjem temperature u kapilari povećavala vremena migracije alpelisiba i unutarnjeg standarda, a samim time je i analiza bila dulja. Time je potvrđena već poznata ovisnost povećanja vremena analize sa smanjenjem temperature. Pri nižim temperaturama u kapilari raste viskoznost otopine elektrolita, zbog čega se smanjuju i elektroforetska pokretljivost čestica i brzina elektroosmotskog toka u kapilari, što onda negativno utječe na brzinu kretanja čestica prema detektoru, odnosno katodi.



Slika 12. Grafički prikaz ovisnosti vremena migracije o temperaturi u kapilari

Pri svim ispitanim temperaturama razlučivanje je bilo veliko (Slika 13), stoga je prednost pri odabiru temperature u kapilari imalo vrijeme trajanja analize. Pri temperaturi od 30 °C vrijeme trajanja analize je najkraće, razlučivanje je odlično, pikovi su simetrični i uski. Sukladno tome, temperatura od 30 °C odabrana je za daljnju optimizaciju.

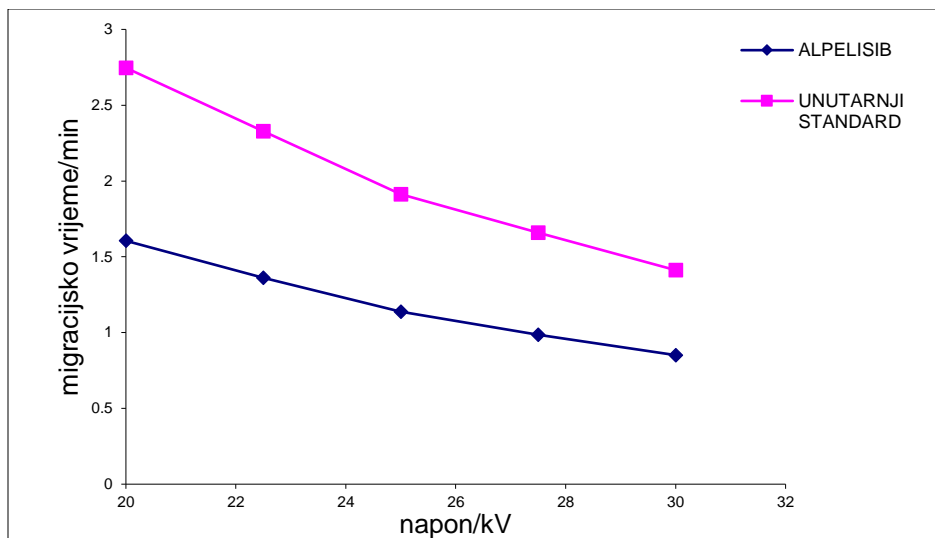


Slika 13. Grafički prikaz ovisnosti razlučivanja o temperaturi

4.6. Utjecaj primijenjenog napona

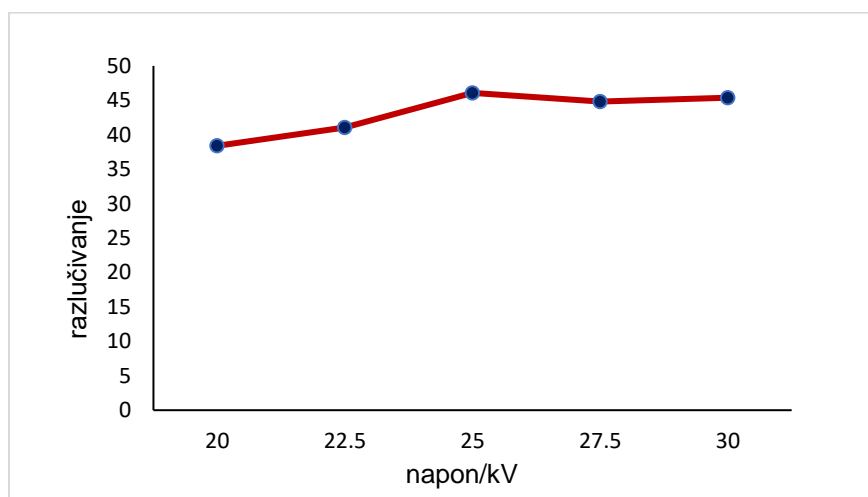
Napon pri kojem se odvija analiza utječe na brzinu kretanja čestica u kapilari. Brzina kretanja proporcionalna je jakosti primijenjenog električnog polja, a jakost električnog polja veća je što je primijenjeni napon veći. Povećanjem napona skraćuje se vrijeme analize, ali može doći do smanjenog razlučivanja i preklapanja pikova. Osim na vrijeme analize i učinkovitost razdvajanja, promjenom napona može se utjecati na površinu pika, a time i na osjetljivost metode. Naime, povećanjem napona smanjuje se površina pika, zbog čega se smanjuje osjetljivost metode. Još jedan parametar koji je bitan kod odabira napona jest jakost struje u kapilari. Veći napon uzrokuje veću struju u kapilari, zbog čega raste rizik od Jouleova zagrijavanja.

