

Razvoj i validacija nove bioanalitičke metode za istovremeno određivanje ribocikliba, letrozola i ibuprofena kapilarnom elektroforezom

Božić, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:913389>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Josipa Božić

**RAZVOJ I VALIDACIJA NOVE BIOANALITIČKE
METODE ZA ISTOVREMENO ODREĐIVANJE
RIBOCIKLIBA, LETROZOLA I IBUPROFENA
KAPILARNOM ELEKTROFOREZOM**

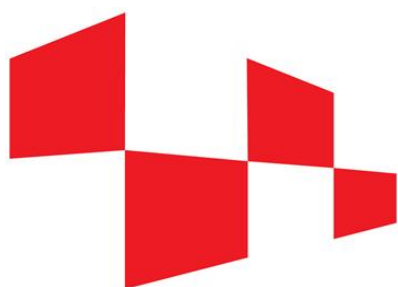
Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2023. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Mirande Sertić. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Nives Galić.

Ovaj rad financirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom *Nova bioanalitička rješenja za personalizaciju terapije raka dojke* (HRZZ-UIP-2019-04-8461)



HRZZ

Hrvatska zaklada
za znanost

Zahvale

Izv. prof. dr. sc. Miranda Sertić, ne mogu Vam dovoljno zahvaliti na ukazanom povjerenju, susretljivosti, ažurnosti, sugestijama i prilikama koje ste mi pružili tijekom izrade ovog diplomskog rada. Rad u Vašem laboratoriju sve je što jedna kemičarka može poželjeti, a Vas se kao mentoricu ne može dovoljno nahvaliti. Hvala Vam na svemu!

Prof. dr. sc. Nives Galić, hvala Vam na svim savjetima, kako prilikom izrade ovog diplomskog rada, tako i prilikom izrade završnog rada 2020. godine. Vaša stručnost iznimno mi je pomogla.

Zvonimir, hvala na konstruktivnim savjetima i na pomoći u uspostavljanju odgovarajućeg feng shuija u labosu, kao i na gašenju kapilarne i kraćenju vremena između analiza razgovorom. Lu, hvala na pomoći s kapilarnom koja je nekad slušala samo sebe, nesebično si pomagala kad god je trebalo.

Kristina, hvala ti što si bila moj psihoterapeut sve ove godine. Ako sam na nečemu zahvalna ovom faksu, onda je to činjenica da imam tebe u životu. Sve studentske nedaće bile su lakše uz tebe. Ti si pjesma moje duše.

Emma, hvala na svim skriptama koje si nesebično dijelila, zajedničkom učenju kad je bilo kritično, na podršci i optimizmu koji unosiš gdje god se pojaviš. Kamen, krš i amoniti zauvijek imaju mjesto u mom srcu.

Svim mojim prijateljima koji su ostali moji prijatelji nakon 2. godine faksa, hvala što ste još tu! Za sve šetnje, kave, izlaske, izlete i sve što slijedi, hvala. Sve vas obožavam.

Marine, jednim hvala ne mogu dovoljno zahvaliti za ljubav, podršku bez zadržke i sve trenutke koje smo proživjeli skupa. Uz tebe odustajanje nije opcija, zbog tebe sam najbolja verzija sebe.

Sanja i Dragana, hvala na sestrinskoj ljubavi uz koju je sve lakše. Sve je bolje kad smo zajedno. ♡

Mama i Tata, bez kojih ništa od ovoga ne bi bilo moguće, hvala vam na bezuvjetnoj podršci koju mi pružate cijeli život i na lagodnom studentskom životu koji ste mi omogućili. Nikad niste propitkivali moje životne odluke, a nadam se da sam opravdala povjerenje koje ste mi dali. Dugo smo ovo čekali, ali tko čeka, taj dočeka. Ovo je naša diploma.



Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Bioanalitika.....	2
2.1.1. <i>Razvoj bioanalitičke metode</i>	<i>2</i>
2.1.2. <i>Validacija bioanalitičke metode.....</i>	<i>2</i>
2.2. Kapilarna elektroforeza	3
2.2.1. <i>Instrument za kapilarnu elektroforezu</i>	<i>4</i>
2.2.2. <i>Parametri koji utječu na brzinu kretanja analita u kapilari</i>	<i>5</i>
2.2.3. <i>Primjena kapilarne elektroforeze.....</i>	<i>7</i>
2.3. Rak dojke.....	8
2.3.1. <i>Liječenje raka dojke</i>	<i>8</i>
2.3.2. <i>Letrozol</i>	<i>11</i>
2.3.3. <i>Ribociklib</i>	<i>11</i>
2.3.4. <i>Ibuprofen.....</i>	<i>12</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Kemikalije i pribor.....	14
3.1.1. <i>Priprema standardnih otopina.....</i>	<i>15</i>
3.1.2. <i>Priprema otopina za otopinu radnog pufera</i>	<i>15</i>
3.2. Instrument i uvjeti	16
3.2.1. <i>Korištena instrumentacija.....</i>	<i>16</i>
3.2.2. <i>Razvoj metode</i>	<i>17</i>
3.2.3. <i>Validacija metode</i>	<i>18</i>
3.3. Primjena metode na biološki uzorak.....	20
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Razvoj metode za analizu ibuprofena, letrozola i ribocikliba.....	21
4.1.1. <i>Odabir radne otopine pufera</i>	<i>21</i>
4.1.2. <i>Ispiranje kapilare.....</i>	<i>32</i>
4.1.3. <i>Prilagodba elektroforetskih uvjeta.....</i>	<i>33</i>
4.2. Validacija metode.....	34
4.2.1. <i>Preciznost.....</i>	<i>34</i>

4.2.2. <i>Linearnost</i>	35
4.2.3. <i>Točnost</i>	38
4.2.4. <i>Granica detekcije i granica kvantifikacije</i>	39
4.2.5. <i>Robusnost</i>	40
4.2.6. <i>Specifičnost</i>	41
4.3. Primjena metode na biološki uzorak	42
§ 5. ZAKLJUČAK	44
§ 6. POPIS OZNAKA, POKRATA I SIMBOLA	45
§ 7. LITERATURNI IZVORI	47
§ 8. DODATAK	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

RAZVOJ I VALIDACIJA NOVE BIOANALITIČKE METODE ZA ISTOVREMENO ODREĐIVANJE RIBOCIKLIBA, LETROZOLA I IBUPROFENA KAPILARNOM ELEKTROFOREZOM

Josipa Božić

Rak dojke, s dominantnim podtipom HR+ HER2–, najčešći je rak u svijetu. Jedan od načina liječenja HR+ HER2– raka dojke je kombinacijom CDK4/6 inhibitora i inhibitora aromataze, često uz lijekove ribociklib i letrozol. Kapilarna elektroforeza metoda je koja se iz dana u dan sve više razvija te bi se s odgovarajućom reproducibilnošću i osjetljivošću mogla koristiti u svrhu terapijskog praćenja lijekova. U ovom je radu razvijena i validirana metoda za određivanje ribocikliba, letrozola i ibuprofena kapilarnom elektroforezom uz ketoprofen kao unutarnji standard. Separacija je postignuta uz 75 mmol dm^{-3} fosfat, $8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ sulfobutileter- β -ciklodekstrin (SBE- β -CD) i 5 % izopropanola u radnom puferu pri naponu 15 kV i temperaturi 25 °C. Uzorak je injektiran hidrodinamički pri tlaku –50 mbar u trajanju 5 sekundi, nakon injektiranja ultračiste vode 6 sekundi. Metoda je precizna, linearna u rasponu masene koncentracije od 1 do $75 \mu\text{g cm}^{-3}$, specifična, robusna za promjenu temperature, koncentracije SBE- β -CD te napona.

(49 stranica, 28 slika, 7 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: bioanalitika, kapilarna elektroforeza, letrozol, rak dojke, ribociklib

Mentor: izv. prof. dr. sc. Miranda Sertić

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Nives Galić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
2. prof. dr. sc. Mirta Rubčić
3. doc. dr. sc. Morana Dulić

Zamjena: prof. dr. sc. Sanda Rončević

Datum diplomskog ispita: 17. veljače 2023.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NEW BIOANALYTICAL METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF RIBOCICLIB, LETROZOLE AND IBUPROFEN BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Josipa Božić

Breast cancer is the most common type of cancer in the world, with subtype HR+ HER2– being most prevalent. HR+ HER2– breast cancer can be treated with hormone therapy, with ribociclib (CDK 4/6 inhibitor) and letrozole (aromatase inhibitor) being a commonly used medicine combination. Capillary electrophoresis is a rapidly developing method which could be used for therapeutic drug monitoring purposes after providing acceptable reproducibility and sensitivity. A method for analysis of ribociclib, letrozole and ibuprofen by capillary electrophoresis using ketoprofene as an internal standard was developed and validated. The separation was obtained with 75 mmol dm⁻³ phosphate, 8,5 mmol dm⁻³ sulphobutylether-β-cyclodextrin (SBE-β-CD) and 5% isopropanol. The hydrodynamic injection was performed at –50 mbar pressure for 5 seconds, after the injection of ultrapure water for 6 seconds. The method is precise, linear in a range of mass concentration of 1 to 75 μg cm⁻³, specific and robust for the change of temperature, SBE-β-CD concentration and voltage.

(49 pages, 28 figures, 7 tables, 56 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: bioanalytics, breast cancer, capillary electrophoresis, letrozole, ribociclib

Mentor: Dr. Miranda Sertić, Associate Professor

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Nives Galić, Full Professor

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Full Professor
 2. Dr. Mirta Rubčić, Full Professor
 3. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Sanda Rončević, Full Professor

Date of exam: February 17th, 2023

§ 1. UVOD

Rak dojke najčešći je rak u svijetu. 2020. godine dijagnosticirano je 2,3 milijuna novih slučajeva raka dojke, od ukupno dijagnosticiranih 19,3 milijuna slučajeva raka.¹ HR+ HER2– rak dojke ima prekomjerno eksprimirane hormonske receptore, a nema prekomjerno eksprimirane receptore ljudskog faktora rasta. Često korištena kombinacija lijekova za liječenje HR+ HER2– raka dojke u kliničkoj praksi jest kombinacija ribocikliba (inhibitor CDK4/6 kinaza) i letrozola (inhibitor aromataze).² Uz navedene lijekove pacijenti, ovisno o drugim bolestima ili nuspojavama, koriste i druge lijekove kao što je ibuprofen, nesteroidni protuupalni lijek široke primjene.

Terapijsko praćenje lijeka omogućuje individualizaciju potrebne doze lijeka u svrhu poboljšanja životnih uvjeta pacijenta (smanjenje nuspojava i toksičnih interakcija lijekova). Koncentracija lijeka u svrhu terapijskog praćenja lijeka najčešće se mjeri u plazmi imunokemijskim ili kromatografskim metodama.³

Prvi komercijalni instrument kapilarne elektroforeze visoke djelotvornosti pojavio se na tržištu 1988. godine te se od tada kapilarna elektroforeza rapidno razvija. Kapilarnu se elektroforezu u bioanalitici želi izjednačiti sa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), no za kliničku primjenu još nije dovoljno reproducibilna, osjetljiva i selektivna. Prednosti kapilarne elektroforeze u odnosu na tekućinsku kromatografiju su manja količina potrebnog uzorka i otapala korištenih za analizu te kraće vrijeme analize.⁴

Cilj ovog diplomskog rada jest razviti i validirati metodu za simultanu analizu ribocikliba, letrozola i ibuprofena kapilarnom elektroforezom uz ketoprofen kao unutarnji standard.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Bioanalitika

Bioanalitika jest pojam koji opisuje kvantitativno mjerenje spoja (lijeka) ili njegovog metabolita u biološkim tekućinama (krvi, plazmi, serumu, urinu) ili ekstraktima tkiva.⁵

Bioanalitička metoda sastoji se od pripreme uzorka te detekcije spoja. Priprema uzorka podrazumijeva pročišćavanje ili ukoncentriravanje uzorka prije analize kako bi se poboljšala detekcija i kvantitativno određivanje. U slučaju bioloških tekućina, najčešće se pribjegava ekstrakciji tekuće-tekuće ili ekstrakciji na čvrstoj fazi kako bi se od uzorka odvojili interferirajući spojevi iz biološkog matriksa. Detekcija spoja najčešće uključuje odvajanje analita od drugih spojeva iz smjese te korištenje prikladnog detektora i interpretaciju rezultata dobivenih na detektoru.⁶

Glavna uloga bioanalitike u farmaceutskoj industriji jest pružiti kvantitativnu analizu lijeka ili metabolita određenog lijeka u svrhu proučavanja farmakokinetike, toksikokinetike, bioekvivalencije te farmakodinamike lijeka.⁵

2.1.1. Razvoj bioanalitičke metode

Razvoj bioanalitičke metode proces je koji obuhvaća definiranje metoda identifikacije i kvantifikacije spoja u određenom matriksu. Prilikom razvoja metode potrebno je uzeti u obzir mnoštvo parametara kao što su kemijska svojstva analita, koncentracija analita, matriks u kojemu se analit nalazi, ekonomski aspekt, dostupne uređaje te željenu preciznost i točnost. Razvoj metode podrazumijeva uzorkovanje, pripremu uzorka, separaciju, detekciju, kvantitativno određivanje te očitavanje i interpretaciju rezultata.⁷

Razvoju metode u praksi pristupa se ponavljanjem povezanih koraka koji se procjenjuju i po potrebi mijenjaju kako bi se dobila najbolja metoda sačinjena od optimalnih uvjeta.⁸

2.1.2. Validacija bioanalitičke metode

Kako bi se dokazalo da se bioanalitička metoda može koristiti u određenu svrhu, metodu je potrebno validirati prema određenim smjernicama, a smjernice se razlikuju ovisno o državi u

kojoj se istraživanja provode, o svrsi istraživanja i slično. Kako bi se metoda koristila za analizu lijekova, metoda mora biti pouzdana i ponovljiva.⁶

Europska agencija za lijekove (European Medicines Agency, EMA) propisuje dokument *ICH Harmonised Tripartite Guideline* u kojemu su navedeni parametri koje je potrebno odrediti te daje upute za testiranje svakog parametra metode. Prema pravilniku *ICH Harmonised Tripartite Guideline* za validaciju analitičkih postupaka potrebno je validirati metodu određivanjem točnosti, preciznosti (ponovljivost i međupreciznost), specifičnosti, granice detekcije, granice kvantifikacije, robusnosti, linearnosti te raspona.⁹ Prilikom validacije bioanalitičke metode potrebno je odrediti i učinak matriksa, stabilnost analita u biološkom matriksu te stabilnost analita i unutarnjeg standarda u matičnim otopinama, radnim otopinama i ekstraktima tijekom skladištenja.¹⁰ Bioanalitička metoda se nakon uspješne validacije može koristiti u predviđene svrhe.¹¹

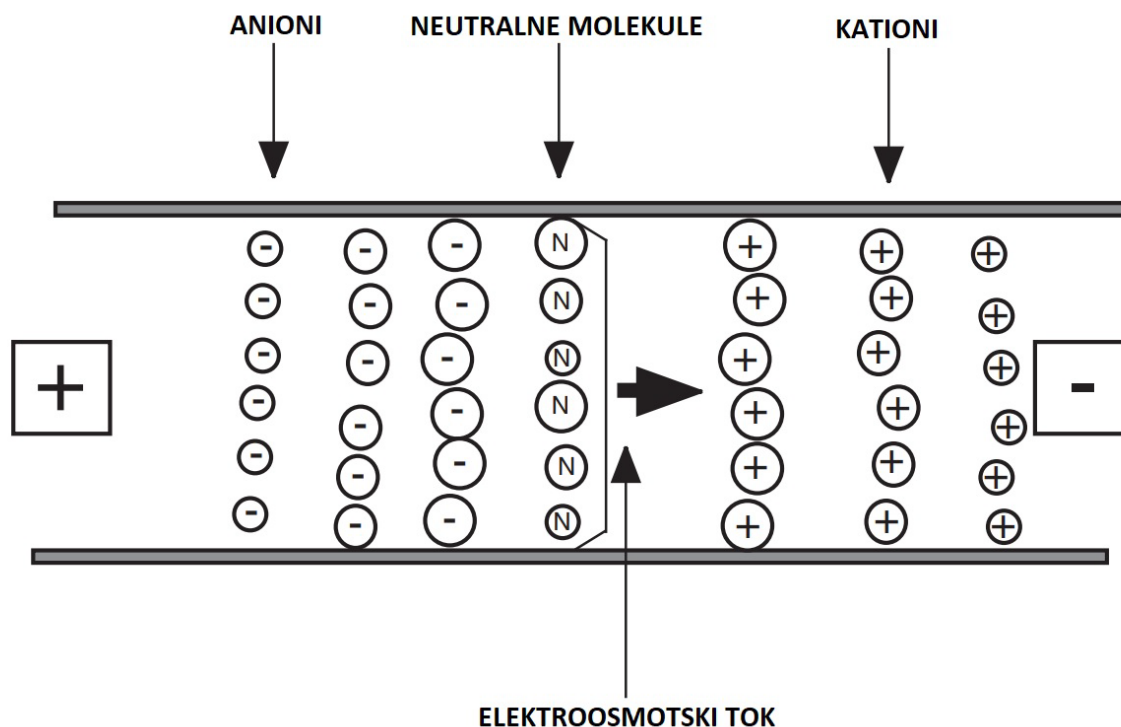
2.2. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE) separacijska je tehnika koja se temelji na različitoj brzini kretanja čestica u uskoj kapilari na koju je primjenjeno električno polje visokog potencijala (10-30 kV). Kapilare korištene za kapilarnu elektroforezu najčešće su duljine od 10 do 110 centimetara i unutarnjeg promjera od 25 do 75 mikrometara.¹²

Unutar kapilare sve se molekule gibaju prema negativno nabijenoj katodi uslijed nastanka elektrosmotskog toka (engl. *Electro Osmotic Flow*, EOF). Elektroosmotski tok jest tok čistog pufera u kapilari koji se giba uslijed površinskog nabijanja unutarnje stijenke kapilare. Kapilare su najčešće izrađene od izvučenog kvarca te unutrašnja stijenka sadrži brojne silanolne grupe, a silanolne grupe iznad pH-vrijednosti 2 postaju negativno nabijene.¹³ Na površini kapilare stvara se sloj pozitivno nabijenih iona (suprotno nabijeni od silanolnih grupa), dok se u difuzijskom dijelu nalaze kationi i anioni. Primjenom napona na krajevima kapilare, kationi iz difuznog dijela bivaju privučeni prema katodi te svojim kretanjem povlače za sobom i okolnu tekućinu.¹⁴

Kapilarnom elektroforezom moguće je istovremeno analizirati katione, anione i neutralne molekule. Unutar kapilare, prvi će do katode doći mali kationi jer se kreću u istome smjeru kao puferska otopina i imaju najveću brzinu, potom neutralne molekule koje se kreću brzinom istom kao i puferska otopina te konačno negativno nabijeni ioni za koje je

elektroosmotska pokretljivost značajno veća u odnosu na brzinu kojom se oni kreću prema pozitivno nabijenoj anodi. Redosljed migracije nabijenih i nenabijenih vrsta prikazan je na slici 1.



