



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zvonimir Mlinarić

**Nove metode kapilarne elektroforeze
spregnute sa spektrometrijom masa za
analizu odabranih antitumorskih lijekova**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zvonimir Mlinarić

**Nove metode kapilarne elektroforeze
spregnute sa spektrometrijom masa za
analizu odabranih antitumorskih lijekova**

DOKTORSKI RAD

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

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Zvonimir Mlinarić

**Novel methods of capillary electrophoresis
coupled with mass spectrometry for the
analysis of selected antitumor drugs**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Assoc. Prof. Miranda Sertić, PhD

Zagreb, 2026

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u suradnji s Kliničkim bolničkim centrom Zagreb, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Mirande Sertić.

Istraživanje je financirano projektom Hrvatske zaklade za znanost „Nova bioanalitička rješenja za personalizaciju terapije raka dojke“, voditeljice izv. prof. dr. sc. Mirande Sertić (UIP-2019-04-8461)“, programom „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ (DOK-2021-02-4995) te projektom Farmlnova Europskog fonda za regionalni razvoj (KK.01.1.1.02.0021).

Zahvala

SAŽETAK

Rak dojke jedan je od najčešćih zloćudnih tumora, a hormonski receptor–pozitivan i humani epidermalni faktor rasta 2–negativan podtip čini oko 70 % svih slučajeva te ima najpovoljniju prognozu. Liječenje se temelji na endokrinoj terapiji inhibitorima aromataze (anastrozol i letrozol) i selektivnim degradatorom estrogenskog receptora fulvestrantom, često u kombinaciji s ciljanom terapijom poput inhibitora o ciklinu D ovisnih kinaza 4 i 6 (ribociklib, palbociklib, abemaciclib) ili inhibitorom fosfatidilinozitol-3-kinaze alpelisibom. Budući da se radi o relativno novijim lijekovima, postoji potreba za razvojem analitičkih metoda za kontrolu kvalitete. S druge strane, velika interindividualna farmakokinetička varijabilnost i rizik od ozbiljnih nuspojava ovih lijekova upućuje na potrebu za pouzdanim analitičkim metodama za terapijsko praćenje lijekova (TDM). Cilj ove doktorske disertacije bio je razviti i validirati komplementarne analitičke postupke za određivanje odabranih antitumorskih lijekova, uz povezivanje farmaceutske i bioanalitičke analize. Razvijeno je i validirano ukupno 6 analitičkih metoda – dvije CE-DAD, HPLC-DAD, dvije MEKC-MS/MS i UHPLC-MS/MS metode u skladu sa smjericama ICH Q2(R2) i ICH M10. Posebno je istraženo sprezanje MEKC i MS tehnika što je vrlo rijetko u literaturi. Rezultati su potvrdili veliku učinkovitost ekstrakcije, dobru selektivnost, osjetljivost i ponovljivost svih metoda. Dok je za farmaceutske oblike primijenjena jednostavna tekućinska ekstrakcija, za ljudsku plazmu razvijeni su postupci pripreme uzoraka temeljeni na taloženju proteina, nakon kojeg je slijedila disperzivna tekućinska mikroekstrakcija (DLLME), disperzivna mikroekstrakcija potpomognuta surfaktantom (SE-LLME) ili disperzivna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (DSPME). U okviru DSPME postupka sintetiziran je i karakteriziran novi hibridni polimetakrilatni sorbens. Metode su uspješno primijenjene na farmaceutske oblike i uzorke plazme pacijentica. Ekološka i ekonomska procjena alatima AGREEprep, AGREE i BAGI pokazala je da su razvijeni postupci održivi i troškovno prihvatljivi, pri čemu se CE istaknula kao posebno ekološki prihvatljiva alternativa tekućinskoj kromatografiji. Zaključno, razvijeni analitički postupci predstavljaju pouzdanu, učinkovitu i održivu osnovu za rutinsku kontrolu kvalitete lijekova i buduću primjenu terapijskog praćenja u kliničkoj praksi.

Ključne riječi: rak dojke, antitumorski lijekovi, kapilarna elektroforeza, micelarna elektrokinetička kromatografija, spektrometrija masa, priprema uzorka

SUMMARY

Introduction: Breast cancer is one of the most commonly diagnosed malignancies worldwide and remains a major public health challenge. Based on molecular characteristics, breast cancer is most frequently classified according to hormone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 expression. The hormone receptor-positive, HER2-negative (HR+/HER2-) subtype accounts for approximately 70% of all cases and is associated with the most favourable prognosis. The treatment of HR+/HER2- breast cancer is primarily based on endocrine therapy, increasingly combined with targeted anticancer drugs to improve therapeutic efficacy and delay disease progression. In recent years, cyclin-dependent kinase 4 and 6 (CDK4/6) inhibitors ribociclib (RIB), palbociclib (PAL), abemaciclib (ABE), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors like alpelisib (ALP), aromatase inhibitors anastrozole (ANA) and letrozole (LET), and selective estrogen receptor degraders like fulvestrant (FUL) have become integral components of therapy for this breast cancer subtype. Despite their proven clinical benefit, these drugs exhibit pronounced interindividual pharmacokinetic variability and may cause serious adverse effects, including neutropenia, hepatotoxicity, metabolic disturbances, and hyperglycaemia. These characteristics highlight the need for reliable, selective, and sensitive analytical methods suitable for therapeutic drug monitoring, as well as for accurate determination of active pharmaceutical ingredients in dosage forms during quality control. Analytical requirements for pharmaceutical dosage forms and biological matrices differ substantially due to matrix complexity, required sensitivity, selectivity, and regulatory constraints. Consequently, there is no universal analytical method capable of fulfilling all analytical demands simultaneously. Therefore, there is a clear need for versatile, sensitive, and selective analytical strategies capable of addressing the distinct requirements of pharmaceutical quality control and therapeutic drug monitoring of modern anticancer agents. In particular, the development of miniaturised, efficient, and environmentally sustainable sample preparation techniques remains crucial for reliable analysis in complex biological matrices such as human plasma. At the same time, analytical methods must comply with increasingly stringent regulatory, ecological, and economic expectations, while providing sufficient robustness for routine application.

This doctoral dissertation focuses on the systematic development of complementary analytical workflows for the determination of the selected anticancer drugs used in the treatment of HR+/HER2- breast cancer. The work aims to bridge the gap between pharmaceutical and bioanalytical analysis by combining tailored sample preparation strategies with suitable separation and detection techniques. Emphasis is placed on the development and optimisation of miniaturised extraction approaches, including protein precipitation followed by dispersive liquid-liquid or solid-phase microextraction, as well as on advancing capillary electrophoresis-based methods, particularly MEKC-MS/MS, to overcome existing limitations related to sensitivity and compatibility with mass spectrometry. In parallel, conventional chromatographic techniques are employed where appropriate to ensure comprehensive analytical coverage. Furthermore, this thesis integrates analytical performance evaluation with ecological and economic assessment, reflecting the principles of green and sustainable analytical chemistry. By validating and applying the developed methods to real pharmaceutical products and patient plasma samples, this work aims to provide reliable, efficient, and sustainable analytical solutions that support both routine quality control and the future implementation of therapeutic drug monitoring in clinical practice.

Methods: In this work, several sample preparation strategies were developed and optimised. For the extraction of selected drugs from pharmaceutical dosage forms, simple liquid extraction proved to be sufficient. In contrast, due to the high complexity of human plasma, various miniaturised sample preparation techniques were designed and implemented. Specifically, protein precipitation (PPT) with acetonitrile followed by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction (SE-LLME), or dispersive solid-phase microextraction (DSPME) was employed. For the PPT-DLLME and PPT-SE-LLME approaches, multiple extraction conditions were systematically investigated, together with their compatibility with the subsequent analytical techniques. For the PPT-DSPME approach, a novel hybrid polymethacrylate-based sorbent was designed, synthesised, and structurally and kinetically

characterised, and its performance was optimised for the quantitative extraction of ALP from human plasma. For the analysis of selected drugs in pharmaceutical dosage forms, two CE-DAD and one HPLC-DAD methods were developed and cross-validated. Conversely, for the determination of selected drugs in human plasma, two MEKC-MS/MS and one UHPLC-MS/MS methods were developed. All analytical methods were validated in accordance with ICH Q2(R2) or ICH M10 guidelines and were applied to pharmaceutical products or real patient plasma samples to demonstrate their practical applicability. Furthermore, the ecological and economic performance of all sample preparation and analytical methods was evaluated using the AGREEprep, AGREE, and BAGI assessment tools.

Results: In this study, the PPT-DLLME, PPT-SE-LLME, and PPT-DSPME sample preparation approaches, together with two CE-DAD, HPLC-DAD, two MEKC-MS/MS, and UHPLC-MS/MS analytical methods, were developed, validated, and applied to real samples. The obtained results confirmed the suitability of the developed methodologies for pharmaceutical quality control and for therapeutic drug monitoring (TDM) in clinical practice.

All protein precipitation (PPT) procedures were performed by adding acetonitrile at a plasma-to-solvent volume ratio of 1:4. For DLLME, the dry residue obtained after PPT and solvent evaporation was reconstituted in 100 μ L of water, followed by the addition of 100 μ L of chloroform and 50 μ L of propan-2-ol. Recoveries exceeding 89.4% were achieved for all six analytes. The PPT-DLLME procedure for the extraction of six drugs was coupled with a newly developed MEKC-MS/MS method. The incorporation of ammonium perfluorooctanoate (APFO) as a surfactant enabled the successful coupling of MEKC with MS detection. Both MEKC and MS conditions were optimised to ensure rapid, sensitive, and selective analysis, allowing complete separation of the analytes within 16 min. The electrophoretic background electrolyte consisted of 125 mM APFO at an apparent pH of 10.5 in 32% methanol, while the sheath liquid comprised 70% methanol containing 0.2% formic acid, delivered at a flow rate of 10 μ L/min. The method was validated in accordance with ICH M10 guidelines, demonstrating excellent selectivity, accuracy, precision (RSD \leq 15.8%), and stability (bias \leq

12.6%), along with negligible matrix effects (RSD \leq 14.0%) and absence of carry-over across a wide concentration range. Linearity was confirmed, with inter-day slope RSD values below 8.7%. Notably, very low analyte concentrations could be detected following the injection of only 68.7 nL of sample.

For SE-LLME, the dry residue obtained after PPT and evaporation was reconstituted in water and chloroform, followed by the addition of PFOA. Seven extraction conditions were evaluated, with optimal performance achieved using 150 μ L of water, 50 μ L of chloroform, and 20 μ L of 50 mM PFOA. Under these conditions, recoveries greater than 78.7% were obtained for ALP and FUL. The PPT-SE-LLME approach was coupled with another newly developed MEKC-MS/MS method. Optimal MEKC conditions consisted of 50 mM APFO at an apparent pH 9.75 with 25% methanol, a separation voltage of 30 kV, a capillary temperature of 30 $^{\circ}$ C, and the application of an additional pressure of 100 mbar during analysis. The implementation of sweeping preconcentration resulted in a substantial enhancement of sensitivity, with enrichment factors of 109-fold for ALP and 11.2-fold for FUL. This was particularly important for FUL, which is administered once monthly and is present in very low concentrations in plasma. Method validation according to ICH M10 guidelines demonstrated excellent linearity ($r \geq 0.9963$) across the calibration ranges of 200–2000 ng/mL for ALP and 10–100 ng/mL for FUL, as well as satisfactory accuracy (mean bias from –10.3% to 7.5%) and precision (RSD \leq 12.6%). Although pronounced matrix effects were observed for ALP, reproducibility across six different plasma sources (RSD \leq 12.7%) ensured method reliability. The analytes exhibited adequate stability under benchtop, autosampler, freeze-thaw, and long-term storage conditions (bias \leq 11.1%). No carry-over was detected, and dilution integrity was successfully demonstrated (bias \leq 2.7%).

