Utjecaj organskog otapala na analizu gemcitabina i onečišćenja citozina primjenom MEKC metode

Blažević, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:900644

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Iva Blažević

Utjecaj organskog otapala na analizu gemcitabina i onečišćenja citozina primjenom MEKC metode

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Mirandi Sertić na strpljenju, izdvojenom vremenu i podršci koju pružila tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na ljubavi, podršci i razumijevanju koju su imali za mene tijekom školovanja. Bez vas ne bih uspjela!

Sadržaj

1. UVOD 1
   1.1. Lijekovi za liječenje zloćudnih bolesti 1
   1.2. Antitumorski lijekovi nespecifični za pojedine faze staničnog ciklusa 1
   1.3. Antitumorski lijekovi specifični za pojedine faze staničnog ciklusa 2
   1.4. Gemcitabin 4
   1.5. Farmakokinetička svojstva gemcitabina 8
   1.6. Micelarna elektrokinetička kromatografija 8
2. OBRAZLOŽENJE TEME 10
3. MATERIJALI I METODE 11
   3.1. MATERIJALI 11
      3.1.1. Kemikalije 11
      3.1.2. Standardi 11
      3.1.3. Radni instrumenti 11
      3.1.4. Pribor 12
      3.1.5. Programski paketi 12
   3.2. METODE 13
      3.2.1. Priprema instrumenta 13
      3.2.2. Priprema radnog pufera 13
      3.2.3. Priprema standardnih otopina 13
      3.2.4. Kapilarnoelektroforetski uvjeti analize 14
4. REZULTATI I RASPRAVA 15
   4.1. Strukturna karakterizacija onečišćenja gemcitabina masenom spektrometrijom 15
   4.2. Odabir metode 17
   4.3. Odabir organskog otapala 18
5. ZAKLJUČAK 27
6. LITERATURA 28
7. SAŽETAK / SUMMARY 30

1. UVOD

1.1. Lijekovi za liječenje zloćudnih bolesti

Liječenje zloćudnih bolesti provodi se primjenom kemoterapije, zračenja, kirurškim zahvatima, endokrinološkom terapijom, imunoterapijom i termoterapijom. Kemoterapija je terapija izbora pri sustavno prisutnoj bolesti. Danas se kemoterapija primjenjuje kao primarno indukcijsko liječenje (primarno liječenje lijekovima u bolesnika s uznapredovalom bolešću za koju nema alternativne mogućnosti liječenja), kao neoadjuvantno liječenje u bolesnika s lokaliziranom bolešću (za koje je lokalno liječenje poput kirurškog zahvata ili zračenja samo po sebi neodgovarajuće) i kao adjuvantna kemoterapija koja je pomoć lokalnim načinima liječenja (kirurški zahvat ili radioterapija). Antitumorski lijekovi mogu biti specifični za pojedine faze staničnog ciklusa i bez specifičnosti za faze staničnog ciklusa (Katzung i sur., 2011; Francetić i sur., 2015).

1.2. Antitumorski lijekovi nespecifični za pojedine faze staničnog ciklusa

Alkilirajući lijekovi ostvaruju citotoksičan učinak prijenosom alkilne skupine na različite dijelove stanice. Alkiliranje DNK unutar stanice je glavni učinak koji uzrokuje staničnu smrt. Alkilirajući lijekovi se mogu podijeliti na analoge dušikova plikavca (ciklofosfamid, ifosfamid, klorambucil, melfalan, klormetin), alkil sulfonate (busulfan), etilen-imine (tiotepa), nitrozoureje (karmustin i lomustin) te ostali alkilirajući pripravci (dakarbazin i temozolomid). Opći mehanizam djelovanja ovih lijekova podrazumijeva unutarmolekularnu ciklizaciju uz stvaranje iona etilamonija što prenosi alkilnu skupinu na stanične elemente. Kao sekundarni mehanizam, spojevi nitrozoureje uzrokuju stvaranje izocijanata, što rezultira karbamilacijom lizinskih ostataka proteina.

Analozi platine su cisplatin, karboplatin i oksaliplatin. Djeluju vezanjem za DNK i stvaranjem veza među uzvojnicama (Francetić i sur., 2015). Time je zaustavljen rast stanice jer je inhibirana sinteza DNK. Ubijaju tumorske stanice u svim stadijima staničnog ciklusa. Osim za DNK, analozi platine pokazuju i sklonost vezivanju citoplazmatskih proteina jezgre, što pridonosi citotoksičnom i antitumorskom učinku.

Antraciklini su antitumorski antibiotici i jedni od najupotrebljivanijih citotoksičnih lijekova. Ostvaruju citotoksičan učinak četirima glavnim mehanizmima: inhibicija

topoizomeraze II; visokospecifičnim umetanjem između parova baza nukleinskih kiselina s posljedičnim blokiranjem sinteze DNK i RNK i lomovima DNK; stvaranjem slobodnih radikala semikvinona i slobodnih kisikovih radikala; i vezanje za membranu stanice s posljedičnim poremećajem transporta tekućine i iona. U antracikline ubrajamo doksorubicin, daunorubicin, idarubicin, epirubicin, mitoksantron te daktinomicin.

U antitumorske antibiotike ubrajaju se i mitomicin te bleomicin. Mitomicin se aktivira enzimskom redukcijom u alkilirajući metabolit koji se veže na DNK. Učinkovit je u svim fazama staničnog ciklusa, a najbolje se kombinira s radioterapijom kako bi se uništile hipoksične tumorske stanice. Bleomicin se veže za DNK i uzrokuje lomove jednostrukih i dvostrukih lanaca stvaranjem slobodnih radikala i inhibicijom DNK sinteze. On je specifičan za stanični ciklus i nakuplja se u stanici u G_2-fazi.

Kamptotekini su inhibitori topoizomeraze I, enzima ključnog za cijepanje i ponovno spajanje jednostrukih lanaca DNK. Inhibicija enzima uzrokuje oštećenje DNK. Topotekan i irinotekan su dva kamptotekina koja se primjenjuju u kliničkoj praksi (Katzung i sur., 2011).

1.3. Antitumorski lijekovi specifični za pojedine faze staničnog ciklusa

Antitumorski kemoterapeutici prirodnog podrijetla su vinka alkaloidi, taksani, epidofilotoksini i kamptotekini.

Vinka alkaloidi su vinblastin, vinkristin i vinorelbin te su specifični za M-fazu staničnog ciklusa jer inhibiraju polimerizaciju tubulina, što remeti spajanje mikrotubula, važnog dijela citoskeleta i mitotičkog vretena. Rezultat je prekid mitoze u metafazi i prekid stanične diobe te stanična smrt.

Taksani (paklitaksel i docetaksel) se visokim afinitetom vežu za mikrotubule i pojačavaju polimerizaciju tubulina te se to događa u odsutnosti proteina udruženih s mikrotubulima i gvanozin-trifosfata, a rezultira inhibicijom mitoze kod stanične diobe. Iksabepilon je novi inhibitor mikrotubula koji nije taksan i veže se na β-tubulin podjedinicu mikrotubula inhibirajući tako normalnu dinamiku mikrotubula.

Epipodofiltoksini su etopozid i tenipozid koji inhibiraju topoizomerazu II, što uzrokuje prekid lanca DNA i stvaranje kompleksa lijek-DNA-enzim (Katzung i sur., 2011).

Antimetaboliti su lijekovi koji sprječavaju normalnu staničnu diobu kočenjem djelovanja ključnih enzima ili ugradnjom u DNK lanac stanice u replikaciji. Antimetaboliti su specifični za S-fazu staničnog ciklusa. U antimetabolite ubrajamo analoge folne kiseline, analoge purina te analoge pirimidina.

Analozi folne kiseline, antifolati, koče djelovanje enzima ključnih za biosintezu nukleotida. Metotreksat se visokim afinitetom veže na aktivno katalitičko mjesto dihidrofolat reduktaze i ometa sintezu tetrahidrofolata važnog za sintezu purina i pirimidina. Pemetreksed koči aktivnost timidilat-sintetaze, dihidrofolat-reduktaze i glicinamid-ribonukleotid formilteransferaze, enzima ovisnih o folatima i ključnih za biosintezu timidinksih i purinskih nukleotida. Metotreksat i pemetreksed ulaze u stanicu putem nosača folata i potrebna im je pretvorba u poliglutamatni oblik kako bi djelovali.

Analozi purina, tj. antagonisti purina su 6-tiopurini (6-merkaptopurin i 6-tiogvanin) fludarabin, kladribin, klofarabin i nelarabin. Tiopurini su inaktivni u svom ishodnom obliku i moraju se metabolizirati u monofosfatni oblik. 6-merkaptopurin se metabolizira djelovanjem hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferaze u monofosfatni nukleotid, 6-tioinozinsku kiselinu koja inhibira nekoliko enzima bitnih za sintezu novih purinskih nukleotida. Monofosfatni oblik se metabolizira u trifosfatni oblik koji se može ugraditi u RNK i DNK. Od 6-merkaptopurina nastaju i znatne količine tiogvanilne kiseline i 6-metilmerkaptopurin ribotida koji pridonose citotoksičnom učinku. 6-tiogvanin inhibira nekoliko enzima u biosintetskom putu purinskih nukleotida. Posljedica su raznolika metabolička oštećenja, poput inhibicije međupretvorbe purinskih nukleotida; smanjenja unutarstanične koncentracije gvanina, što uzrokuje inhibiciju sinteze glikoproteina; ometanje sinteze DNK i RNK; i ugradnje tiopurinskih nukleotida u DNK i RNK. Tiopurini se metaboliziraju i djelovanjem tiopurin-metil-transferaze, gdje se metilna skupina dodaje tiopurinskom prstenu. Fludarabin fosfat se defosforilira u 2-fluoro-arabinofuranozil-adenozin, a potom se unutarstanično fosforilira djelovanjem deoksicitidin-kinaze u trifosfat. Trifosfatni metaboliti ometaju sintezu i popravak DNK inhibirajući DNK-polimerazu- α i β. Trifosfatni metaboliti se mogu izravno ugraditi u DNK te inhibirati sintezu i funkcioniranje DNK. Difosfatni metabolit fludarabina inhibira ribonukleotid-reduktazu inhibirajući tako esencijalni deoksiribonukleotidni trifosfat. Kladribin (2-klorodeoskiadenozin) purinski je analog visokospecifičan za limfoidne stanice. Fosforilira se djelovanjem deoksicitidin-kinaze do trifosfotnog oblika koji se ugrađuje u DNK. Trifosfatni oblik može inhibirati DNK-polimerazu α i β i tako ometati sintezu i popravak DNK.