Slika 1. Migracija kationa, neutralnih molekula, elektroosmotskog toka i aniona prilikom primjene napona na krajevima kapilare od izvučenog kvarca (modif. D. G. Watson, *Pharmaceutical Analysis*, Elsevier Limited, 2017, str. 372, ref. 12)

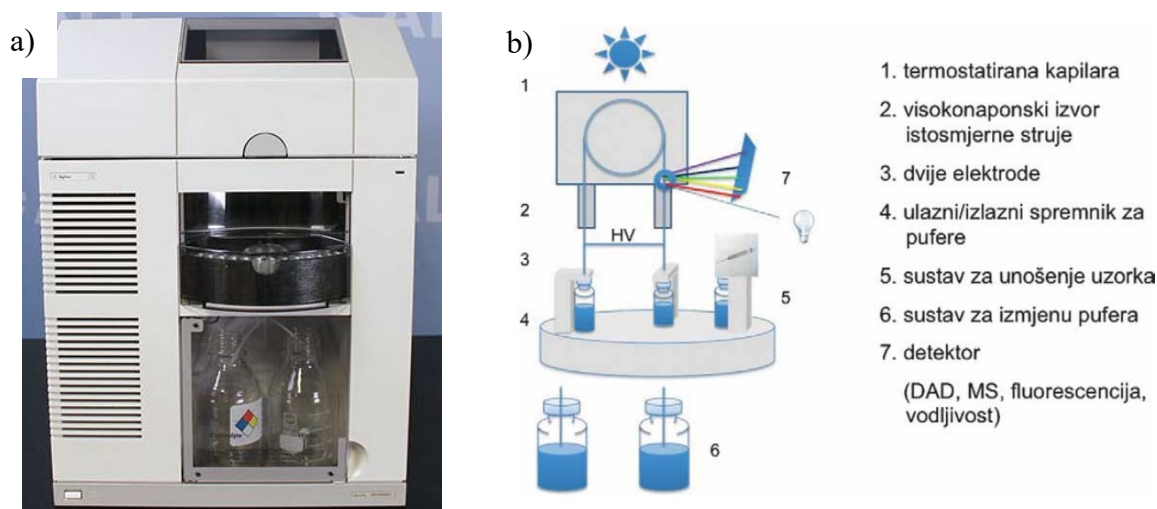
Na slici 1 vidljiv je i ravan profil elektroosmotskog toka. Ravan profil karakteristika je kapilarne elektroforeze te je iznimno povoljan jer ne pridonosi disperziji zona analita, a javlja se zbog jednake jakosti električnog polja u svakoj točki unutar kapilare, a koja pokreće elektroosmotski tok unutar kapilare. Ne postoji pad tlaka unutar kapilare kao što je to slučaj kod korištenja vanjske pumpe u tekućinskoj kromatografiji koji rezultira širenjem zona analita uslijed različite brzine gibanja čestica u sredini kromatografske kolone i uz rubove kolone.¹⁵

2.2.1. Instrument za kapilarnu elektroforezu

Instrument za kapilarnu elektroforezu sastoji se od termostatisane kapilare smještene unutar kazete pri čemu su krajevi kapilare uronjeni u spremnike s puferskom otopinom. Unutar instrumenta ključne su dvije elektrode te visokonaponski izvor istosmjerne struje, sustav za

injektiranje uzorka te detektor. Detektori u kapilarnoj elektroforezi, ovisno o analitima, mogu biti detektor apsorpcije u UV-VIS dijelu elektromagnetskog spektra, fluorimetar, spektrometar masa, konduktometar, amperometar, potenciometar i drugi.¹⁶ Shema uređaja za kapilarnu elektroforezu prikazana je na slici 2 b.

Kapilara za kapilarnu elektroforezu najčešće se izrađuje od kvarcnog stakla ili fluorirane ugljikovodične smole, a izvana je, zbog zaštite od pucanja, obložena slojem toplinski vodljivog polimera.¹⁷ Ovisno o ispuni kapilare razlikuju se metode kapilarne elektroforeze. Kapilara može biti punjena elektrolitnom otopinom radnog pufera (kapilarna zonska elektroforeza), gelom (kapilarna gel-elektroforeza), otopinom amfolita (kapilarno izoelektrično fokusiranje), elektrolitskim tekućinama različite pokretljivosti (kapilarna izotahoforeza), radnim puferom s dodatkom kiralnog selektora (kiralna kapilarna elektroforeza) ili surfaktanta (micelarna elektrokinetička kromatografija), organskim otapalom (nevodena kapilarna elektroforeza) ili pak stacionarnom fazom (kapilarna elektrokromatografija) koja objedinjuje metodu kapilarne elektroforeze i kromatografije.¹⁴



Slika 2. a) Hewlett Packard G1600AX 3D Capillary Electrophoresis instrument

(<https://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/hewlett-packard-g1600ax-3d-capillary-electrophoresis-6449>, ref. 17) b) Shema uređaja za kapilarnu elektroforezu (M.

Damić, B. Nigović, *Farmaceutski glasnik*, **66** (2010) str. 196, ref. 14)

2.2.2. Parametri koji utječu na brzinu kretanja analita u kapilari

Brzina kojom se čestice gibaju unutar kapilare može se zapisati prema formuli (1) kako slijedi

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

u kojoj v_{ep} označava brzinu iona u električnom polju, μ_{ep} elektroforetsku pokretljivost čestice, a E jakost primijenjenog električnog polja.

Jakost primijenjenog električnog polja (E) ovisi o primijenjenom naponu i duljini kapilare prema formuli (2)

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

u kojoj je V primijenjeni napon, a L duljina kapilare.

Elektroforetska pokretljivost čestice (μ_{ep}) dana je izrazom (3)

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

u kojemu je q naboj čestice, η viskoznost otopine, a r hidrodinamički polumjer čestice.¹⁴ Spoje li se jednačbe (1), (2) i (3) u jednu, brzina putovanja analita postaje

$$v_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \frac{V}{l} \quad (4)$$

Iz jednačbe (4) vidljivo je da je brzina čestice to veća što joj je naboj veći, a hidrodinamički radijus manji.

Brojni su drugi parametri koji utječu na brzinu kretanja analita u kapilari tijekom elektroforeze te na izgled elektroferograma. Unutarnji promjer kapilare predstavlja problem zbog adsorpcije molekula analita na površinu kapilare, a uslijed čega dolazi do smanjenja selektivnosti i učinkovitosti separacije. Što je unutarnji promjer kapilare veći, veća je i površina na koju se analit može adsorbirati te smanjiti pouzdanost rezultata.

Radna otopina pufera od izuzetne je važnosti jer se njome može postići efikasnije razdvajanje signala analita u elektroferogramu, bolji izgled signala ili je moguće promijeniti vrijeme analize. Kapacitet pufera nužno mora biti dovoljno velik za sprječavanje promjene pH-

vrijednosti do koje dolazi gibanjem iona u kapilari. Sastavnice pufera pak trebaju što slabije apsorbirati u području valne duljine korištene za detekciju analita ako se detekcija vrši takvim detektorom. pH-vrijednost pufera utječe na naboj analita i molekula koje se dodaju u pufer kao modulatori te na elektroosmotski tok otopine. Dodatci u radnoj otopini pufera mogu utjecati na stupanj ionizacije analita, kompleksirati analite te ih učiniti vidljivima u UV-VIS području elektromagnetskog spektra, odvojiti enantiomere ili pak usporiti kretanje čestica. Modulatori mogu biti organska otapala, kelatori, kiralni selektori ili surfaktanti, a njihove koncentracije odredit će izgled elektroferograma.¹⁸

2.2.3. Primjena kapilarne elektroforeze

Područje primjene kapilarne elektroforeze uistinu je široko te se kapilarna elektroforeza može koristiti za analizu aminokiselina, proteina, u analizi antitijela, za proučavanje interakcija enzima i supstrata, u analizi lijekova, biljnih otrova, tvari iz okoline (pesticidi, herbicidi, ugljikovodici, organometalni spojevi), za separaciju i kvantifikaciju enantiomera, biokemijsku analizu bioloških tekućina, u sekvencioniranju DNA i analizi prehrambenih proizvoda.^{10, 15}

U Hrvatskoj se u *Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu* pri *Kliničkoj bolnici Merkur* kapilarna elektroforeza koristi kao rutinska akreditirana metoda za analizu hemoglobina A_{1c}¹⁹, u *Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku* pri *Kliničkoj bolnici Dubrava* koristi se kao rutinska akreditirana metoda za analizu serumskih proteina²⁰, a u *Odjelu za elektroforetsku i imunokemijsku laboratorijsku dijagnostiku* pri *Kliničkom bolničkom centru Zagreb* za dijagnostiku hemoglobinopatija.²¹

S mogućnošću analize bioloških tekućina te lijekova, kapilarna elektroforeza nameće se u kliničkoj praksi i za praćenje koncentracije lijekova i metabolita lijeka u plazmi. Zlatni standard u bioanalitici predstavlja tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), no kapilarna elektroforeza zbog jednostavnosti, automatiziranosti te manje količine potrebnog uzorka (volumen uzorka u nanolitrima ili mikrolitrima ovisno o instrumentu²²) i otapala predstavlja konkurentnu i ekološki prihvatljiviju metodu. Volumen korištenog organskog otapala za analizu kapilarnom elektroforezom čak je do 98 % manji od volumena korištenog za analizu tekućinskom kromatografijom obrnutih faza.²³

2.3. Rak dojke

Rak dojke najčešći je rak u svijetu. 2020. godine dijagnosticirano je 2,3 milijuna novih slučajeva raka dojke, od ukupno dijagnosticiranih 19,3 milijuna slučajeva raka.¹ Od raka dojke obolijevaju uglavnom žene, a od ukupnog broja slučajeva manje od 1 % su muškarci.²⁴ Dijagnoza raka dojke najčešće se postavlja mamografijom, a potvrđuje se patohistološkom analizom.²⁵

Do 75 % rakova dojki pretjerano eksprimira estrogenski (engl. *Estrogen Receptor*, ER) ili progesteronski receptor (engl. *Progesteron Receptor*, PR) te se takvi rakovi nazivaju HR+ (engl. *Hormone Receptor Positive*, hormonski receptor pozitivni). Takvi se tipovi raka dojke liječe endokrinom terapijom. HR– (hormonski receptor negativni) rakovi nemaju prekomjerno ekspimirane hormonske receptore te se ne mogu liječiti na isti način.¹⁹ U 15 do 30 % rakova dojke pretjerano se eksprimira HER2 receptor (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, receptor ljudskog epidermalnog faktora rasta 2) zadužen za signalnu kaskadu koja dovodi do proliferacije i dijeljenja stanica raka.²⁶ ER, PR i HER2 koriste se kao tumorski biljezi koji se određuju i mjere iz tkiva tumora.²⁷

Kategorizacija raka dojke na temelju genetskih informacija²⁸ je slijedeća:

- i) Luminal A grupa - ER i PR pozitivni, HER2 negativni tumori (liječe se antihormonskom terapijom i kemoterapijom)
- ii) Luminal B grupa - ER pozitivni, PR negativni, HER2 pozitivni tumori (liječe se kemoterapijom i monoklonskim anti-HER2 antitijelima)
- iii) HER2 pozitivni - ER i PR negativni, HER2 pozitivni tumori (liječe se kemoterapijom i monoklonskim anti-HER2 antitijelima)
- iv) Trostruko negativni – ER, PR i HER2 negativni tumori (liječe se kemoterapijom)

2.3.1. Liječenje raka dojke

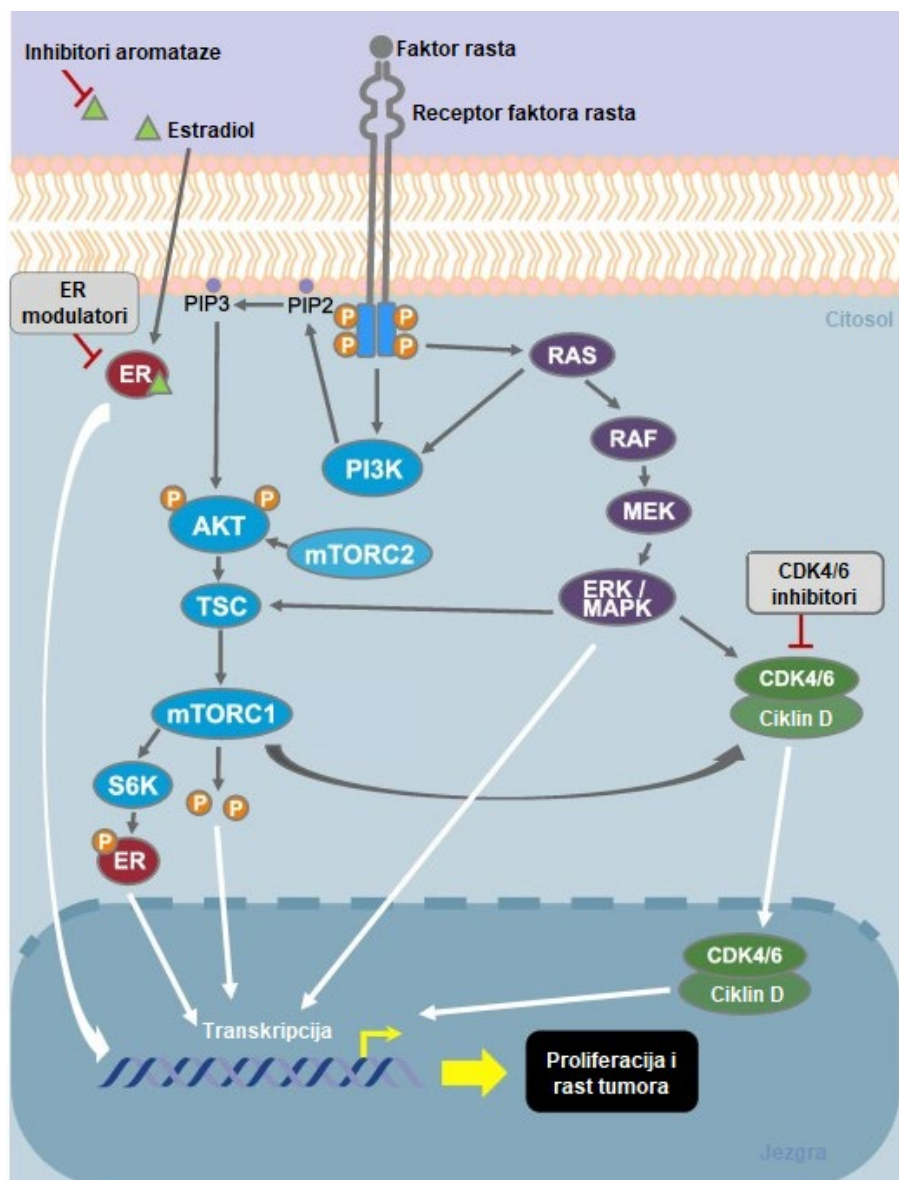
Nekoliko je pristupa liječenju raka dojke koji su uglavnom određeni stupnjem u kojem je rak dijagnosticiran i njegovim patohistološkim te imunološkim karakteristikama. Za uklanjanje raka dojke koji je lokaliziran te pronađen u ranoj fazi obavlja se mastektomija te terapija zračenjem. Za tumore veće od jednog centimetra u promjeru koristi se kemoterapija citostaticima. U terapiji liječenja raka dojke koji ima ekspimirane hormonske receptore koristi se endokrina terapija hormonskim agonistima i antagonistima koja, osim što smanjuje smrtnost

pacijenata oboljelih od raka dojke, također smanjuje i vjerojatnost ponovne pojave tumorskih stanica. Endokrinu terapiju pacijenti znatno bolje podnose nego kemoterapiju koja uzrokuje više nuspojava.²⁹

Personalizirana medicina podrazumijeva pristup liječenju koji je skrojen prema potrebama pacijenta, a u području onkologije cilj joj je smanjiti toksičnost lijekova korištenih u terapiji te osigurati dulji period bez ponovnog razvoja raka, a sve uz maksimalnu efikasnost. Praćenjem tumorskih markera svakom se pacijentu može dati odgovarajuća terapija.³⁰ Pogrešna terapija smanjuje kvalitetu života pacijenta te je ekonomski nepovoljna za zdravstveni sustav. Tijekom terapije lijek je potrebno dozirati u točno određenim količinama i vremenskim razmacima kako bi koncentracija lijeka u organizmu bila veća od najmanje učinkovite koncentracije, a manja od najmanje toksične koncentracije.³¹

Praćenje koncentracije lijeka tijekom terapije (engl. *Therapeutic Drug Monitoring*, TDM) postupak je određivanja koncentracije lijeka u krvi pacijenta, a na temelju kojega se pristupa individualizaciji terapije. Individualno doziranje podrazumijeva prilagodbu doze lijeka, učestalost i način primjene lijeka te formulaciju lijeka. Tim se postupkom toksični učinak lijeka svodi na najmanju moguću mjeru uz osiguravanje maksimalne učinkovitosti primjenjene terapije. Uslijed korištenja drugih lijekova, starosne dobi ili drugih fizioloških i genetskih faktora lijekovi se različito apsorbiraju i distribuiraju u organizmima pojedinaca te je primijećena interindividualna razlika u koncentraciji lijeka u krvi i terapijskom odgovoru. Faktori koji utječu na koncentraciju lijeka u krvotoku su metabolizam (biotransformacija) lijeka, brzina i intenzitet apsorpcije iz probavnog trakta u slučaju peroralne primjene te izlučivanje lijeka iz organizma. Za terapijsko praćenje koncentracije lijeka koriste se imunokemijske i instrumentalne metode (plamena spektrofotometrija, atomska apsorpcijska spektrometrija, plinska kromatografija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti³¹ te kapilarna elektroforeza¹⁶).

Liječenje HR+ HER2- raka dojke vrši se endokrinom terapijom selektivnim modulatorima estrogenskih receptora (tamoksifen), inhibitorima aromataze (letrozol, anastrozol, egzemestan), profestinima (megestrol-acetat) i selektivnim deregulatorima estrogenskih receptora (fulvestrant) zajedno sa inhibitorima kinaza ovisnih o ciklinima 4 i 6 (engl. *Cyclin-Dependent Kinase*, CDK4/6) (ribociklib, palbociklib, abemaciclib) kako bi se izbjeglo stvaranje otpornosti na endokrinu terapiju i poboljšali terapijski ishodi.³³ Na slici 3 prikazana je unutarstanična signalizacija koja uzrokuje proliferaciju i rast tumora.



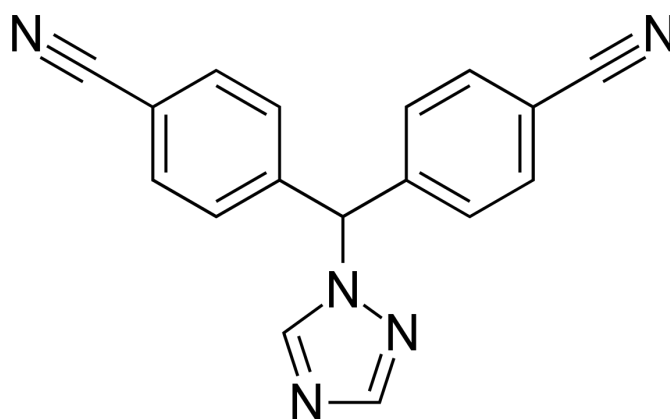
Slika 3. Unutarstanični signalni put koji uzrokuje proliferaciju i rast tumora uz ključne točke djelovanja antitumorskih lijekova (inhibitori aromataze, ER modulatori i CDK4/6 inhibitori)

(AKT – protein kinaza B; CDK – ciklin-ovisna kinaza; ER – estrogenski receptor; ERK/MAPK – kinaza regulirana vanstaničnim signalima/protein kinaza aktivirana mitogenom; MEK – kinaza protein kinaza aktiviranih mitogenom; mTORC1 – ciljna molekula rapamicin kompleksa 1 u sisavaca; mTORC2 – ciljna molekula rapamicin kompleksa 2 u sisavaca; P – fosforilacija; PIP2 – fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat; PIP3 – fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat; PI3K – fosfoinozimid-3-kinaza; RAF – faktor rapidnog ubrzanja fibrosarkoma; RAS – virus štakorskog sarkoma; S6K – S6 kinaza; TSC – tuberozno sklerozni protein) (modif. J. O’Shaughnessy, J. T. Beck, M. Royce, *Cancer Treat Rev*, **69** (2018) str. 205., ref. 34)

2.3.2. Letrozol

Letrozol (4-[(4-cijanofenil)-(1,2,4-triazol-1-il)metil]benzonitril, slika 4) je nesteroidni inhibitor aromataze, enzima koji katalizira zadnji korak biosinteze estrogena, a koristi se kao lijek za žene u postmenopauzi. Lijek dolazi u obliku tablete za oralnu primjenu. Preporučena doza od 2,5 mg letrozola dnevno inhibira više od 99,1 % aktivnosti aromataze u žena sa rakom dojke. Letrozol je izuzetno selektivan te se za aromatazu veže preko struktura s dušikom na željezo, a cijanobenzil unutar strukture letrozola nalikuje na steroidni kostur androstendiona, koji se u sintezi estrogena veže na aromatazu.³⁵

Osim inhibiranja aromataze, letrozol je povezan i sa smanjenjem kardiovaskularnih bolesti te povećanjem tjelesne mase.³⁶ Nuspojave koje se javljaju tijekom korištenja letrozola su mnogobrojne, od kojih česte uključuju kožni osip, opće loše stanje, stanjivanje ili propadanje kostiju, depresiju, hipertenziju i ukočenost zglobova.³⁷ Poželjno je koristiti optimalnu dozu letrozola kako bi se pacijenticama liječenje olakšalo te kako bi se minimizirale neželjene nuspojave.