Tijekom optimizacije u ovom radu ispitane su vrijednosti napona u rasponu od 15 do 30 kV. Na slici 14 vidljivo je da se s povećanjem primijenjenog napona smanjuje vrijeme migracije i alpelisiba i 4-aminobenzojeve kiseline, što je u skladu s prethodno opisanim izrazom za brzinu kretanja čestica u kapilari.



Slika 14. Grafički prikaz ovisnosti vremena migracije o naponu

Iako se povećanjem napona smanjila površina pikova, osjetljivost je i dalje bila zadovoljavajuća pri svim ispitanim vrijednostima napona, kao i razlučivanje među pikovima (Slika 15). Napon od 30 kV nije razvijao preveliku struju u kapilari. Struja u kapilari pri primijenjenom naponu od 30 kV i pri koncentraciji borata od 25 mM iznosila je oko 110 μ A, što ne predstavlja rizik od Jouelova zagrijavanja.



Slika 15. Grafički prikaz ovisnosti razlučivanja o naponu

Na temelju dobivenih rezultata odabran je napon od 30 kV jer osigurava najkraće trajanje analize, pikovi imaju zadovoljavajući izgled, razlučivanje je veliko, a struja razvijena u kapilari nije previsoka.

4.7. Validacija metode

U fazi optimizacije metode određeni su optimalni uvjeti analize: koncentracija boratnog pufera od 25 mM, napon od 30 kV, temperatura od 30 °C, otopina radnog pufera bez dodatka organskog otapala ili surfaktanta. S druge strane, validacijom analitičkog postupka utvrđuje se prikladnost ispitivanog analitičkog postupka za određenu primjenu. U svrhu validacije kapilarnoelektroforetske metode za analizu alpelisiba ispitani su, u skladu s ICH smjernicama, specifičnost/selektivnost, linearnost, točnost, preciznost, granica određivanja i izdržljivost (www.ich.org). Tijekom validacije ove metode kao analitički signal koristili su se korigirana površina (omjer površine pika alpelisiba i površine pika unutarnjeg standarda) i korigirano vrijeme migracije (omjer migracijskog vremena alpelisiba i migracijskog vremena unutarnjeg standarda).

4.7.1. Specifičnost/selektivnost

Specifičnost analitičke metode definira se kao sposobnost metode da nedvojbeno razlikuje samo jednu komponentu od svih ostalih koje su prisutne u uzorku. U praksi je to jako rijetko i uglavnom se govori o selektivnosti analitičke metode. Selektivnost metode njena je sposobnost da točno odredi ispitivani analit u prisutnosti ostalih komponenti uzorka, kao što su npr. pomoćne tvari iz tablete. Selektivnost razvijene metode u ovom radu ispitana je mjerenjem čistoće pika kako bi se utvrdilo da svaki pik na elektroferogramu pripada samo jednom spoju. Provjera čistoće pika bitna je jer u nekim slučajevima pomoćne tvari iz tablete mogu imati isto vrijeme migracije kao i željeni analit, pa mogu uzrokovati lažno pozitivan rezultat površine pika. Čistoća pika provjerena je programom Agilent SD CE/MSD ChemStation, koji procjenjuje čistoću na temelju podudaranja UV spektra u rasponu valnih duljina od 200 do 400 nm u različitim dijelovima pika. Vrijednost faktora čistoće pika bila je u rasponu od 998,9 do 1000,0. Time je pokazano da su spektri u svim dijelovima pika identični, odnosno da su pikovi homogeni.

4.7.2. Linearnost i granica određivanja

Linearnost analitičke metode definira se kao sposobnost metode da unutar određenog intervala koncentracije ispitivanog analita daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost je ispitana primjenom 7 različitih koncentracija alpelisiba, pri čemu je za

svaku napravljeno 3 mjerenja. U svaku otopinu dodan je unutarnji standard u koncentraciji od 50 µg/mL. Kalibracijska krivulja dobivena je grafičkim prikazom ovisnosti korigirane površine pikova o koncentraciji alpelisiba u uzorku. Linearnom regresijom (metodom najmanjih kvadrata) kalibracijske krivulje dobivena je jednadžba pravca prema kojoj je kasnije određivan sadržaj alpelisiba, a linearnost je izražena pomoću koeficijenta korelacije regresijskog pravca (r). Jednadžba regresijskog pravca i koeficijent korelacije mogu se vidjeti u Tablici 1.