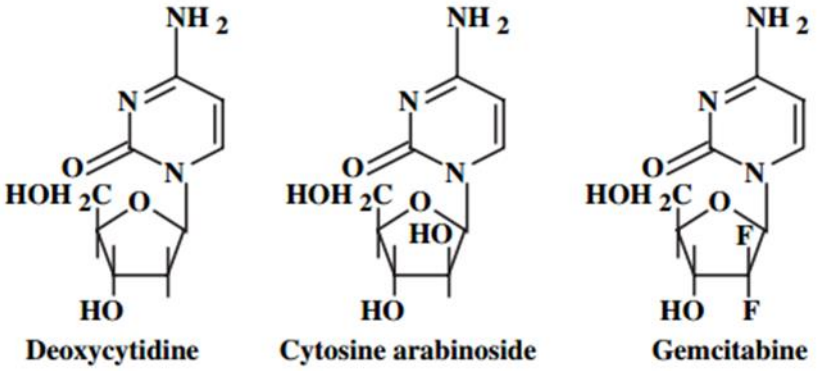
Analozi pirimidina se mogu podijeliti na fluoropirimidine i analoge deoksicitidina.

Fluoropirimidini su 5-fluorouracil i kapecitabin koji su inaktivni u svom osnovnom obliku i trebaju se aktivirati enzimskim reakcijama do ribozil i deoksiribozil metabolita. 5-Fluorouracil se metabolizira do 5-fluoro-2'-deoksiuridin-5'-monofosfata koji stvara kovalentni kompleks s enzimom timidilat-sintetazom i reduciranim folat 5,10-metilentetrahidrofolatom i tako koči de novo sintezu timidilata zbog čega je inhibirana sinteza DNK. 5-Fluorouracil se biotransformira i u 5-fluorouridin-5'-trifosfat koji se ugrađuje u RNK te ometa mehanizme posttranskripcijske obradbe RNK i translaciju mRNK. Daljnji metabolit je 5-fluorodeoksiuridin-5'-trifosfat koji se ugrađuje u staničnu DNK i inhibira sintezu i funkcije DNK. Kapecitabin je prolijek koji se metabolizira do 5-fluorouracila čija je citotoksičnost rezultat učinka na DNK i RNK.

Analozi deoksicitidina su citarabin i gemcitabin. Citarabin je citozin arabinozid koji ima specifično djelovanje na stanice u S-fazi. Deoksicitidin-kinaza transformira citarabin u 5'-mononukleotid koji se dalje do trifosfatnih metabolita koji inhibiraju DNA-polimeraze što uzrokuje prekid sinteze DNA (Katzung i sur., 2011; Francetić i sur., 2015).

1.4. Gemcitabin

Gemcitabin (2',2'-difluorodeoksicitidin, dFdC) je analog citozin arabinozida (Ara-C), koji se razlikuju strukturno u dva supstituirana fluora na položaju 2' furanoznog prstena (Slika 1). Gemcitabin je najvažniji razvijeni analog citidina nakon Ara-C pokazujući značajna farmakološka svojstva i širok spektar antitumorskog djelovanja. Izvorno je gemcitabin istraživan kao antivirusno sredstvo, a danas je indiciran kod uznapredovalog karcinoma gušterače, karcinoma pluća nemalih stanica, karcinoma mokraćnog mjehura, jajnika, sarkoma mekih tkiva i non Hodgkinovih limfoma (Mini i sur., 2006).

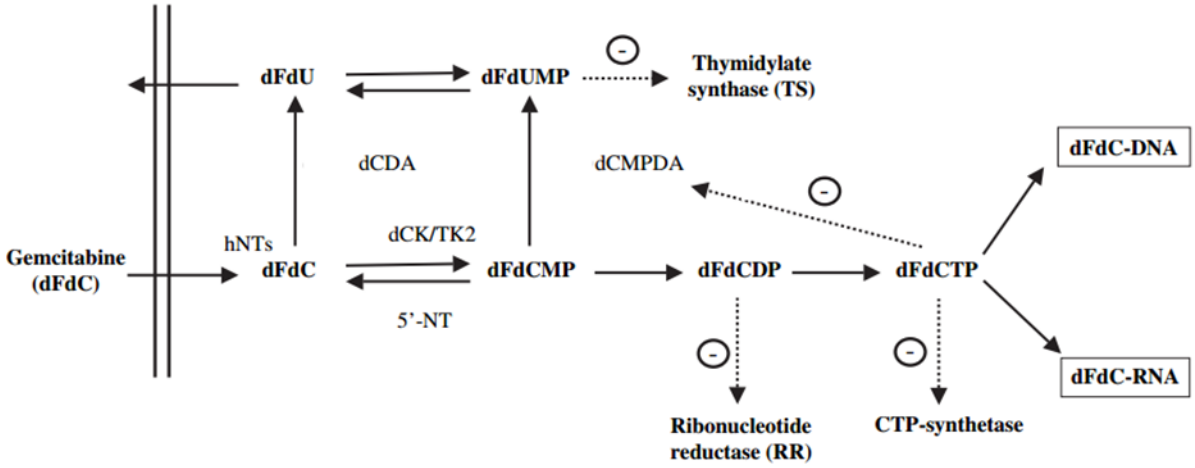


Slika 1. Struktura deoksicitidina, citozin arabinozida i gemcitabina (Mini i sur., 2006).

Transport gemcitabina kroz staničnu membranu se odvija putem nukleozidnih transportera koji se nalaze na staničnoj membrani. Nukleozidni transport se smatra preduvjetom za inhibiciju rasta stanice i kliničke učinkovitosti gemcitabina te se inhibicijom transporta nukleozida kroz stanicu postiže rezistencija na gemcitabin (Mini i sur., 2006).

Poput Ara-C, gemcitabin je prolijek koji se metabolizira u stanici djelovanjem deoksicitidin-kinaze (Dck) u gemcitabin monofosfat koji se zatim prevodi u aktivne metabolite gemcitabin difosfat i gemcitabin trifosfat (dFdCDP i dFdCTP). Gemcitabin djeluje citotoksično kočenjem sinteze DNK, putem dvaju mehanizama kojima djeluju dFdCDP i dFdCTP. dFdCTP natječe se s deoksicitidin trifosfatom (dCTP) za ugradnju u DNK. dFdCTP se ugrađuje u DNK i nakon ugradnje još jednog nukleotida dovodi do terminacije DNK polimerizacije. Naknadno ugrađeni nukleotid je važan za skrivanje dFdCTP od DNK popravljačkih enzima te je mehanizam ugradnje gemcitabina u DNK otporan na normalne mehanizme popravka DNK. dFdCTP se ugrađuje i u RNK ovisno o liniji stanica (Slika 2). Ugradnja ovisi o koncentraciji i vremenu, što vodi do inhibicije sinteze RNK (Ruiz van Haperen i sur., 1993). U humanim tumorskim staničnim linijama koje su pokazale određenu rezistenciju na gemcitabin, osjetljivost na lijek je povezana s razlikama u ugradnji u RNK (Kroep i sur., 2000).

dFdCDP inhibira ribonukleotid reduktazu koja je odgovorna za kataliziranje reakcija kojima nastaju deoksinukleozid trifosfati za sintezu DNK. Inhibicija enzima uzrokuje smanjenje koncentracije dCTP, potentnog inhibitora dCK, uzrokujući učinkovitiju fosforilaciju gemcitabina (Heinemann i sur., 1990; HALMED 2015).



Slika 2. Mehanizam djelovanja gemcitabina (Mini i sur., 2006).

Deoksicitidin-kinaza je enzim koji ograničava brzinu biotransformacije analoga nukleozida, a istraživanja pokazuju da je deoksicitidin-kinaza ograničavajući faktor aktivnosti gemcitabina jer je nedostatak deoksicitidin-kinaze uključen u stečenu otpornost različitih in vitro modela na terapiju gemcitabinom. Ekspresija deoksicitidin-kinaze može se koristiti kao parametar tumorske osjetljivosti jer je uočena jasna korelacija aktivnosti deoksicitidin-kinaze i osjetljivosti tumora na gemcitabin (Ciccolini i sur., 2016).

Gemcitabin je uglavnom inaktiviran deoksicitidin deaminazom (dCDA) koja prevodi gemcitabin u difluorouridin (dFdU). Deaminacija gemcitabin monofosfata (dFdCMP) u 2',2'-difluorodeoksiuridin monofosfat (dFdUMP) djelovanjem dCMP-deaminaze i zatim u dFdU predstavlja drugi put inaktivacije gemcitabina. Gemcitabin i dFdU nisu supstrati pirimidin nukleozid fosforilaze te se lijek više ne razgrađuje i izlazi iz stanice (Slika 2) (Heinemann i sur., 1992).

Važna odrednica osjetljivosti na gemcitabin je intracelularno zadržavanje dFdCTP. Aktivni metaboliti gemcitabina se zadržavaju u stanici dulje nego što je potrebno većini populaciji stanica za prolaz kroz stanični ciklus (Mini i sur., 2006). Djelovanje gemcitabina nije ograničeno samo na S-fazu staničnog ciklusa (faza sinteze DNK) te pod određenim okolnostima blokira napredovanje stanica na spoju granice G1/S faze (HALMED, 2015).

Gemcitabin se u Republici Hrvatskoj može kao ljekoviti oblik naći u obliku praška za otopinu za infuziju i u obliku koncentrata za otopinu za infuziju. Prema zadnjoj listi HZZO-a više nema smjernica za gemcitabin. Odluka o opravdanosti indikacije procjenjuje se na razini Bolničkog povjerenstva za lijekove (Francetić i sur., 2015).

Gemcitabin je indiciran za liječenje odraslih bolesnika s lokalno uznapredovalim ili metastatskim adenokarcinomom gušterače (HALMED, 2015). Nažalost, većina bolesnika s lokalno uznapredovalim i metastatskim rakom gušterače nemaju koristi od monoterapije gemcitabinom. 2005. godine, režim od četiri lijeka (gemcitabin, 5-fluorouracil, epirubicin i cisplatin) pokazao je poboljšanje u ukupnom preživljavanju pacijenata s karcinomom gušterače u odnosu na liječenje s gemcitabinom kao monoterapijom. 2011. godine, novi režim liječenja FOLFIRINOX (kombinacija 5-fluorouracila, leukovorin/folne kiseline, oksaliplatina i irinotekana) je pokazao puno veće ishode opstanka u pacijenata s karcinomom gušterače, u usporedbi sa samim gemcitabinom. Usporedbom gemcitabina i nab-paklitaksela (nanočestica albumin-vezani paklitaksel) s gemcitabinom samim pokazala se statistički značajna prednost u preživljavanju kod kombinacije citostatika te je uvedena kao opcija u terapiji uznapredovalog karcinoma gušterače (Yue i sur., 2017).