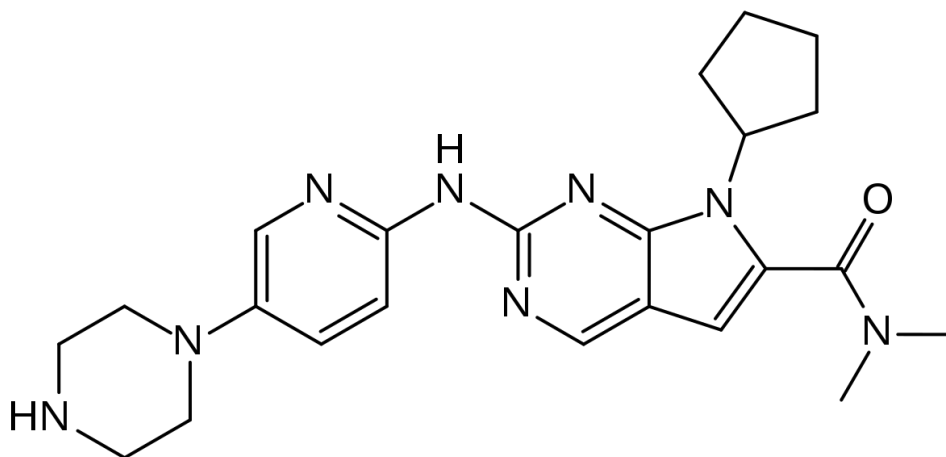


Slika 4. Strukturna formula letrozola (4-[(4-cijanofenil)-(1,2,4-triazol-1-il)metil]benzonitril)

2.3.3. Ribociklib

Ribociklib (7-ciklopentil-*N,N*-dimetil-2-[(5-piperazin-1-ilpiridin-2-il)amino]pirolo[2,3-*d*]pirimidin-6-karboksamid, slika 5) selektivni je inhibitor CDK4/6 koji sprječava fosforilaciju retinoblastomskog proteina vezanjem za mjesto vezanja adenzin-trifosfata (ATP).³⁸ Kao lijek dolazi u obliku tablete za oralnu primjenu. Preporučena dnevna doza je 600 mg (tri tablete po

200 mg) jednom dnevno tijekom 21 dana. Česte nuspojave uslijed korištenja ribocikliba su neutropenija, leukopenija, glavobolja, alopecija, anemija i druge. Nepodnošljive nuspojave mogu zahtijevati smanjenje doze ili trajni prekid liječenja ribociklibom.³⁹ Važno je odrediti optimalnu dozu lijeka u svrhu očuvanja kvalitete života pacijenta te smanjenja nuspojava.

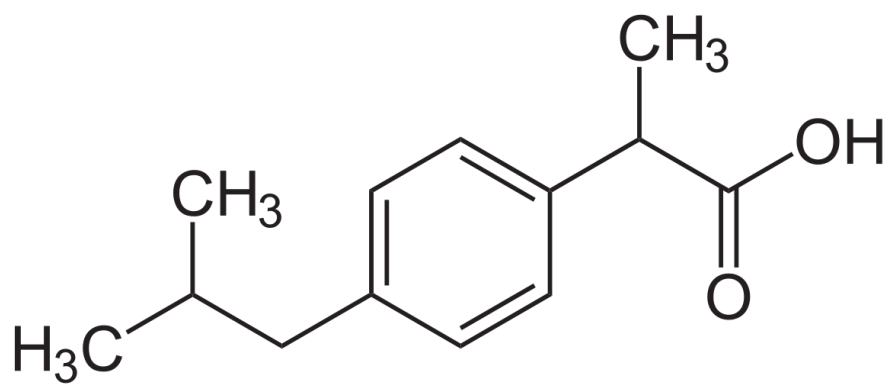


Slika 5. Strukturna formula ribocikliba (7-ciklopentil-*N,N*-dimetil-2-[(5-piperazin-1-ilpiridin-2-il)amino]pirolo[2,3-d]pirimidin-6-karboksamid)

2.3.4. Ibuprofen

Ibuprofen (2-(4-izobutilfenil)propanska kiselina, slika 6) nesteroidni je protuupalni lijek s analgetskim, protuupalnim i antipiretskim učincima. Terapijski učinci ibuprofena rezultat su inhibitornog djelovanja na enzim ciklooksigenazu, uslijed čega dolazi do smanjene sinteze prostaglandina. Preporučena dnevna doza ibuprofena iznosi od 1200 do 1800 miligrama dnevno podijeljeno u više doza. Kod teških i akutnih stanja doza se može povećati do 2400 miligrama dnevno u podijeljenim dozama, do trenutka uspostave kontrole nad akutnim stanjem. Lijek za oralnu primjenu dolazi u obliku tableta i kapsula, sirupa, oralne suspenzije, mekih kapsula za žvakanje, šumećih granula i sirupa. Nuspojave koje se javljaju uslijed korištenja ibuprofena su poremećaji probavnog sustava (povraćanje, proljev, nadutost, gastrointestinalna hemoragija), poremećaji imunološkog sustava te srčani i krvožilni poremećaji.⁴⁰

Ibuprofen se uvrštava u terapiju pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa, ankiloznog spondilitisa, osteoartritisa, kapsulitisa, burzitisa i tenditisa.⁴⁰



Slika 6. Strukturna formula ibuprofena (2-(4-izobutilfenil)propanska kiselina)

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije i pribor

U tablici 1 prikazane su kemikalije korištene u izradi ovog diplomskog rada.

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih za izradu diplomskog rada *Razvoj i validacija nove bioanalitičke metode za istovremeno određivanje ribocikliba, letrozola i ibuprofena kapilarnom elektroforezom*

Kemikalija	Proizvođač	Čistoća	M / g mol ⁻¹
Metanol (CH ₃ OH)	VWR International	≥ 99,8 %	32,040
Natrijev hidroksid <i>c</i> (NaOH) = 1 mol dm ⁻³	Agilent Technologies	p. a.	39,997
Ultračista voda (<i>Milli-Q</i>) (H ₂ O)	Merck	≥ 99,9 %	18,015
Fosforna kiselina (H ₃ PO ₄)	Lach-Ner	p. a.	97,994
Fosfatni pufer, pH = 2,5 <i>c</i> (Na ₃ PO ₄) = 50 mmol dm ⁻³	Agilent Technologies	p. a.	163,940
Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O)	Gram-mol	p. a.	156,010
Natrijev dodecil-sulfat (CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na)	Sigma-Aldrich	≥ 99,0 %	288,380
Izopropanol ((CH ₃) ₂ CHOH)	Bisolve Chimie SARL	≥ 99,8 %	60,100
Boratni pufer, pH = 9,3 <i>c</i> (CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na) = 100 mmol dm ⁻³ <i>c</i> (Na ₂ [B ₄ O ₅ (OH) ₄]) = 50 mmol dm ⁻³	Agilent Technologies	p. a.	288,377; 237,241
Klorovodična kiselina <i>c</i> (HCl) = 1 mol dm ⁻³	VWR International	p. a.	36,458
Natrijeva sol sulfobutileter-β- ciklodekstrina	Cyclolab Ltd.	≥ 99,0 %	2163,00

Acetonitril (ACN)	J. T. Baker	$\geq 99,8 \%$	41,050
Ribociklib ($C_{23}H_{30}N_8O$)	Toronto Research Chemicals	$> 98 \%$	434,548
Letrozol ($C_{17}H_{11}N_5$)	Tokyo Chemical Industry	$> 98 \%$	285,303
Ibuprofen ($C_{13}H_{18}O_2$)	Sigma-Aldrich	$> 98 \%$	206,290
Ketoprofen ($C_{16}H_{14}O_3$)	Sigma-Aldrich	$> 98 \%$	254,281

Pribor korišten za izradu ovog diplomskog rada uključuje pipete (*Rainin Instrument*), bočice za uzorkovanje sustavom za kapilarnu elektroforezu (*Agilent Technologies*), bočice za centrifugiranje od polipropilena i injekcijske membranske filtre veličine pora 0,2 μm (*VWR International*), a korišteni instrumenti uključuju analitičke vage AG245 (*Mettler Toledo*) i MX5 Microbalance (*Mettler Toledo*), uređaj za centrifugiranje Mini-Centrifuge (*IKA-Werke*) te Mini-Vortex uređaj (*IKA-Werke*).

3.1.1. Priprema standardnih otopina

Matične standardne otopine ribocikliba, letrozola, ibuprofena i ketoprofena masene koncentracije 1 mg cm^{-3} pripremljene su odvagom na analitičkoj vagi MX5 Microbalance i otapanjem odgovarajuće količine standarda ribocikliba, letrozola, ibuprofena i ketoprofena u metanolu u odmjernoj tikvici od 10 cm^3 . Tako pripremljene otopine čuvane su u hladnjaku na + 4 °C omotane parafilmom.

Radne standardne otopine korištene za razvoj i validaciju metode pripremane su svaki dan neposredno prije mjerenja dodatkom odgovarajuće količine matične standardne otopine ribocikliba, letrozola, ibuprofena i ketoprofena te razrjeđenjem do željene koncentracije smjesom otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) u bočice za uzorkovanje sustavom za kapilarnu elektroforezu u volumenu 0,5 cm^3 .

3.1.2. Priprema otopina za otopinu radnog pufera

Ultračista voda za pripremu otopina radnog pufera i radnih standardnih otopina dobivena je *Milli-Q* sustavom za pročišćavanje vode. Tvari za pripremu otopine radnog pufera vagane su na AG245 analitičkoj vagi.

Otopina fosfatnog pufera koncentracije 150 mmol dm^{-3} pripremljena je odvagom i otapanjem odgovarajuće količine natrijevog dihidrogenfosfata dihidrata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 cm^3 .

Otopina boratnog pufera koncentracije 150 mmol dm^{-3} pripravljena je odvagom i otapanjem odgovarajuće količine natrijevog tetraborata oktahidrata ($\text{Na}_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4] \cdot 8 \text{ H}_2\text{O}$) u ultračistoj vodi u odmjerne tikvici od 200 cm^3 .

Otopina sulfobutileter- β -ciklodekstrina (SBE- β -CD) koncentracije 40 mmol dm^{-3} pripravljena je odvagom i otapanjem odgovarajuće količine SBE- β -CD-a u ultračistoj vodi u odmjerne tikvici od 100 cm^3 .

Otopina natrijeva dodecil-sulfata (SDS) koncentracije 150 mmol dm^{-3} pripravljena je odvagom i otapanjem odgovarajuće količine SDS-a ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) u ultračistoj vodi u odmjerne tikvici od 200 cm^3 .

Nakon otapanja, otopina boratnog i fosfatnog pufera te SDS-a i SBE- β -CD-a profiltrirane su kroz membranske filtre veličine pora $0,2 \mu\text{m}$ te čuvane na sobnoj temperaturi.

Neposredno prije analize pripravljene su otopine radnog pufera miješanjem odgovarajućih volumena otopina boratnog pufera, fosfatnog pufera, SBE- β -CD-a, SDS-a, izopropanola, metanola i ultračiste vode u bočice za uzorkovanje sustavom za kapilarnu elektroforezu u volumenu od $0,5 \text{ cm}^3$. Svježe otopine radnog pufera pripremane su za svaku petu analizu.

3.2. Instrument i uvjeti

3.2.1. Korištena instrumentacija

Za kapilarno-elektroforetska mjerenja korišten je ^3DCE Agilent High-Performance Capillary Electrophoresis (G1600A) uređaj s integriranim detektorom niza dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD) uz kapilaru od izvučenog kvarca ukupne duljine 35 cm i unutrašnjeg promjera $50 \mu\text{m}$. Za analizu podataka dobivenih mjerenjima korišteni su programi 3D-CE/MSD ChemStation (*Agilent Technologies*) te Microsoft Office 365 Excel[®].

Nakon stavljanja nove kapilare u uređaj, kapilara je za metodu određivanja letrozola, ibuprofena i ribocikliba prvotno ispirana 5 minuta metanolom, 30 minuta otopinom natrijevog hidroksida koncentracije 1 mol dm^{-3} , 10 minuta ultračistom vodom, 30 minuta otopinom klorovodične kiseline koncentracije 1 mol dm^{-3} , 10 minuta ultračistom vodom, 10 minuta 10%-tnom otopinom fosforne kiseline, 10 minuta ultračistom vodom te 30 minuta radnim puferom (75 mmol dm^{-3} natrijev dihidrogenfosfat, $8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ SBE- β -CD, 5 % izopropanol). Prije prve analize u danu kapilara je ispirana 15 minuta 10%-tnom otopinom fosforne kiseline, 10

minuta ultračistom vodom te 25 minuta radnim puferom (75 mmol dm⁻³ natrijev dihidrogenfosfat, 8,5 mmol dm⁻³ SBE-β-CD, 5 % izopropanol). Na kraju radnog dana kapilara je ispirana 10 minuta 10%-tnom otopinom fosforne kiseline i 30 minuta ultračistom vodom. Između analiza analiti su iz kapilare ispirani pod naponom (-15 kV) u trajanju vremena analize, a nakon toga slijedilo je ispiranje kapilare 10 minuta 10%-tnom otopinom fosforne kiseline te 15 minuta radnim puferom (75 mmol dm⁻³ natrijev dihidrogenfosfat, 8,5 mmol dm⁻³ SBE-β-CD, 5 % izopropanol).

3.2.2. Razvoj metode

U razvoj metode u ovom radu uključeni su sljedeći procesi: odabir odgovarajućeg radnog pufera, prilagodba trajanja ispiranja kapilare, prilagodba elektroforetskih uvjeta te odabir unutarnjeg standarda.

U svrhu odabira radnog pufera isprobani su bazični uvjeti uz boratni pufer te dodatak SDS-a u ulozi surfaktanta i organskih otapala izopropanola i metanola. Osim bazičnih, analize su se provele i u kiselim uvjetima uz fosfatni pufer i dodatak SDS-a u ulozi surfaktanta, β-SBE-CD-a te organskih otapala izopropanola i metanola.

Vrijeme ispiranja kapilare određeno je kao vrijeme potrebno da se iz kapilare isperu svi analiti nakon analize. Ispiranje analita nakon analize omogućeno je ispiranjem pod naponom tijekom kojega su vidljivi signali analita koji izlaze iz kapilare. Ispiranje između analiza prilagođeno je vremenu potrebnom za dobivanje reproducibilnih elektroferograma, a kemikalije korištene za ispiranje preporučene su u knjizi *High Performance Capillary Electrophoresis* str. 131. i 132. (Agilent Technologies) (ref. 15).

Prilagodba elektroforetskih uvjeta u ovome radu odnosi se na injektiranje uzorka. Hidrodinamičko injektiranje uzorka isprobano je sa *inlet* i *outlet* dijela kapilare te injektiranje uzorka samostalno i nakon vodenog čepa (engl. *sample stacking*). Injektiranje uzorka izvršeno je pod tlakom od 50 mbar.

Kao potencijalni unutarnji standardi isprobani su benzimidazol, acetilsalicilna kiselina, ketoprofen, oksazepam, sulfadiazin i sulfanilamid. Standardi su otapani u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) te analizirani zasebno. Na elektroferogramu su promatrana vremena migracije analita te intenzitet signala.

3.2.3. Validacija metode

Metoda je validirana prema ICH smjernicama za validaciju analitičkih postupaka (ref. 9). Validacijom su određene preciznost (ponovljivost i međupreciznost), linearnost, robusnost, točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije i specifičnost.

Preciznost (engl. *precision*) analitičkog postupka predstavlja slaganje između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. **Ponovljivost** (nepreciznost u seriji) jest preciznost u uvjetima pod kojima isti analitičar, koristeći istu opremu u istom laboratoriju, dobije nezavisne rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na istovjetnim ispitivanim uzorcima.⁹ Ponovljivost metode određena je iz devet analiza u jednom danu, po tri analize za tri koncentracije analita (letrozol, ribociklib, ibuprofen) prisutne u otopini ($10 \mu\text{g cm}^{-3}$, $50 \mu\text{g cm}^{-3}$ i $75 \mu\text{g cm}^{-3}$), dok je koncentracija ketoprofena bila ista u svim otopinama i iznosila $50 \mu\text{g cm}^{-3}$. Vrijeme migracije i površina signala analita korigirani su vrijednostima vremena migracije i površine signala unutarnjeg standarda te je na temelju korigiranih vrijednosti izračunata relativna standardna devijacija (RSD) vremena migracije i površine signala za svaki od analita. **Međupreciznost** (nepreciznost iz dana u dan) predstavlja neslaganja unutar laboratorija u nekom neodređenom vremenskom periodu, a koja su posljedica promjene uvjeta kao što su promjena reagensa, analitičara ili instrumenta.⁴¹ Međupreciznost je određivana tijekom tri dana za koncentracije analita (letrozol, ribociklib, ibuprofen) $50 \mu\text{g cm}^{-3}$, a svaki su dan provedena tri mjerenja. Vrijeme migracije i površina signala korigirani su vrijednostima dobivenima za unutarnji standard te je na temelju korigiranih vrijednosti izračunata relativna standardna devijacija (RSD) vremena migracije i površine signala za svaki od analita. Korigirano vrijeme migracije (t_{kor}) izračunato je prema izrazu (5), a korigirana površina ispod signala (A_{kor}) prema izrazu (6)

$$t_{\text{kor}} = \frac{t_{\text{mig}} (\text{analit})}{t_{\text{mig}} (\text{unutarnji standard})} \quad (5)$$

$$A_{\text{kor}} = \frac{A (\text{analit})}{A (\text{unutarnji standard})} \quad (6)$$

gdje je t_{mig} vrijeme migracije analita odnosno unutarnjeg standarda, a A površina ispod signala analita, odnosno unutarnjeg standarda u danim uvjetima.

Linearnost (engl. *linearity*) s analitičkog stajališta govori o linearnoj funkciji uspostavljenoj između analitičkog signala i količine ili koncentracije analita u uzorku.⁹ U ovome radu linearnost je određena za masene koncentracije letrozola, ribocikliba i ibuprofena $1 \mu\text{g cm}^{-3}$, $5 \mu\text{g cm}^{-3}$, $10 \mu\text{g cm}^{-3}$, $25 \mu\text{g cm}^{-3}$, $50 \mu\text{g cm}^{-3}$ i $75 \mu\text{g cm}^{-3}$ regresijskom analizom, pri čemu je koncentracija ketoprofena kao unutarnjeg standarda u svim otopinama bila ista i iznosila $50 \mu\text{g cm}^{-3}$.