For DSPME, a novel hybrid polymethacrylate-based sorbent was synthesised using methacrylic acid (MAA) as the primary monomer, 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as a co-monomer, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as a crosslinker, and AIBN as an initiator. A MAA-to-HEMA ratio of 4:1 and a total monomer-to-EGDMA ratio of 3:10 were

identified as optimal for sorbent synthesis and performance. The resulting polymethacrylate-based sorbent was structurally characterised using FTIR spectroscopy and dynamic light scattering. Adsorption studies indicated that ALP binding was best described by the Ho-McKay pseudo-second-order kinetic model. The binding, washing, and elution steps were systematically optimised, yielding recoveries greater than 81.6% in the PPT-DSPME procedure. Additionally, sorbent synthesis was shown to be highly reproducible between batches (RSD = 3.5%). Furthermore, this sample preparation strategy effectively addressed the issue of phospholipid interference, which is frequently insufficiently resolved by alternative sample preparation techniques. The PPT-DSPME approach was subsequently coupled with a newly developed UHPLC-MS/MS method. The method was validated and demonstrated excellent linearity ($r \geq 0.9969$) across the calibration range of 50–2000 ng/mL for ALP, as well as satisfactory accuracy (mean bias from –3.5% to 1.1%) and precision (RSD $\leq 4.9\%$). Although pronounced matrix effects were observed, reproducibility across six different plasma sources (RSD $\leq 4.7\%$) ensured method reliability.

All developed analytical and sample preparation methods were evaluated from ecological and economic perspectives using the AGREE, AGREEprep, and BAGI tools. The simple liquid extraction, PPT-DLLME, PPT-SE-LLME, and PPT-DSPME achieved AGREEprep scores of 0.39, 0.43, 0.44 and 0.38, respectively. Additionally, BAGI scores for all sample preparations were greater than 65, demonstrating economic acceptability of the developed methods. On the other hand, CE-DAD, HPLC-DAD, two MEKC-MS/MS methods and UHPLC-MS/MS methods achieved AGREE scores of 0.86, 0.59, 0.64, 0.64, and 0.57, respectively. This demonstrated the ecological efficiency of all methods, emphasising the CE technique as a greener alternative to the more routinely used LC. Finally, BAGI scores greater than 72.5 for all methods proved the economic efficiency of the proposed methods.

Finally, all developed analytical methods were applied to real samples for their intended purposes. The two CE-DAD and the HPLC-DAD methods were applied to pharmaceutical dosage forms and were demonstrated to be suitable for determination assays in quality

control. In contrast, the two MEKC-MS/MS and the UHPLC-MS/MS methods were applied to real patient samples, and the determined drug concentrations were consistent with those reported in clinical studies. These findings suggest the applicability of the proposed methods as the foundation for the development of TDM.

Conclusion: In this thesis, a comprehensive set of miniaturised sample preparation strategies and complementary analytical methods was successfully developed, validated, and applied to pharmaceutical formulations and patient plasma samples. The proposed PPT-DLLME, PPT-SE-LLME, and PPT-DSPME approaches demonstrated high extraction efficiency, robustness, and suitability for complex biological matrices, while maintaining low sample and solvent consumption. The introduction of a novel hybrid polymethacrylate-based sorbent for DSPME further contributed to efficient analyte extraction and effective mitigation of phospholipid interference. The developed CE-DAD, HPLC-DAD, MEKC-MS/MS, and UHPLC-MS/MS methods exhibited excellent analytical performance in terms of selectivity, sensitivity, accuracy, precision, and linearity, fully complying with ICH Q2(R2) and M10 validation requirements. Their successful application to real pharmaceutical products and patient plasma samples confirmed their practical applicability for quality control and TDM. In addition, the ecological and economic assessment using AGREE, AGREEprep, and BAGI metrics demonstrated that the proposed workflows are environmentally sustainable and cost-effective, with capillary electrophoresis emerging as a particularly green alternative to conventional liquid chromatography. Overall, the results highlight the potential of the developed methodologies as reliable, efficient, and sustainable tools for routine pharmaceutical analysis and as a solid foundation for future implementation in clinical TDM.

Keywords: breast cancer, anticancer drugs, capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, mass spectrometry, sample preparation

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rak dojke	2
1.1.1 Terapija raka dojke.....	2
1.1.2. Inhibitori CDK4/6 i PI3K.....	4
1.1.3. Inhibitori aromataze i selektivni degradatori estrogenskih receptora	5
1.1.4. Fizikalno-kemijska svojstva odabranih lijekova	6
1.2. Kapilarna elektroforeza	9
1.2.1. Osnovni principi i fizikalna pozadina	9
1.2.2. Faktori koji utječu na učinkovitost CE.....	12
1.2.2.1. Adsorpcija	12
1.2.2.2. Jouleovo zagrijavanje.....	13
1.2.2.3. Elektroforetska disperzija	16
1.2.2.4. Širenje prilikom injektiranja uzorka	18
1.3. Micelarna elektrokinetička kromatografija	20
1.3.1. Osnovni princip razdvajanja	20
1.3.2. Surfaktanti i njihova uloga u MEKC-u.....	23
1.3.3. <i>Sweeping</i> tehnika ukoncentriravanja uzorka	25
1.4. Kapilarna elektroforeza spregnuta sa spektrometrijom masa	27
1.4.1. Povijesni razvoj CE-MS tehnike	28
1.4.2. CE-MS sučelja	29
1.5. Zelena analitička kemija.....	33
1.5.1. Zelena analitička kemija	33
1.5.2. Plava analitička kemija	35
1.6. Pregled dosad objavljenih analitičkih metoda za odabrane lijekove	36
2. OBRAZLOŽENJE TEME	38
3. MATERIJALI I METODE	39
3.1. Materijali.....	39

3.1.1. Analitički standardi	39
3.1.2. Farmaceutski oblici	40
3.1.3. Otapala, soli, puferi, kiseline i lužine.....	40
3.1.4. Instrumenti	41
3.1.5. Pribor	42
3.1.6. Računalni programi	44
3.2. Metode	45
3.2.1. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute s detektorom niza dioda za određivanje CDK4/6 inhibitora u ljekovitim oblicima.....	45
3.2.1.1. Priprema standardnih otopina.....	45
3.2.1.2. Priprema uzoraka	45
3.2.1.3. Uvjeti CE analize	46
3.2.2. Metode kapilarne elektroforeze i tekućinske kromatografije spregnute s detektorom niza dioda za određivanje alpelisiba u ljekovitim oblicima.....	46
3.2.2.1. Priprema standardnih otopina.....	46
3.2.2.2. Priprema uzoraka	47
3.2.2.3. Uvjeti analize	47
3.2.3. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute sa spektrometrijom masa za određivanje šest lijekova u ljudskoj plazmi	48
3.2.3.1. Priprema standardnih otopina.....	48
3.2.3.2. Uvjeti MEKC metode.....	49
3.2.3.3. Uvjeti MS metode.....	50
3.2.3.4. Prikupljanje uzoraka	51
3.2.3.5. Priprema uzoraka	51
3.2.4. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute sa spektrometrijom masa za određivanje alpelisiba i fulvestranta u ljudskoj plazmi	52
3.2.4.1. Priprema standardnih otopina.....	52
3.2.4.2. Uvjeti MEKC metode.....	52
3.2.4.3. Uvjeti MS metode.....	53
3.2.4.4. Priprema uzoraka	54

3.2.5. Disperzivna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi za određivanje alpelisiba u ljudskoj plazmi metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute sa spektrometrijom masa.....	54
3.2.5.1. Uvjeti UHPLC-MS/MS metode.....	54
3.2.5.2. Sinteza hibridnog HEMA-MAA polimetakrilatnog sorbensa.....	56
3.2.5.3. Priprema uzoraka.....	57
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	58
4.1. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute s detektorom niza dioda za određivanje CDK4/6 inhibitora u ljekovitim oblicima.....	58
4.1.1. Razvoj CE metode.....	58
4.1.1.1. Odabir unutarnjeg standarda.....	58
4.1.1.2. Optimizacija pH elektroforetskog pufera.....	59
4.1.1.3. Optimizacija napona razdvajanja.....	62
4.1.1.4. Optimizacija temperature kapilare.....	64
4.1.2. Validacija metode.....	66
4.1.2.1. Selektivnost metode.....	66
4.1.2.2. Linearnost i granice dokazivanja i određivanja.....	66
4.1.2.3. Točnost i preciznost.....	67
4.1.2.4. Robusnost.....	68
4.1.3. Primjena metode.....	70
4.2. Metode kapilarne elektroforeze i tekućinske kromatografije spregnute s detektorom niza dioda za određivanje alpelisiba u ljekovitim oblicima.....	71
4.2.1. Razvoj CE metode.....	71
4.2.1.1. Odabir unutarnjeg standarda.....	71
4.2.1.2. Optimizacija koncentracije elektroforetskog pufera.....	71
4.2.1.3. Ispitivanje utjecaja dodatka modifikatora elektroforetskog pufera.....	73
4.2.1.4. Optimizacija napona razdvajanja.....	75
4.2.1.5. Optimizacija temperature kapilare.....	76
4.2.2. Validacije CE metode.....	77
4.2.2.1. Selektivnost metode.....	77

4.2.2.2. Linearnost	78
4.2.2.3. Točnost i preciznost	78
4.2.2.4. Robusnost.....	79
4.2.3. Unakrsna validacija CE i HPLC metoda	80
4.2.4. Primjena metoda.....	82
4.3. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute sa spektrometrijom masa za određivanje šest lijekova u ljudskoj plazmi	84
4.3.1. Optimizacija MEKC metode.....	84
4.3.1.1. Optimizacija pH elektroforetskog pufera	84
4.3.1.2. Optimizacija koncentracije APFO	86
4.3.1.3. Optimizacija sastava elektroforetskog pufera i dodatnog hidrodinamičkog tlaka tijekom analize	88
4.3.1.4. Optimizacija temperature kapilare i napona razdvajanja	90
4.3.1.5. Optimizacija <i>sweeping online</i> ukoncentriravanja uzorka	94
4.3.2. Optimizacija MS/MS metode	95
4.3.2.1. Optimizacija Agilent Jet Stream parametara	96
4.3.2.2. Optimizacija sastava i brzine protoka obložne tekućine	99
4.3.2.3. Optimizacija ESI parametara.....	103
4.3.3. Optimizacija pripreme uzorka	108
4.3.4. Validacija metode	110
4.3.4.1. Selektivnost, specifičnost i prijenos analita	111
4.3.4.2. Linearnost i kalibracijski raspon	112
4.3.4.3. Točnost i preciznost	113
4.3.4.4. Učinak matrice	115
4.3.4.5. Stabilnost.....	116
4.3.5. Primjena metode.....	117
4.4. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute sa spektrometrijom masa za određivanje alpelisiba i fulvestranta u ljudskoj plazmi	118
4.4.1. Optimizacija MEKC metode.....	118
4.4.1.1. Optimizacija pH elektroforetskog pufera	119

4.4.1.2. Optimizacija koncentracije APFO	120
4.4.1.3. Optimizacija sastava elektroforetskog pufera i dodatnog hidrodinamičkog tlaka tijekom analize	121
4.4.1.4. Optimizacija temperature kapilare i napona razdvajanja	124
4.4.1.5. Optimizacija <i>sweeping online</i> ukoncentriravanja uzorka	125
4.4.2. Optimizacija MS/MS metode	126
4.4.2.1. Optimizacija Agilent Jet Stream parametara	127
4.4.2.2. Optimizacija obložne tekućine	130
4.4.2.3. Optimizacija ESI parametara.....	133
4.4.3. Optimizacija pripreme uzorka	136
4.4.4. Validacija metode	139
4.4.4.1. Selektivnost, specifičnost i prijenos analita	140
4.4.4.2. Linearnost i kalibracijski raspon	141
4.4.4.3. Učinak matrice	142
4.4.4.4. Točnost i preciznost	143
4.4.4.5. Stabilnost.....	143
4.4.4.6. Prijenos analita i integritet prilikom razrjeđenja	145
4.4.5. Primjena metode.....	146
4.5. Disperzivna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi za određivanje alpelisiba u ljudskoj plazmi metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute sa spektrometrijom masa	148
4.5.1. Dizajn hibridnog HEMA-MAA polimetakrilatnog sorbensa	148
4.5.2. Strukturna karakterizacija sorbensa.....	150
4.5.3. Ispitivanje kinetike vezanja analita na sorbens.....	152
4.5.4. Optimizacija DSPME postupka pripreme uzorka	154
4.5.5. Validacija metode	159
4.5.5.1. Učinak matrice	159
4.5.5.2. Linearnost metode.....	159
4.5.5.3. Točnost i preciznost	160
4.5.6. Primjena metode.....	160