Granica određivanja (engl. *limit of quantitation*, LOQ) najniža je koncentracija analita koju je moguće odrediti u uzorku, datom analičkom metodom pod optimalnim uvjetima, s prihvatljivom točnošću i preciznošću. LOQ je koncentracija analita pri kojoj je omjer signala i šuma 10:1. Omjer signala alpelisiba i šuma određivan je pomoću programa ChemStation. Pri koncentraciji alpelisiba od 5 µg/mL dobiven je omjer 10:1, stoga je to najniža koncentracija alpelisiba pri kojoj se on može točno i precizno odrediti.

Tablica 1. Linearnost i granica određivanja

linearno područje (µg/mL)	jednadžba pravca	koeficijent korelacije (r)	LOQ (µg/mL)
10 – 100	$y = 0.0052x - 0.0285$	0.999	5

4.7.3. Preciznost

Preciznost se definira kao slaganje između niza ponovljenih mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. U ovom radu ispitana je ponovljivost, podudaranje rezultata dobivenih istom metodom, pod istim uvjetima i u kratkom vremenskom intervalu te srednja preciznost, podudaranje rezultata dobivenih pod različitim uvjetima u istom laboratoriju. Ponovljivost je ispitana primjenom tri različite koncentracije alpelisiba, pri čemu je za svaku napravljeno 6 uzastopnih mjerenja u istom danu. Srednja preciznost ispitana je također primjenom 3 različite koncentracije alpelisiba, pri čemu su za svaku napravljena 3 mjerenja 3 različita dana. Za izračun preciznosti korišteni su korigirano vrijeme migracije i korigirana površina pika. Rezultati su izraženi kao relativne standardne devijacije (Tablica 2). Iz dobivenih vrijednosti

relativne standardne devijacije može se zaključiti da je metoda zadovoljavajuće ponovljivosti i srednje preciznosti.

Tablica 2. Ponovljivost i srednja preciznost korigiranog vremena migracije i korigirane površine pri različitim koncentracijama alpelisiba

PONOVLJIVOST		SREDNJA PRECIZNOST	
RSD (KORIGIRANO VRIJEME MIGRACIJE)/%	RSD (KORIGIRANA POVRŠINA PIKA)/%	RSD (KORIGIRANO VRIJEME MIGRACIJE)/%	RSD (KONJUGIRANA POVRŠINA PIKA)/%
0,21 – 0,56	0,67 – 0,99	0,89 – 0,90	3,93 – 5,87

4.7.4. Točnost

Točnost analitičke metode iskazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata te stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Za određivanje točnosti analitičke metode provedena su 3 mjerenja uzorka za 3 koncentracije alpelisiba u linearnom području. Točnost je izračunata kao analitički prinos, a on je jednak omjeru srednje vrijednosti izmjerene koncentracije alpelisiba u uzorku i stvarne vrijednosti u uzorku. Koncentracija je određena iz korigirane površine pika upotrebom jednadžbe regresijskog pravca dobivenog kod ispitivanja linearnosti. Dobivene vrijednosti analitičkog prinosa prikazane su u Tablici 3 te ukazuju na dobru točnost metode.

Tablica 3. Točnost metode

c(alpelisib)/ $\mu\text{g/mL}$	analitički prinos/%
40	103,61
50	99,81
60	101,67

4.7.5. Izdržljivost metode

Izdržljivost se definira kao mjera sposobnosti analitičkog postupka da ostane nepromijenjen pod utjecajem malih, ali namjernih promjena parametara metode. Izdržljivost je ispitana mijenjanjem nekoliko eksperimentalnih parametara koji su bili optimizirani tijekom razvoja metode. Ispitane