Robusnost (engl. *ruggedness/robustness*) predstavlja podložnost analitičke metode na promjene uvjeta ispitivanja u odnosu na različitost vrste uzoraka, analita, uvjete pohrane, uvjeta okolišta i/ili uvjeta pripreme uzoraka pod kojima se metoda može primjenjivati onakva kakva jest ili uz utvrđene manje izmjene.⁴¹ U ovom je radu robusnost ispitana za promjenu temperature od $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, promjenu napona od $\pm 0,5 \text{ kV}$ te promjenu koncentracije dodanog SBE- β -CD-a u radni pufer od $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Napravljena su po tri mjerenja za svaki od uvjeta, pri čemu su analiti bili masene koncentracije $50 \mu\text{g cm}^{-3}$. Robusnost je izražena kao RSD korigiranog vremena migracije i korigirane površine signala za svaki od analita, za svaki od promijenjenih uvjeta.

Točnost (engl. *accuracy*) predstavlja stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti.⁴¹ Točnost je određena na temelju mjerenja triju koncentracija uz tri ponavljanja te usporedbom eksperimentalno dobivenih vrijednosti koncentracija preko baždarnog pravca (linearnost) sa pripremljenim vrijednostima. Mjerno odstupanje (engl. *bias, b*) određeno je kao odstupanje srednje vrijednosti eksperimentalno dobivenih koncentracija od prave vrijednosti.

Granica detekcije (engl. *limit of detection, LOD*) je najmanja količina analita u uzorku koju je metodom moguće detektirati, ali ne nužno i kvantitativno odrediti. **Granica kvantifikacije** (engl. *limit of quantification, LOQ*) je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuću preciznost i točnost.⁹

Granica detekcije izračunata je množenjem standardne devijacije odsječka na y osi regresijskog pravca (σ) sa faktorom 3,3 te dijeljenjem s nagibom kalibracijske krivulje (S) kako je prikazano u jednadžbi (7). Granica kvantifikacije izračunata je prema izrazu (8).

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad (7)$$

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad (8)$$

Specifičnost (engl. *specificity*) podrazumijeva određivanje analita u prisustvu drugih spojeva koji su očekivano prisutni u smjesi. Specifičnost je određena *peak purity* testom u programu *3D-CE/MSD ChemStation* uz granicu (*threshold*) od 0,990 (99,0 %). Čistoća signala (engl. *peak purity*) u kapilarnoj elektroforezi potvrđuje da tijekom analize dva analita nemaju isto vrijeme migracije te ju je nužno odrediti prije kvantitativnog određivanja analita. Čistoća signala govori o distorziji spektra analita koja je uzrokovana prisustvom druge tvari drugačijeg spektra, a program ju procjenjuje na temelju sličnosti linija u spektru.⁴² Uz slaganje spektara iznad 99,0 % metoda se smatra specifičnom za određeni analit.¹⁵

3.3. Primjena metode na biološki uzorak

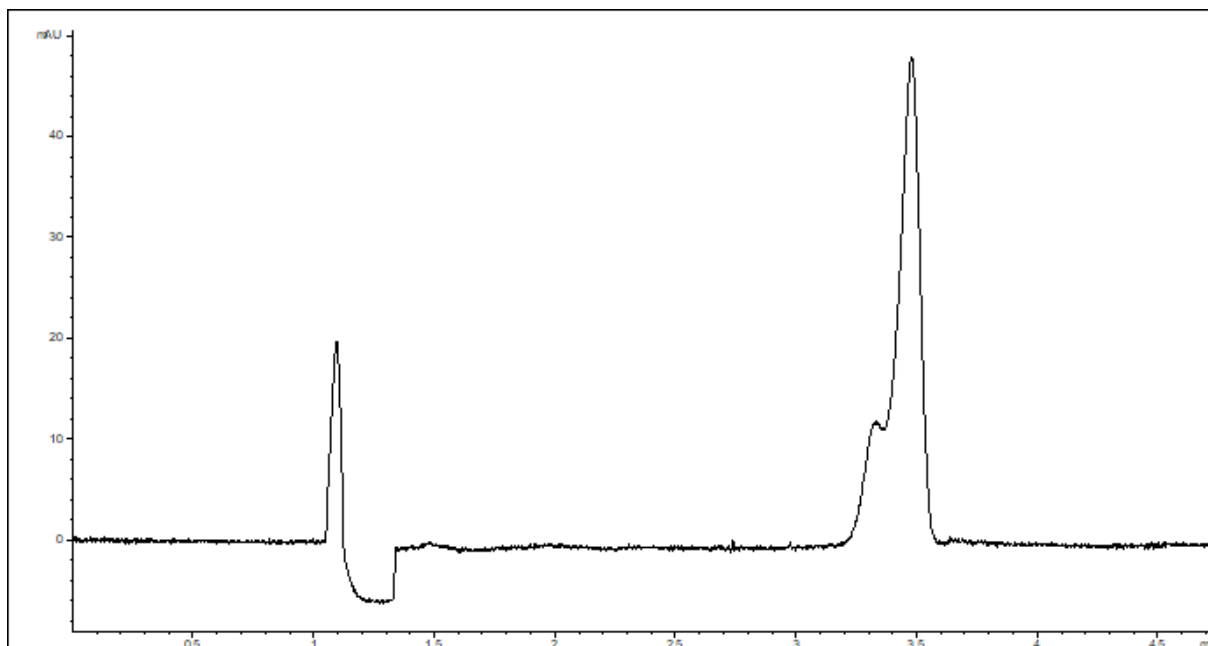
Uzorci krvi dobiveni su iz Kliničkog bolničkog centra Zagreb u spremnicima sa K₂-EDTA antikoagulansom uz odgovarajuće odobrenje nadležnih etičkih povjerenstava. U svrhu dobivanja krvne plazme uzorci krvi centrifugirani su 10 minuta na 1500 g, a supernatant je odvojen. U uzorak krvne plazme (0,245 cm³), u svrhu odjeljivanja proteina, dodano je 0,750 cm³ acetonitrila te je obogaćen (engl. *spiked*) ribociklibom u koncentraciji 20 μg cm⁻³. U drugi uzorak plazme (0,250 cm³) dodano je 0,750 cm³ acetonitrila u svrhu odjeljivanja proteina. Uzorci su miješani na vortex mješalici 10 sekundi i centrifugirani na 2000 g 5 minuta. Supernatanti su odijeljeni u zasebne polipropilenske bočice za centrifugiranje te potom upareni do suha, a suhi ostatci su otopljeni u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v). Uzorci su analizirani uz fosfatni pufer ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$) s dodatkom SBE-β-CD-a ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 15 kV.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

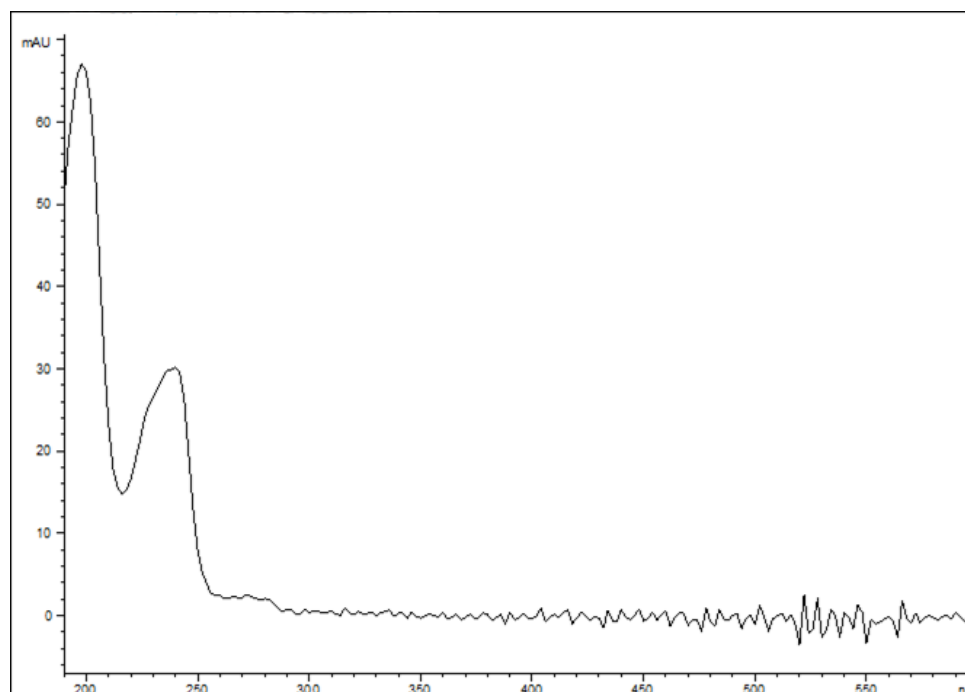
4.1. Razvoj metode za analizu ibuprofena, letrozola i ribocikliba

4.1.1. Odabir radne otopine pufera

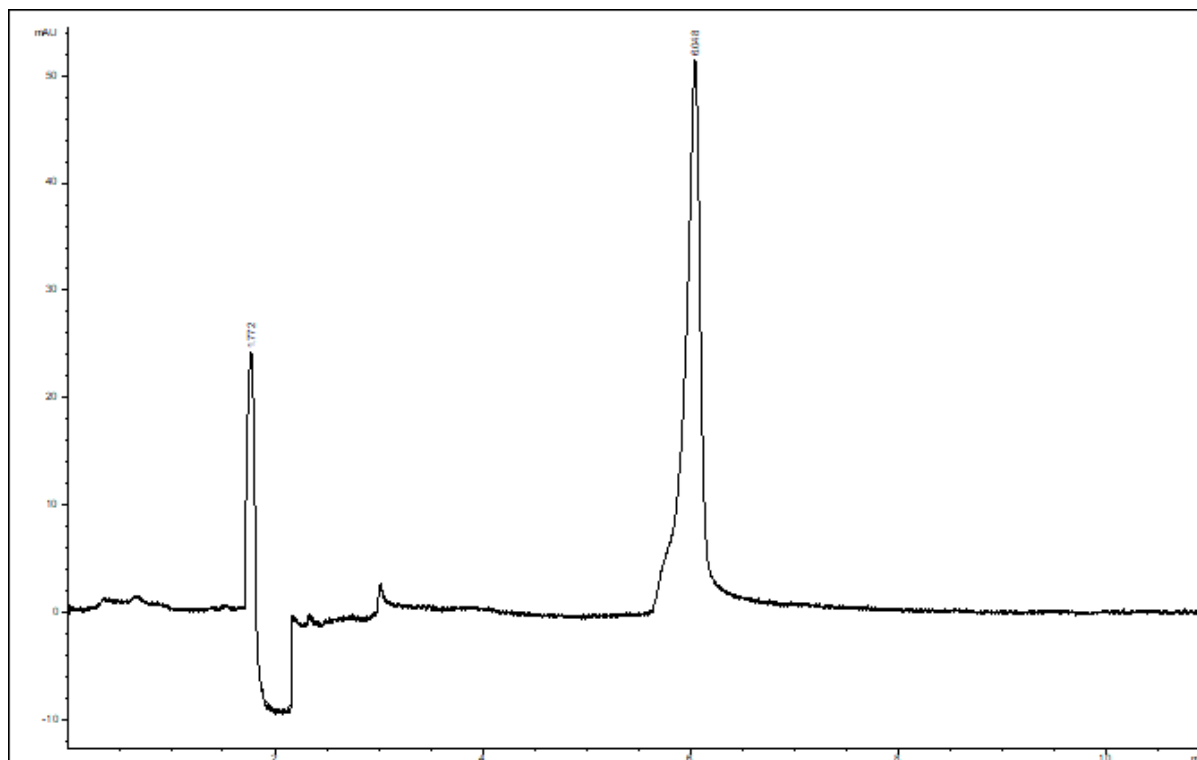
Tijekom razvoja metode za istovremenu analizu letrozola, ribocikliba i ibuprofena mjerenja su prvo provedena na uzorku letrozola, potom uzorku letrozola i ribocikliba te na kraju na uzorku letrozola, ribocikliba i ibuprofena (uz dodatak ketoprofena kao unutarnjeg standarda). Prvi parametar pri razvoju CE metode jest ispitivanje vrste radnog pufera. pH pufera ima izravan utjecan na elektroosmotski tok. S porastom pH-vrijednosti pufera koji se nalazi u kapilari veći je i broj ioniziranih silanolnih skupina i brži EOF, a time i brže kretanje analita u kapilari.⁴³ Iz tih su razloga prva mjerenja rađena uz boratni pufer bazičnog pH s dodatkom SDS-a. Na elektroferogramu (slika 7) je vidljivo da je vrijeme migracije letrozola 3,5 minuta. Na slici 8 vidljivo je i da signal letrozola nije simetričan te je za daljnja mjerenja u sastav pufera dodana prvo veća koncentracija SDS-a (60 mmol dm^{-3}), a potom i metanol u volumnom udjelu 15 %. Spektar letrozola pri valnoj duljini od 200 nm prikazan je na slici 8.



Slika 7. Elektroferogram ($\lambda = 200$ nm) letrozola ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) otopljenog u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) uz boratni pufer ($c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$) s dodatkom SDS-a ($c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$) pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i naponu od 25 kV

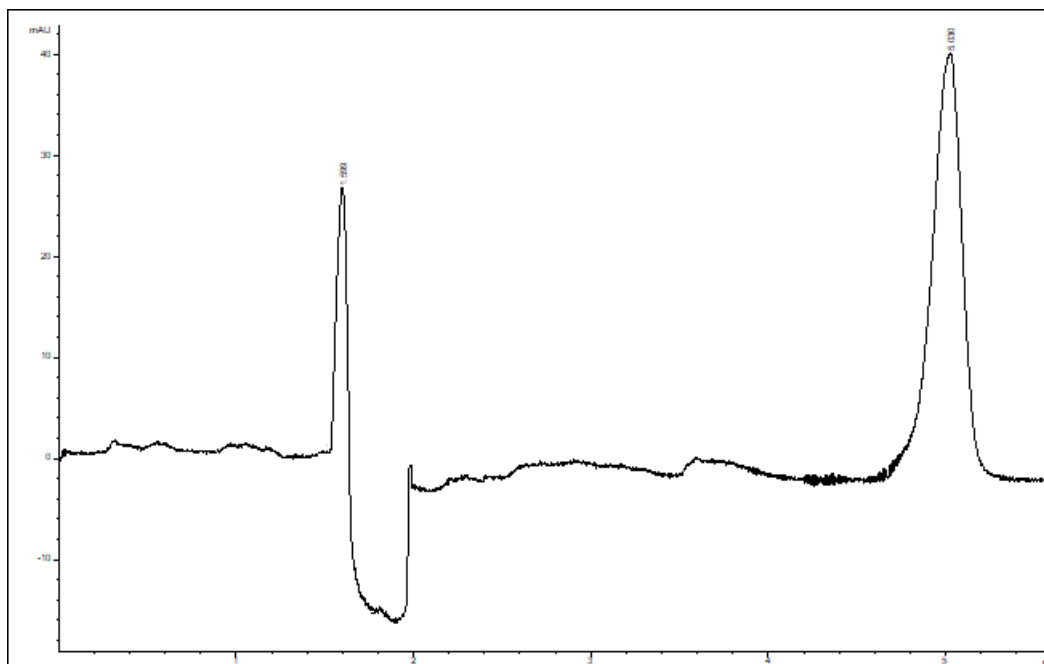


Slika 8. UV-VIS spektar letrozola ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) dobiven uz detektor s nizom dioda (DAD) u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v)



Slika 9. Elektroferogram ($\lambda = 200 \text{ nm}$) letrozola ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) otopljenog u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) uz boratni pufer ($c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$) s dodatkom SDS-a ($c = 60 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 15 % metanola pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i naponu od 25 kV

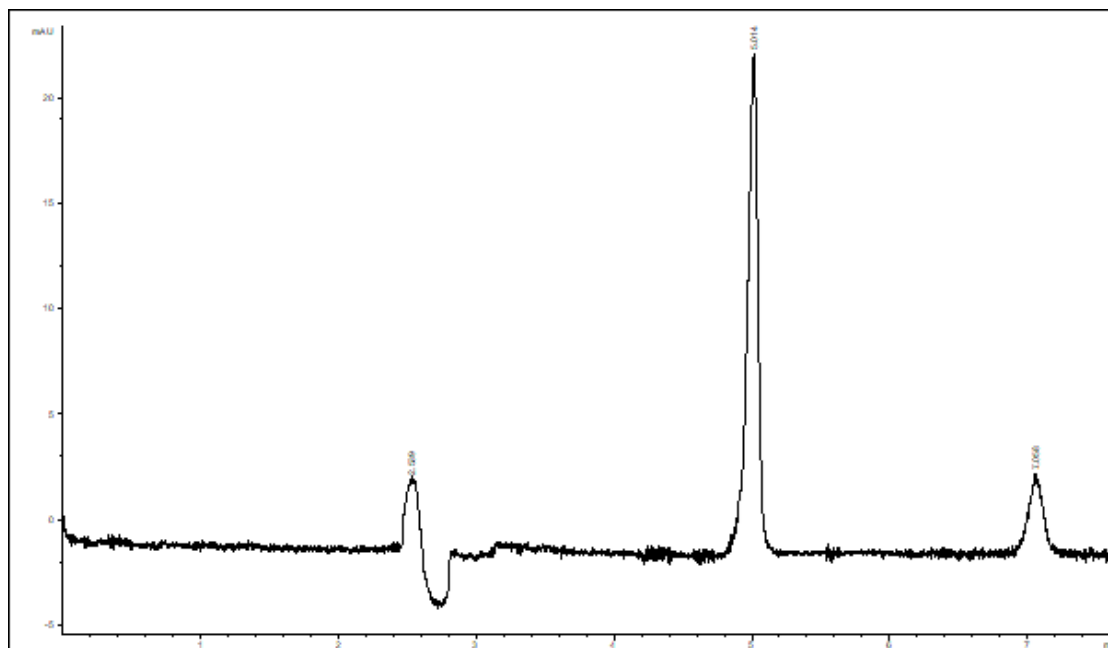
Na slici 9 vidljivo je da je dodatkom organskog otapala vrijeme migracije letrozola očekivano povećano, a signal je u elektroferogramu na 6. minuti. Organska otapala povećavaju viskoznost otopine radnog pufera te produljuju vrijeme analize zbog sporijeg EOF-a.⁴³ No, signal letrozola je uz dodatak 15 % metanola znatno simetričniji u odnosu na signal uz radni pufer bez metanola. Kako bi se simetričnost signala dodatno poboljšala, isproban je dodatak 15 % izopropanola u otopinu radnog pufera.



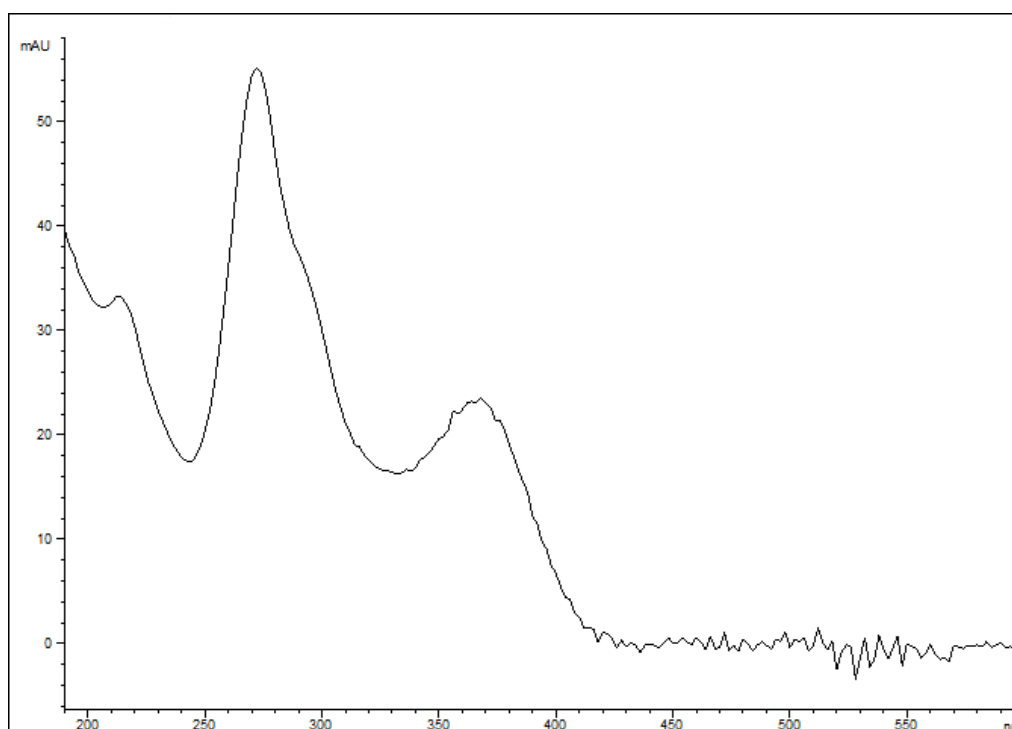
Slika 10. Elektroferogram ($\lambda = 200$ nm) letrozola ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) otopljenog u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) uz boratni pufer ($c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$) s dodatkom SDS-a ($c = 60 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 15 % izopropanola pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i naponu od 25 kV

Uz pufer sastava boratni pufer ($c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$), SDS ($c = 60 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 15 % izopropanola dobiven je zadovoljavajuće simetričan i visok signal letrozola.