Gemcitabin u kombinaciji s cisplatinom indiciran je kao lijek prvoga reda u bolesnika s lokalno uznapredovalim ili metastatskim karcinomom pluća nemalih stanica, a monoterapija gemcitabinom može se razmotriti u starijih bolesnika ili bolesnika s ocjenom općeg stanja.

Gemcitabin je indiciran u liječenju lokalno uznapredovalog ili metastatskog karcinoma mokraćnog mjehura u kombinaciji s cisplatinom.

U kombinaciji s paklitakselom, gemcitabin je indiciran za liječenje bolesnica s neoperabilnim lokalno recidivirajućim ili metastatskim karcinomom dojke s recidivom bolesti nakon adjuvantne/neoadjuvantne kemoterapije.

Gemcitabin je u kombinaciji s karboplatinom indiciran u liječenju bolesnica s lokalno uznapredovalim ili metastatskim epitelnim karcinomom jajnika kod kojih je došlo do relapsa bolesti nakon razdoblja bez recidiva od najmanje 6 mjeseci nakon prvolinijskog liječenja platinom (HALMED, 2015).

Neutropenija je glavni čimbenik koji ograničava dozu. Mučnina i povraćanje se pojavljuju u oko 70 % bolesnika, a zabilježeni su i simptomi slični gripi. U rijetkim su slučajevima zabilježeni bubrežni mikroangiopatski sindromi poput hemolitičkog-uremijskog sindroma i trombotična trombocitopenična purpura (Katzung i sur., 2011). Potrebno je provoditi redovite sistematske preglede i pretrage funkcije bubrega i jetre bolesnika kako bi se prepoznala nehematološka toksičnost. Moguće je smanjiti dozu sa svakim ciklusom ili unutar ciklusa, ovisno o stupnju toksičnosti kod pojedinog bolesnika. Gemcitabin može

izazvati supresiju koštane srži, što se očituje leukopenijom, trombocitopenijom i anemijom. Neovisno o indikaciji, bolesniku je potrebno kontrolirati broj trombocita i granulocita prije svake doze. Prije početka ciklusa bolesnici trebaju imati apsolutni broj granulocita najmanje 1,500 (x 106/L) i broj trombocita 100,000 (x 106/L) (HALMED, 2015).

1.5. Farmakokinetička svojstva gemcitabina

Farmakokinetika gemcitabina ispitana je u 353 bolesnika u sedam ispitivanja. Ispitivanja su uključila 121 ženu i 232 muškarca u dobi od 29 do 79 godina. Među ovim bolesnicima približno je 45 % imalo karcinom ne-malih stanica pluća, a u 35 % je bio dijagnosticiran karcinom gušterače. Primjenjivane su doze u rasponu od 500 do 2592 mg/m^2, u vremenskom rasponu od 0,4 do 1,2 sati. Vršne koncentracije u plazmi (dobivene u roku od 5 minuta nakon završetka infuzije) bile su 3,2 do 45,5 μg/ml. Volumen distribucije središnjeg odjeljka iznosio je 12,4 l/m^2 za žene i 17,5 l/m^2 za muškarce, a volumen perifernog odjeljka nije bio osjetljiv na spol i iznosi 47,4 l/m^2. Vezivanje za proteine se smatra zanemarivim. Poluvrijeme eliminacije se kreće u rasponu od 42 do 94 minute ovisno o dobi i spolu. Citidin deaminaza u jetri, bubrezima, krvi brzo metabolizira gemcitabin. Unutarstaničnim metabolizmom gemcitabina nastaju gemcitabin monofosfati, difosfati i trifosfati koji nisu otkriveni u plazmi niti u urinu. Primarni metabolit dFdU nije aktivan i pronađen je plazmi i urinu. Sistemski klirens se kreće u rasponu od 29,2 l/hr/m^2 do 92,2 l/hr/m^2 ovisno o spolu i dobi (HALMED, 2015).

1.6. Micelarna elektrokinetička kromatografija

Kapilarna elektroforeza (CE) je separacijska tehnika koja odjeljuje analite na temelju razlike u pokretljivosti u električnom polju visokog napona u uskoj kapilari. Vrsta kapilarne elektroforeze koja se koristi za odjeljivanje nabijenih i neutralnih analita je micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *Micellar electrokinetic chromatography*, MEKC). MEKC objedinjuje elektroforezu i kromatografiju. Mobilnoj fazi se dodaje površinski aktivna tvar koja sadrži hidrofobne i hidrofilne skupine u koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije kako bi se formirale micele koje se ponašaju kao pseudostacionarna faza. Razdvajanje analita se temelji na različitoj raspodjeli između micelarne faze i vodene faze. Ako micele posjeduju naboj onda se razdvajanje postiže kombinacijom raspodjele između

pseudostacionarne i vodene faze te elektroforetske pokretljivosti samog analita. Najčešće korišteni surfaktant je natrijev dodecilsulfat (engl. *Sodium dodecyl sulfate*, SDS). Molekule SDS-a na vanjskoj površini nose negativan naboj zbog sulfatnih skupina i putuju prema anodi, ali zbog djelovanja elektroosmotskog toka (engl. *Electroosmostic flow*, EOF) putuju prema negativno nabijenoj katodi. EOF je tok čistog pufera u kapilari, a posljedica je površinskog naboja na unutrašnjoj stijenci kapilare. Unutrašnja stijenka kapilare sadrži brojne silanolne grupe koje se ovisno o pH-vrijednosti elektrolita mogu nalaziti u anionskoj formi. Elektrostatskim silama su uz negativno nabijene silanolne skupine privučeni pozitivno nabijeni ioni iz elektrolitske otopine, čime je stvoren električni dvosloj. Slijedi difuzijski dio u kojem se javljaju kationi i anioni. Kada se na krajevima kapilare primijeni napon, otopljeni kationi u difuznom dijelu dvostrukog sloja su privučeni prema katodi i za sobom povlače okolnu tekućinu. Zahvaljujući elektroosmotskom toku, svi analiti se kreću u istom smjeru, neovisno o naboju. Pri uobičajenom načinu analize kapilarnom elektroforezom stijenka kapilare je negativno nabijena i na injektorskom kraju se nalazi pozitivno nabijena elektroda, a elektroosmotski tok je usmjeren od anode prema katodi. U takvim uvjetima i anioni putuju prema negativno nabijenoj katodi, jer je veličina elektroosmotskog toka za više od jednog reda veličine veća od njihove elektroforetke pokretljivosti koja ih nosi prema pozitivno nabijenoj anodi. Zahvaljujući tome, kapilarnom elektroforezom se mogu istovremeno analizirati kationi, neutralne molekule i anioni jer se svi kreću u istom smjeru. Kationi putuju najbrže jer su njihovo elektroforetsko privlačenje i EOF usmjereni u smjeru katode. Neutralne molekule su nošene brzinom elektroosmotskog toka i ne razdvajaju se jedne od drugih. Anioni putuju najsporije jer su privučeni prema katodi, a nošeni elektroosmotskim tokom (Damić i Nigović, 2010). Brzina kretanja neutralnih analita u MEKC-u ovisi o konstanti raspodjele između micele i vodene otopine. Nabijeni analiti u MEKC-u stupaju u različite hidrofobne i elektroosmotske interakcije te brzina njihovog putovanja ovisi o konstanti raspodjele između micela i otopine pufera te o elektroforetskoj pokretljivosti analita (El Deeb i sur., 2001).

Prilikom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode potrebno je optimizirati parametre koji utječu na elektroosmotski tok i elektroforetsku mobilnost analita. To su vrsta i koncentracija pufera, pH pufera, dodatak organskog otapala, vrsta i koncentracija površinski aktivnih tvari, napon i temperatura pri kojoj se odvija analiza te izbor kapilare.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Onečišćenje u lijekovima je definirano prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. International Conference on Harmonization, ICH) kao svaki sastojak ljekovite tvari koji nema definiran kemijski entitet kao nova ljekovita tvar ili kao svaki sastojak farmaceutskog oblika koji nije ljekovita ili pomoćna tvar. Mogu se podijeliti na organska onečišćenja, anorganska onečišćenja, ostatna otapala i metalna onečišćenja. Onečišćenja u lijekovima mogu potjecati iz različitih izvora, a mogu biti povezana s aktivnom djelatnom tvari ili gotovim ljekovitim oblikom.

Onečišćenja mogu imati neželjene farmakološke učinke, uzrokovati nuspojave, biti toksični, mijenjati aktivnosti ili stabilnost ljekovite tvari, mogu utjecati na bioraspoloživost ili učinkovitost lijeka te su zbog toga ispitivanja i kontrola onečišćenja ključan korak u razvoju lijeka čime se osigurava kvaliteta i sigurnost lijeka.

Cilj ovog rada bio je ispitati i optimizirati vrstu i koncentraciju organskog otapala u otopini radnog pufera pri razvoju nove, brze, jednostavne i ekološki prihvatljive micelarne elektrokinetičke kromatografske metode za istovremenu analizu gemcitabina i njegovog onečišćenja citozina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

Otopina natrijeva hidroksida 1M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Otopina natrijeva hidroksida 0,1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Acetonitril, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Natrijev dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Etanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

3.1.2. Standardi

Gemcitabin (European Pharmacopoeia Reference Standard)

Gemcitabine impurity A (European Pharmacopoeia Reference Standard)

3.1.3. Radni instrumenti

Analitička vaga, model AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

Uređaj za kapilarnu elektroforezu, G1600A (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)

LC/MSD Trap VL maseni detektor s elektrosprej-ionizatorom i analizatorom stupicom

za ione (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Spektrofotometar Agilent 8453 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Digitalni pH-metar (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

3.1.4. Pribor

Injekcijski filtri, Acrodisc GHP, veličina pora 0,20 μm, promjer 26 mm (Gelman, Ann Arbor SAD)

Bočice za uzorkovanje sustavom za tekućinsku kromatografiju, 1,5 mL (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Kapilara od izvučenog kvarca unutrašnjeg promjera 50 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Pipete model Pipet-Lite XLS (0,5-10μL) (Rainin Instrument LLC, Oakland, CA, SAD)

Vanjska pumpa za direktno injektiranje u spektrometar masa (KD Scientific Inc., Holliston, SAD)

3.1.5. Programski paketi

3D-CE/MSD ChemStation, Rev. A. 10.02 (1757) (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)

Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema instrumenta

Prije prvog korištenja kapilara je kondicionirana ispiranjem 5 minuta s metanolom, 1M NaOH 15 minuta, ultračistom vodom 10 minuta i 20 minuta s otopinom radnog pufera. Korištena kapilara se na početku radnog dana kondicionirala s 0,1 M NaOH 10 minuta, ultračistom vodom 10 minuta i otopinom radnog pufera 10 minuta. Kako bi se osigurala ponovljivost rezultata, kapilara se između analiza ispirala 10 minuta otopinom radnog pufera. Na kraju radnog dana kapilara se ispirala 10 minuta s vodom i 30 minuta s 0,1 M NaOH.