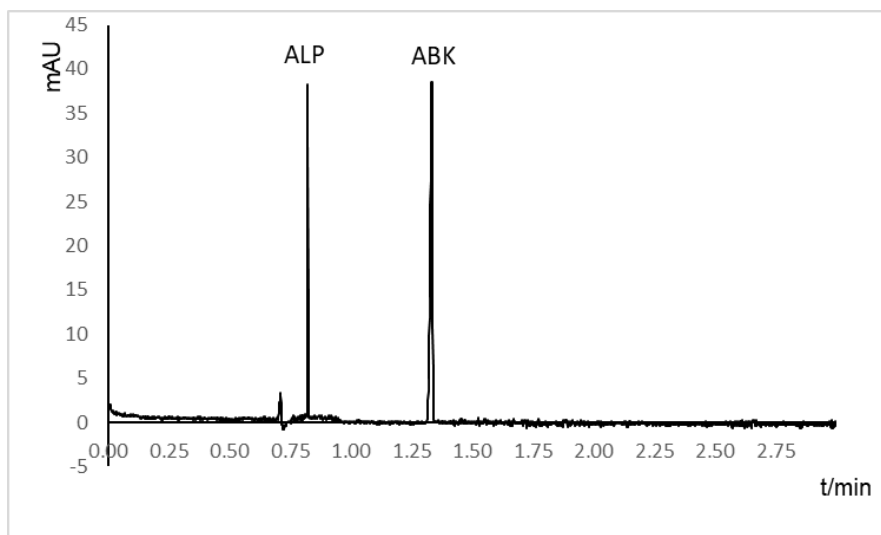
su koncentracije pufera od 24 i 26 mM (± 1 mM), temperature od 29 i 30 °C (± 1 °C) te napon od 29 kV ($- 1$ kV).. Promatrane su promjene u korigiranom vremenu migracije pikova i korigiranoj površini pikova. Te su promjene izražene kao relativne standardne devijacije (Tablica 4). Ispitane promjene su prihvatljive te je pokazano da je izdržljivost metode dobra.

Tablica 4. Izdržljivost metode

parametar	RSD (korigirano vrijeme)/%	RSD (korigirana površina)/%
± 1 mM pufer	0,51	1,53
± 1 °C	0,69	1,51
29 kV	1,81	3,19

4.8. Primjena novorazvijene metode za analizu gotovog ljevitog oblika

Optimizirana i validirana metoda primijenjena je za analizu sadržaja alpelisiba u gotovom ljevitom obliku. Kao uzorak su korištene Piqray 50 mg filmom obložene tablete. Na Slici 16 može se vidjeti dobiveni elektroferogram analize gotovog ljevitog oblika. Mjerenjem čistoće pika pomoću programa ChemStation nisu primijećene nikakve interferencije pomoćnih tvari iz tablete s pikom alpelisiba i pikom 4-aminobenzojeve kiseline. Koncentracija alpelisiba u otopini tablete izmjerena je iz korigirane površine pika upotrebom jednadžbe regresijskog pravca dobivenog kod ispitivanja linearnosti. Napravljena su 3 mjerenja uzorka tablete i dobiven je analitički prinos u rasponu od 96,34% do 99,04%. Prema dobivenim rezultatima analitičkog prinosa može se zaključiti da je utjecaj matriksa zanemariv i da je novorazvijena metoda zonske kapilarne elektroforeze uspješno primijenjena za analizu sadržaja alpelisiba u tableti.

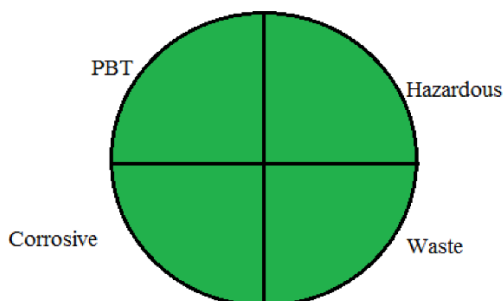


Slika 16. Elektroferogram analize gotovog ljeovitog oblika alpelisiba uz dodatak unutarnjeg standarda; uvjeti analize: 25 mM borat, 30 kV, 30 °C

4.9. Zelenost metode

4.9.1. Procjena zelenosti novorazvijene metode prema smjernicama ACS-a

Procjenom zelenosti novorazvijene metode prema smjernicama Američkog kemijskog društva dobiven je najbolji mogući rezultat, što se može vidjeti na Slici 17. Sva četiri kvadranta unutar simbola kruga obojana su zeleno. Iz toga se može zaključiti da ova metoda ne uključuje primjenu toksičnih tvari koje se teško razgrađuju i akumuliraju u živim organizmima, uporabu tvari opasnih za ljudsko zdravlje s TRI liste, uporabu korozivnih tvari te da je količina otpada u jednoj analizi manja od 50 grama.