Sljedeći korak u razvoju metode jest dodatak ribocikliba u otopinu uzorka, također masene koncentracije $50 \mu\text{g cm}^{-3}$. Analiza uz boratni pufer ($c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$), SDS ($c = 60 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 15 % izopropanola napravljena je i za otopinu letrozola ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) i ribocikliba ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$), ali nije polučila dobre rezultate jer je signal ribocikliba nizak te je šum bazne linije pri valnoj duljini od 200 nm bio izražen (slika 11). Spektar ribocikliba pri valnoj duljini od 200 nm prikazan je na slici 12.

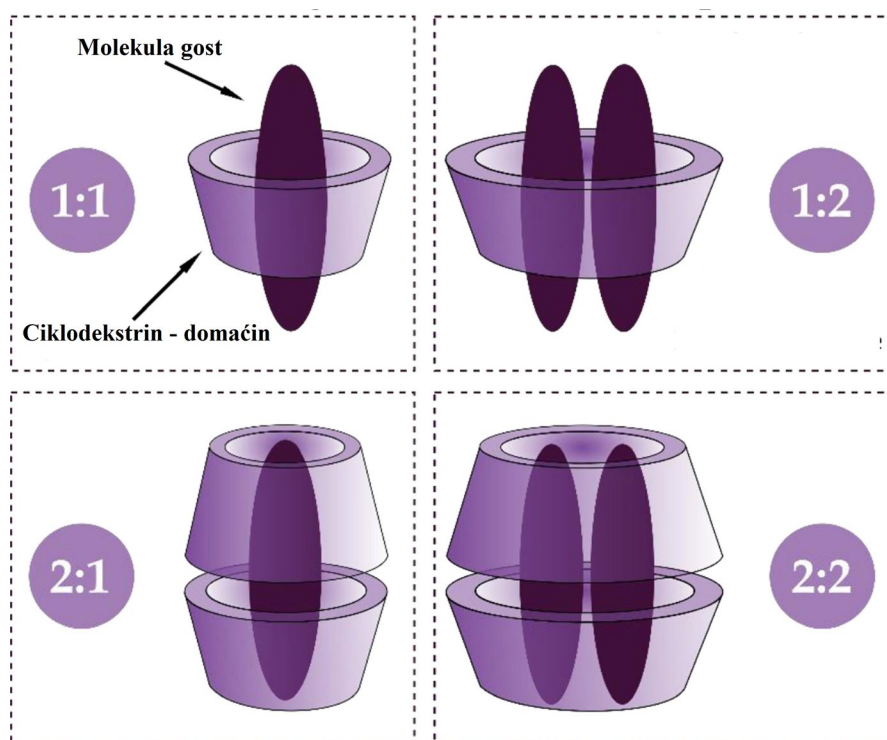


Slika 11. Elektroferogram ($\lambda = 200$ nm) letrozola ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) i ribocikliba ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) otopljenih u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) uz boratni pufer ($c = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$) s dodatkom SDS-a ($c = 60 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 15 % izopropanola pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i naponu od 25 kV

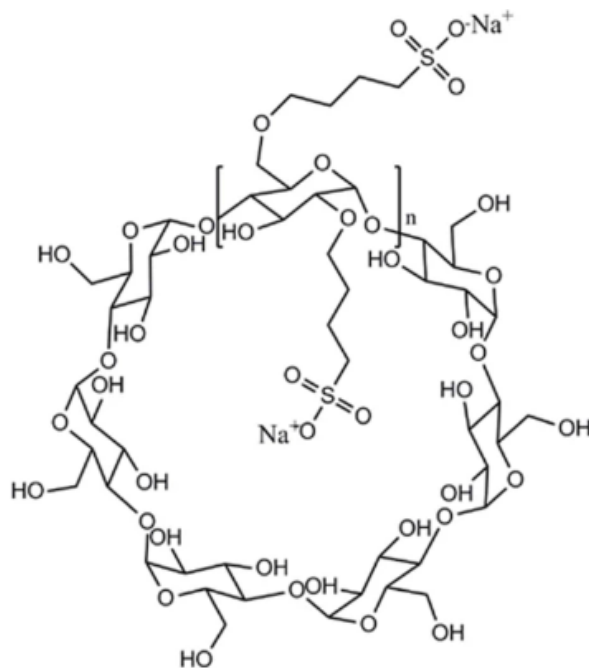


Slika 12. UV-VIS spektar ribocikliba ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) dobiven uz detektor s nizom dioda (DAD) u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v)

Nakon toga, ista otopina letrozola i ribocikliba mjerena je u uvjetima prikladnima za analizu ribocikliba, a koje je u preliminarnim ispitivanjima razvila istraživačka skupina izv. prof. dr. sc. Sertić – kiseli uvjeti uz fosfatni pufer i sulfobutileter- β -ciklodekstrin (SBE- β -CD). Ciklodekstrini su makrociklički oligosaharidi povezani α -1,4-glikozidnim vezama. β -ciklodekstrini sastoje se od 7 D-glukoinskih podjedinica te tvore oblik krnjeg stošca u čiju se hidrofobnu unutrašnjost nekovalentnim interakcijama mogu vezati molekule. Veliku važnost pri tvorbi kompleksa ciklodekstrin-molekula imaju i sterički efekti.⁴⁴ Ovisno o veličini molekule koja se ugrađuje u ciklodekstrin, stehiometrijski omjer u kojemu kompleksi mogu nastati može biti 1:1, 1:2, 2:1 i 2:2 kako je prikazano na slici 13.⁴⁵ Kemijskim reakcijama lako je modificirati hidroksilne skupine glukoinskih podjedinica te stvoriti ciklodekstrine željenih svojstava kako bi se u njih ugradili željeni analiti.⁴⁶ Slika 14 prikazuje strukturu sulfobutileter- β -ciklodekstrina. Ciklodekstrini se u analitici lijekova najčešće koriste kao kiralni selektori u kapilarnoj elektroforezi. Enantiomeri sa kiralnim selektorima stupaju u različite interakcije te ih se na temelju toga može razdvojiti u smjesi. Dodatak ciklodekstrina u otopinu radnog pufera utječe na selektivnost metode uslijed različitog stupnja interakcije s analitima, kao i na konačan oblik signala analita u elektroferogramu.⁴⁷

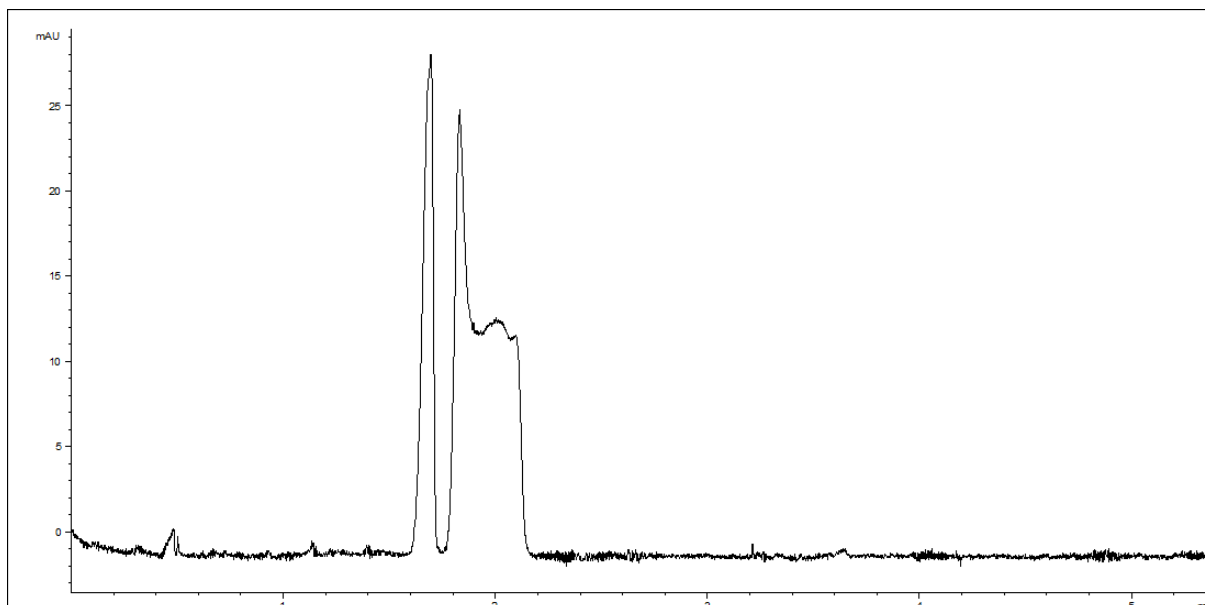


Slika 13. Shematski prikaz stehiometrijskih odnosa molekula gosta i ciklodekstrina kao molekule domaćina (modif. A. C. Samamed, J. Rakmai, J. C. Mejuto, J. Simal-Gandara, G. Astray, *Food Chem*, **384** (2022) 132467, ref. 45)



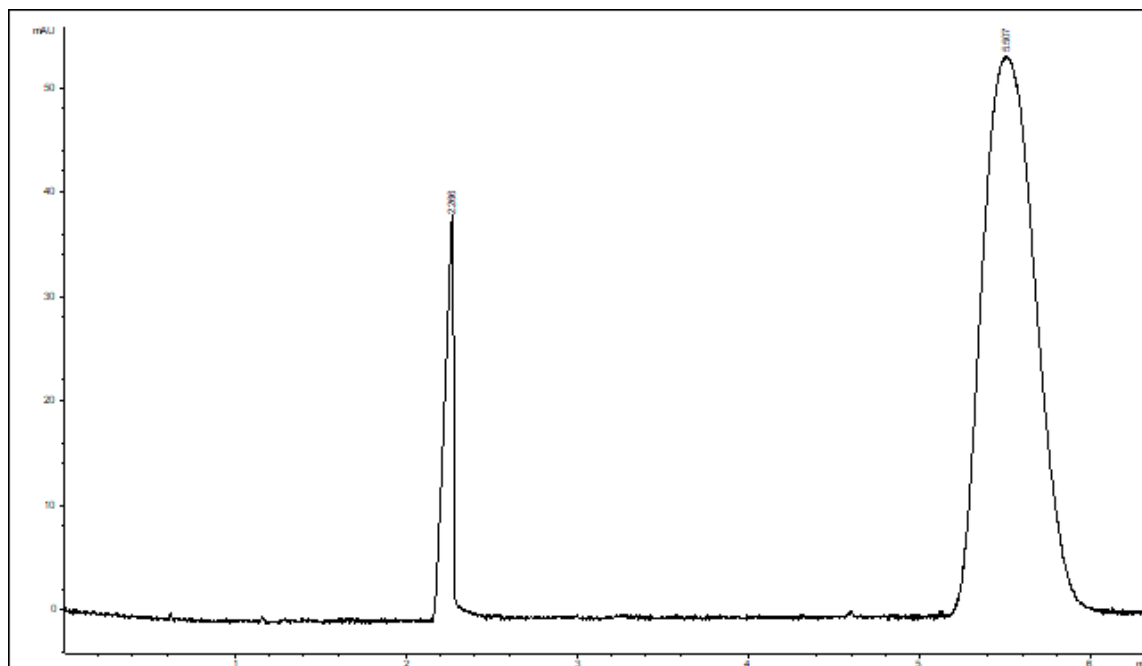
Slika 14. Struktura molekule sulfobutyleter- β -ciklodekstrina (<https://hr.cydextrin2.com/beta-cyclodextrin-sulfobutyl-ether-sodium>, datum pristupa 26. 1. 2023., ref. 48)

U početnom sastavu radnog pufera nalazili su se natrijev dihidrogenfosfat množinske koncentracije 75 mmol dm^{-3} i SBE- β -CD množinske koncentracije $8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$. Na elektroferogramu na slici 15 vidljivo je da su vremena migracije ribocikliba (1,7 min) i letrozola (2 min) kratka, ali signal letrozola je razvučen.



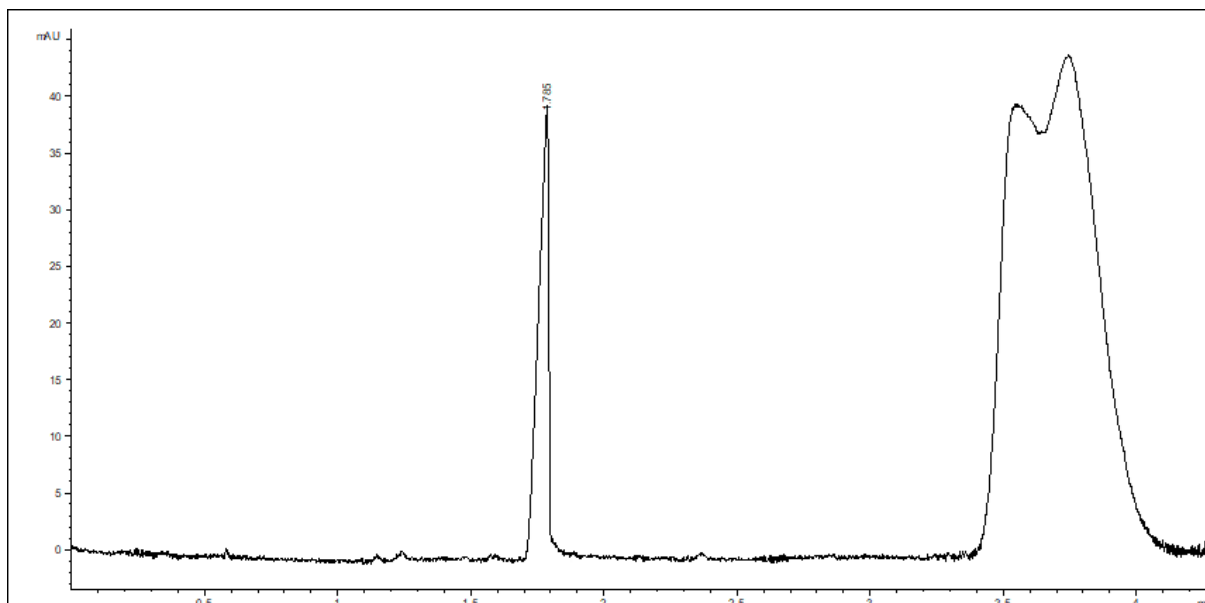
Slika 15. Elektroferogram ($\lambda = 200$ nm) ribocikliba ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) i letrozola ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) otopljenih u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) uz fosfatni pufer ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$) s dodatkom SBE- β -CD-a ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i naponu od 15 kV

U radnu otopinu fosfatnog pufera ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$) i SBE- β -CD-a ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) dodano je 5 % izopropanola jer se prethodno u bazičnim uvjetima izopropanol pokazao dobrim organskim dodatkom u analizi letrozola te je uz izopropanol i u kiselim uvjetima postignut simetričan pik letrozola, ali je produljeno vrijeme trajanja analize (signal letrozola na 5,5 min), što je vidljivo na slici 16.



Slika 16. Elektroferogram ($\lambda = 200$ nm) ribocikliba ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) i letrozola ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) otopljenih u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) uz fosfatni pufer ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$) s dodatkom SBE- β -CD-a ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 15 kV

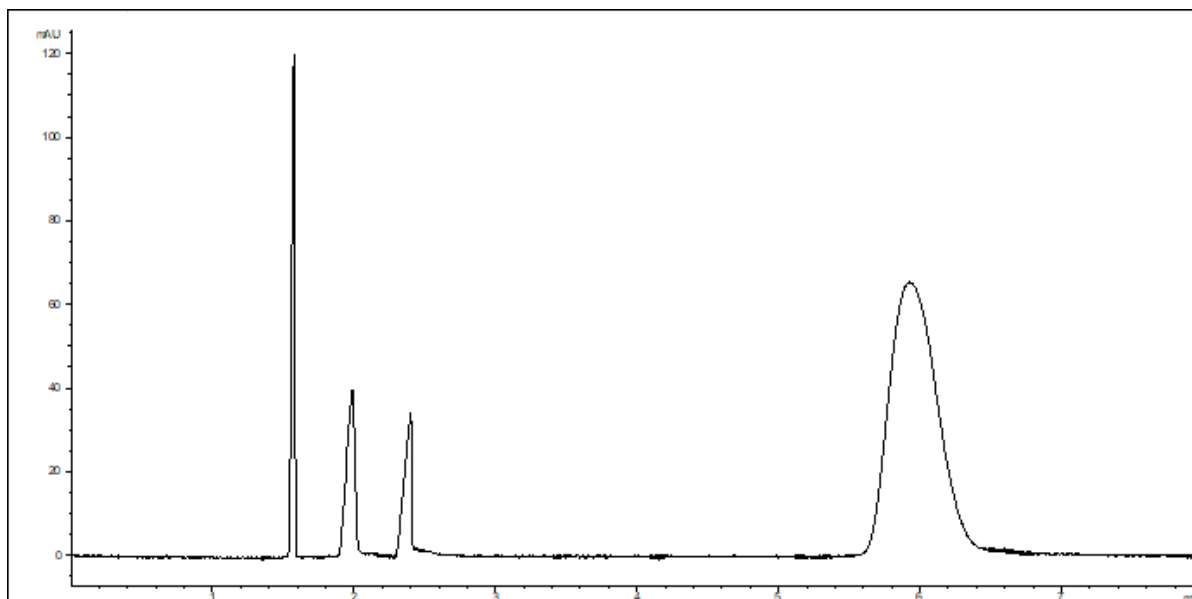
Uz 5 % izopropanola u otopini radnog pufera vrijeme migracije letrozola je 5,5 minuta te su u svrhu smanjenja trajanja analize isprobane manje koncentracije izopropanola (3 % i 4 %). Vrijeme analize skraćeno je (signal letrozola na 3,7 min), ali signal letrozola je podijeljen i nije simetričan (slika 17).