3.2.2. Priprema radnog pufera

Otopina fosfatnog pufera u koncentraciji 100 mM priređena je vaganjem 0,3278 g natrijeva dihidrogenfosfata i 0,515993 g dinatrijeva hidrogenfosfata u odmjernoj tikvici od 50,0 ml i nadopunjavanjem ultračistom vodom do oznake.

Otopina surfaktanta SDS-a pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine natrijeva dodecil sulfata u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 50,0 ml te nadopunjavanjem do oznake kako bi se postigla željena koncentracija od 100 mM.

Kako bi se pospješilo otapanje krutih supstancija, otopine fosfatnog pufera i SDS-a su tijekom pripreme bile izložene ultrazvučnoj kupelji tijekom 5 minuta. Pripremljene otopine su čuvane na sobnoj temperaturi i prije pripreme otopine radnog pufera profiltrirane su kroz membranski filter.

Otopina radnog pufera pripremi se miješanjem otopine fosfatnog pufera, otopine SDS-a, ultračiste vode i organskog otapala u željenim omjerima u tri bočice za uzorkovanje.

3.2.3. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine gemcitabina i citozina pripremljene su otapanjem odgovarajuće količine čistih supstancija u odmjernoj tikvici od 5,0 ml u ultačistoj vodi kako bi se postigla koncentracija od 1,0 mg/mL. Standardne otopine su čuvane na temperaturi od +4°C.

Radne standardne otopine pripremane su svaki dan prije mjerenja mješanjem odgovarajućeg volumena matičnih standardnih otopina gemcitabina i citozina s ultračistom vodom.

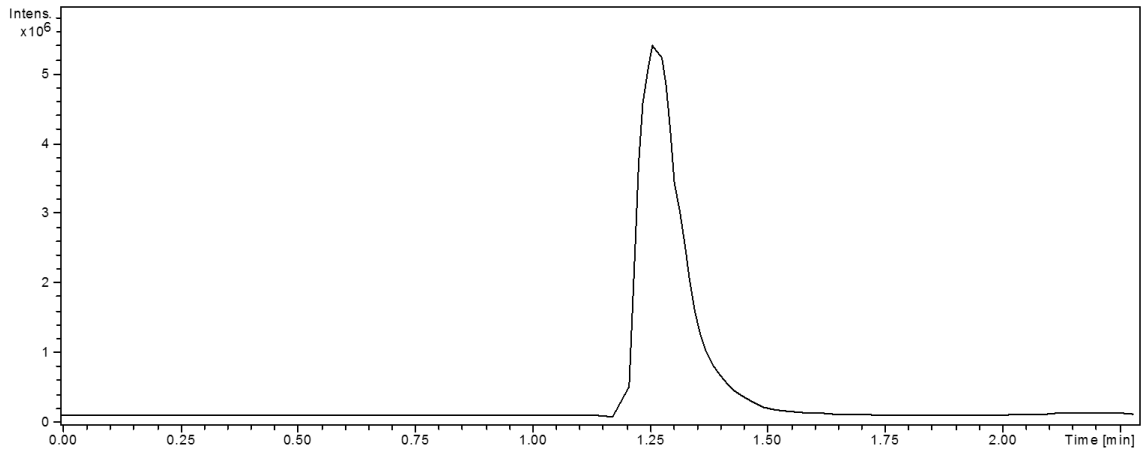
3.2.4. Kapilarnoelektroforetski uvjeti analize

Analize su provedene na uređaju za kapilarnu elektroforezu (G1600A Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka. Korištene kapilare su od izvučenog kvarca, ukupne duljine 35 cm, duljine do detektora 27 cm i unutrašnjeg promjera od 50 μm (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka). Uzorci su injektirani u kapilaru pri tlaku od 50 mbar, pri temperaturi od 25°C tijekom 6 s. Analize su provođene pri naponu od 25 kV, a valna duljina detektora je podešena na 275 nm.

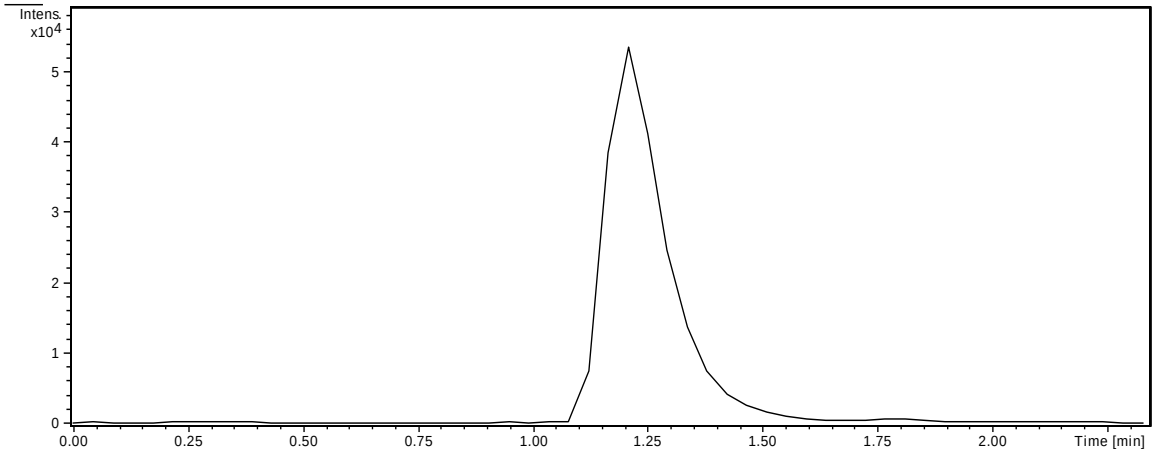
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Strukturna karakterizacija onečišćenja gemcitabina masenom spektrometrijom

Razdvajanje gemcitabina i njegovog onečišćenja kapilarnoelektroforetskom metodom je otežano zbog sličnih fizikalno-kemijskih svojstava. Za strukturnu karakterizaciju standarda onečišćenja gemcitabina korišten je vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (LC-MS) uz primjenu elektrosprej ionizacije (engl. *Electrospray Ionization*, ESI) i analizatora ionske stupice (engl. *Ion Trap*) koji pružaju detaljne strukturne informacije o lijeku i njegovim onečišćenjima. Na Slici 3. i Slici 4. prikazani su kromatogrami izoliranih iona gemcitabina i njegovog onečišćenja (engl. *Extracted ion chromatogram*, EIC) na kojima je vidljivo da gemcitabin i njegovo onečišćenje imaju jako slično vrijeme zadržavanja.

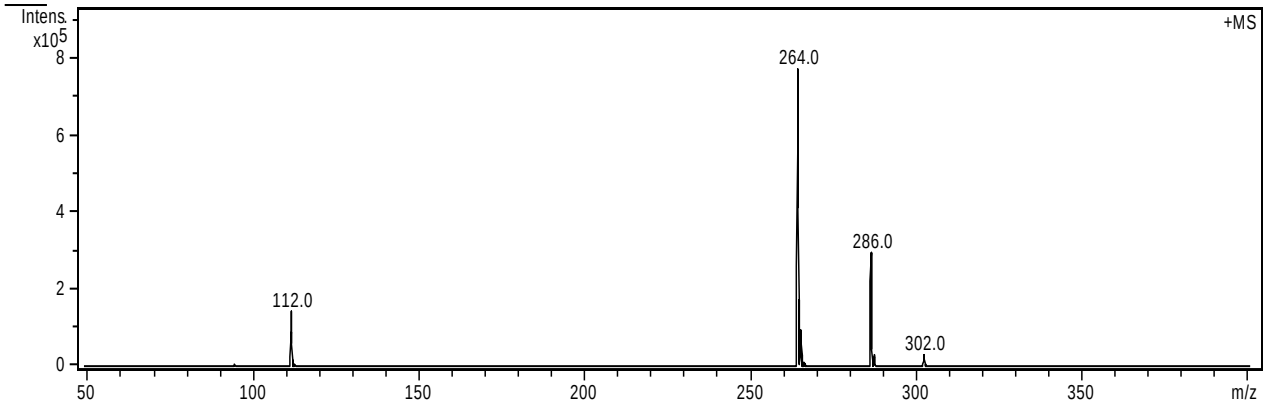


Slika 3. EIC kromatogram gemcitabina.



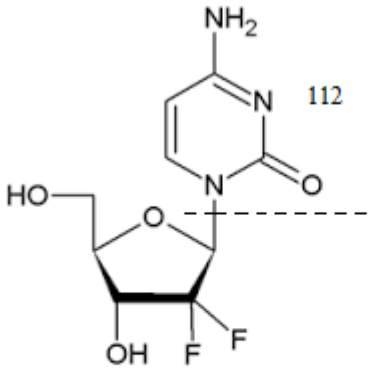
Slika 4. EIC kromatogram onečišćenja gemcitabina.

Kako bi se na temelju masenog spektra i razjašnjenih fragmentacijskih puteva mogla predložiti struktura onečišćenja, potrebno je masenim spektrometrom analizirati gemcitabin. Pomoću dobivenih masenih spektara gemcitabina predložen je fragmentacijski put za gemcitabin. Na MS spektru gemcitabina vidljiv je molekulski ion [M+H]+ m/z 264, fragmentni ion 112 m/z te aduktori s ionom natrija (m/z 286) i ionom kalija (m/z 302) (Slika 5).