4.6. Ekološka i ekonomska evaluacija razvijenih analitičkih metoda i metoda pripreme uzoraka	161
4.6.1. Ekološka evaluacija razvijenih metoda pripreme uzoraka alatom AGREEprep	161
4.6.2. Ekonomska evaluacija razvijenih metoda pripreme uzoraka alatom BAGI	165
4.6.3. Ekološka evaluacija razvijenih analitičkih metoda alatom AGREE.....	168
4.6.4. Ekonomska evaluacija razvijenih analitičkih metoda alatom BAGI.....	171
5. ZAKLJUČCI	173
6. POPIS LITERATURE	175
7. PRILOZI	191
7.1. Maseni elektroferogrami uzoraka plazme pacijentica	191
7.2. Znanstveni radovi	197
8. POPIS KRATICA I OZNAKA.....	278
9. ŽIVOTOPIS.....	282

1. UVOD

Razvoj moderne onkološke terapije obilježen je sustavnim napretkom razumijevanja molekularnih mehanizama patogeneze malignih bolesti te usporednim razvojem novih terapijskih mogućnosti čiji je cilj selektivno djelovati na ključne regulacijske procese u tumorskim stanicama. U protekla dva desetljeća, osobito u području liječenja hormonski ovisnog karcinoma dojke, opažen je značajan pomak od nespecifičnih citotoksičnih terapija prema ciljanoj terapiji koja modulira signalne kaskade ključne za proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje tumorskih stanica. Među tim molekulama posebno se ističu inhibitori o ciklinu D ovisnih kinaza 4 i 6 (CDK4/6), kao i inhibitori fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) poput alpelisiba, čija je klinička učinkovitost dokazana u velikom broju randomiziranih kliničkih studija. Uvođenje ovih lijekova, kao i njihova široka primjena u svakodnevnoj kliničkoj praksi, donijelo je nova očekivanja i kliničku korist, ali istodobno i složen skup farmakokinetičkih i analitičkih izazova. Njihov terapijski odgovor često je nepredvidljiv zbog relativno uske terapijske širine, velikog stupnja interindividualne varijabilnosti (uzrokovane razlikama u aktivnosti metaboličkih enzima, jetrenoj funkciji, brzini apsorpcije i genskim čimbenicima) te brojnih mogućih interakcija s drugim lijekovima, osobito u politerapijskim režimima koji su standard u onkologiji. Farmakokinetička varijabilnost ovih lijekova, kao i mogući razvoj toksičnih reakcija poput neutropenije, hiperglikemije, hepatotoksičnosti ili metaboličkih poremećaja, zahtijevaju vrlo osjetljive i selektivne analitičke metode za njihovo određivanje u biološkim uzorcima pacijenata. Usporedno s potrebom za metodama koje omogućuju terapijsko praćenje lijekova (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM), postoji i potreba za jednostavnim, ponovljivim i pouzdanim metodama prikladnima za određivanje sadržaja djelatnih tvari u farmaceutskim oblicima, osobito u okviru kontrole kvalitete farmaceutskih proizvoda. Regulatorni zahtjevi, između ostalog, nalažu kvantitativnu provjeru sadržaja djelatne tvari u farmaceutskim oblicima prije stavljanja lijeka na tržište. Upravo ta razlika u analitičkim zahtjevima dovodi do jednog od ključnih metodoloških izazova u analitici lijekova, odnosno do činjenice da ne postoji univerzalna metoda koja bi mogla jednako učinkovito zadovoljiti potrebe i farmaceutske kontrole kvalitete i kliničke bioanalize. Razlog tomu leži u fundamentalnim razlikama koje proizlaze iz kompleksnosti matrice, potrebne osjetljivosti

metode, prisutnosti endogenih interferenata, selektivnosti detekcijskog sustava, regulatornih kriterija za validaciju te konačno, krajnje svrhe analize (kvaliteta proizvoda ili optimizacija terapije). U nastavku uvodnog dijela prikazana su farmakološka i fizikalno-kemijska svojstva odabranih analita, analitički izazovi vezani uz njihovo određivanje u različitim matricama, temeljna načela kapilarne elektroforeze i njenih varijanti, specifičnosti CE-MS sprezanja te razlozi zašto su ove tehnike odabrane u sklopu ove disertacije.

1.1. Rak dojke

Rak dojke heterogena je bolest koja se klinički i molekularno najčešće klasificira prema ekspresiji hormonskih (estrogenskih i progesteronskih) receptora (engl. *hormone receptor*, HR) te receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) (1–4). Najzastupljeniji podtip, koji čini približno 70 % svih slučajeva, je hormonski ovisan (HR+), a HER2 negativan (HER2-) rak dojke (3). Oko 20 % slučajeva čini HER2+ rak dojke, dok u oko 10 % slučajeva rak dojke ne pokazuje povećanu ekspresiju niti HR niti HER2 pa se takav fenotip naziva trostruko negativni rak dojke (engl. *triple negative*, TN) (5–7). Najbolje preživljenje zabilježeno je u HR+/HER2- slučajevima raka dojke, dok je najmanja stopa preživljenja kod TN fenotipa (8).

1.1.1 Terapija raka dojke

Terapija raka dojke provodi se kirurški djelomičnom ili potpunom mastektomijom, radioterapijski ili farmakološki (4,9). Posljednjih godina eksperimentalno se istražuje i liječenje raka dojke onkolitičkim virusima (10–12). Ovisno o stupnju malignosti, moguće je primijeniti i neoadjuvantnu terapiju, ali i adjuvantnu terapiju nakon kirurškog zahvata. Farmakoterapija raka dojke nudi najviše mogućnosti, a odabire se prema prethodno opisanoj molekularnoj klasifikaciji raka. Tako se može govoriti o klasičnoj kemoterapiji, antihormonskoj ili endokrinoj terapiji te o ciljanoj terapiji, odnosno o imunoterapiji kao posebnoj ciljanoj terapiji.

Zbog odsustva pretjerane ekspresije proteina na koje se može ciljano djelovati, klasična kemoterapija najčešće se indicira u TN slučajevima raka dojke. U tu se skupinu ubrajaju DNA-interkalirajući agensi doksorubicin i epirubicin, metilirajući agensi cisplatin i karboplatin, alkilirajući agens ciklofosamid, antifolat metotreksat, inhibitor DNA-polimeraze gemcitabin, inhibitori timidilat-sintaze 5-fluorouracil i kapecitabin, inhibitori polimerizacije tubulina vinkristin, vinblastin i vinorelbin te inhibitori depolimerizacije mikrotubula paklitaksel, docetaksel, eribulin i iksabepilon (4). Budući da ovakve terapije djeluju i na leukocite, nerijetko se primijenjuje i faktor stimulacije rasta granulocita (engl. *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF), budući da se pokazalo kako primjena G-CSF značajno smanjuje stupanj infekcija i leukopenija, iako ih nije moguće u potpunosti izbjeći (13,14).

S druge strane, antihormonska terapija koristi se kod HR+ raka dojke. U ove lijekova spadaju inhibitori aromataze anastrozol (ANA), letrozol (LET) i eksemestan, selektivni modulatori estrogenskih receptora tamoksifen i toremifen te selektivni degradatori estrogenskih receptora fulvestrant (FUL) i elacestrant. Ipak, u određenom broju slučajeva, unatoč antihormonskoj terapiji dolazi do relapsa ili metastaziranja raka dojke uslijed kompenzatornih mehanizama aktivacije estrogenskih receptora (15). U tim se slučajevima za liječenje indicira kombinacija ciljane i antihormonske terapije.

Ciljana terapija može se podijeliti na lijekove koji su male molekule, najčešće inhibitori različitih kinaza te na monoklonska protutijela. U terapiji HR+ raka dojke primijenjuju se inhibitori o ciklinu D ovisnih kinaza 4 i 6 (CDK4/6) ribociklib (RIB), palbociklib (PAL) i abemaciklib (ABE), inhibitor fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K) alpelisib (ALP) te inhibitor AKT kinaza kapivasertib (16).

U terapiji HER2+ raka dojke primjenjuju se inhibitori kinazne domene receptora HER2, uključujući tukatinib, lapatinib i neratinib te monoklonska protutijela usmjerena na ovaj receptor, među kojima su trastuzumab, pertuzumab i margetuksimab. Trastuzumab i margetuksimab vežu se na jednaki epitop na HER2 sprječavajući stvaranje homodimera. S

druge strane, pertuzumab se veže na domenu HER2 sprječavajući vezanje na HER3 (17). Zbog sinergističkog učinka, trastuzumab i pertuzumab često se indiciraju zajedno, uz docetaksel, za liječenje metastatskog HER2+ raka dojke, ali i za neoadjuvantno liječenje ranog HER2+ raka dojke. Još jedna strategija liječenja obuhvaća konjugate monoklonskog protutijela i vrlo citotoksičnih spojeva. U tu skupinu spadaju trastuzumab-derukstekan i trastuzumab-emtansin koji se koriste za ciljanu dopremu citotoksičnih spojeva u stanice s pretjeranom ekspresijom HER2, a koji se koriste u slučajevima rezistencije na prethodnu terapiju (18,19). TN rak dojke, za koji je karakterističan izostanak ekspresije standardnih terapijskih meta, uz prethodno opisanu klasičnu kemoterapiju, liječi se i inhibitorima histonske deacetilaze panobinostatom i entinostatom te inhibitorima poli(ADP-riboza) polimeraze (PARP) olaparibom i talazoparibom. PARP inhibitori posebno se koriste u terapiji raka dojke s mutacijom gena *BRCA* (20).

Što se tiče imunoterapije raka dojke, za liječenje su dostupna monoklonska protutijela pembrolizumab koji cilja protein programirane stanične smrti 1 (engl. *programmed cell death protein 1*) i atezolizumab koji cilja protein ligand za taj protein (engl. *programmed cell death-ligand 1*). Na taj se način sprječava inhibitorni učinak nekih tumorskih stanica na aktivaciju citotoksičnih T-stanica (21,22).

1.1.2. Inhibitori CDK4/6 i PI3K

Iako se u kliničkim studijama trenutno nalazi desetak inhibitora CDK4/6, od strane Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) i Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) za liječenje lokalno uznapredovalog ili metastatskog HR+/HER2- raka dojke trenutno su registrirani već spomenuti RIB, PAL i ABE. Oni se koriste u kombinacijama s inhibitorom aromataze ili s FUL na temelju pozitivnih ishoda u kliničkim ispitivanjima MONALEESA (RIB), PALOMA (PAL) i MONARCH (ABE) (23–25). U Kini je u kombinaciji s FUL registriran i dalpiciklib (26). ABE se primijenjuje peroralno kontinuirano, dok se zbog izražene neutropenije kao nuspojave RIB i PAL primijenjuju 21 dan kontinuirano nakon čega slijedi 7 dana pauze kako bi se oporavio status neutrofila (27,28). Osim

hematoloških nuspojava, očekivane nuspojave inhibitora CDK4/6 su mučnina, glavobolja, infekcije, umor i alopecija. Zbog svoje kardiotoksičnosti, RIB je kontraindiciran u primjeni s drugim lijekovima koji produljuju QT interval kao što su antiaritmici, klaritromicin ili haloperidol.

Svi se inhibitori CDK4/6 metaboliziraju hepatički, primarno enzimom CYP3A4. Zanimljivo je kako su metaboliti sva tri lijeka imaju aktivni, s naglaskom na metabolite ABE. Ovi lijekovi također inhibiraju velik broj enzima i transportera, uključujući i sam CYP3A4, što treba uzeti u obzir u politerapiji. Tako je primjerice PAL kontraindiciran u primjeni sa statinima, dok je poseban oprez potreban u terapiji bilo kojim inhibitorom CDK4/6 zajedno sa lijekovima kao što su ritonavir, klaritromicin rifampicin ili ketokonazol.