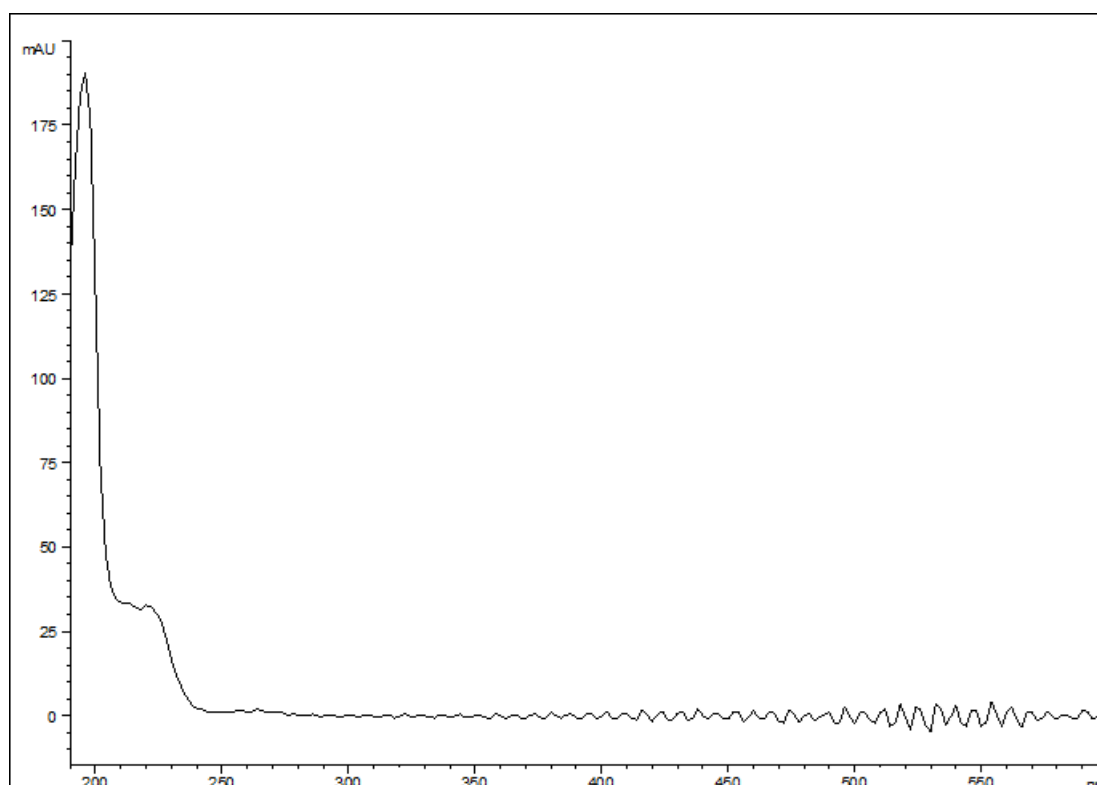
Slika 17. Elektroferogram ($\lambda = 200$ nm) ribocikliba ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) i letrozola ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) otopljenih u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) uz fosfatni pufer ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$) s dodatkom SBE- β -CD-a ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 3 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 15 kV

Na kraju su u otopinu analita dodani ibuprofen ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) i ketoprofen ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) kojima su prethodno postignuti uvjeti za analizu ribocikliba i letrozola odgovarali, signali su simetrični, visoki i razdvojeni (slika 18). Umjesto ketoprofena u svrhu unutarnjeg standarda isprobani su benzimidazol, acetilsalicilna kiselina, oksazepam, sulfadiazin i sulfanilamid, ali pri danim uvjetima i valnoj duljini od 200 nm nisu davali signal u elektroferogramu u trajanju analize od 7 minuta. Iz tih je razloga kao unutarnji standard odabran ketoprofen. Nadalje, ketoprofen i ibuprofen nesteroidni su protuupalni lijekovi, te bi se u drugačijim okolnostima ova metoda mogla iskoristiti za analizu letrozola, ribocikliba i ketoprofena uz ibuprofen kao unutarnji standard. Spektri ibuprofena i ketoprofena pri valnoj duljini od 200 nm nalaze se na slici 19, odnosno slici 20.

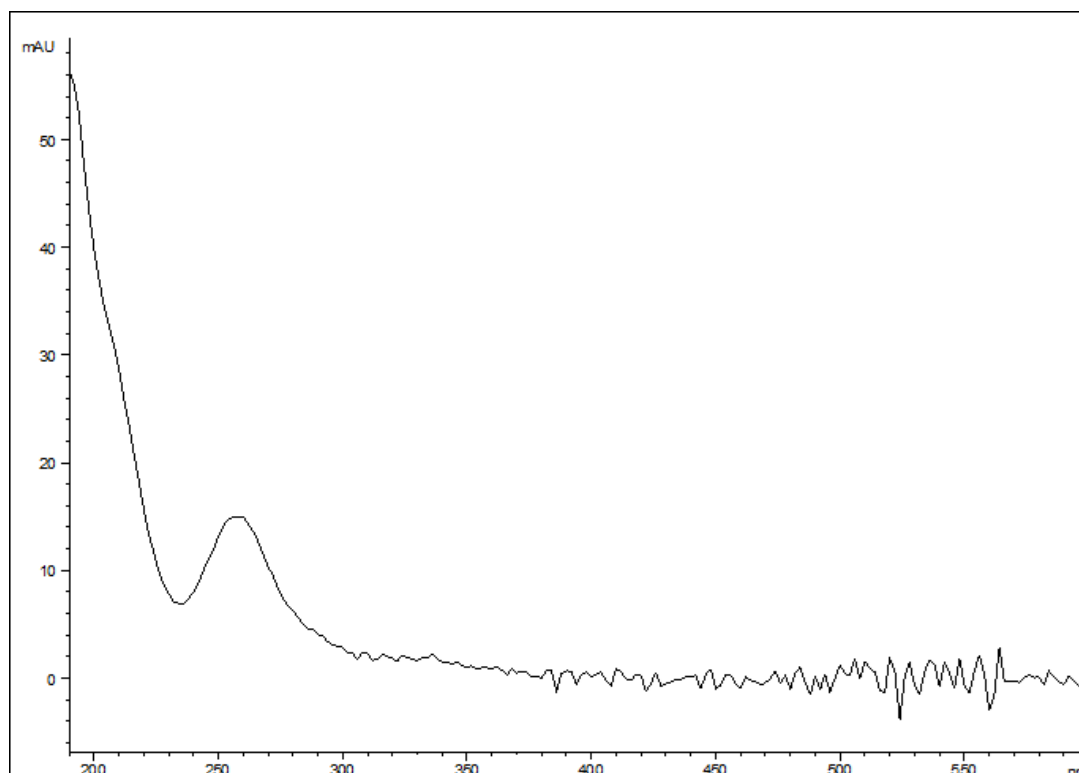
Unutarnji standard iznimno je važan u bioanalitici. Dodaje se u uzorak uvijek u istoj koncentraciji kako bi se smanjila varijabilnost tijekom pripreme uzorka i same analize. Injektiranje uzorka u vrlo maloj količini u kapilarnoj elektroforezi za posljedicu ima manju preciznost i točnost te je teško procijeniti robusnost metode. Uvođenjem unutarnjeg standarda te korekcijom vremena migracije i površine ispod signala, omogućene su veća preciznost i točnost te procjena robusnosti analitičke metode.⁴⁹



Slika 18. Elektroferogram ($\lambda = 200$ nm) ibuprofena ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$), ketoprofena ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$), ribocikliba ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) i letrozola ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) otopljenih u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) uz fosfatni pufer ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$) s dodatkom SBE- β -CD-a ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 15 kV



Slika 19. UV-VIS spektar ibuprofena ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) dobiven uz detektor s nizom dioda (DAD) u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v)



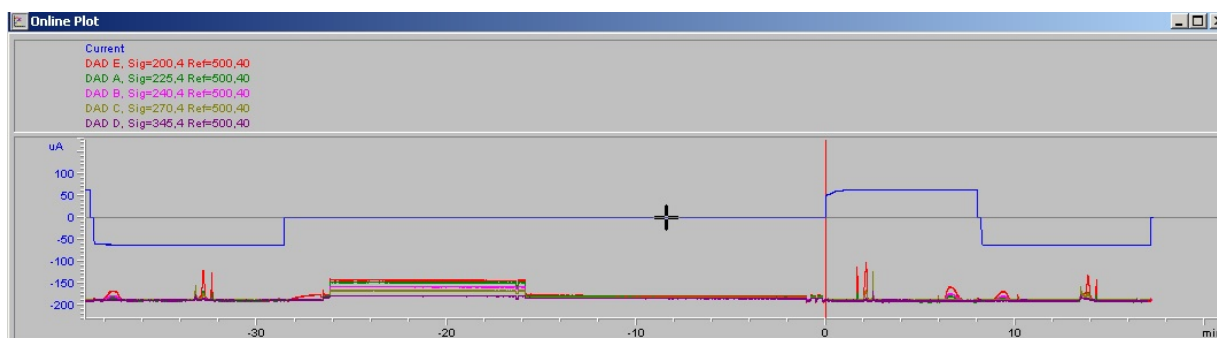
Slika 20. UV-VIS spektr ketoprofena ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) dobiven uz detektor s nizom dioda (DAD) u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v)

Redosljed izlaska analita i unutarnjeg standarda iz kapilare uz optimirane uvjete je: ibuprofen (1,558 min), ketoprofen (1,968 min), ribociklib (2,387 min) te letrozol (5,568 min). Ibuprofen je od navedenih molekula najmanje molekulske mase, a slijedi ga ketoprofen. Ribociklib u odnosu na letrozol ima 1,5 puta veću molekulsku masu, ali izlazi ranije. Ibuprofen sa ciklodekstrinom stvara kompleks stehiometrijskog omjera 1:1⁵⁰, kao i ketoprofen.⁵¹ Pretpostavka je da kompleks omjera 1:1 stvara i ribociklib, dok letrozol vjerojatno radi komplekse u kojima sudjeluje više molekula ciklodekstrina te kao takav ima najduže vrijeme migracije.

4.1.2. Ispiranje kapilare

Za postignute uvjete u fosfatnom radnom puferu ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$) s dodatkom SBE- β -CD-a ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola primijećeno je smanjenje intenziteta signala svakom sljedećom analizom, a na kraju i pucanje kapilare. Tijekom protjecanja pufera s analitima kroz kapilaru moguća je adsorpcija tvari na stijenke kapilare, čime se smanjuje reproducibilnost metode te je moguće začepljenje kapilare koje može rezultirati njezinim pucanjem.⁴³ Važno je

bilo optimirati duljinu trajanja ispiranja između analiza kako bi se osigurala reproducibilnost metode. Dostatnim se pokazalo ispiranje između dviju analiza 10%-tnom fosfornom kiselinom 10 minuta te 15 minuta radnim puferom. Nakon svake analize kapilara se ispirala pod naponom u trajanju vremena same analize, pri čemu su u programu kapilarne elektroforeze vidljivi signali analita kako izlaze iz kapilare (slika 21). Takav je način ispiranja moguć zbog injektiranja uzorka na *outlet* dijelu kapilare.



Slika 21. Slika zaslona *Online plot* dijela sučelja kapilarno-elektroforetskog uređaja (^{3D}CE Agilent High-Performance Capillary Electrophoresis (G1600A)) tijekom analize ibuprofena, ribocikliba i letrozola uz ketoprofen kao unutarnji standard

4.1.3. Prilagodba elektroforetskih uvjeta

Injektiranje uzorka isprobano je na strani za unos (*inlet*) uzorka u kapilaru te na strani za izlaz (*outlet*) uzorka iz kapilare. S obzirom na to da su u optimiziranoj metodi korišteni ciklodekstrini, molekule vrlo velike molekulske mase s kojima analiti tvore komplekse, nakon injektiranja na strani za unos uzorka na elektroferogramu nije bilo signala unutar 10 minuta zbog predugog vremena migracije. Iz tog se razloga uzorak injektirao na strani za izlaz uzorka kojoj je prozor za detektor bliži te je trajanje analize iznosilo 6 minuta.

Uzorak je injektiran 5 sekundi jer je to vrijeme prethodno utvrđeno kao dovoljno dugo za prikladnu količinu uzorka u kapilari, a prije uzorka injektirana je voda 6 sekundi kako bi se stvorio čep otapala manje ionske jakosti u odnosu na pufer (engl. *sample stacking*). Molekule analita u vodi gibaju se znatno većom brzinom nego u elektrolitu (radnom puferu) jer veći otpor razrijeđenog uzorka inducira jače električno polje u zoni uzorka. Kad se molekule analita koje se brzo gibaju nađu u radnom puferu, brzina migracije im se naglo snižava zbog slabijeg električnog polja uslijed čega se molekule nađu bliže jedna drugoj.¹⁶ Korištenje ove metode rezultiralo je signalima jačeg intenziteta, odnosno poboljšanjem osjetljivosti metode.

4.2. Validacija metode

4.2.1. Preciznost

Preciznost je određena kao ponovljivost i međupreciznost. Ponovljivost i međupreciznost izražene su kao relativne standardne devijacije korigiranog vremena migracije ($RSD t_{kor}$) i korigirane površine signala ($RSD A_{kor}$). Dobivene vrijednosti RSD-a prikazane su u tablici 2 (ponovljivost) te tablici 3 (međupreciznost), dok se tablice sa korigiranim vremenima i korigiranim površinama ispod signala nalaze u dodatku u tablici D1 (ponovljivost) i tablici D2 (međupreciznost). Metoda se pokazala ponovljivo uz sve vrijednosti RSD-a ispod 5 %. Najveće odstupanje u međupreciznosti izračunato je za površinu u elektroferogramu ispod signala za letrozol ($RSD = 14,79\%$).

Tablica 2. Dobivene RSD vrijednosti u svrhu određivanja ponovljivosti metode za određivanje ibuprofena, ribocikliba i letrozola uz ketoprofen ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) kao unutarnji standard kapilarnom elektroforezom (radni pufer sastava: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$), SBE- β -CD ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 15 kV, injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)

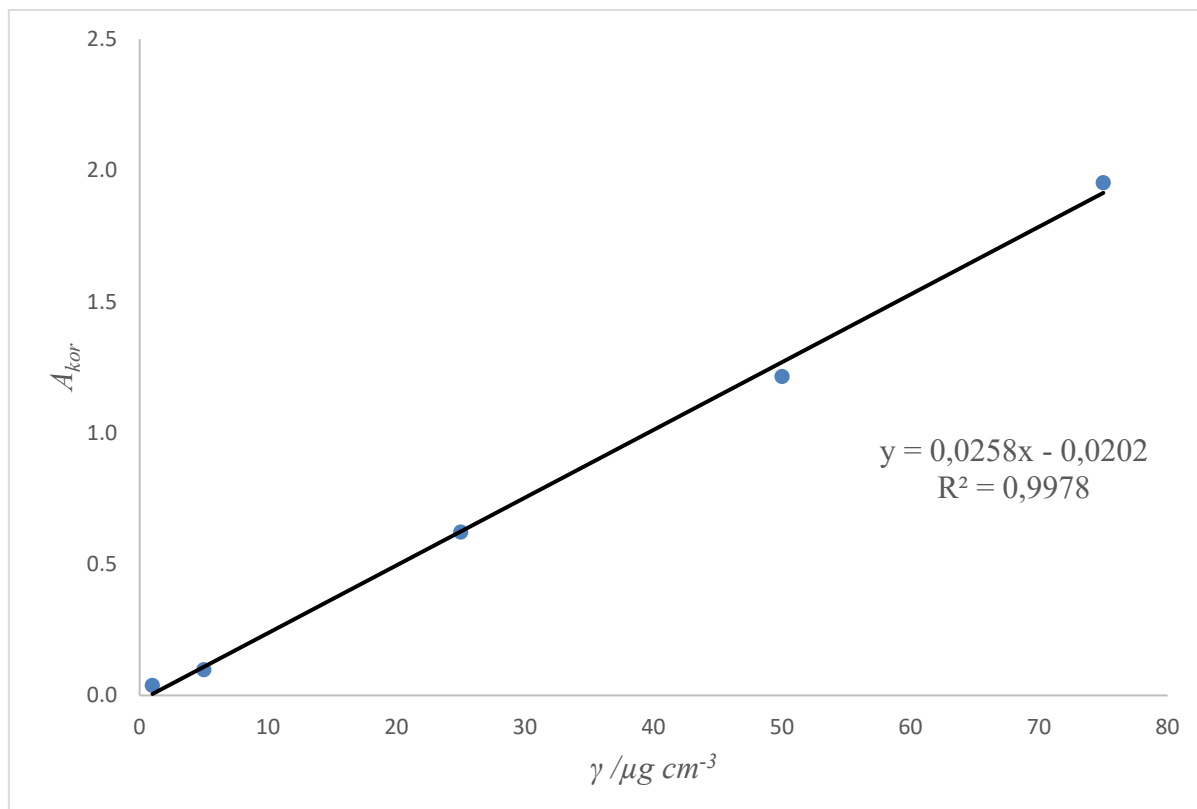
γ (analit) / $\mu\text{g cm}^{-3}$	Analit	$RSD t_{kor}$ (%)	$RSD A_{kor}$ (%)
10	Ibuprofen	0,85	1,19
	Ribociklib	0,42	1,04
	Letrozol	0,99	2,56
50	Ibuprofen	2,02	1,75
	Ribociklib	0,36	2,41
	Letrozol	3,24	3,71
70	Ibuprofen	0,30	1,84
	Ribociklib	0,74	2,09
	Letrozol	0,63	4,90

Tablica 3. Dobivene RSD vrijednosti u svrhu određivanja međupreciznosti metode (tri dana, $n = 9$) za određivanje ibuprofena, ribocikliba i letrozola uz ketoprofen ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) kao unutarnji standard kapilarnom elektroforezom (radni pufer sastava: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$), SBE- β -CD ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i naponu od 15 kV, injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)

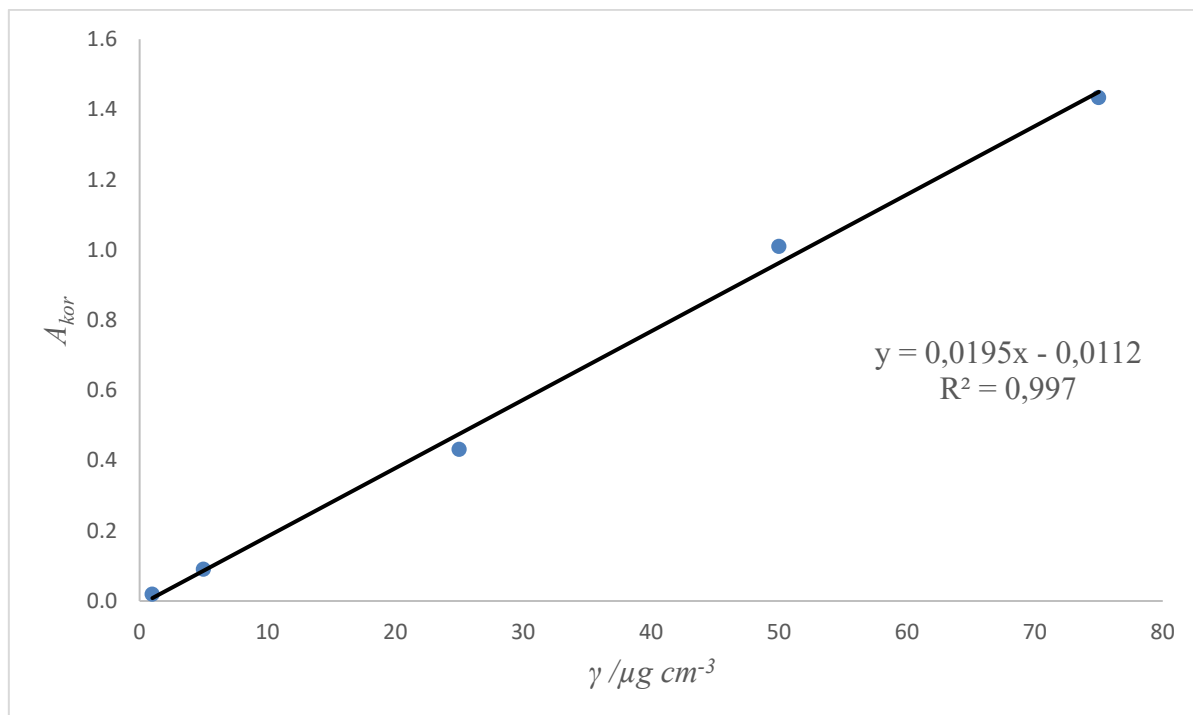
Analit	RSD t_{kor} (%)	RSD A_{kor} (%)
Ibuprofen	2,50	3,56
Ribociklib	0,50	5,79
Letrozol	5,79	14,79