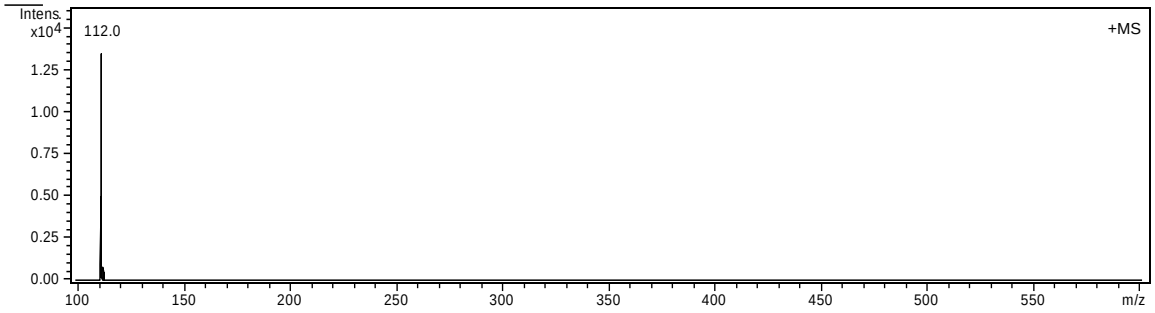
Slika 5. ESI-MS spektar gemcitabina.

Iz dobivenih masenih spektara gemcitabina predložena je fragmentacijska shema za gemcitabin (Slika 6). Fragmentni ion 112 m/z dobiven je gubitkom šećerne jedinice nukleozida, odnosno pucanjem N-glikozidne veze.

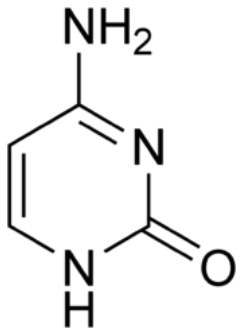


Slika 6. Shematski prikaz fragmentacije gemcitabina.

Masenom spektrometrijom standarda onečišćenja dobiven je molekulski ion [M+H]+ m/z 112 (Slika 7). Na temelju dobivenog masenog spektra potvrđuje se da je onečišćenje gemcitabina pirimidinska baza citozin (Slika 8).



Slika 7. ESI-MS spektar onečišćenja gemcitabina, citozina.



Slika 8. Struktura citozina (4-amino-1H-pirimidin-2-ona).

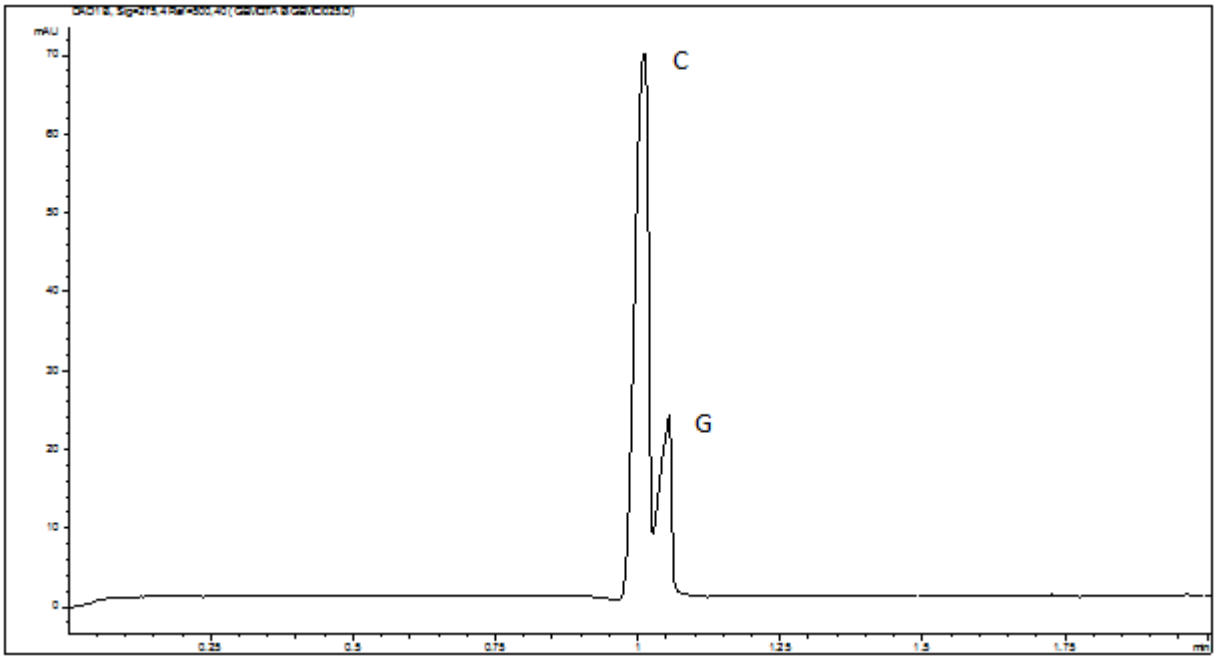
U monografiji gemcitabin hidroklorida u 8. izdanju Europske farmakopeje citozin je naveden kao Onečišćenje A.

4.2. Odabir metode

U preliminarnom ispitivanju kapilarnom zonskom elektroforezom nije postignuto razdvajanje gemcitabina i citozina zbog njihove slične strukture.

Pri razvoju nove MEKC metode ispitivane su različite vrste radnih pufera (pH 3.0 - 9.3) s različitim koncentracijama surfaktanta SDS-a (20 mM – 70 mM) među kojima su

najbolje razdvajanje i oblik pikova postignuti upotrebom fosfatnog pufera (pH 7.0) i 70 mM koncentracijom SDS-a. Citozin je detektiran u prvom piku. Odabrana je valna duljina od 275 nm pri kojoj gemcitabin ima apsorpcijski maksimum no gemcitabin i citozin imaju sličan UV spektar. Međutim, nije postignuto granično razlučivanje od 1,5, što znači da pikovi koeluiraju (Slika 9).



Slika 9. Elektroferogram smjese standardnih otopina gemcitabina (G, 50 μg/ml) i citozina (C, 50 μg/ml).

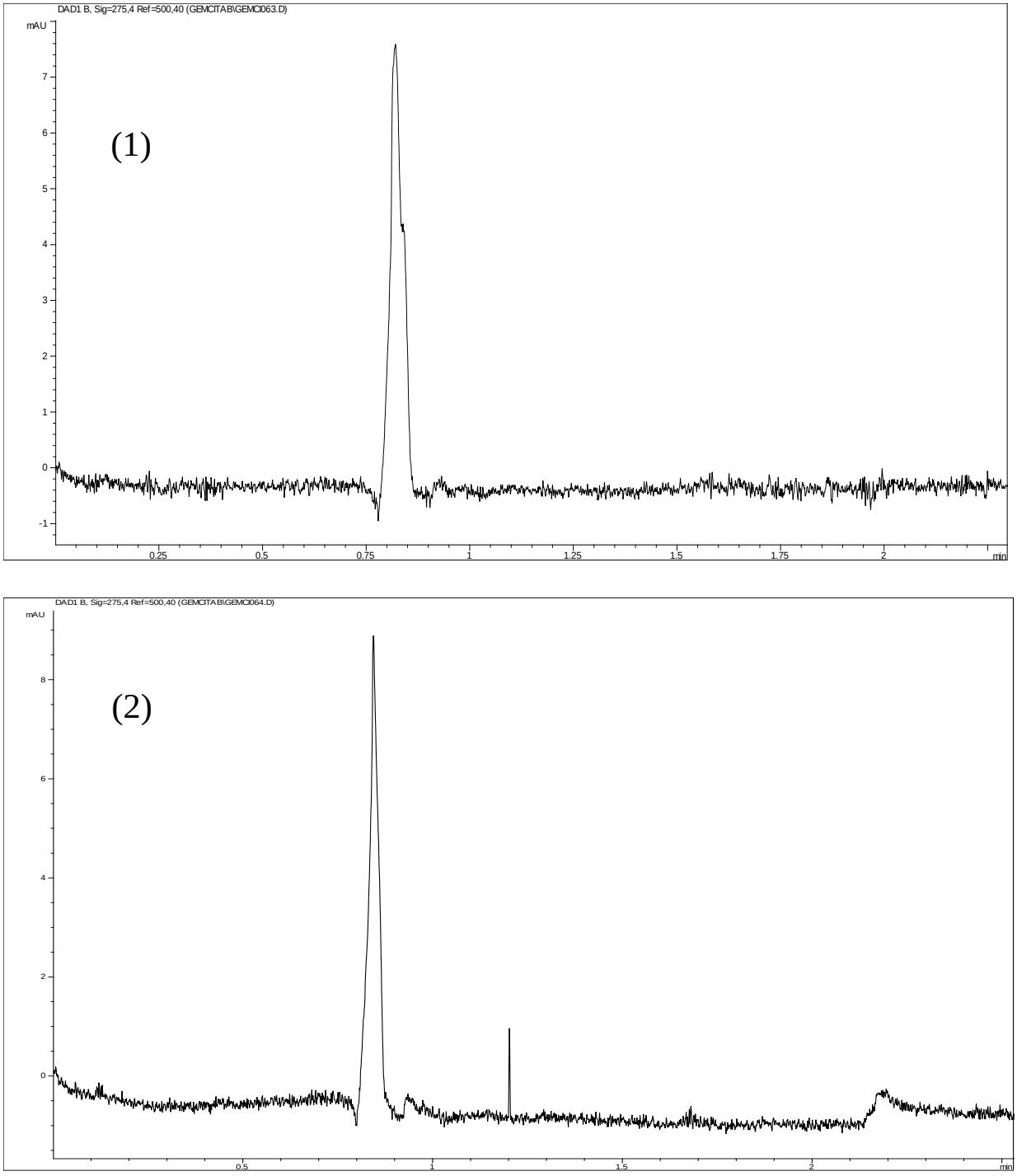
Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 70 mM SDS, 25 kV, 25 ℃, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

4.3. Odabir organskog otapala

Dodavanjem organskog otapala u otopinu radnog pufera mijenja se selektivnost i vrijeme migracije analita, mijenjajući zeta-potencijal, viskoznost. Utjecaj organskog otapala na selektivnost je složen i najbolje se eksperimentalno određuje. Ispitana su različita organska otapala u više koncentracija koja su različito utjecala na oblik pikova i razlučivanje između pikova.