ALP je prvi oralni, selektivni inhibitor α -izoforme fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K α). Njegova primjena odobrena je na temelju rezultata SOLAR-1 kliničke studije, koja je pokazala korist u liječenju pacijentica s mutacijom PIK3CA u kombinaciji s FUL (29,30). ALP se primijenjuje peroralno kontinuirano. Iako je uvođenje ALP-a rezultiralo značajnim poboljšanjima kliničkih ishoda za ovaj specifični podtip raka dojke, nekoliko izazova povezanih s njegovom primjenom i dalje postoji. Konkretno, kliničke studije pokazale su da je hiperglikemija vrlo česta nuspojava terapije ALP-om, koja pogađa do 80 % pacijenata u određenim populacijama (31). Hiperglikemija izazvana ALP-om predstavlja najčešći uzrok smanjenja doze te je, nakon progresije bolesti, drugi najčešći razlog prekida liječenja, često unutar prvih 30 dana terapije (32). Štoviše, sugerirano je da hiperglikemija izazvana inhibitorom PI3K pokreće kompenzacijsko oslobađanje inzulina dovoljno za reaktivaciju PI3K signalizacije putem alternativnih izoformi, što potencijalno doprinosi razvoju rezistencije na liječenje (33). Posebno su zabilježeni i smrtonosni slučajevi hiperglikemijske ketoacidoze i hiperosmolarnog hiperglikemijskog sindroma nakon primjene ALP-a (34).

1.1.3. Inhibitori aromataze i selektivni degradatori estrogenskih receptora

Anastrozol i letrozol su indicirani za adjuvantno liječenje ranog raka dojke, kao i uznapredovalog raka dojke ili nakon relapsa. U slučajevima neoperabilnog raka dojke, mogu

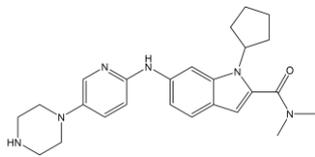
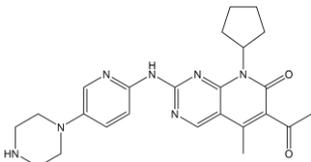
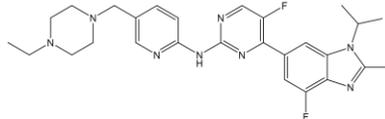
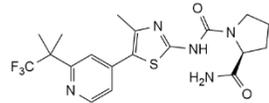
se indicirati i za neoadjuvantno liječenje. Fulvestrant je pak indiciran za liječenje lokalno uznapredovalog ili metastatskog raka dojke. ANA i LET primijenjuju se peroralno kontinuirano, dok se FUL zbog loše apsorpcije uslijed izrazite lipofilnosti primijenjuje intramuskularnom injekcijom jednom mjesečno, uz iznimku prvog doziranja kada se primijenjuje i dodatna udarna doza (35). ANA se dominantno metabolizira glukoronidacijom te u manjoj mjeri enzimom CYP3A4, dok se LET primarno metabolizira enzimom CYP2A6 (36–38). S druge strane, FUL se dominantno metabolizira glukoronidacijom i sulfatacijom. S obzirom na mehanizam djelovanja ovih lijekova, očekivane nuspojave su simptomi manjka estrogena što uključuje mučninu, vazomotorne simptome, hiperkolesterolemiju, smanjenje gustoće kostiju, psihološke simptome te u ekstremnim slučajevima i tromboembolijske događaje (36).

1.1.4. Fizikalno-kemijska svojstva odabranih lijekova

Poznavanje fizikalno-kemijskih svojstava analita, prvenstveno kiselinsko-baznih konstanti (pKa) različitih funkcionalnih skupina, dimenzija molekule, broja akceptora i donora vodikovih veza te lipofilnosti (logP), preduvjet je za racionalni razvoj analitičkih metoda, posebice u CE tehnici gdje naboj, dimenzije i lipofilnost diktiraju migracijsko ponašanje. Pregled ključnih svojstava prikazan je u Tablicama 1 i 2.

Iz Tablice 1. vidljivo je kako su inhibitori CDK4/6 umjereno lipofilni i bazični spojevi. U skladu s tim, sva su tri lijeka pri fiziološkom pH uglavnom u kationskom obliku. S druge strane, iako je i ALP bazična molekula, pri fiziološkom pH se nalazi u blago negativno nabijenoj formi. Zbog prisutnosti piperazinskih, piridinskih, pirimidinskih, amidnih, aminske, urea i ketonskih funkcionalnih skupina, ovi su lijekovi dobri akceptori i umjereni donori vodikovih veza.

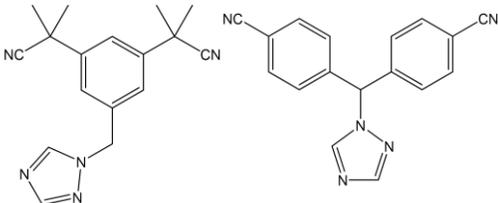
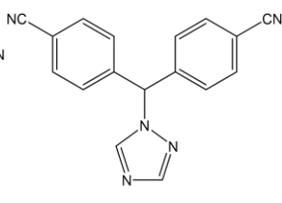
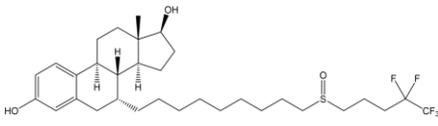
Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva ribocikliba (RIB), palbocikliba (PAL), abemacicliba (ABE) i alpelisiba (ALP). Izračunato koristeći (39,40).

Lijek	RIB	PAL	ABE	ALP
Strukturna formula				
Molekulska formula	$C_{23}H_{30}N_8O$	$C_{24}H_{29}N_7O_2$	$C_{27}H_{32}F_2N_8$	$C_{19}H_{22}F_3N_5O_2S$
Molarna masa	434,548 g/mol	447,543 g/mol	506,606 g/mol	441.47 g/mol
LogP	2,04	2,39	4,04	3,03
pKa kiselih skupina	11,57	11,34	9,53	7,79, 15,46
pKa bazičnih skupina	0,13, 2,98, 4,31, 8,81	-0,63, 3,46, 8,81	-1,15, 0,84, 2,67, 4,34, 8,40	-1,00, 1,48, 2,83
Broj donora VV	2	2	1	2
Broj akceptora VV	7	8	7	4
Broj rotirajućih veza	5	5	7	5
Van der Waalsov volumen	398.86 Å ³	406.57 Å ³	456.38 Å ³	365.22 Å ³

Kratice: VV – vodikove veze

Iz Tablice 2. vidljivo je kako su ANA i LET umjereno lipofilni spojevi koji su pozitivno nabijeni tek pri vrlo niskim pH vrijednostima, dok su pri fiziološkom pH neutralne molekule. S druge strane, FUL je vrlo lipofilan lijek s LogP vrijednosti od 8,06 koji je negativno nabijen tek pri visokim pH vrijednostima, dok je pri fiziološkom pH neutralna molekula. Zbog prisutnosti triazolnih prstenova i nitrilnih skupina, ANA i LET su umjereni akceptori vodikovih veza. S druge strane, zbog hidroksilnih skupine i jedne keto skupine, FUL može biti i donator i akceptor vodikovih veza.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva anastrozola (ANA), letrozola (LET) i fulvestranta (FUL). Izračunato koristeći (39,40).

Lijek	ANA	LET	FUL
Strukturna formula			
Molekulska formula	$C_{17}H_{19}N_5$	$C_{17}H_{11}N_5$	$C_{32}H_{47}F_5O_3S$
Molarna masa	293.374 g/mol	285.31 g/mol	606.78 g/mol
LogP	2,35	2,32	8,06
pKa kiselih skupina	-	-	10,32
pKa bazičnih skupina	2,00	1,89	-0,88
Broj donora VV	0	0	2
Broj akceptora VV	4	4	3
Broj rotirajućih veza	4	3	15
Van der Waalsov volumen	281.5 Å ³	249.3 Å ³	561.9 Å ³

Kratice: VV – vodikove veze

1.2. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza (engl. *capillary electrophoresis*, CE) predstavlja, uz kromatografske tehnike, jednu od najvažnijih separacijskih analitičkih tehnika u modernoj analitičkoj kemiji. Karakterizira ju razdvajanje nabijenih analita pod utjecajem vanjskog električnog polja unutar kapilare uskog promjera (41). Od svog nastanka krajem 20. stoljeća, CE se istaknula kao vrlo svestrana tehnika, koju odlikuje velika učinkovitost razdvajanja, minimalna potrošnja uzorka i sposobnost analize širokog spektra analita, uključujući male ione, biomolekule i makromolekulske komplekse.

1.2.1. Osnovni principi i fizikalna pozadina

Temeljni principi na kojima se zasniva CE su inherentno multidisciplinarni i obuhvaćaju aspekte elektrostatike, dinamike fluida, termodinamike i fenomena prijenosa mase. Ovo poglavlje ima za cilj razjasniti fizičke i teorijske temelje CE, s posebnim naglaskom na elektroforetsku pokretljivost, elektroosmotski tok (engl. *electroosmotic flow*, EOF) i čimbenike koji utječu na migraciju i razdvajanje analita.

Elektroforeza se temelji na različitoj migraciji nabijenih kemijskih vrsta pod utjecajem vanjskog električnog polja. U homogenom mediju, elektroforetska brzina (v) nabijene čestice izravno je proporcionalna primijenjenoj jakosti električnog polja (E) i njezinoj elektroforetskoj pokretljivosti (μ_{ep}) prema sljedećoj jednadžbi:

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

Elektroforetska pokretljivost definirana je kao omjer brzine iona u stacionarnom stanju i primijenjenog električnog polja, a sama je funkcija ionskog naboja (q), viskoznosti medija (η) i hidrodinamičkog polumjera analita (r):

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

Ovaj odnos pretpostavlja sferičnu česticu i uvjete laminarnog toka. Odstupanja nastaju u slučaju asimetričnih makromolekula i vrlo malih iona, što zahtijeva sofisticiranije modele za točan opis ponašanja analita pri čemu sila otpora gibanju kemijske vrste nije proporcionalna

s 6π već s faktorom koji je brojčano manji od toga. Važno je i napomenuti kako Stokesov ili hidrodinamički polumjer predstavlja polumjer solvatiranog iona, a ne kristalografski polumjer.

Utjecaj temperature na elektroforetsku pokretljivost najviše se očituje se kroz promjenu viskoznosti. Naime, viskoznost (η) ovisi o temperaturi (T) prema sljedećoj jednadžbi:

$$\eta = C \cdot e^{\frac{E_a}{RT}} \quad (3)$$

gdje je C predeksponencijalni faktor, E_a aktivacijska energija za viskozni tok, a R opća plinska konstanta. Nadalje, odlika CE, koja ju razlikuje od klasične gel elektroforeze, je prisutnost EOF-a. On nastaje stvaranjem električnog dvosloja na stijenci kapilare, obično sastavljene od taljenog silicijevog dioksida, koji pokazuje neto negativni površinski naboj u većini vodenih uvjeta. Primjena vanjskog električnog polja inducira migraciju difuznog sloja protuiona prema katodi, čime se generira protok otopine:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot E \quad (4)$$

Elektroosmotska pokretljivost (μ_{EOF}) pak ovisi o zeta potencijalu (ζ) stijenske kapilare, električnoj permitivnosti (ϵ) medija i viskoznosti (η):

$$\mu_{EOF} = \frac{\zeta}{4\pi\epsilon\eta} \quad (5)$$

Ukupna migracijska brzina nabijene čestice u CE stoga je zbroj brzine EOF-a te inherentne brzine čestice:

$$v_{uk} = v + v_{EOF} = \mu_{ep}E + \mu_{EOF}E = \left(\frac{q}{6\pi r} + \frac{\zeta}{4\pi\epsilon} \right) \cdot \frac{E}{\eta} \quad (6)$$

Iz jednadžbe je vidljivo da neutralne vrste migriraju isključivo uslijed EOF-a, dok nabijeni analiti doživljavaju kombinirane učinke elektroforetske pokretljivosti i EOF-a. Ova spoznaja olakšava analizu neutralnih spojeva i omogućuje fino podešavanje uvjeta razdvajanja složene smjese analita.