Slika 17. Profil zelenosti određen prema smjernicama ACS-a

4.9.2. Procjena zelenosti novorazvijene metode prema Eco-Scale metodi

Rezultat prema Eco-Scale metodi dobiven je tako da su od maksimalnog broja bodova (100) oduzeti kazneni bodovi. Ispitivana metoda skupila je ukupno 16 kaznenih bodova, stoga ukupni rezultat prema Eco-Scale izračunu iznosi 84 (Tablica 5). S obzirom na to da je rezultat veći od 75, smatra se da je metoda odlične zelenosti. Kazneni bodovi za korištene reagense dobiveni su umnoškom broja piktograma na pakiranju reagensa s faktorom opasnosti prema GHS smjernicama. Ispitivana metoda dobila je ukupno 10 kaznenih bodova na temelju korištenih reagensa. S druge strane, ispitivana metoda nije dobila kaznene bodove za potrošnju energije po analizi jer ona iznosi 0.015 kWh, a za potrošnju energije manju od 0.1 kWh po analizi ne dobivaju se kazneni bodovi. Uređaj za kapilarnu elektroforezu hermetički je zatvoren, stoga ne dolazi do isparavanja plinova iz uređaja. Zbog toga ni u toj kategoriji metoda nije dobila kaznene bodove. Preostala 4 kaznena boda dodana su zbog toga što otpad nije tretiran.

Tablica 5. Procjena zelenosti ispitivane metode prema Eco-Scale sustavu

<i>reagens</i>	<i>broj piktograma</i>	<i>opasnost prema GHS-u</i>	kazneni bodovi
acetonitril	2	2	4
metanol	3	2	6
1 M NaOH	1	2	2
otpad	≤ 1 mL (g), bez tretiranja otpada		4
potrošnja energije po analizi	≤ 0.1 kWh po analizi		0
rizik tijekom rada na instrumentu	Hermetički zatvoren analitički proces		0
ukupni kazneni bodovi			16
broj bodova dobivenih prema Eco-Scale metodi			84

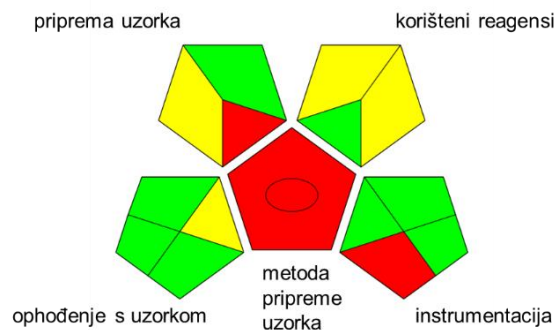
4.9.3. Procjena zelenosti novorazvijene metode prema GAPI-ju

Indeks zelene analitičke procedure poslužio je za procjenu zelenog karaktera cijele analitičke metodologije. Kao rezultat procjene zelenosti dobiven je piktogram koji označava stupanj ekološke prihvatljivosti metode po segmentima analitičke metodologije, od prikupljanja uzorka do same analize (Slika 18). Parametri korišteni za procjenu zelenosti ispitivane metode prema GAPI-

ju mogu se vidjeti u Tablici 6. Zelenom bojom označeni su parametri koji su ispitivanoj metodi u skladu s kriterijima zelene analitičke kemije, a crvenom bojom oni koji značajno odstupaju od njih.

Tablica 6. Procjena zelenosti ispitivane metode prema GAPI-ju

PRIPREMANJE UZORKA I ANALIZA	
priprema uzorka	
prikupljanje uzorka	<i>at-line</i>
fizikalni i kemijski postupci očuvanja uzorka	/
transport uzorka	/
skladištenje uzorka	/
metoda pripreme uzorka	potrebna ekstrakcija
tip ekstrakcije	makroekstrakcija
korišteni reagensi/otapala	zelena otapala
dodatni postupci	/
reagensi i otapala	
količina	< 10 mL (< 10 g)
opasnost za zdravlje	NFPA = 2 – 3 (umjerena toksičnost/iritabilnost)
zapaljivost	NFPA = 2 – 3
instrumentacija	
potrošnja energije	≤ 0,1 kWh po analizi
opasnost pri radu	hermetički zatvoren analitički proces
otpad	< 10 mL (< 10 g)
ophođenje s otpadom	bez tretiranja



Slika 18. Piktogram dobiven korištenjem indeksa zelene analitičke metode (GAPI-ju)

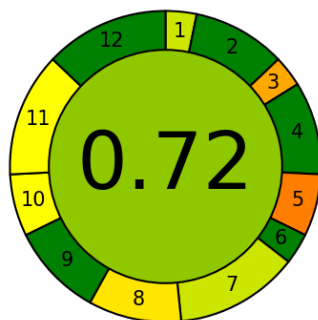
4.9.4. Procjena zelenosti novorazvijene metode prema AGREE metodi

Procjenom zelenosti ispitivane metode pomoću AGREE kalkulatora dobiven je rezultat u obliku piktograma koji se može vidjeti na Slici 19. Na piktogramu je vidljiv brojčani rezultat zelenosti ispitivane metode te on iznosi 0,72. Oko kruga koji prikazuje brojčani rezultat zelenosti nalazi se kružni vijenac na kojemu je prikazana zelenost svakog ispitanog kriterija. AGREE metoda razlikuje se od ostalih po tome što omogućava analitičaru da procijeni važnost svakog pojedinog kriterija na način da mu da određenu težinu. Svakom kriteriju određena je težina od 1 do 4. Što je veća težina, to je pojedini kriterij zauzeo veći udio kružnog vijenca (Slika 19). Dobiveni brojčani rezultat također upućuje na to da je metoda vrlo zelena.