4.2.2. Linearnost

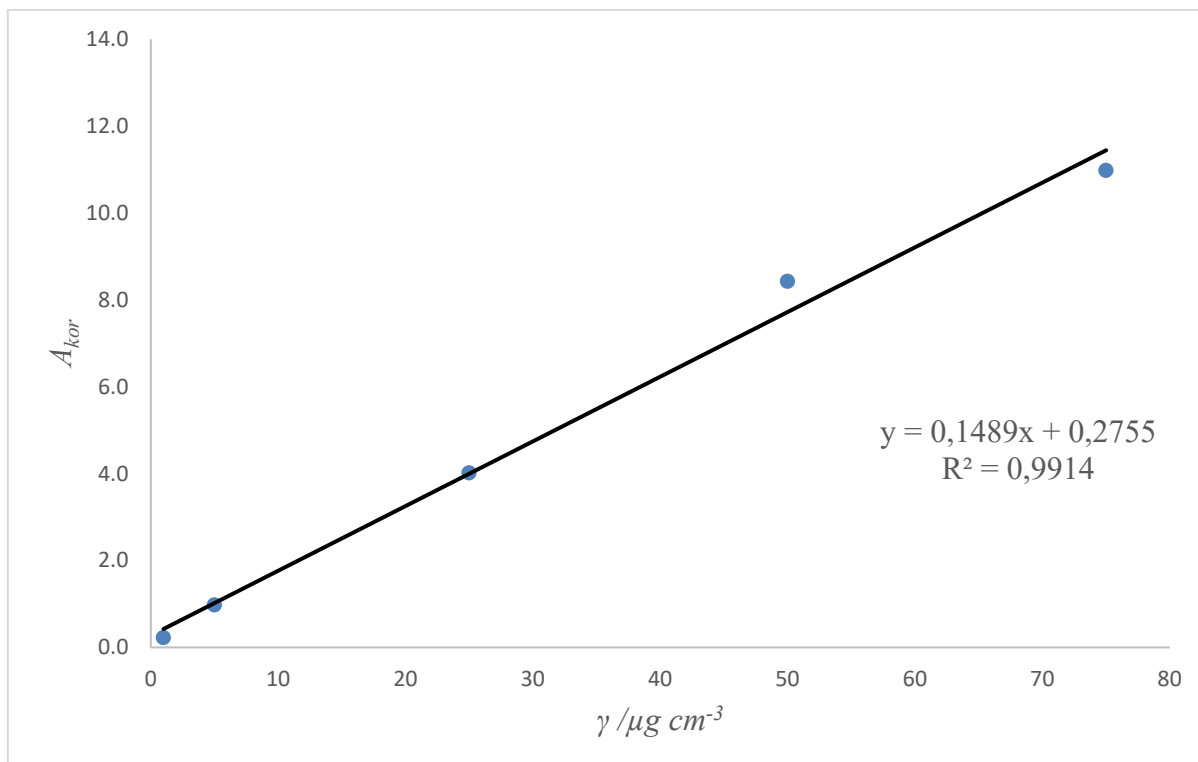
Ispitana je linearnost ovisnosti korigirane površine ispod signala ibuprofena, ribocikliba i letrozola o njihovoj koncentraciji te su konstruirani baždarni dijagrami na temelju eksperimentalno dobivenih podataka. Jednadžba baždarnog pravca za ibuprofen je $y = 0,0258x - 0,0202$ (slika 22), za ribociklib $y = 0,0195x - 0,0112$ (slika 23), a za letrozol $y = 0,1489x - 0,2755$ (slika 24). U koncentracijskom području od 1 do $75 \mu\text{g cm}^{-3}$ dobivene su zadovoljavajuće vrijednosti R^2 (0,9978 za ibuprofen, 0,997 za ribociklib i 0,9914 za letrozol) te je u tom području metoda linearna.



Slika 22. Ovisnost korigirane površine ispod signala o masenoj koncentraciji ibuprofena u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) mjerenjem kapilarnom elektroforezom (uvjeti: $\lambda = 200$ nm; radni pufer: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75$ mmol dm⁻³) s dodatkom SBE- β -CD-a ($c = 8,5$ mmol dm⁻³) i 5 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 15 kV; injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)



Slika 23. Ovisnost korigirane površine ispod signala o masenoj koncentraciji ribocikliba u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) mjerenjem kapilarnom elektroforezom (uvjeti: $\lambda = 200$ nm; radni pufer: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75$ mmol dm⁻³) s dodatkom SBE- β -CD-a ($c = 8,5$ mmol dm⁻³) i 5 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 15 kV; injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)



Slika 24. Ovisnost korigirane površine ispod signala o masenoj koncentraciji letrozola u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) mjerenjem kapilarnom elektroforezom (uvjeti: $\lambda = 200$ nm; radni pufer: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75$ mmol dm⁻³) s dodatkom SBE- β -CD-a ($c = 8,5$ mmol dm⁻³) i 5 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 15 kV; injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)

4.2.3. Točnost

Točnost je određena kao mjerna nesigurnost (b), a izračunata kao razlika između srednje vrijednosti niza izračunatih koncentracija iz baždarnih pravaca i referentne vrijednosti. Referentna vrijednost definirana je kao koncentracija analita pripremljena za analizu. Mjerno odstupanje najmanje je za ibuprofen (0,73-1,38), a najveće za letrozol (3,05-10,74), kako je vidljivo u tablici 4. Za svaki je analit mjerna nesigurnost pri najmanjoj koncentraciji (10 $\mu\text{g cm}^{-3}$) najveća.

Tablica 4. Određivanje mjernog odstupanja (b) za svaki od analita na temelju apsolutne vrijednosti razlike referentne vrijednosti (pripremljena koncentracija) i eksperimentalne vrijednosti (koncentracija izračunata na temelju baždarnih pravaca dobivenih u svrhu provjere linearnosti metode)

Analit	$\gamma_{\text{ref}} / \mu\text{g cm}^{-3}$	$\gamma_{\text{exp}} / \mu\text{g cm}^{-3}$	b
Ibuprofen	10	8,75	$b=1,38$
		8,60	
		8,52	
	50	50,19	$b=0,73$
		49,18	
		48,44	
	75	72,51	$b=0,9$
		74,91	
		74,88	
Ribociklib	10	6,61	$b=3,46$
		6,55	
		6,45	
	50	54,30	$b=5,12$
		54,40	
		56,66	
	75	74,61	$b=1,97$
		72,91	
		71,58	
Letrozol	10	6,70	$b=3,05$
		7,08	
		7,09	
	50	37,62	$b=10,74$
		39,51	
		40,64	
	75	66,28	$b=4,67$
		71,86	
		72,85	

4.2.4. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije (LOD) dobivena regresijskom analizom na temelju baždarnih pravaca za ibuprofen iznosi $0,095 \mu\text{g cm}^{-3}$, za ribociklib $0,085 \mu\text{g cm}^{-3}$, a za letrozol $1,149 \mu\text{g cm}^{-3}$.

Granica kvantifikacije (LOQ) dobivena regresijskom analizom za ibuprofen iznosi $0,289 \mu\text{g cm}^{-3}$, za ribociklib iznosi $0,259 \mu\text{g cm}^{-3}$, a za letrozol $3,481 \mu\text{g cm}^{-3}$.

4.2.5. Robusnost

Za provjeru robusnosti metode mijenjane su temperatura (tablica 5), koncentracija SBE- β -CD-a (tablica 6) te napon (tablica 7) pri kojima se metoda izvodi. Uzimajući u obzir kriterij vrijednosti RSD ispod 5 % za većinu uvjeta, metoda je robusna za promjenu temperature za ± 2 °C, promjenu napona za $\pm 0,5$ kV te promjenu koncentracije dodanog SBE- β -CD-a u radni pufer od $\pm 0,5$ mmol dm⁻³. Promjena temperature znatno utječe na vrijeme migracije i površinu ispod signala letrozola te je RSD najveći i iznosi 7,27 % za vrijeme, odnosno 6,95 % za površinu. Tablice sa korigiranim vremenom i korigiranom površinom ispod signala na temelju kojih su izračunate RSD vrijednosti nalaze se u dodatku u tablici D3 (promjena temperature), tablici D4 (promjena koncentracije SBE- β -CD) te tablici D5 (promjena napona).

Tablica 5. Dobivene RSD vrijednosti u svrhu određivanja robusnosti metode za određivanje ibuprofena, ribocikliba i letrozola uz ketoprofen ($\gamma = 50$ $\mu\text{g cm}^{-3}$) kao unutarnji standard kapilarnom elektroforezom ($\lambda = 200$ nm; radni pufer sastava: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75$ mmol dm⁻³), SBE- β -CD ($c = 8,5$ mmol dm⁻³) i 5 % izopropanola pri temperaturama od 23, 25 i 27 °C i naponu od 15 kV, injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)

Analit	RSD t_{kor} (%)	RSD A_{kor} (%)
Ibuprofen	1,28	4,05
Ribociklib	0,50	3,54
Letrozol	7,27	6,95

Tablica 6. Dobivene RSD vrijednosti u svrhu određivanja robusnosti metode za određivanje ibuprofena, ribocikliba i letrozola uz ketoprofen ($\gamma = 50$ $\mu\text{g cm}^{-3}$) kao unutarnji standard kapilarnom elektroforezom ($\lambda = 200$ nm; radni pufer sastava: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75$ mmol dm⁻³), SBE- β -CD ($c = 8, 8,5$ i $9,5$ mmol dm⁻³) i 5 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 15 kV, injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)

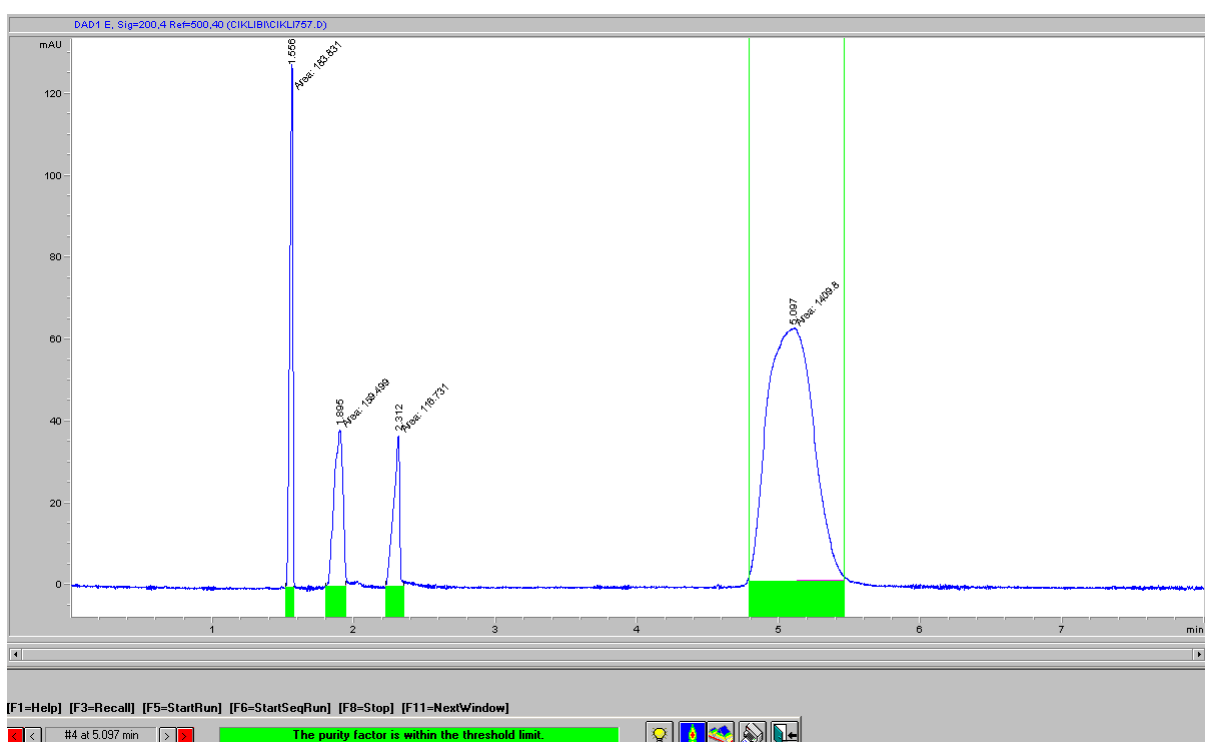
Analit	RSD t_{kor} (%)	RSD A_{kor} (%)
Ibuprofen	2,01	2,20
Ribociklib	0,68	4,12
Letrozol	4,66	4,83

Tablica 7. Dobivene RSD vrijednosti u svrhu određivanja robusnosti metode za određivanje ibuprofena, ribocikliba i letrozola uz ketoprofen ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) kao unutarnji standard kapilarnom elektroforezom ($\lambda = 200 \text{ nm}$; radni pufer sastava: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$), SBE- β -CD ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i naponu od 14,5, 15 i 15,5 kV, injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)

Analit	RSD t_{kor} (%)	RSD A_{kor} (%)
Ibuprofen	1,38	2,40
Ribociklib	0,34	4,92
Letrozol	4,33	4,07

4.2.6. Specifičnost

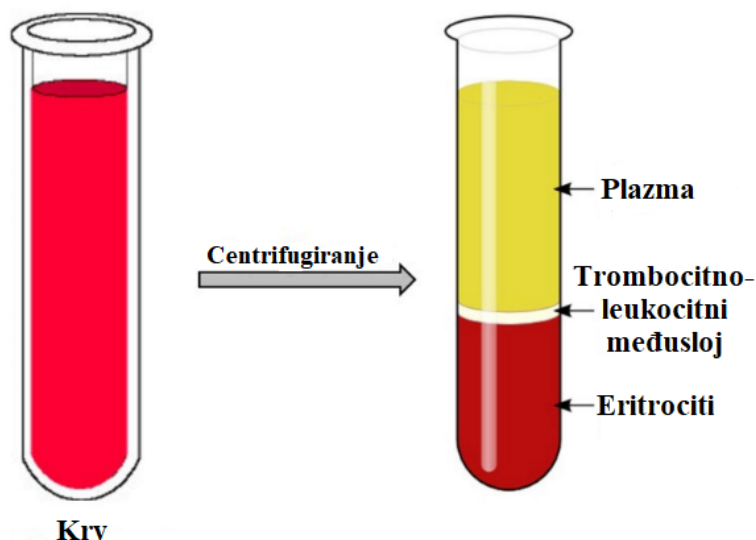
Specifičnost metode određena je pomoću *Peak purity* opcije programa kapilarne elektroforeze (slika 25). *Threshold* je postavljen na 0,990 te su svi signali bili iznad te granice, odnosno njihova je čistoća veća od 99,0 %. Uz taj se rezultat metoda može definirati kao specifična.



Slika 25. Slika zaslona sučelja kapilarno-elektroforetskog uređaja (^3DCE Agilent High-Performance Capillary Electrophoresis (G1600A)) tijekom provjere *peak purity* (*threshold* 0,990) ibuprofena, ketoprofena, ribocikliba i letrozola

4.3. Primjena metode na biološki uzorak

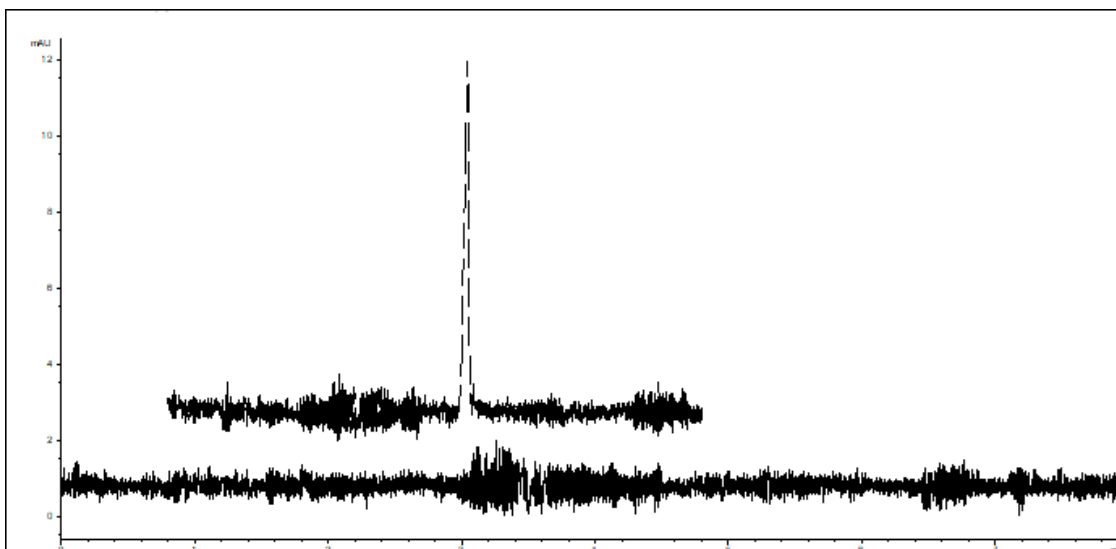
Krvna plazma svijetlo je žute boje te sadrži koagulanse, proteine, elektrolite, glukozu, lipide i lijekove te njihove metabolite. Plazma se iz krvi dobiva centrifugiranjem krvi sa antikoagulansom, pri čemu dolazi do odvajanja na plazmu, trombocitno-leukocitni međusloj i sloj eritrocita⁵², prikazano na slici 26.



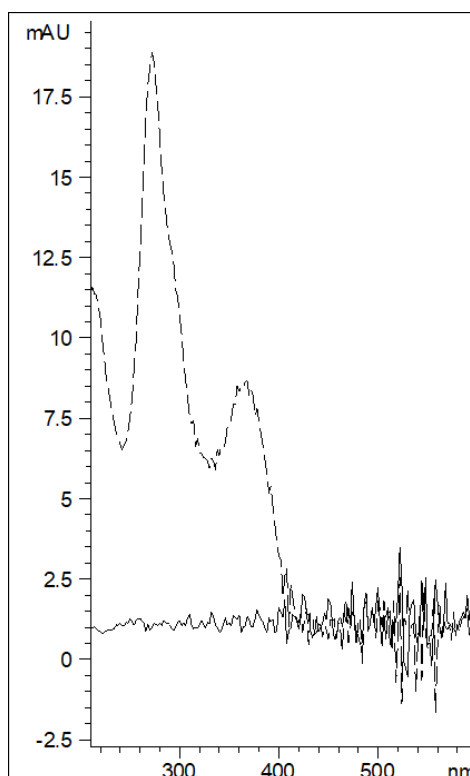
Slika 26. Prikaz nastanja krvne plazme iz krvi procesom centrifugiranja (modif.

<https://www.horiba.com/int/technology/measured-and-controlled-objects/liquid/blood-plasma/>, datum pristupa 6. veljače 2023., ref. 53)

Očekivana koncentracija ribocikliba u plazmi je između 711 i 3500 ng cm⁻³,^{54, 55} dok je za letrozol srednja vrijednosti koncentracije u plazmi između 28,4 i 349,2 ng cm⁻³.⁵⁶ Budući da su očekivane koncentracije niskih vrijednosti, uzorak je potrebno obogatiti (engl. *spike*) kako bi rezultati bili zadovoljavajuće osjetljivosti. Na slici 27 prikazana su dva elektroferograma pri valnoj duljini 345 nm, elektroferogram dobiven analizom plazme te plazme obogaćene ribociklibom ($\gamma = 20 \mu\text{g cm}^{-3}$) čiji je signal na slici označen crtkano. Preklopljeni UV-VIS spektar plazme i uzorka obogaćenog ribociklibom prikazan je na slici 28. Vidljiv je izražen šum koji se javlja zbog prisustva drugih tvari u plazmi, a koje nisu uklonjene uz taloženje acetonitrilom.