Učinkovitost razdvajanja u CE, kao i kod kromatografskih tehnika, kvantificira se brojem teorijskih tavana (N) koji se može izračunati prema sljedećoj jednadžbi:

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t}{w_h} \right)^2 \quad (7)$$

gdje su t migracijsko vrijeme analita, a w i w_h širine elektroforetskog vrha pri baznoj liniji, odnosno na polovici njegove visine. Također, vrijedi i sljedeća jednadžba:

$$N = \frac{L}{HETP} \quad (8)$$

gdje je L duljina kapilare, a $HETP$ duljina ekvivalentna jednom teorijskom tavanu (engl. *height equivalent to a theoretical plate*).

U CE tehnici nerijetko se opažaju značajno veći brojevi teorijskih tavana u odnosu na kromatografske tehnike – u nekim slučajevima i milijun teorijskih tavana po jednom metru duljine kapilare (42).

U idealnom slučaju, prilikom injektiranja uzorka, širina zone analita je zanemariva. Migracijom pak dolazi do širenja zone analita uslijed longitudinalne difuzije prema Gaussovoj raspodjeli. Standardna devijacija tako dobivene krivulje (σ) odgovara upravo w_h . Takva vremenska standardna devijacija može se pretvoriti u prostornu množenjem s ukupnom brzinom migracije analita koja pak ovisi o koeficijentu difuzije (D) prema sljedećoj jednadžbi:

$$\sigma^2 = 2D \cdot t \quad (9)$$

Pokazalo se kako se prethodno spomenuta vrijednost $HETP$ može izraziti i kao:

$$HETP = \frac{\sigma^2}{L} \quad (10)$$

Kombinirajući jednadžbe (6), (8), (9) i (10) dobiva se:

$$N = \frac{L \cdot (\mu_{ep} + \mu_{EOF}) \cdot E}{2D} = \frac{V \cdot (\mu_{ep} + \mu_{EOF})}{2D} \quad (11)$$

O jednadžbi (11) detaljnije su raspravljali Jorgenson i Lukacz (41). Iz nje je bitno uočiti da, pomalo iznenađujuće, broj teorijskih tavana ne ovisi o migracijskom vremenu analita ili duljini kapilare, već samo o μ , D i V . Kako su μ i D karakteristični za određeni analit i eksperimentalni postav, nije ih jednostavno mijenjati. Iz toga proizlazi da se broj teorijskih tavana može povećati samo povećanjem napona razdvajanja. Ipak, kako će biti opisano

kasnije, povećanje napona razdvajanja povećava i doprinose drugih uzroka širenja zone analita, pretežno toplinskih, te je stoga u CE tehnici potrebna pažljiva optimizacija svih parametara metode.

1.2.2. Faktori koji utječu na učinkovitost CE

Proširenje zone analita nastaje iz više razloga, uključujući već spomenutu longitudinalnu difuziju, Jouleovo zagrijavanje, adsorpciju, elektrodispersiju, injektiranje, širinu detekcijskog prozora i druge manje učinke. Tako se, uz prethodnu pretpostavku da se radi o Gaussovima krivuljama, ukupno širenje zone analita može izraziti ukupnom varijancom (σ^2) kojoj doprinose pojedinačni spomenuti učinci:

$$\sigma_{uk}^2 = \sigma_D^2 + \sigma_f^2 + \sigma_A^2 + \sigma_{ED}^2 + \sigma_I^2 + \sigma_W^2 + \sigma_{ostali}^2 \quad (12)$$

Svi se ovi učinci mogu više ili manje kontrolirati dizajnom CE instrumenta, ali je njihovo potpuno uklanjanje gotovo nemoguće. Zato je bitno razumijeti na koji način svaki od ovih parametara utječe na širenje elektroforetskih vršaka te posljedično razlučivost analita i osjetljivost analitičke metode.

1.2.2.1. Adsorpcija

Na elektroforetsku migraciju utječu ne samo difuzijski i toplinski učinci, već i perturbacije koje proizlaze iz interakcija analita i unutarnje stijenke kapilare. Posljedično, otopljene se tvari mogu adsorbirati na stijenke kapilare slabo i reverzibilno, ali i ireverzibilno. U najgorem slučaju, analit može biti u potpunosti imobiliziran na unutarnjoj stijenci kapilare. Ipak, u većini slučajeva, adsorpcija je djelomična te se opaža proširenjem ili asimetričnošću elektroforetskog vrha. Već je iz razvoja kromatografskih tehnika poznato da površine od silicijevog dioksida snažno vežu biomolekule, primjerice proteine. Iako su istraživane razne kemijske modifikacije silanolnih skupina kako bi se suzbila adsorpcija, njeno potpuno uklanjanje još je nedostižno. U slučaju kada koeficijent distribucije (K) ne ovisi o koncentraciji analita, govorimo o linearnim adsorpcijskim izotermama. Ipak, češća je situacija da K opada s koncentracijom analita te se opažaju nelinearne adsorpcijske izoterme. U tom slučaju, desorpcija analita nije dovoljno brza, nema ustaljenog stanja te dio

adsorbiranog analita zaostaje za glavnom što uzrokuje *tailing* elektroforetskog vrha. Liu i suradnici izveli su jednadžbu za varijancu elektroforetskog vrha uslijed adsorpcije koja glasi (43):

$$\sigma_A^2 = \frac{2c_f \cdot (1 - c_f)^2 \cdot (\mu_{ep} + \mu_{EOF}) \cdot r_u \cdot L \cdot N}{Z \cdot \alpha} \quad (13)$$

gdje je c_f koncentracija slobodne frakcije analita, r_u unutarnji polumjer kapilare, N broj molekula analita u kapilari po jedinici volumena, Z broj molekula analita koji kolidiraju s površinom kapilare u jedinici vremena i α udio molekula koje prilikom kolizije adhereiraju na površini kapilare.

Adsorpcija analita može se drastično smanjiti odabirom radnog pufera pri kojemu su analit i silanolne skupine jednakog predznaka naboja, zbog čega se za adsorpciju mora prevladati odbojna Coulombova sila. Hjertén u svom radu razvija način procjene utjecaja adsorpcije na ukupno širenje elektroforetskog vrha koristeći sljedeću jednadžbu (44):

$$HETP = \frac{2D}{\mu_{ep}} \cdot \frac{1}{E} + \frac{\Delta x_0^2}{12L} \quad (14)$$

gdje je Δx_0 širina zone analita prilikom injektiranja. Naime, ukoliko je graf ovisnosti *HETP* o recipročnoj vrijednosti jakosti električnog polja $1/E$ prema jednadžbi (14) linearan pri malim vrijednostima E , adsorpcija analita je zanemariva te se ujedno može procijeniti i Δx_0 . U praktičnom smislu, utjecaj adsorpcije analita može se ispitati propuštanjem analita kroz detektor te promjenom polariteta napona razdvajanja pri čemu analit još jednom prođe kroz detektor. Usporedbom oblika i površina elektroforetskih vrhova, tako se može odrediti dolazi li do adsorpcije analita te ako dolazi, izračunati u kojoj mjeri.

1.2.2.2. Jouleovo zagrijavanje

Električna snaga (P) nekog sustava predstavlja utrošak energije da se određena količina naboja prenese s mjesta jednog električnog potencijala na mjesto drugog električnog potencijala u jedinici vremena, a može se iskazati kao:

$$P = U \cdot I = R \cdot I^2 \quad (15)$$

Međutim, protokom električne struje kroz bilo kakav vodič, neizbježno dolazi do djelomične pretvorbe električne energije u toplinsku što se naziva Jouleovim zagrijavanjem. Kao posljedica toga, u samoj kapilari tijekom analize dolazi do značajnog povećanja temperature. Iz jednadžbe (3) te činjenice da su μ_{ep} i η obrnuto proporcionalni slijedi:

$$\mu_{EOF} = C \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (16)$$

Temperaturu unutar kapilare moguće je odrediti mjereći elektroosmotsku mobilnost pri dva različita napona razdvajanja, od čega je poželjno da je jedan napon vrlo mali. Koristeći jednadžbu (16) za dva različita napona razdvajanja vrijedi:

$$\frac{\mu_{EOF_1}}{\mu_{EOF_2}} = e^{-\frac{E_a}{RT_1} + \frac{E_a}{RT_2}} \quad (17)$$

Empirijski je pak određeno da za snagu manju od 3 W, ovisnost temperature kapilare o snazi pri sobnoj temperaturi T_s dobro opisuje jednadžba:

$$T = 11,5 \cdot P + T_s \quad (18)$$

Ukupna generirana toplina uslijed Jouleovog zagrijavanja po jedinici volumena (Q) može se izraziti kao (42):

$$Q = E^2 \cdot \Lambda \cdot c \cdot \varphi \quad (19)$$

gdje je E jakost električnog polja, Λ toplinska provodnost elektrolita, c koncentracija elektrolita i φ ukupna poroznost medija (koja iznosi 1 za šuplju kapilaru). Budući da je temperatura unutar kapilare uvijek veća od sobne temperature, toplina se odvodi iz nje kondukcijom kroz elektroforetski pufer te kondukcijom, konvekcijom i radijacijom iz elektroforetskog pufera u stijenku kapilare te potom u okolni zrak. Time se stvara temperaturni gradijent između središta kapilare i okolnog zraka. Taj toplinski gradijent ima paraboličan oblik kroz kapilaru te logaritamski oblik u stijenci kapilare i okolnom zraku. Temperaturna razlika ΔT između središta i stijenske kapilare može se izraziti kao:

$$\Delta T = \frac{Q \cdot d_u^2}{16K} \quad (20)$$

gdje je d_u unutarnji promjer kapilare, a K toplinska provodnost elektroforetskog pufera. Ta je razlika za tipične elektroforetske uvjete reda veličine nekoliko desetinki °C. S druge strane, temperaturna razlika kroz stijenku kapilare izražava se kao:

$$\Delta T = \frac{Q \cdot d_u^2}{8K_s} \cdot \ln\left(\frac{d_u}{d_v}\right) \quad (21)$$

gdje je K_s toplinska provodnost stijenke kapilare, a d_v vanjski promjer kapilare. Kako je toplinska provodnost silicijevog dioksida veća od vode, temperaturna razlika kroz stijenku kapilare obično je manja od temperaturne razlike između središta i stijenke kapilare. Ipak, budući da je toplinska provodnost zraka značajno manja od silicijevog dioksida i vode, odvodnja topline s vanjske stijenke kapilare u okolni zrak ograničavajući je faktor odvodnje topline iz kapilare općenito. Toplina se s vanjske stijenke kapilare u okolni zrak dominantno odvodi konvekcijom te stoga dizajn CE instrumenta s ventilatorom koji relativno velikom brzinom upuhuje zrak na kapilaru značajno poboljšava odvodnju topline.

Kako temperatura unutar kapilare utječe na viskoznost, a viskoznost utječe na elektroforetsku pokretljivost, jasno je kako će uslijed temperaturnog gradijenta kroz kapilaru isti analit imati različite migracijske brzine te će stoga doći do značajnog širenja elektroforetskog vrha i smanjenja broja teorijskih tavana. Iz svega navedenog, jasno je kako je potrebno minimizirati Jouleovo zagrijavanje te temperaturni gradijent kroz kapilaru. Iz jednadžbe (19) vidljivo je kako je ukupna generirana toplina proporcionalna (kvadratu) jakosti električnog polja, toplinskoj provodnosti otopine elektrolita i koncentraciji elektrolita. Stoga će smanjenje primijenjenog napona razdvajanja te korištenje elektrolita manje toplinske provodnosti najviše smanjiti Jouleovo zagrijavanje. Takvi su elektroliti borat i fosfat te su stoga oni često puferi odabira u CE tehnicima. Iz jednadžbi (20) i (21) vidljivo je kako se temperaturni gradijent pak može minimizirati odabirom kapilara manjih unutarnjih promjera. Treba uzeti u obzir i da u slučaju da zona analita nije otopljen u elektroforetskom puferu (što je slučaj kod *stacking* i *sweeping online* ukoncentriravanja uzorka), jakost električnog polja kroz kapilaru nije uniformna te se zona analita može toliko zagrijati da u ekstremnim slučajevima i zavrije.