Tablica 7. Kriteriji zelenosti prema metodi AGREE

broj kriterija	kriterij	rezultat	težina	obrazloženje
1.	uzorkovanje	<i>At-line</i>	1	manje važno za uzorak tablete
2.	minimalna količina uzorka	0,001 g	3	Bitno je da bi se minimalizirala količina korištenog otapala za ekstrakciju.
3.	smještaj analitičkog uređaja	<i>At-line</i>	1	manje važno za uzorak tablete
4.	broj važnih koraka u pripremi uzorka	3	3	Što je manji broj koraka, to je manja količina manualnog rada.

5.	automatizacija; minijaturizacija pripreme uzorka	poluautomatiziran proces, bez minijaturizacije pripreme	2	Analiza je automatizirana. Priprema je manualna, ali je jednostavna i s malim brojem koraka.
6.	tip derivatizacijskog agensa	nema	1	Za analizu alpelisiba nije potrebna derivatizacija.
7.	količina otpada	2 mL	4	Količina otpada treba biti što manja.
8.	broj analita u jednoj analizi; učinkovitost	1 analit; 8 uzoraka po satu	3	Poželjno je razviti metodu za analizu većeg broja analita. Učinkovitost je veća što je analiza kraća, a priprema uzorka jednostavnija.
9.	potrošnja energije	0,015 kWh	3	Poželjna je što manja potrošnja energije.
10.	tipova reagensa/otapala	neki su prirodnog porijekla	2	Najveći udio korištenih otapala bio je prirodnog porijekla.
11.	toksični reagensi/otapala i njihova količina	koriste se; 2 mL po uzorku	4	Budući da je priprema manualna, bolje je koristiti otapala što manje toksičnosti.
12.	izbjegnute prijetnje	sve od navedenog	4	Cilj je izbjeći prijetnje za okoliš i zdravlje.



Slika 19. Piktogram dobiven korištenjem metode AGREE

5. ZAKLJUČCI

U okviru ovog istraživačkog rada prvi put je razvijena, optimizirana i validirana kapilarnoelektroforetska metoda za identifikaciju i kvantitativno određivanje alpelisiba u gotovom farmaceutskom obliku. Određeni su optimalni uvjeti kapilarnoelektroforetske analize: koncentracija boratnog pufera od 25 mM, odsustvo surfaktanta i organskog otapala, temperatura od 30 °C i napon od 30 kV. Pri tim je uvjetima analiza najbrža, razlučivanje veliko, a pikovi su uski i simetrični. Optimizirana kapilarnoelektroforetska metoda validirana je prema međunarodnim ICH smjernicama. Metoda se pokazala linearnom u rasponu od 10 do 100 µg/mL ($r = 0,999$), preciznom ($RSD \leq 5,87\%$), točnom (99,81 – 103,61%), osjetljivom ($LOQ = 5 \mu\text{g/mL}$) i robusnom ($RSD \leq 3,19\%$) Optimizirana i validirana metoda uspješno je primijenjena na tableti za identifikaciju i kvantitativno određivanje alpelisiba. Procjenom zelenosti metode prema Eco-Scale metodi, GAPI-ju, metodi AGREE i smjernicama ACS-a potvrđeno je da je razvijena metoda izrazito zelena.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Mirandi Sertić na pruženoj prilici, brojnim korisnim savjetima, strpljenju te na svim priuštenim kapilarama koje nisu preživjele prethodna 3 mjeseca.

Zahvaljujem asistentima Zvonimiru Mlinariću i Lu Turković na pomoći u izvođenju eksperimentalnog dijela rada, na savjetima o pravilnom pipetiranju i ugodnoj atmosferi koja je cijelo vrijeme bila prisutna.

Zahvaljujem i ostalim članovima Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova na društvu u laboratoriju i svim skuhanim kavama.