Prvo upotrebljeno organsko otapalo je bio acetonitril, u koncentracijama 5 % i 10 % (v/v). Dodatkom acetonitrila pikovi gemcitabina i citozina se nisu vidjeli razdvojeni, odnosno

nije se postiglo bolje razlučivanje u odnosu na prethodno dobivene rezultate kao što se vidi na Slici 10. pa se acetonitril nije koristio u daljnjem razvoju metode.



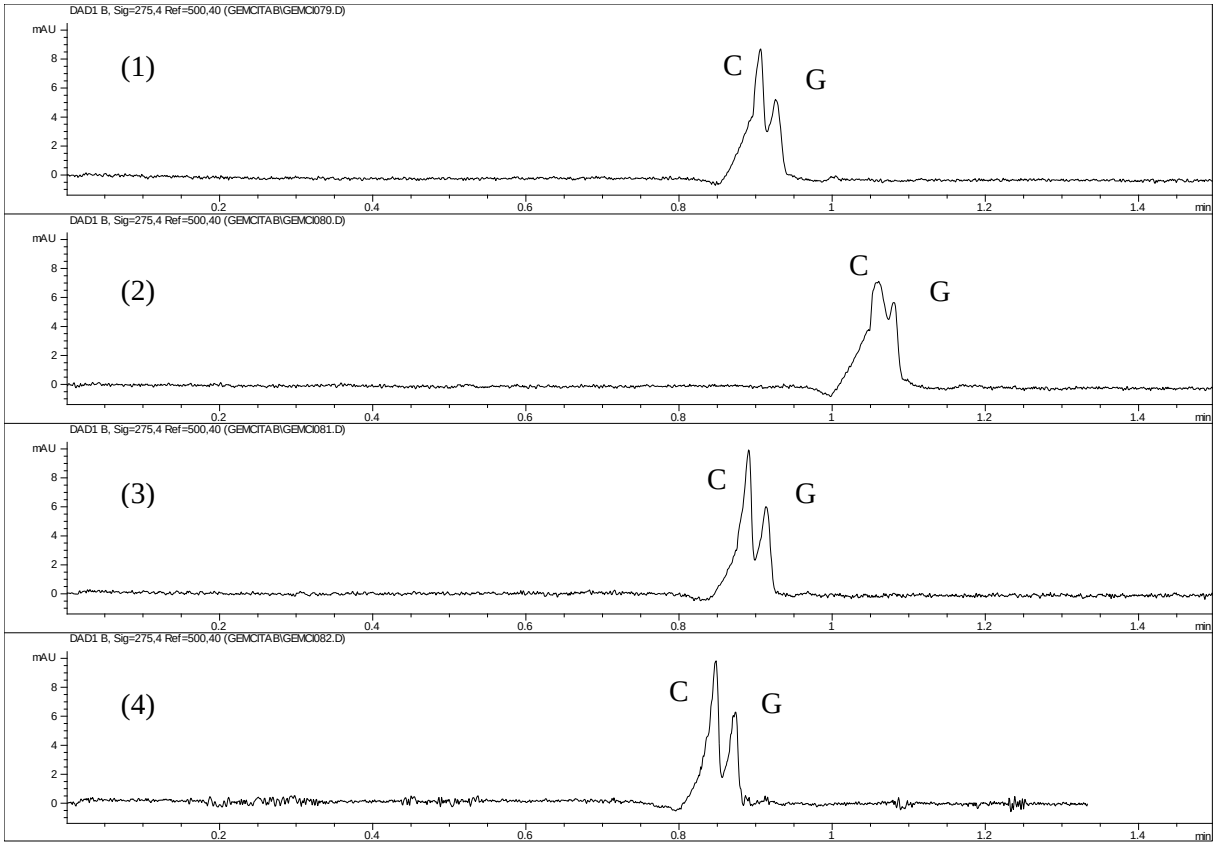
Slika 10. Elektroferogram smjese standardnih otopina gemcitabina (50 µg/ml) i citozina (50 µg/ml) pri dodatku 5 % (v/v) (1) i 10 % (v/v) acetonitrila (2) u otopinu radnog pufera.

Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 70 mM SDS, 5 % (v/v) acetonitril (1), tj. 10 % (v/v) acetonitril (2), 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

Sljedeće ispitivano organsko otapalo je bio etanol. Etanol je dodan u otopinu radnog pufera u koncentraciji od 5 % i 10 % (v/v) (Slika 11 (1) i (2)). Primijećeno je da se povećanjem koncentracije etanola produžilo vrijeme migracije analita zbog mijenjanja viskoznosti radnog pufera i zeta-potencijala na stijenci kapilare. Unatoč tome, nije postignuto granično razlučivanje između pikova pri navedenim koncentracijama etanola.

Sljedeći korak bio je modifikacija koncentracija fosfatnog pufera i SDS-a. Mijenjanjem koncentracije surfaktanta utječemo na selektivnost metode zbog razlika u konstanti raspodjele analita između micela SDS-a i vodenog puferskog medija. Uz povećanje koncentracije SDS-a na 80 mM i 85 mM smanjena je koncentracija fosfatnog pufera na 15mM, odnosno 10mM (Slika 11 (3) i (4)) što je utjecalo na migraciju analita. Smanjenjem ionske jakosti pufera veći je zeta potencijal na unutrašnjoj površini kapilare. Pri takvim uvjetima EOF je veći i vrijeme analize je kraće. Primjenom preniske koncentracije radnog pufera može doći do apsorpcije uzorka na stijenku kapilare što može uzrokovat širenje pikova i propadanje kapilare. Razdvajanje gemcitabina i citozina pri nižim koncentracijama fosfatnog pufera i višim koncentracijama SDS-a je bilo učinkovitije, postignuto je veće razlučivanje, ali oblik i simetrija pikova nisu bili zadovoljavajući.

U pokušaju optimizacije oblika i simetrije pikova gemcitabina i citozina ispitan je dodatak 1 % Tritona® u otopinu radnog pufera. Triton® je neionski surfaktant koji u kombinaciji s ionskim surfaktantom SDS-om dovodi do stvaranja kombiniranih micela. Stvaranje kombiniranih micela nije pomoglo u razvoju analitičke metode (Slika 12).



Slika 11. Elektroferogrami smjese standardnih otopina gemcitabina (G, 50 μg/ml) i citozina (C, 50 μg/ml) uz dodatak etanola u otopinu radnog pufera.

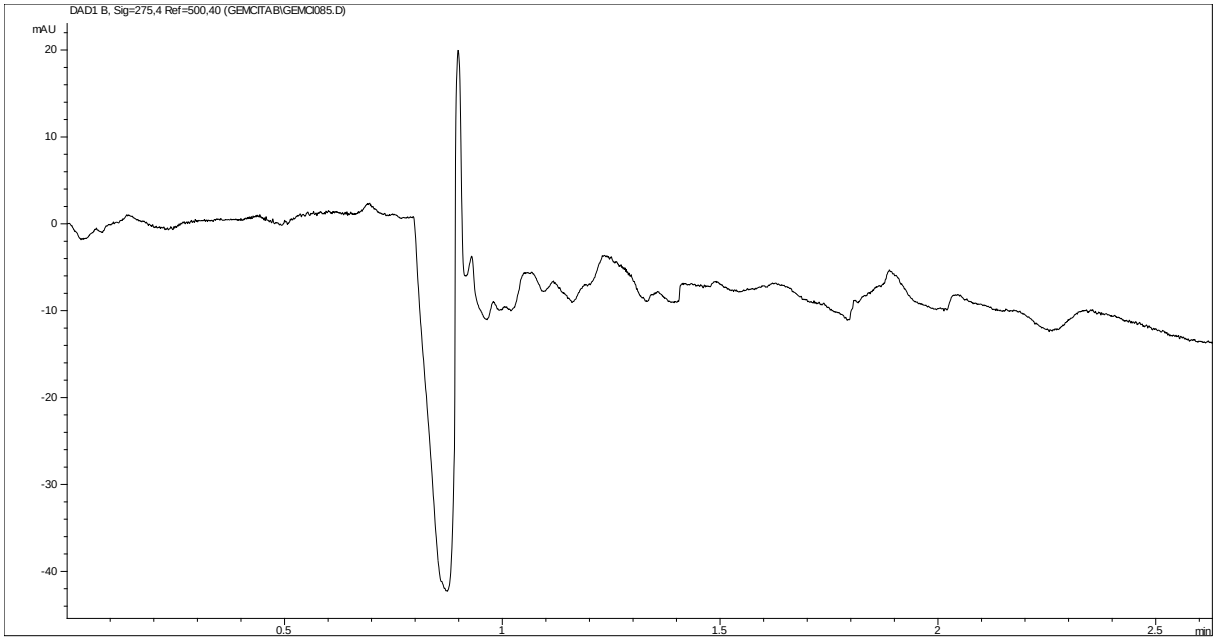
Uvjeti analize:

(1) 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 70 mM SDS, 5 % (v/v) etanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

(2) 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 70 mM SDS, 10 % (v/v) etanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

(3) 15 mM fosfatni pufer pH 7,0, 80 mM SDS, 5 % (v/v) etanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

(4) 15 mM fosfatni pufer pH 7,0, 80 mM SDS, 10 % (v/v) etanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.