1.2.2.3. Elektroforetska disperzija

Elektroforetska disperzija, ili jednostavnije elektrod disperzija, predstavlja jedan od ključnih fenomena koji određuju granice učinkovitosti razdvajanja u CE tehnici. Njezino razumijevanje nužan je preduvjet za razvoj reproducibilnih i učinkovitih elektroforetskih metoda. Riječ je o obliku disperzije koji proizlazi iz interakcija između lokalnih varijacija vodljivosti, ionske mobilnosti i jakosti električnog polja, odnosno iz inherentne nelinearnosti elektrokinetičkih procesa kada zona uzorka ulazi u područje pufera i miješa se s njegovim sastavnicama. Osnovni uzrok elektrod disperzije je razlika u specifičnoj vodljivosti (κ) između uzorka i pufera te omjer koncentracija analita i puferskog koiona (c_a/c_p), pri čemu oba faktora proizlaze iz razlika u mobilnostima analita i puferskih koiona. Budući da ionska mobilnost izravno određuje doprinos pojedinog iona ukupnoj vodljivosti sustava, svaka promjena sastava u zoni uzorka dovodi do lokalnog redistribuiranja električnog polja. Električno polje se povećava u regijama s nižom vodljivošću, dok se smanjuje u regijama s većom vodljivošću, stvarajući tako diferencijalne migracijske brzine unutar iste analitičke zone. Ovo mehanističko objašnjenje temelj je razumijevanja asimetrije elektroforetskih vrhova. Naime, ako je mobilnost analita manja od mobilnosti koiona pufera ($\mu_a < \mu_p$), električno polje u zoni uzorka bit će jače nego u puferu, što dovodi do zaoštavanja prednjeg ruba i progresivnog širenja stražnjeg dijela zone. Elektroforetski vrh tako pokazuje izraženi *tailing*, pri čemu se stražnji rub širi s vremenom, a visina vrha značajno opada zbog redistribucije mase. Obrnuto, kada je mobilnost analita veća od mobilnosti koiona pufera ($\mu_a > \mu_p$), električno polje u zoni uzorka opada pa analit pri ulasku u frontalni pufer biva ubrzan, dok se stražnji rub stabilizira. Rezultat je elektroforetski vrh s izraženom *fronting* asimetrijom. Samo u slučaju kada su mobilnosti jednake ($\mu_a = \mu_p$) električno polje ostaje homogeno pa se u tom slučaju može govoriti o idealnim uvjetima migracije bez elektrod disperzijskog doprinosa. Elektrod disperzija je izrazito koncentracijski ovisna. Mikkers i suradnici pokazali su da širenje vrha uslijed elektrod disperzije postaje značajno kada omjer koncentracije analita i koiona pufera c_a/c_p premaši približno 0,01 (45). Ispod te vrijednosti dominira difuzijsko širenje, a iznad nje dolazi do preopterećenja elektrolitskog sustava i pojave izražene elektrod disperzije.

Ovo jasno demonstrira da elektrodispersija ne samo da određuje oblik i simetriju vrhova, nego i izravno uvjetuje razlučivost između analita. Jedan od najkritičnijih aspekata elektrodispersije odnosi se na fenomene na granici između zone uzorka i zone pufera. Pretpostavka o isključivo elektrodispersijskom širenju često ne vrijedi u prvim trenucima migracije jer se uzorak pri injektiranju gotovo uvijek nalazi ili u čistoj vodi ili u elektrolitu različite vodljivosti od separacijskog pufera. Zbog toga se na granici između zona formiraju gradijenti vodljivosti i koncentracije, što dovodi do razrjeđenja ili ukoncentriravanja uzorka, ovisno o odnosu vodljivosti i mobilnosti analita i puferskog koiona (Tablica 3).

Tablica 3. Mogući scenariji na granici zone uzorka i pufera pri različitim odnosima vodljivosti (κ) i elektroforetskih mobilnosti (μ) analita i puferskog koiona. Prilagođeno prema (46).

	$\kappa_a > \kappa_p$	$\kappa_a = \kappa_p$	$\kappa_a < \kappa_p$
$\mu_a > \mu_p$	Razrjeđenje uzorka <i>Tailing</i> vrha	<i>Tailing</i> vrha	Ukoncentriravanje uzorka <i>Tailing</i> vrha
$\mu_a = \mu_p$	Razrjeđenje uzorka	Bez učinka	Ukoncentriravanje uzorka
$\mu_a < \mu_p$	Razrjeđenje uzorka <i>Fronting</i> vrha	<i>Fronting</i> vrha	Ukoncentriravanje uzorka <i>Fronting</i> vrha

Vidljivo je kako u slučaju $\kappa_a < \kappa_p$ dolazi do ukoncentriravanja uzorka te se taj fenomen često namjerno koristi za poboljšanje osjetljivosti metode, a ta se tehnika ukoncentriravanja naziva *stacking*. S druge strane, uputno je odabrati elektroforetski pufer veće vodljivosti od analita kako ne bi došlo do razrjeđenja analita tijekom elektroforeze.

U praksi, to znači da elektrodispersija ne djeluje isključivo tijekom migracije nego i u ranim fazama nakon injektiranja, pri čemu je početna distorzija često presudna za konačni oblik elektroforetskog vrha. Ovaj fenomen treba promatrati u širem kontekstu ukupne disperzije, gdje elektrodispersija čini samo jedan od članova ukupne varijance zone.

1.2.2.4. Širenje prilikom injektiranja uzorka

Širenje zone uzorka prilikom samog injektiranja najvažniji je ekstrinzični faktor koji doprinosi širenju elektroforetskog vrha. U slučaju da se uzorak u kapilari injektira pravokutno pulsno, varijancu elektroforetskog vrha povezanu s injektiranjem opisuje sljedeća jednačba:

$$\sigma_I^2 = \frac{L^2}{12} \quad (22)$$

Vinther i Sørenberg tako su procijenili da u slučaju hidrodinamičkog injektiranja u trajanju od 0,2 sekunde, doprinos σ_I^2 ukupnoj σ^2 iznosi oko 1 %, dok prilikom injektiranja u trajanju od 15 sekundi, taj doprinos iznosi oko 98 % (47). U takvim su slučajevima nužne tehnike *online* ukoncentriravanja uzorka kako bi se smanjila širina elektroforetskog vrha.

Konačno, uzimajući u obzir sve uzroke disperzije elektroforetskog vrha, Liu i suradnici izveli su sljedeću jednačbu za duljinu ekvivalentnu teorijskom tavanu (43):

$$HETP = \frac{L^2}{12} + \frac{2D}{(\mu_{ep} + \mu_{EOF}) \cdot E} + \frac{c_f \cdot (1 - c_f)^2 \cdot (\mu_{ep} + \mu_{EOF}) \cdot r_u \cdot E \cdot N}{Z \cdot \alpha} + \frac{\delta^2 \cdot \kappa^2 \cdot \mu_{ep}^2}{K^2 \cdot D} \cdot \left(K_1 \cdot \frac{E^5 \cdot r_u^6}{(\mu_{ep} + \mu_{EOF})} + K_2 \cdot \frac{E^6 \cdot r_u^8}{L \cdot D} \right) \quad (23)$$

gdje je L duljina kapilare, D difuzijski koeficijent, E jakost primijenjenog električnog polja, c_f koncentracija slobodne frakcije analita uslijed adsorpcije, r_u unutarnji polumjer kapilare, N broj molekula analita u kapilari po jedinici volumena, Z broj molekula analita koji kolidiraju s površinom kapilare u jedinici vremena, α udio molekula koje prilikom kolizije adhereiraju na površini kapilare, δ temperaturni koeficijent mobilnosti analita, κ specifična vodljivost elektrolita, K toplinska vodljivost elektrolita, K_1 konstanta koja iznosi $6,5 \cdot 10^{-4}$, a K_2 konstanta koja iznosi $4,34 \cdot 10^{-5}$. Pri stabilnim elektroforetskim uvjetima, jednačba (23) može se zapisati kao:

$$HETP = A + \frac{B}{E} + C \cdot E + G_1 \cdot E^5 + G_2 \cdot E^6 \quad (24)$$

Na temelju jednadžbe (24) može se uočiti da duljina ekvivalentna teorijskom tavanu u CE tehnici predstavlja superpoziciju više fizikalno različitih doprinosa disperziji elektroforetskog vrha, pri čemu relativni značaj pojedinog člana snažno ovisi o primijenjenoj jakosti električnog polja. Član A opisuje doprinose disperziji koji su neovisni o električnom polju te obuhvaćaju geometrijske i instrumentalne izvore proširenja vrha, uključujući ograničenja sustava injektiranja i detekcije. Iako se u idealiziranim teorijskim razmatranjima često zanemaruju, ovi doprinosi postaju značajni u praktičnim eksperimentalnim uvjetima, osobito pri radu s vrlo uskim vrhovima i kratkim migracijskim vremenima. Član B/E predstavlja doprinos longitudinalne difuzije, koja proizlazi iz Brownovog gibanja analita tijekom migracije kroz kapilaru. Budući da je ovaj doprinos obrnuto proporcionalan jakosti električnog polja, njegov utjecaj dominira pri niskim vrijednostima E , gdje su migracijska vremena duga, a difuzijski procesi imaju dovoljno vremena za izraženo širenje elektroforetskog vrha. Povećanjem jakosti električnog polja, trajanje migracije se smanjuje, čime se longitudinalna difuzija učinkovito suzbija, što predstavlja jednu od temeljnih prednosti CE u odnosu na kromatografske tehnike. Suprotno tome, član $C \cdot E$ opisuje disperziju povezanu s kinetički ograničenim procesima, prije svega adsorpcijom analita na stijenku kapilare i njegovom naknadnom desorpcijom. Ovaj doprinos raste s porastom električnog polja jer povećana elektroforetska brzina rezultira većom frekvencijom sudara molekula analita sa stijenkom kapilare. Parametri c_f , Z i α u jednadžbi (23) dodatno naglašavaju ulogu ravnoteže između slobodne i adsorbirane frakcije analita, pri čemu čak i slaba, ali kinetički spora interakcija sa stijenkom može dovesti do značajnog proširenja vrha. Ovaj efekt je osobito izražen kod polarnijih analita ili u sustavima s nedovoljno pasiviranom površinom kapilare. Najizraženiji doprinosi pri velikim vrijednostima električnog polja opisani su članovima $G_1 \cdot E^5$ i $G_2 \cdot E^6$, koji su izravna posljedica Jouleovog zagrijavanja elektrolita. Povećanjem jakosti električnog polja dolazi do porasta disipacije električne energije unutar kapilare, što uzrokuje radijalne temperaturne gradijente. Budući da su elektroforetska mobilnost i viskoznost elektrolita funkcije temperature, takvi gradijenti dovode do radijalno nehomogenih brzina migracije analita, čime se generira dodatna disperzija. Veliki red ovisnosti o E jasno pokazuje da

Jouleovo zagrijavanje predstavlja dominantno ograničenje pri primjeni vrlo visokih električnih polja, osobito u kapilarama većeg unutarnjeg promjera ili pri uporabi vrlo vodljivih elektrolita. Takav oblik jednadžbe (24) izravno uspostavlja formalnu analogiju s Van Deemterovom jednadžbom u kromatografskim tehnikama, pri čemu se pojedini članovi mogu interpretirati kao elektroforetski ekvivalenti difuzije, kinetičkih ograničenja i toplinskih efekata. Međutim, za razliku od kromatografije, gdje je optimalna brzina mobilne faze ograničena prijenosom mase između mobilne i stacionarne faze, u CE dominantna ograničenja pri velikim brzinama migracije proizlaze iz elektrotermičkih efekata. Posljedično, optimalna vrijednost *HETP* u CE ne predstavlja isključivo kompromis između difuzije i kinetike, već i kompromis između elektroforetske učinkovitosti i termalne stabilnosti sustava. Zaključno, jednadžba (24) pruža sveobuhvatan teorijski okvir za razumijevanje i kvantitativnu analizu učinkovitosti kapilarne elektroforeze te jasno pokazuje da maksimizacija razlučivosti zahtijeva pažljivu optimizaciju jakosti električnog polja, geometrije kapilare i sastava elektrolita. Ovakav pristup omogućuje racionalan dizajn elektroforetskih sustava, osobito u zahtjevnim primjenama poput CE-MS i MEKC-MS, gdje se istodobno moraju zadovoljiti kriteriji velike učinkovitosti razdvajanja i stabilnosti ionskog izvora, kao što će biti opisano kasnije.