7. POPIS LITERATURE

1. Sung H, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71, 209 – 249.
2. Jakić-Razumović J., Tomić S. Tumori dojke. U: Patologija, 4. izdanje. Damjanov I, et al., Zagreb, Medicinska naklada, 2014, str. 645 – 656.
3. Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020, <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2019-2020.pdf>, pristupljeno 25. 3. 2023.
4. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Annals of Oncology*, 2012, 23, 207 – 210.
5. Tečić Vuger A. Karakteristike i prognoza bolesnica s trostruko negativnim rakom dojke: hrvatska monoinstitucijska retrospektivna kohortna studija. *Acta clinica Croatica*, 2020, 59, 97 – 108.
6. Šeparović R, et al. Kliničke upute Hrvatskog onkološkog društva za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnica/ka oboljelih od invazivnog raka dojke. *Liječnički vjesnik*, 2015, 137, 143 – 149.
7. Piqray, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/piqray>, 2020, pristupljeno 27. 3. 2023.
8. Alpelisib, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alpelisib>, pristupljeno 27. 3. 2023.
9. Capillary Electrophoresis, [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Capillary_Electrophoresis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Capillary_Electrophoresis), pristupljeno 5. 4. 2023.
10. Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farmaceutski glasnik* 2010, 66, 195 – 207.
11. Sertić M. Nove kapilarno elektroforetske i kromatografske metode u analitici statina [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2013.

12. Theory of Capillary Electrophoresis, https://www.brainkart.com/article/Theory-of-Capillary-Electrophoresis_29777/, pristupljeno 25. 3. 2023.
13. Kizilkaya F. Investigation of electroosmotic flow dynamics and reproducibility in capillary electrophoresis [disertacija]. Louisiana State University; 2012.
14. Seo SW, et al. A sensitive HPLC-FLD method for the quantification of alpelisib, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in rat plasma: Drug metabolism and pharmacokinetic evaluation in vitro and in vivo. *Journal of Chromatography B*, 2021, 1163, 122508.
15. Wang Q, et al. Characterization of Alpelisib in Rat Plasma by a Newly Developed UPLC-MS/MS Method: Application to a Drug-Drug Interaction Study. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12.
16. Lee S, et al. Bioanalysis of alpelisib using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and application to pharmacokinetic study. *Journal of Analytical Science & Technology*, 2022, 13.
17. Keith LH, Gron LU, Young JL. Green Analytical Methodologies. *Chemical Reviews*, 2007, 107, 2695 – 2708.
18. Gałuszka A, et al. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2012, 37, 61 – 72.
19. Płotka-Wasyłka J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*, 2018, 181, 204 – 209.
20. Mlinarić Z, et al. Rapid Capillary Electrophoresis Method for Simultaneous Determination of Abemaciclib, Ribociclib, and Palbociclib in Pharmaceutical Dosage Forms: A Green Approach. *Molecules*, 2022, 27, 7603.
21. Pena-Pereira F, Woynowski W, Tobiszewski M. AGREE-Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Anal. Chem.*, 2020, 92, 10076 – 10082.
22. Nigović B., et al. Analitika lijekova – priručnik za vježbe za studente farmacije. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2022, str. 112.
23. Xuan X, Li D. Joule heating effects on peak broadening in capillary zone electrophoresis. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2004, 14, 1171.

24. Markarian SA, Harutyunyan LR, Harutyunyan RS. The Properties of Mixtures of Sodium Dodecylsulfate and Diethylsulfoxide in Water. *Journal of Solution Chemistry*, 2005, 34, 361 – 368.
25. ICH Harmonised Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Secretariat, <http://www.ich.org>, 2006, pristupljeno 10. 4. 2023.

Ivor Babić

Razvoj i validacija prve kapilarnoelektroforetske metode za analizu novog antitumorskog lijeka alpelisiba – zeleno rješenje

8. SAŽETAK

Rak dojke jedan je od najčešće dijagnosticiranih zloćudnih tumora. Sa 685 000 smrtnih slučajeva u 2020. godini bio je peti vodeći uzrok smrtnosti od raka. Alpelisib je jedan od novih lijekova za tumor dojke, a odobren je 2019. godine od strane FDA-a za liječenje raka dojke koji je pozitivan na HR receptor, negativan na HER2 receptor, a koji ima PIK3CA mutaciju.

Do sada su objavljene svega tri metode tekućinske kromatografije za analizu alpelisiba u biološkim uzorcima u različitim prekliničkim ispitivanjima. Cilj ovog rada bio je razviti, optimizirati i validirati prvu kapilarnoelektroforetsku metodu za identifikaciju i određivanje sadržaja alpelisiba u gotovom farmaceutskom obliku.