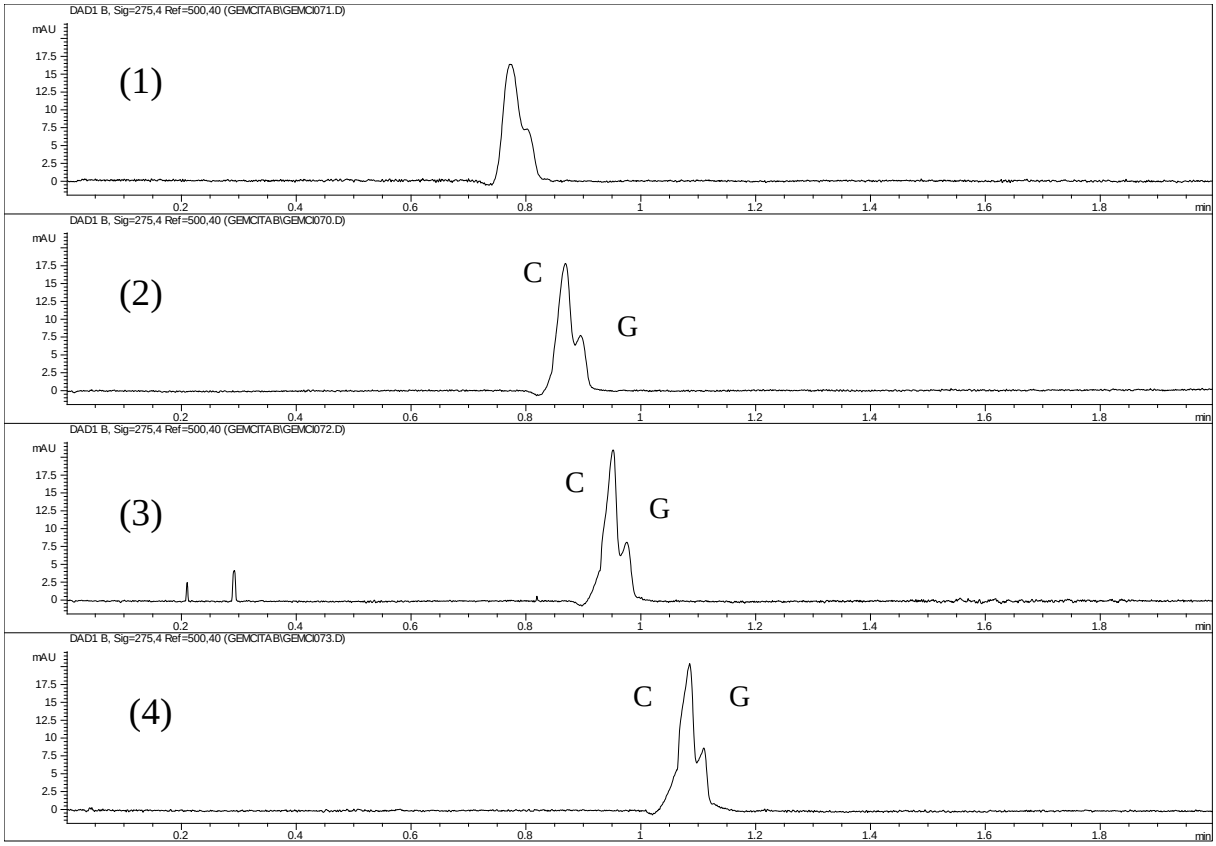
Slika 12. Elektroferogram smjese standardnih otpina gemcitabina (50 µg/ml) i citozina (50 µg/ml) uz dodatak Tritona® u otopinu radnog pufera.

Uvjeti analize: 10 mM fosfatni pufer pH 7,0, 85 mM SDS-a, 5 % (v/v) etanol, 1 % Triton®, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

Sljedeće ispitivano organsko otapalo je metanol. Metanol je dodan u otopinu radnog pufera u koncentraciji 2 %, 5 %, 10 % i 15 % (Slika13). Povećanjem koncentracije metanola produžilo se vrijeme analize jer je metanol promijenio viskoznost radnog pufera i zeta potencijal na stijenci kapilare, a ovisnost migracije analita o koncentraciji metanola vidljiv je na Slici 14..

Budući da je vrijeme analize nakon dodatka organskog otapala i dalje kratko, odlučujući faktor su razlučivanje, oblik i simetrija pikova. Najbolji oblik pikova i razlučivanje su postignuti pri dodatku 5 % metanola u otopinu radnog pufera sastava 20 mM fosfatnog pufera i 70 mM SDS-a (Slika 13 (2)). Unatoč tome, postignuto je tek razlučivanje od 0,71, što je manje od razlučivanja 1,06 postignutog dodatkom 5 % etanola, ali je bolji oblik pikova postignut upotrebom metanola.

Metanolom u koncentraciji 10 % i 15 % (Slika 13 (3) i (4)) je postignuto malo manje razlučivanje nego s 5 % metanolom, ali je narušen oblik i simetrija pikova.



Slika 13. Elektroferogrami smjese standardnih otopina gemcitabina (G, 50 μg/ml) i citozina (C, 50 μg/ml) uz dodatak metanola u otopinu radnog pufera.

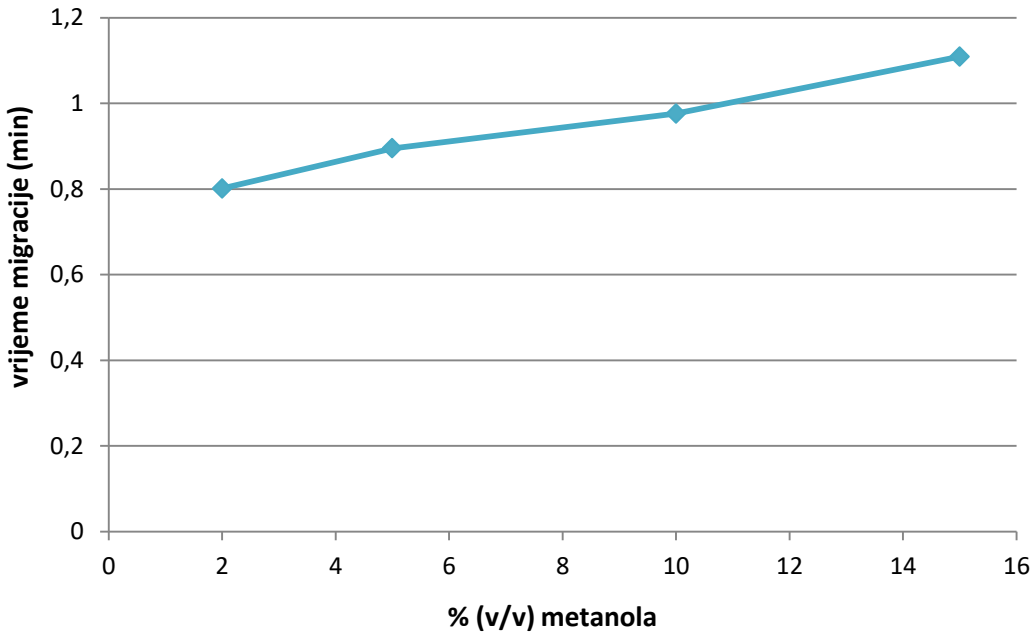
Uvjeti analize:

(1) 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 70 mM SDS, 2 % (v/v) metanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

(2) 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 70 mM SDS, 5 % (v/v) metanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

(3) 15 mM fosfatni pufer pH 7,0, 80 mM SDS, 10 % (v/v) metanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

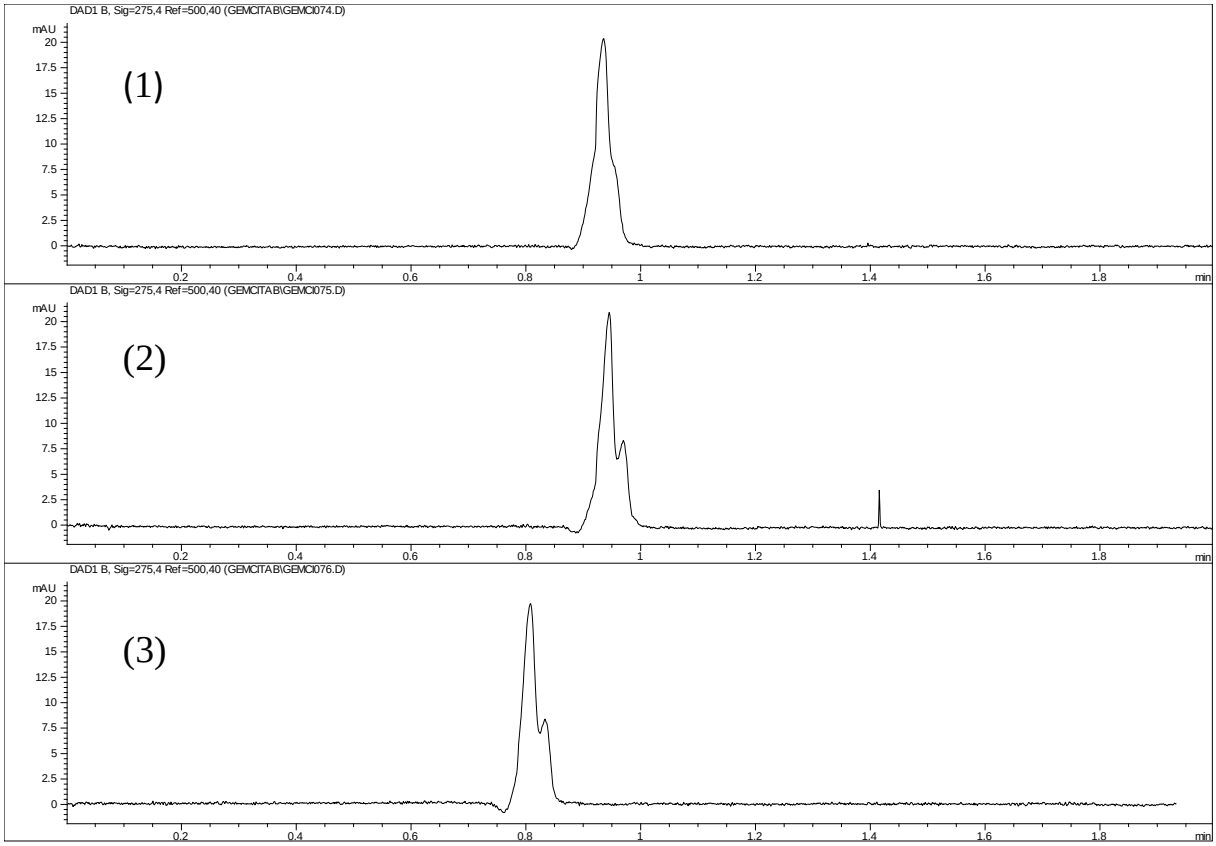
(4) 15 mM fosfatni pufer pH 7,0, 80 mM SDS, 15 % (v/v) metanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.



Slika 14. Utjecaj udjela organskog otapala u radnom puferu na vrijeme migracije gemcitabina (50 µg/ml).

Uvjeti analize: 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 70 mM SDS, 25 kV, 25 °C, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s. Uzorak: 50 µg/ml gemcitabina, 50 µg/ml citozina

Sljedeći korak u razvoju metode je bio optimizacija koncentracije fosfatnog pufera i surfaktanta SDS-a i metanola. Smanjenjem koncentracije SDS-a na 50 mM, pri 20 mM fosfatnog pufera i 10 % metanola, smanjili smo učinkovitost razdvanja analita (Slika 15 (1)) jer se modifikacijom SDS-a utječe na selektivnost metode. Smanjenjem koncentracije fosfatnog pufera na 15 mM pri koncentraciji SDS-a od 70 mM i 10 % metanola (Slika 15 (2)) postignuto je bolje razlučivanje, a najbolje razlučivanje od 0,72 je postignuto 15 mM koncentracijom fosfatnog pufera, 80 mM SDS-om i 5 % metanolom (Slika 15 (3)).