1.3. Micelarna elektrokinetička kromatografija

Micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *micellar electrokinetic chromatography*, MEKC) predstavlja jednu od najznačajnijih modifikacija kapilarne elektroforeze, razvijenu s ciljem proširenja primjenjivosti CE tehnike na neutralne i hidrofobne spojeve. Uvođenjem micelarne pseudostacionarne faze u elektroforetski pufer, MEKC omogućuje kombinaciju elektroforetskog i kromatografskog mehanizma razdvajanja, čime se postiže selektivnost nedostupna klasičnoj CZE tehnici. Ova karakteristika čini MEKC osobito prikladnom tehnikom za analizu lijekova koji, zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava, ne pokazuju zadovoljavajuće razdvajanje u standardnim CE sustavima.

1.3.1. Osnovni princip razdvajanja

U MEKC sustavima, dodatkom surfaktanata u koncentracijama većim od CMC dolazi do spontanog formiranja micela u vodenoj otopini. Takve se micelle u električnom polju

ponašaju kao pseudostacionarna faza, dok vodena faza elektroforetskog pufera predstavlja mobilnu fazu. Razdvajanje analita u MEKC-u temelji se na njihovoj različitoj raspodjeli između micelarne i vodene faze. Hidrofobni analiti pokazuju veći afinitet prema micelama te se zadržavaju dulje, dok polarni analiti pretežno migriraju s EOF-om. Migracijsko vrijeme analita stoga ovisi o ravnoteži između njegove vlastite elektroforetske pokretljivosti, brzine EOF-a i stupnja interakcije s micelarnom fazom, što rezultira kromatografskim mehanizmom analognim tekućinskoj kromatografiji s obrnutom fazom, ali implementiranim unutar elektroforetskog okvira. Za razliku od klasične kromatografije, u MEKC sustavima ne dolazi do fiksne interakcije analita sa stacionarnom fazom, već do dinamičke raspodjele između faza, što omogućuje brzu uspostavu ravnoteže i veliku učinkovitost razdvajanja. Ovaj mehanizam osobito je pogodan za razdvajanje strukturno srodnih spojeva, kod kojih su razlike u elektroforetskoj pokretljivosti male, ali su razlike u hidrofobnosti izraženije.

Kako je razdvajanje u MEKC-u posljedica dinamičke raspodjele analita između vodene i micelarne faze, migracijsko ponašanje analita može se opisati u terminima ravnotežne raspodjele između dviju faza koje se gibaju različitim efektivnim brzinama u električnom polju. U svakom trenutku analit se nalazi u jednoj od dviju populacija – slobodnoj ili micelarnoj frakciji. Slobodna frakcija migrira zajedno s EOF-om i inherentnom elektroforetskom pokretljivošću analita, dok je gibanje micelarne frakcije određeno elektroforetskom pokretljivošću micela. Ukupna brzina migracije analita stoga predstavlja vremenski uprosječenu vrijednost doprinosa obje faze, što se može izraziti kao:

$$v_{uk} = f_{ep} \cdot v_{ep} + f_{mc} \cdot v_{mc} \quad (25)$$

gdje su f_{ep} i f_{mc} udjeli vremena koje analit provede u slobodnoj frakciji, odnosno u micelarnoj fazi, pri čemu vrijedi $f_{ep} + f_{mc} = 1$. Kako su brzine migracije proporcionalne elektroforetskim pokretljivostima, može se zapisati i:

$$\mu_{uk} = f_{ep} \cdot \mu_{ep} + f_{mc} \cdot \mu_{mc} \quad (26)$$

Uz pretpostavku brze uspostave ravnoteže raspodjele, omjer analita u micelarnoj i puferskoj fazi može se opisati ravnotežnim koeficijentom raspodjele:

$$K = \frac{c_{mc}}{c_{ep}} \quad (27)$$

gdje su c_{mc} i c_{ep} ravnotežne koncentracije analita u micelarnoj fazi, odnosno u elektroforetskom puferu. U skladu s kromatografskom teorijom, faktor zadržavanja u MEKC-u definira se kao omjer količine analita u micelarnoj fazi i količine analita u vodenoj fazi:

$$k' = \frac{n_{mc}}{n_{ep}} = \frac{c_{mc} \cdot V_{mc}}{c_{ep} \cdot V_{ep}} \quad (28)$$

Budući da je volumen micelarne faze u MEKC-u znatno manji od volumena elektroforetskog pufera, faktor zadržavanja u ovom kontekstu predstavlja mjeru afiniteta analita prema micelama, a ne geometrijski omjer faza, kao u klasičnoj kromatografiji. Uvođenjem faktora zadržavanja, moguće je izraziti f_{ep} i f_{mc} kao:

$$f_{ep} = \frac{1}{1 + k'} \quad \text{i} \quad f_{mc} = \frac{k'}{1 + k'} \quad (29)$$

Uvrštavanjem jednadžbe (29) u jednadžbu (26) dobiva se (48):

$$\mu_{uk} = \frac{1}{1 + k'} \cdot \mu_{ep} + \frac{k'}{1 + k'} \cdot \mu_{mc} \quad (30)$$

čime se jasno pokazuje da je faktor zadržavanja ključni parametar koji povezuje fizikalni mehanizam razdvajanja s eksperimentalno mjerljivim migracijskim vremenima. Budući da se migracijsko vrijeme analita nalazi između migracijskog vremena EOF-a (t_{EOF}) i migracijskog vremena micelarne faze (t_{mc}), faktor zadržavanja može se izravno izraziti pomoću migracijskih vremena, što dovodi do izraza:

$$k' = \frac{t - t_{EOF}}{t_{EOF} \cdot \left(1 - \frac{t}{t_{mc}}\right)} \quad (31)$$

Ovaj izraz pokazuje da se MEKC ponaša kao kromatografski sustav s ograničenim elucijskim prozorom koji je određen vremenima t_{EOF} i t_{mc} . U graničnom slučaju kada t_{mc} teži beskonačnosti faktor zadržavanja poprima oblik identičan onome u tekućinskoj kromatografiji, čime se dodatno potvrđuje formalna analogija između MEKC-a i kromatografskih tehnika.

Budući da se u MEKC-u razdvajanje analita efektivno događa samo između vremena t_{EOF} i t_{mc} , može se definirati i kapacitet elektroforetskih vrhova kao:

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \ln \frac{t_{mc}}{t_{EOF}} \quad (32)$$

Uvrštavanjem jednadžbe (31) u klasičnu jednadžbu za izračun razlučivosti dobiva se izraz za izračun razlučivosti u MEKC tehnici (49):

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k'_2}{1 + k'_2} \cdot \frac{1 - \frac{t_{EOF}}{t_{mc}}}{1 + \frac{t_{EOF}}{t_{mc}} \cdot k'_1} \quad (33)$$

Iz jednadžbe (33) vidljivo je da razlučivost snažno ovisi o omjeru $\frac{t_{EOF}}{t_{mc}}$ te je isti poželjno smanjiti. U praktičnom smislu, navedeni omjer može se smanjiti smanjenjem jakosti EOF-a, primjerice dodatkom organskog modifikatora u elektroforetski pufer, uzimajući u obzir rizike koji će biti opisani kasnije.

1.3.2. Surfaktanti i njihova uloga u MEKC-u

Odabir surfaktanta u MEKC-u ključna je odrednica fizikalno-kemijskih karakteristika micelarne pseudostacionarne faze i konceptualno je analogan izboru stacionarne faze u kromatografskim tehnikama. Ipak, za razliku od kromatografskih tehnika, promjena micelarne faze u MEKC-u jednostavno se postiže ispiranjem kapilare elektroforetskim puferom koji sadrži drugi surfaktant, što tehniku čini vrlo fleksibilnom. Dobro je opisano kako anionski micelarni sustavi poput SDS-a pokazuju kromatografsko ponašanje usporedivo s ponašanjem stacionarnih faza modificiranih oktadecilnim (C18) skupinama, posebno za spojeve umjereno topljive u vodi (50). Zbog toga je SDS jedan od najčešće korištenih surfaktanata u MEKC-u. Naime, pokazalo se kako surfaktanti s kraćim alkilnim lancima, primjerice decilsulfat, pokazuju manju učinkovitost razdvajanja analita, dok surfaktanti s duljim alkilnim lancima pokazuju manju topljivost u vodenim elektroforetskim puferima što ograničava njihovu upotrebu.

S druge strane, kationski su se surfaktanti poput cetiltrimetilamonijevog klorida (CTAC) pokazali povoljniji za razdvajanje većih ili hidrofobnijih analita s ograničenom topljivošću u

uobičajenim elektroforetskim puferima. Treba uzeti u obzir i da se CTAC snažno adsorbira na stijenku kapilare što dovodi do promjene predznaka površinskog naboja, odnosno posljedično smjera EOF-a.

Neionski surfaktanti kao što su oktilglukozid, sorbitani, polisorbati i esteri glicerola te zwitterionski surfaktanti kao što su sulfobetaini ili CHAPS, minimalno utječu na jakost i smjer EOF-a te ne povećavaju znatno vodljivost pufera, čime se smanjuje Jouleovo zagrijavanje (51). Ovi surfaktanti zadržavaju stabilnost micela i omogućuju kontrolu faktora zadržavanja bez dodatne elektroosmotske interferencije, što je ključno pri radu s biomolekulama, uključujući membranske proteine, gdje se očuvanje konformacije analita odražava na reproducibilnost migracijskih vremena. Žučne soli predstavljaju jedinstvenu klasu surfaktanata s krutim steroidnim kosturom. Njihova sposobnost formiranja stabilnih micela u prisutnosti organskih modifikatora omogućuje povećanje t_{mc} za hidrofobne analite, čime se proširuje spektar primjenjivosti MEKC-a (52,53). Njihova inherentna kiralnost dodatno omogućuje kontrolu selektivnosti i razlučivosti u enantioseparacijama, a faktor zadržavanja se može fino podešavati kombinacijom žučnih soli s drugim surfaktantima u miješanim sustavima (54).