Tijekom optimizacije ispitan je utjecaj koncentracije pufera (15 – 50 mM), dodatka organskog otapala (metanol) i surfaktanta (SDS), temperature (15 – 30 °C) i napona (15 – 30 kV). Određeni su optimalni uvjeti analize: koncentracija boratnog pufera od 25 mM, napon od 30 kV, temperatura od 30 °C, odsustvo organskog otapala i surfaktanta. Metoda je nakon razvoja uspješno validirana prema ICH smjernicama. U svrhu validacije ispitani su selektivnost, linearnost, ponovljivost, srednja preciznost, točnost, granica određivanja i izdržljivost. Metoda se pokazala linearnom u rasponu od 10 do 100 µg/mL ($r = 0,999$), preciznom ($RSD \leq 5,87\%$), točnom (99,81 – 103,61%), osjetljivom ($LOQ = 5 \mu\text{g}/\text{ml}$) i robusnom ($RSD \leq 3,19\%$).

Optimizirana i validirana metoda primijenjena je za analizu sadržaja alpelisiba u tableti i dobiven je analitički prinos u rasponu od 96,34% do 99,04%

Procjenom zelenosti metode prema smjernicama ACS-a metoda je dobila maksimalan rezultat zelenosti. Prema Eco-Scale smjernicama metoda je dobila 84 boda od mogućih 100, a taj ju rezultat svrstava u kategoriju odlične zelenosti. GAPI je poslužio za procjenu zelenog karaktera cijele analitičke metodologije, od prikupljanja uzorka do same analize, a najveći broj koraka u pripremi uzorka i analizi dobio je zelenu boju na piktogramu. Korištenjem kalkulatora metode AGREE procijenjena je zelenost 12 kriterija zelene analitičke kemije te je dobiven rezultat zelenosti od 0,72, što također potvrđuje da je novorazvijena metoda uistinu vrlo zelena.

KLJUČNE RIJEČI: alpelisib, rak dojke, kapilarna elektroforeza, zelena kemija

Ivor Babić

Development and validation of the first capillary electrophoretic method for the analysis of the new antitumor drug alpelisib - the green solution

9. SUMMARY

Breast cancer is one of the most frequently diagnosed malignant tumors. With 685,000 deaths in 2020, it was the fifth leading cause of death from cancer. Alpelisib is a relatively new antitumor drug. It was approved in 2019. by the FDA for the treatment of HR positive, HER2 negative breast cancer with PIK3CA mutation.

So far, only three liquid chromatography methods have been published for the analysis of alpelisib in biological samples in different preclinical trials. The aim of this research was to develop, optimize and validate the first capillary electrophoretic method for the identification and quantification of alpelisib in the pharmaceutical dosage form.

During the optimization, the effects of buffer concentration (15 - 50 mM), addition of organic solvent (methanol) and surfactant (SDS), temperature (15 - 30 °C) and voltage (15 - 30 kV) were examined. The optimal analysis conditions were determined: borate buffer concentration of 25 mM, voltage of 30 kV, temperature of 30 °C, absence of organic solvent and surfactant. After development, the method was successfully validated according to ICH guidelines. For the purpose of validation, selectivity, linearity, precision, accuracy, limit of quantification and robustness were tested. The method proved to be linear in the range from 10 to 100 µg/mL ($r = 0.999$), precise ($RSD \leq 5,87 \%$), accurate (99.81 – 103.61%), sensitive (LOQ = 5 µg/mL) and robust ($RSD \leq 3.19\%$).

The optimized and validated method was applied to analyze the content of alpelisib in the tablet and the the recovery was found to be in a range from 96,34 to 99,04%

By evaluating the greenness of the method according to the ACS guidelines, the method received the maximum greenness score. According to the Eco-Scale guidelines, the method received 84 points out of a possible 100, and this result places it in the category of excellent greenness. GAPI was used to assess the green character of the entire analytical methodology, from sample collection to the analysis itself, and the largest number of steps in sample preparation and analysis received the green color on the pictogram. Using the AGREE method calculator, the greenness of 12 criteria of green analytical chemistry was evaluated and a greenness result of 0,72 was obtained, which also confirms that the newly developed method is very green.

KEYWORDS: alpelisib, breast cancer, capillary electrophoresis, green chemistry

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 4.1.2001. godine u Zagrebu. Maturirao sam 2019. godine u Gimnaziji Velika Gorica kao maturant generacije. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjelovao sam na državnim natjecanjima iz hrvatskog jezika i biologije, a 2017. godine osvojio sam 3. mjesto na prvenstvu Balkana u karateu kao član juniorske karate reprezentacije. 2019. godine upisao sam studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu. Od prve godine studija sudjelujem u aktivnostima Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske, a posebno bih izdvojio ulogu organizatora Natjecanja u konzultacijskim vještinama 2023. godine u Rijeci. Dobitnik sam i nagrade za najbolji postignuti uspjeh na 3. studijskoj godini farmacije u akademskoj godini 2021./2022.