Slika 27. Elektroferogrami ($\lambda = 345 \text{ nm}$) uzorka plazme bez dodanog ribocikliba te uzorka plazme obogaćenog ribociklibom ($\gamma = 20 \mu\text{g cm}^{-3}$) (označeno crtkano) uz fosfatni pufer ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$) s dodatkom SBE- β -CD ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i naponu od 15 kV



Slika 28. UV-VIS spektar uzorka plazme i uzorka plazme obogaćenog ribociklibom ($\gamma = 20 \mu\text{g cm}^{-3}$) (označen crtkano) u smjesi otapala metanol:voda = 50:50 (v/v) dobiven uz detektor s nizom dioda (DAD)

§ 5. ZAKLJUČAK

Razvijena je i validirana metoda za istovremeno određivanje ibuprofena, letrozola i ribocikliba kapilarnom elektroforezom uz ketoprofen ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) kao unutarnji standard.

Radni pufer za analizu ibuprofena, letrozola i ribocikliba sadrži 75 mmol dm^{-3} natrijevog dihidrogenfosfata, $8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ sulfobutileter- β -ciklodekstrina i 5 % izopropanola. Mjerenja su rađena pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i naponu od 15 kV. Injektiranje uzorka izvršeno je pod tlakom -50 mbar na *outlet* dijelu kapilare u trajanju od 5 sekundi, nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi.

Redosljed kojim se analiti i unutarnji standard pojavljuju u elektroferogramu ovisno o vremenima migracije jest ibuprofen (1,558 min), ketoprofen (1,968 min), ribociklib (2,387 min) te letrozol (5,568 min). Metoda je linearna u koncentracijskom rasponu od 1 do $75 \mu\text{g cm}^{-3}$. Mjerenjem dobivene granice detekcije i kvantifikacije su redom: za ibuprofen 0,095 i $0,288 \mu\text{g cm}^{-3}$, za ribociklib 0,085 i $0,258 \mu\text{g cm}^{-3}$ te za letrozol 1,145 i $3,481 \mu\text{g cm}^{-3}$. Ostvarene su zadovoljavajuća preciznost, točnost i specifičnost. Metoda je robusna za promjenu temperature od $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, promjenu napona od $\pm 0,5 \text{ kV}$ te promjenu koncentracije dodanog SBE- β -CD-a u radni pufer od $\pm 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Mala količina potrebnog uzorka te mala količina potrebnog pufera za provedbu mjerenja prednosti su ove metode te bi rezultati ovog diplomskog rada mogli poslužiti za daljnju optimizaciju metode kako bi ona pronašla primjenu u terapijskom praćenju lijekova, a u svrhu poboljšanja životnih uvjeta pacijenata oboljelih od HR+ HER2- raka dojke.

§ 6. POPIS OZNAKA, POKRATA I SIMBOLA

AKT – protein kinaza B

ATP – adenozin trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*)

b – mjerna nesigurnost (engl. *Bias*)

CDK4/6 – ciklin-ovisna kinaza 4/6 (engl. *Cyclin-Dependent Kinase*)

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

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

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

EMA – Europska agencija za lijekove (*European Medicines Agency*)

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

ER – estrogenski receptor

ERK/MAPK – kinaza regulirana vanstraničnim signalima/protein kinaza aktivirana mitogenom (engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinases/Mitogen-Activated Protein Kinases*)

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

HER2 – receptor ljudskog epidermalnog faktora rasta (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor*)

HR – hormonski receptor

ICH – Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih zahtjeva za registraciju farmaceutskih proizvoda za primjenu kod ljudi (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*)

LOD – granica detekcije (engl. *Limit of Detection*)

LOQ – granica kvantifikacije (engl. *Limit of Quantitation*)

MEK – kinaza protein kinaza aktiviranih mitogenom (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*)

mTORC1 – ciljna molekula rapamicin kompleksa u sisavaca (engl. *Mammalian Target of Rapamycin Complex*)

p. a. – čistoća za analitičke svrhe (lat. *pro analysi*)

PI3K – fosfoinozimid-3-kinaza (engl. *Phosphoinositide-3-Kinase*)

PIP2 – fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat (engl. *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate*)

PIP3 – fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (engl. *Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate*)

PR – progesteronski receptor

Raf – faktor rapidnog ubrzavanja fibrosarkoma (engl. *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)

Ras – virus štakorskog sarkoma (engl. *Rat Sarcoma Virus*)

RSD – relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*)

SBE- β -CD – sulfobutileter- β -ciklodekstrin

S6K – S6 kinaza

SDS – natrijev dodecil-sulfat (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate*)

TDM – terapijsko praćenje lijeka (engl. *Therapeutic Drug Monitoring*)

TSC – tuberozno sklerozni protein (engl. *Tuberous Sclerosis Protein*)

UV-VIS – ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (engl. *Ultraviolet-Visible Spectroscopy*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. H. Sung, J. Ferlay, R. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, *CA: Cancer J Clin*, **71** (2021) 209-249.
2. S. Im, Y. Lu, A. Bardia, N. Harbeck, M. Colleoni, F. Franke, L. Chow, *N Engl J Med*, **381** (2019) 307-316.
3. J. Kang, M. Lee, *Korean J Intern Med*, **24** (2009) 1-10.
4. H. J. Isaaq, *Electrophoresis*, **21** (2000) 1921-1939.
5. S. S. Begum, B. Sai Sushmaa, S. Vijayaraja, *PharmaTutor*, **3** (2015) 14-24.
6. S. Pandey, P. Pandey, G. Tiwari, R. Tiwari, *Pharm Methods*, **1** (2010) 14-24.
7. L. Tijare, N. Rangari, U. Mahajan, *Asian J Pharm Clin Res*, **9** (2016) 6-10.
8. *A guide to effective method development in bioanalysis*, Waters, Milford, 2008, str. 10-11.
9. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology Q2 (R1)* (2005)
10. *Guideline on bioanalytical method validation*, European Medicines Agency, London, 2011.
11. O. González, R. M. Alonso, *Handbook of Analytical Separations*, **7** (2020) 115-134.
12. D. G. Watson, *Pharmaceutical Analysis*, Elsevier Limited, 2017, str. 368-387.
13. B. M. Lowe, C. K. Skylaris, N. G. Green, *J Colloid Interface Sci*, **451** (2015) str. 231-244.
14. M. Damić, B. Nigović, *Farmaceutski glasnik*, **66** (2010) 195-207.
15. H. H. Lauer, G. P. Rozing, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Agilent Technologies, 2018.
16. H. Shitani, J. Polonsky, *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications*, Blackie Academic & Professional, London, 1997, str. 2. i 386.
17. <https://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/hewlett-packard-g1600ax-3d-capillary-electrophoresis-6449> (datum pristupa 7. prosinca 2022.)
18. I. Piljac, *Elektroforeza*, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2006. str. 139-158.

19. <https://www.kb-merkur.hr/merkur-odjeli-detaljno/klinicki-zavod-za-medicinsku-biokemiju-i-laboratorijsku-medicinu> *prilog potvrdi o akreditaciji* (datum pristupa 10. siječnja 2023.)
20. <https://www.kbd.hr/wp-content/uploads/2022/06/2022-04-05-POPIS-AKREDIT-LAB-POSTUPAKA.pdf> (datum pristupa 10. siječnja 2023.)
21. <https://www.kbc-zagreb.hr/odjel-za-elektroforetsku-i-imunokemijsku-laboratorijsku-dijagnostiku.aspx> (datum pristupa 10. siječnja 2023.)
22. J. J. P. Mark, A. Beutner, M. Cindric, F. M. Matysik, *Microchim Acta*, **182** (2015) 351-359.
23. A. Wuethrich, J. P. Quirino, *The Application of Green Solvents in Separation Processes*, Elsevier Inc., Amsterdam, 2017, str. 529.
24. S. H. Giordano, *N Engl J Med*, **378** (2018) 2311–2320.
25. A. G. Waks, E. P. Winer, *JAMA*, **321** (2019) 288-297.
26. H. J. Burstein, *N Engl J Med*, **353** (2005) 1652-1654.
27. https://www.cybermed.hr/clanci/tumorski_biljezi_tumorski_markeri (datum pristupa 12. siječnja 2023.)
28. A. A. Onitilo, J. M. Engel, R. T. Greenlee, B. N. Mukesh, *Clin Med Res*, **7** (2009) 4-13.
29. K. L. Maughan, M. A. Lutterbie, P. S. Ham, *Am Fam Physician*, **81** (2010) 1339-1345.
30. S. E. Jackson, J. D. Chester, *Int J Cancer*, **137** (2015) 262-366.
31. Y. Daali, *J Pers Med*, **12** (2022) 1660.
32. D. Čvorišćec, I. Čepelak (ur.), *Štrausova medicinska biokemija*, Vol. 1, Medicinska naklada, Zagreb, 2009, str. 605-621.
33. M. Ban, A. Strikić, B. P. Miše, E. Vrdoljak, *Liječ Vjesn*, **141** (2019) 33-39.
34. J. O'Shaughnessy, J. T. Beck, M. Royce, *Cancer Treat Rev*, **69** (2018) str. 205.
35. A. S. Bhatnagar, *Breast Cancer Res Treat*, **105** (2007) 7-17.
36. H. M. Lamb, J. C. Adkins, *Drugs*, **56** (1998) 1125-1140.
37. <https://halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Letrozol-JGL-25-mg-filmom-oblozene-tablete/15398/> *Sažetak opisa svojstava lijeka* (datum pristupa 11. siječnja 2023.)
38. G. N. Hortobagyi et al., *N Engl J Med*, **375** (2016) 1738-1748.
39. <https://halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Kisqali/13884/> *Sažetak opisa svojstava lijeka, označivanje i uputa o lijeku* (datum pristupa 12. siječnja 2023.)

40. <https://halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Ibuprofen-Mibe-600-mg-filmom-oblozene-tablete/15337/> Sažetak opisa svojstava lijeka (datum pristupa 15. siječnja 2023.)
41. *Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata*, Narodne novine broj 2/05
42. M. Stahl, *Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology*, Agilent Technologies, 2003.
43. M. Sertić, *Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom*, Završni specijalistički, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 24
44. L. Escuder-Gilabert, M. J. Martin-Biosca, *J Chromatogr A*, **1357** (2014) 2-23.
45. A. C. Samamed, J. Rakmai, J. C. Mejuto, J. Simal-Gandara, G. Astray, *Food Chem*, **384** (2022) 132467
46. J. Tang, W. Tang (ur.), *Modified Cyclodextrins for Chiral Separation*, Springer, Berlin, 2013, str. 4.
47. M. Sertić, B. Nigović, M. Jug, *Farmaceutski glasnik*, **66** (2010) 467-475.
48. <https://hr.cyclodextrin2.com/beta-cyclodextrin-sulfobutyl-ether-sodium> (datum pristupa 26. siječnja 2023.)
49. K. D. Altria, *Improved Performance in Capillary Electrophoresis using Internal Standards*, 2002.
50. S. Pereva, V. Nikolova, T. Sarafska, S. Angelova, T. Spassov, T. Dudev, *J Mol Struct*, **1205** (2020) 127575
51. A. Obaid, A. K. M. Jamil, S. Prabu, S. M. Saharin, S. Mohamad, *Spectrochim Acta A*, **241** (2020) 118674
52. <https://www.britannica.com/science/plasma-biology> (datum pristupa 8. veljače 2023.)
53. <https://www.horiba.com/int/technology/measured-and-controlled-objects/liquid/blood-plasma/> (datum pristupa 6. veljače 2023.)
54. T. S. Samant, S. Dhuria, Y. Lu, M. Laisney, S. Yang, *Clin Pharmacol Ther*, **104** (2018) 374-383.
55. J. R. Infante, P. A. Cassier, J. F. Gerecitano, *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*, **22** (2016) 5696-5705.
56. Z. Desta, Y. Kreutz, A. T. Nguyen, L. Li, *Clin Pharmacol Ther*, **90** (2011) 693-700.

§ 8. DODATAK

D1. Rezultati mjerenja u svrhu određivanja ponovljivosti metode za određivanje ibuprofena, ribocikliba i letrozola uz ketoprofen ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) kao unutarnji standard kapilarnom elektroforezom (radni pufer sastava: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$), SBE- β -CD ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 15 kV, injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)

γ (analit) / $\mu\text{g cm}^{-3}$	Analit	t_{kor}	A_{kor}	RSD t_{kor} (%)	RSD A_{kor} (%)
10	Ibuprofen	0,81	0,24	0,85	1,19
	Ribociklib	1,17	0,14	0,42	1,04
	Letrozol	2,40	1,33	0,99	2,56
50	Ibuprofen	0,79	1,27	2,02	1,75
	Ribociklib	1,20	1,12	0,36	2,41
	Letrozol	2,67	6,33	3,24	3,71
70	Ibuprofen	0,83	1,95	0,30	1,84
	Ribociklib	1,22	1,41	0,74	2,09
	Letrozol	2,39	11,12	0,63	4,90

D2. Rezultati mjerenja u svrhu određivanja međupreciznosti metode za određivanje ibuprofena, ribocikliba i letrozola uz ketoprofen ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) kao unutarnji standard kapilarnom elektroforezom (radni pufer sastava: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$), SBE- β -CD ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 15 kV, injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)

Redni broj dana mjerenja	Analit	Redni broj mjerenja u danu	t_{kor}	A_{kor}	RSD t_{kor} (%)	RSD A_{kor} (%)
1.	Ibuprofen	1.	0,83	1,23	2,50	3,56
		2.	0,85	1,25		
		3.	0,83	1,19		
2.		1.	0,81	1,21		
		2.	0,79	1,16		
		3.	0,78	1,14		
3.		1.	0,82	1,20		
		2.	0,80	1,13		
		3.	0,79	1,14		
1.	Ribociklib	1.	1,22	0,77	0,50	5,79
		2.	1,23	0,82		
		3.	1,23	0,82		
2.		1.	1,22	0,88		
		2.	1,21	0,85		
		3.	1,21	0,81		
3.		1.	1,23	0,80		
		2.	1,22	0,74		
		3.	1,21	0,75		
1.	Letrozol	1.	2,65	7,01	5,79	14,79
		2.	2,46	6,52		
		3.	2,61	6,37		
2.		1.	2,75	8,53		
		2.	2,83	8,05		
		3.	2,95	8,32		
3.		1.	2,80	9,65		
		2.	2,83	8,80		
		3.	2,94	9,37		

D3. Rezultati mjerenja u svrhu određivanja robusnosti metode za određivanje ibuprofena, ribocikliba i letrozola uz ketoprofen ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) kao unutarnji standard kapilarnom elektroforezom ($\lambda = 200 \text{ nm}$; radni pufer sastava: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$), SBE- β -CD ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturama od 23, 25 i 27 °C i naponu od 15 kV, injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)

Temperatura / °C	Analit	Redni broj mjerjenja u danu	t_{kor}	A_{kor}	RSD t_{kor} (%)	RSD A_{kor} (%)
23	Ibuprofen	1.	0,80	1,49	1,28	4,05
		2.	0,81	1,45		
		3.	0,79	1,42		
25		1.	0,78	1,35		
		2.	0,79	1,32		
		3.	0,78	1,35		
27		1.	0,78	1,43		
		2.	0,78	1,41		
		3.	0,78	1,44		
23	Ribociklib	1.	1,21	1,06	0,50	3,54
		2.	1,22	1,12		
		3.	1,22	1,09		
25		1.	1,21	1,02		
		2.	1,21	1,00		
		3.	1,20	1,07		
27		1.	1,21	1,05		
		2.	1,21	1,06		
		3.	1,21	1,10		
23	Letrozol	1.	2,60	6,94	7,27	6,95
		2.	2,69	7,07		
		3.	2,78	7,46		
25		1.	3,24	7,81		
		2.	3,13	7,77		
		3.	3,04	7,86		
27		1.	2,95	8,57		
		2.	2,87	8,21		
		3.	2,78	8,25		

D4. Rezultati mjerenja u svrhu određivanja robusnosti metode za određivanje ibuprofena, ribocikliba i letrozola uz ketoprofen ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) kao unutarnji standard kapilarnom elektroforezom ($\lambda = 200 \text{ nm}$; radni pufer sastava: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$), SBE- β -CD ($c = 8, 8,5 \text{ i } 9,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturi od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i naponu od 15 kV, injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)

Koncentracija SBE- β -CD / mmol dm^{-3}	Analit	Redni broj mjerenja u danu	t_{kor}	A_{kor}	RSD t_{kor} (%)	RSD A_{kor} (%)
8,0	Ibuprofen	1.	0,79	1,12	2,01	2,20
		2.	0,79	1,14		
		3.	0,79	1,13		
8,5		1.	0,81	1,21		
		2.	0,79	1,16		
		3.	0,78	1,14		
9,0		1.	0,82	1,16		
		2.	0,82	1,16		
		3.	0,83	1,15		
8,0	Ribociklib	1.	1,21	0,85	0,68	4,12
		2.	1,20	0,87		
		3.	1,20	0,85		
8,5		1.	1,22	0,88		
		2.	1,21	0,85		
		3.	1,21	0,81		
9,0		1.	1,22	0,79		
		2.	1,22	0,81		
		3.	1,22	0,79		
8,0	Letrozol	1.	2,98	9,01	4,66	4,83
		2.	2,81	9,17		
		3.	2,97	8,65		
8,5		1.	2,75	8,53		
		2.	2,83	8,05		
		3.	2,95	8,32		
9,0		1.	2,75	8,95		
		2.	2,69	8,87		
		3.	2,60	9,39		

D5. Rezultati mjerenja u svrhu određivanja robusnosti metode za određivanje ibuprofena, ribocikliba i letrozola uz ketoprofen ($\gamma = 50 \mu\text{g cm}^{-3}$) kao unutarnji standard kapilarnom elektroforezom ($\lambda = 200 \text{ nm}$; radni pufer sastava: natrijev dihidrogenfosfat ($c = 75 \text{ mmol dm}^{-3}$), SBE- β -CD ($c = 8,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i 5 % izopropanola pri temperaturi od 25 °C i naponu od 14,5, 15 i 15,5 kV, injektiranje na outletu pri -50 mbar u trajanju 5 sekundi nakon injektiranja ultračiste vode u trajanju 6 sekundi)

Napon / kV	Analit	Redni broj mjerjenja u danu	t_{kor}	A_{kor}	RSD t_{kor} (%)	RSD A_{kor} (%)
14,5	Ibuprofen	1.	0,83	1,15	1,38	2,40
		2.	0,83	1,14		
		3.	0,82	1,14		
15,0		1.	0,82	1,20		
		2.	0,80	1,13		
		3.	0,79	1,14		
15,5		1.	0,82	1,19		
		2.	0,82	1,12		
		3.	0,82	1,13		
14,5	Ribociklib	1.	1,23	0,70	0,34	4,92
		2.	1,22	0,73		
		3.	1,22	0,75		
15,0		1.	1,23	0,80		
		2.	1,22	0,74		
		3.	1,21	0,75		
15,5		1.	1,22	0,72		
		2.	1,22	0,72		
		3.	1,22	0,67		
14,5	Letrozol	1.	2,63	8,99	4,33	4,07
		2.	2,60	8,83		
		3.	2,57	9,15		
15,0		1.	2,80	9,65		
		2.	2,83	8,80		
		3.	2,94	9,37		
15,5		1.	2,71	8,61		
		2.	2,75	8,68		
		3.	2,75	8,58		

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Josipa Božić

Datum rođenja: 10. prosinca 1997.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

Obrazovanje

2004.–2012. Osnovna škola *Hugo Badalić*, Slavonski Brod

2012.–2016. Opća gimnazija *Matija Mesić*, Slavonski Brod

2016.–2020. Preddiplomski studij *Kemija*, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2020.–2023. Diplomski studij *Kemija – istraživački*, smjer *Analitička kemija i biokemija*, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Josipa Božić, Zvonimir Mlinarić, Lu Turković, Biljana Nigović, Miranda Sertić, *Development and validation of a novel CE method for simultaneous analysis of ribociclib, letrozole and ibuprofen*, 19th Ružička days, Vukovar, 2022, Knjiga sažetaka; str. 112