Slika 15. Elektroferogrami smjese standardnih otopina gemcitabina (G, 50 μg/ml) i citozina (C, 50 μg/ml).

Uvjeti analize:

(1) 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 50 mM SDS, 10 % (v/v) metanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

(2) 15 mM fosfatni pufer pH 7,0, 70 mM SDS, 10 % (v/v) metanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

(3) 15 mM fosfatni pufer pH 7,0, 80 mM SDS, 5 % (v/v) metanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s.

Ni nakon optimizacije koncentracija organskog otapala, pufera i surfaktanta nije postignuto granično razlučivanje od 1,5 ni simetričan oblik pikova.

Predmet daljnjeg istraživanja će biti modifikacija uvjeta analize pomoću drugih aditiva kojima će se postići bolji oblik i simetrija pikova te razlučivanje između pikova gemcitabina i citozina. Može se razmotriti uvođenje unutarnjeg standarda radi isključenja greške pri injektiranju uzorka koja bi mogla utjecat na oblik pikova. Pri daljnjoj optimizaciji uvjeta

analize odlučujući faktori bit će oblik, simetrija i razlučivanje između pikova, a ne vrijeme analize jer su provedene analize trajale < 1 min.

5. ZAKLJUČAK

Ispitivanja i kontrola onečišćenja su sastavni dio razvoja lijekova. Gemcitabin ima svoju monografiju u 8. izdanju Europske farmakopeje koja kao metodu za određivanje sadržaja gemcitabina i onečišćenja navodi tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, uz primjenu gradijenta u trajanju od 20 minute. Cilj ovog rada je bio razviti novu, brzu i ekološki prihvatljivu kapilarnoelektroforetsku metodu za istovremenu identifikaciju i određivanje sadržaja gemcitabina i njegovog onečišćenja citozina. U ovom radu optimizirane su vrste i koncentracije organskog otapala (acetonitril, etanol i metanol) koji se dodavani u otopinu radnog pufera. Ispitan je dodatak neinskog surfaktanta Tritona s ciljem postizanja simetričnih pikova gemcitabina i citozina.

Optimalni uvjeti analize, pri kojima su postignuti najbolji oblik i simetričnost pikova, bili su 20 mM fosfatni pufer pH 7,0, 70 mM SDS, 5 % (v/v) metanol, 25 kV, 25 ºC, detekcija pri 275 nm, hidrodinamičko injektiranje 50 mbar, 6 s i trajanje metode je ispod 1 minute.

Pri navedenim uvjetima nije postignuto granično razlučivanje pikova gemcitabina i onečišćenja citozina od 1,5 što ostaje analitički izazov uz oblik i simetriju pikova. Predlaže se uvođenje unutarnjeg standarda kako bi se isključila greška u injektiranju te modifikacija pomoću drugih aditiva kojima bi se pokušao postići bolji i simetričniji oblik pikova gemcitabina i citozina te veće razlučivanje između pikova.

6. LITERATURA

1. Ciccolini J, Serdjebi C, Peters G, Giovannetti E. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2016, 78, 1–12.
2. Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farmaceutski glasnik* 66, 2010, 195–207.
3. El Deeb S, Abu Iriban M, Gust R. MEKC as a powerful growing analytical technique. *Electrophoresis 32*, 2001, 166–183.
4. Francetić i suradnici. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 485-562.
5. Sažetak opisa svojstava lijeka Gemcitabin Sandoz (gemcitabin), 2017., http://www.halmed.hr, pristupljeno 20. 3. 2017.
6. Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potentiation. *Cancer research*, 1992, 52, 533–539.
7. Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Molecular pharmacology*, 1990, 38, 567–572.
8. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 935-962.
9. Kroep JR, Giaccone G, Tolis C, Voorn DA, Loves WJ, Groeningen CJ, Pinedo HM, Peters GJ. Sequence dependent effect of paclitaxel on gemcitabine metabolism in relation to cell cycle and cytotoxicity in non-small-cell lung cancer cell lines. *British journal of cancer*, 2000, 83, 1069–1076.
10. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, 2006, 17, 7–12.
11. Ruiz van Haperen VWT, Veerman G, Vermorken JB, Peters GJ. 2', 2'-Difluoro-deoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumour cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 1993, 46, 762–766.

12. Yue Q, Gao G, Zou G, Yu H, Zheng X. Natural Products as Adjunctive Treatment for Pancreatic Cancer: Recent Trends and Advancements. *BioMed Research International*, 2017, 1–13.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Gemcitabin (2', 2'-difluorodeoksicitidin, dFdC) je antitumorski lijek koji je analog pirimidina. Indiciran je kod karcinoma gušterače, karcinoma pluća nemalih stanica, karcinoma mokraćnog mjehura, jajnika, sarkoma mekih tkiva i non-Hodgkinovih limfoma.

Za analizu gemcitabina i njegovog onečišćenja citozina odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija. U ovom radu optimizirane su vrste i koncentracije organskog otapala (acetonitril, etanol i metanol) koji se dodavani u otopinu radnog pufera. Ispitan je dodatak neinskog surfaktanta Tritona s ciljem postizanja simetričnih pikova gemcitabina i citozina. Optimalni uvjeti analize su postignuti pri 20 mM fosfatnog pufera pH 7,0, 70 mM SDS-a, 5 % (v/v) metanola, primijenjenom naponu od 25 kV, 25 ºC, detekciji pri 275 nm, hidrodinamičkom injektiranju 50 mbar, 6 s. Pri navedenim uvjetima postignuto je razlučivanje između pikova gemcitabina i citozina od 0,71. Predmet daljnjeg istraživanja bit će modifikacija uvjeta analize dodatkom aditiva kojima bi postiglo bolje razlučivanje, bolji oblik pikova i veća simetričnost pikova.

Gemcitabine (2', 2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) is an anticancer drug which is a pyrimidine analog. It is used in treating pancreatic cancer, non-small cell lung cancer, bladder cancer, ovarian cancer, soft tissue sarcomas and non-Hodgkin limfoma.

Micellar electrokinetic chromatographic approach was chosen to develop a method which would be able to separate gemcitabine and its impurity cytosine. In this research, different types and concentrations of organic solvents (acetonitrile, ethanol and methanol), which were added to the working buffer solution, were optimized. Triton, a neutral surfactant, was tested with the aim of achieving symmetric peaks of gemcitabine and cytosine.

The optimum analysis conditions were achieved with 20 mM phosphate buffer pH 7,0, 70 mM SDS, 5 % (w/w) methanol, applied voltage of 25 kV, at 25 ºC, detection at 275 nm and hydrodynamical injection of 50 mbar, 6s. The resolution of gemcitabine and cytosine peaks achieved under these conditions was 0,71. The subject of further research will be to modify the conditions of analysis by adding additives to achieve better resolution, better shape of the peaks and greater symmetry.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UTJECAJ ORGANSKOG OTAPALA NA ANALIZU GEMCITABINA I ONEČIŠĆENJA CITOZINA PRIMJENOM MEKC METODE

Iva Blažević

SAŽETAK

Gemcitabin (2', 2'-difluorodeoksicitidin, dFdC) je antitumorski lijek koji je analog pirimidina. Indiciran je kod karcinoma gušterače, karcinoma pluća nemalih stanica, karcinoma mokraćnog mjehura, jajnika, sarkoma mekih tkiva i non-Hodgkinovih limfoma.
Za analizu gemcitabina i njegovog onečišćenja citozina odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija. U ovom radu optimizirane su vrste i koncentracije organskog otapala (acetonitril, etanol i metanol) koji se dodavani u otopinu radnog pufera. Ispitan je dodatak neinskog surfaktanta Tritona s ciljem postizanja simetričnih pikova gemcitabina i citozina.
Optimalni uvjeti analize su postignuti pri 20 mM fosfatnog pufera pH 7,0, 70 mM SDS-a, 5 % (v/v) metanola, primijenjenom naponu od 25 kV, 25 ºC, detekciji pri 275 nm, hidrodinamičkom injektiranju 50 mbar, 6 s. Pri navedenim uvjetima postignuto je razlučivanje između pikova gemcitabina i citozina od 0,71.
Predmet daljnjeg istraživanja bit će modifikacija uvjeta analize dodatkom aditiva kojima bi postiglo bolje razlučivanje, bolji oblik pikova i veća simetričnost pikova.

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

Rad sadrži: 31 stranicu, 15 grafičkih prikaza i 12 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: gemcitabin, micelarna elektrokinetička kromatografija

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Olga Gornik, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ivan Pepić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Analysis

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Iva Blažević

INFLUENCE OF ORGANIC SOLVENT ON THE ANALYSIS OF GEMCITABINE AND IMPURITY CYTOZINE BY MEKC

Gemcitabine (2', 2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) is an anticancer drug which is a pyrimidine analog. It is used in treating pancreatic cancer, non-small cell lung cancer, bladder cancer, ovarian cancer, soft tissue sarcomas and non-Hodgkin limfoma.
Micellar electrokinetic chromatographic approach was chosen to develop a method which would be able to separate gemcitabine and its impurity cytosine. In this research, different types and concentrations of organic solvents (acetonitrile, ethanol and methanol), which were added to the working buffer solution, were optimized. Triton, a neutral surfactant, was tested with the aim of achieving symmetric peaks of gemcitabine and cytosine.
The optimum analysis conditions were achieved with 20 mM phosphate buffer pH 7,0, 70 mM SDS, 5 % (w/w) methanol, applied voltage of 25 kV, at 25 ºC, detection at 275 nm and hydrodynamical injection of 50 mbar, 6s. The resolution of gemcitabine and cytosine peaks achieved under these conditions was 0,71.
The subject of further research will be to modify the conditions of analysis by adding additives to achieve better resolution, better shape of the peaks and greater symmetry.

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

Thesis includes: 31 pages, 15 figures and 12 references. Original is in Croatian language.

Keywords: gemcitabine, micellar electrokinetic chromatography

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

Reviewers: **Miranda Sertić**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Olga Gornik, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivan Pepić, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2017.