S druge strane, uspješna sprega micelarne elektrokinetičke kromatografije i spektrometrije masa (MEKC-MS) zahtijeva pažljiv odabir pseudostacionarne faze koja mora zadovoljiti dva često kontradiktorna uvjeta: učinkovito razdvajanje analita unutar kapilare i kompatibilnost s procesom ionizacije u MS izvoru. Klasični surfaktanti, poput SDS-a, unatoč izvrsnim kromatografskim svojstvima, smatraju se nekompatibilnima s MS instrumentima. Naime, zbog svoje nehlapljivosti, SDS kristalizira u ionskom izvoru, uzrokujući fizičko onečišćenje kapilara i emitera, ali i ekstremnu supresiju ionizacije analita uslijed kompeticije za naboj u kapljicama stvorenim elektroraspršenjem (55). Kako bi se ovi problemi riješili, istraživanja su se usmjerila prema primjeni hlapljivih surfaktanata, među kojima su se kao najučinkovitiji pokazali perfluorirani derivati alkanskih karboksilnih kiselina, prvenstveno pentadekafluoroktanska kiselina (engl. *pentadecafluorooctanoic acid*, PFOA), odnosno njena amonijeva sol (engl. *ammonium pentadecafluorooctanoate*, APFO) (56,57). APFO je

anionski surfaktant koji u vodenim otopinama formira micelle pri CMC od približno 25-30 mM pri sobnoj temperaturi (58,59). Za razliku od ugljikovodičnih surfaktanata, perfluorirani lanci APFO-a pokazuju istovremeno hidrofobna i lipofobna svojstva, što rezultira jedinstvenom selektivnošću razdvajanja. U MEKC-MS sustavima, APFO omogućuje razdvajanje širokog spektra hidrofobnih analita koji bi u sustavima sa SDS-om imali prevelike faktore zadržavanja (k), što bi dovelo do pretjerano dugih vremena analize ili nepotpunog eluiranja iz micelnog sustava (60). Ključna prednost APFO-a leži u njegovoj termičkoj labilnosti i hlapljivosti unutar ESI izvora. Tijekom procesa desolvacije, pri povišenim temperaturama plina za sušenje, APFO se raspada na hlapljive fragmente koji se učinkovito uklanjaju vakuumskim sustavom spektrometra masa. Time se drastično smanjuje pozadinski šum i omogućuje određivanje analita u vrlo malim koncentracijama (61). Ipak, primjena velikih koncentracija APFO-a može dovesti do stvaranja klastera koji su vidljivi u spektru masa, stoga je optimizacija njegove koncentracije u elektroforetskom puferu kritičan parametar metode (57). U analitici lijekova, MEKC sustavi često zahtijevaju dodatak znatnih udjela organskih otapala kako bi se osigurala topljivost analita i modificirao EOF. Dodatak organskog otapala značajno povišuje CMC vrijednost APFO-a i mijenja veličinu i agregacijski broj micela. Primjerice, pri volumnim udjelima metanola iznad 30 %, struktura micela se mijenja, što izravno utječe na kromatografsku selektivnost i učinkovitost *sweeping* procesa (62,63). Razumijevanje ove interakcije ključno je za postizanje stabilne električne struje i ponovljivih migracijskih vremena u CE-MS sustavu.

1.3.3. *Sweeping* tehnika ukoncentriravanja uzorka

Unatoč velikoj učinkovitosti razdvajanja koju pruža CE tehnika, njezina primjena u analizi vrlo malih koncentracija analita u složenim biološkim matricama nerijetko je limitirana malim volumenom uzorka i kratkim optičkim putem detekcije ili slabijom ionizacijom u spektrometru masa. Kako bi se prevladala ograničenja u osjetljivosti, razvijene su metode *online* ukoncentriravanja uzorka koje omogućuju injektiranje velikih volumena uzorka bez gubitka razlučivosti. U kontekstu MEKC-a dominantna tehnika ukoncentriravanja neutralnih i hidrofobnih analita je *sweeping* (hrv. pometanje). Koncept *sweepinga*, koji su prvi put

teorijski i eksperimentalno opisali Quirino i Terabe 1998. godine, temelji se na kromatografskom razdvajanju analita između elektroforetskog pufera i pseudostacionarne faze micela koja iz elektroforetskog pufera prodire u zonu uzorka (64,65). Temeljni preduvjet za uspješan *sweeping* je priprema uzorka u otapalu koje ima sličnu ili nižu vodljivost od elektroforetskog pufera, ali bez pseudostacionarne faze, dok se u elektroforetskom puferu surfaktant nalazi u koncentraciji većoj od CMC (66).

Proces ukoncentriravanja započinje primjenom napona razdvajanja, pri čemu micelle iz elektroforetskog pufera migriraju kroz kapilaru brzinom određenom njihovom elektroforetskom pokretljivošću (μ_{mc}) i elektroosmotskim tokom (μ_{EOF}). Budući da je zona uzorka inicijalno slobodna od micela, faktor zadržavanja analita (k) u njoj teži nuli te se neutralni analiti kreću isključivo brzinom EOF-a. Kada fronta micela uđe u zonu uzorka, ona „pomete“ molekule analita. Zbog hidrofobnih interakcija, analiti se naglo raspodjeljuju u unutrašnjost micela, poprimajući efektivnu elektroforetsku pokretljivost karakterističnu za micelarnu fazu. Budući da micelle kontinuirano pristižu iz elektroforetskog pufera i prolaze kroz zonu uzorka, one akumuliraju analite raspršene duž cijele duljine injektirane zone na samu granicu fronte micela. Ovaj proces traje sve dok fronta micela ne prođe kroz cijelu zonu uzorka, nakon čega započinje klasično MEKC razdvajanje.

Stupanj ukoncentriravanja uzorka izravno ovisi o snazi interakcije između analita i micela, što se opisuje faktorom zadržavanja (k). Duljina fokusirane zone analita nakon procesa *sweepinga* (l_{sweep}) može se izračunati koristeći sljedeću jednadžbu (66,67):

$$l_{sweep} = l_i \cdot \frac{1}{1 + k} \quad (34)$$

gdje je l_i duljina injektirane zone. Iz jednadžbe (34) proizlazi da je učinkovitost fokusiranja izravno proporcionalna faktoru zadržavanja k . Zbog toga je kod analita s velikim afinitetom prema micelama moguće injektirati volumene uzorka koji zauzimaju znatan dio kapilare, bez narušavanja učinkovitosti razdvajanja. Uzimajući u obzir jednadžbu (27) te jednake pretpostavke kao i za neutralne analite, može se pokazati da jednadžba (34) vrijedi i za

nabijene analite (68). Povećanje osjetljivosti kvantificira se faktorom povećanja osjetljivosti (engl. *sensitivity enhancement factor*, SEF) koji predstavlja omjer maksimalne visine elektroforetskog vrha dobivene *sweepingom* i one dobivene konvencionalnim hidrodinamičkim injektiranjem. Dodatno, u sustavima gdje postoji razlika u vodljivosti između uzorka i elektroforetskog pufera, *sweeping* se može sinergijski kombinirati s tehnikom sabijanja uzorka pojačanjem polja (engl. *field-amplified sample stacking*, FASS), što dodatno doprinosi sužavanju zone analita (67).

1.4. Kapilarna elektroforeza spregnuta sa spektrometrijom masa

Kao što je opisano u prethodnim poglavljima, CE kao samostalna tehnika nudi iznimnu učinkovitost separacije, minimalnu potrošnju uzorka i prilagodljivu selektivnost. Ipak, njezino šire prihvaćanje povijesno je bilo ograničeno relativno slabom osjetljivošću pri korištenju optičkih detektora, posebno za analite kojima nedostaju snažni kromofori ili fluorofori. Strategije derivatizacije mogu poboljšati detektabilnost, ali povećavaju složenost metode i mogu promijeniti ponašanje analita. Nasuprot tome, MS pruža vrlo osjetljivu, selektivnu i informacijski bogatu detekciju, ali se oslanja na učinkovito spajanje sa separacijskom tehnikom. Sprezanje CE s MS stoga predstavlja logičan i sinergijski razvoj, omogućujući i učinkovito razdvajanje analita i dovoljno osjetljivu i strukturno informativnu detekciju unutar istog analitičkog postupka. Tim se sprežanjem rješavaju i određeni nedostaci LC-MS tehnike. Naime, obrnutofazna LC analite razdvaja prvenstveno na temelju različite hidrofobnosti, dok CE analite razdvaja na temelju različitih elektroforetskih pokretljivosti. Na taj se način mogu analizirati i vrlo polarni mali analiti i vrlo nabijene makromolekule koje ne pokazuju zadržavanje na LC kolonama ili se ne razdvajaju dovoljno učinkovito.

Od svog početnog razvoja, CE-MS se razvio u snažnu analitičku platformu za karakterizaciju malih molekula, metabolita, peptida, proteina i drugih nabijenih ili polarnih analita koje je teško analizirati korištenjem etabliranih separacijskih tehnika poput LC-MS-a.

Ovo poglavlje predstavlja povijesni razvoj, motivaciju i temeljna načela CE-MS. Poseban naglasak stavljen je na izazove pri povezivanju CE i MS, strategija razvijenih za njihovo

prevladavanje i jedinstvene analitičke prednosti CE-MS u usporedbi s drugim spregnutim tehnikama.

1.4.1. Povijesni razvoj CE-MS tehnike

Razvoj CE-MS tehnike usko prati pojedinačne napretke CE i MS tehnika. CE se pojavila kao moderna analitička tehnika krajem 1970-ih i početkom 1980-ih, uvođenjem kvarcnih kapilara i visokonaponskih izvora napajanja koji omogućuju brza i učinkovita razdvajanja analita. Otprilike u isto vrijeme, MS tehnika doživjela je transformaciju pojavom tehnika ionizacije sposobnih za prijenos iona iz otopine u plinovitu fazu. Rani pokušaji povezivanja CE s MS bili su otežani temeljnim nekompatibilnostima između te dvije tehnike. Naime, CE radi pri brzinama protoka reda veličine nanolitara po minuti i zahtijeva vrlo jaka električna polja, dok su rani MS ionski izvori bili dizajnirani za mnogo veće brzine protoka tekućine i bili su osjetljivi na električne smetnje. Izum ionizacije elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionisation*, ESI) krajem 1980-ih predstavljalo je veliki proboj, jer je ESI inherentno kompatibilan s niskim brzinama protoka i može se prilagoditi elektroforetskoj tehnici. Prekretnica se dogodila 1987. godine temeljnim radom Olivaresa, Nguyena, Yonkera i Smitha koji su demonstrirali sprezanje CE i ESI-MS tehnika (69). Naime, ESI omogućuje generiranje iona izravno iz otopine pri atmosferskom tlaku, premošćujući jaz između kraja kapilare i ulaska u vakuumizirani prostor spektrometra masa. Ipak, neriješen je ostao problem zatvaranja strujnog kruga prilikom sprezanja. U samostalnoj CE tehnici, električni krug se zatvara uranjanjem kraja kapilare u bočicu s puferom koja je u kontaktu s uzemljenom elektrodom, dok u CE-MS tehnici kraj kapilare izlazi u otvoreni zrak ionskog izvora. Smithov tim je to riješio razvojem sučelja s obložnom tekućinom (engl. *sheath liquid*) koja je osigurala zatvaranje strujnog kruga, postavljajući temelje za modernu komercijalnu instrumentaciju (70,71). Naknadna istraživanja usredotočila su se na dodatna poboljšanja robusnosti sučelja, električne stabilnosti i osjetljivosti. Ključne prekretnice uključivale su razvoj već spomenutog sučelja s obložnom tekućinom, emitera s poroznim vrhom bez obložne tekućine, a u novije vrijeme i mikroniziranih sučelja. Ove inovacije transformirale su CE-MS iz *proof of concept* tehnike u praktičnu i široko primjenjivu analitičku tehniku. Unatoč tim napretcima, CE-MS je doživio

sporije usvajanje u usporedbi s LC-MS-om. To je dijelom zbog veće tehničke složenosti CE-MS sučelja i percepcije ograničene robusnosti. Međutim, kontinuirana poboljšanja instrumentacije, u kombinaciji s rastućom potražnjom za analizama iznimno velikih razlučivosti vrlo polarnih i nabijenih spojeva, obnovila su interes za CE-MS u više područja primjene.

1.4.2. CE-MS sučelja

Tehnologije različitih CE-MS sučelja kategoriziraju se na temelju načina na koji zatvaraju strujni krug te upravljaju protokom tekućine. Najčešće korišteno te prvo razvijeno sučelje je već spomenuto koaksijalno sučelje s obložnom tekućinom. Strukturno se sastoji od CE kapilare umetnute u veću cijev, odnosno emiter, s trećom vanjskom cijevi koja osigurava plin za raspršivanje. Obložna tekućina, koja je najčešće smjesa vode i organskog otapala s dodatkom hlapljive kiseline ili baze, teče kroz prstenasti prostor između kapilare i emitera. Ona posjeduje dvije ključne funkcije. Prvo, osigurava protok električne struje između metalnog emitera koji je uzemljen i elektroforetskog pufera čime se zatvara strujni krug. Drugo, nativni protok CE tehnike reda je veličine nekoliko desetaka nanolitara po minuti što nije dovoljno za održavanje stabilnog Taylorovog konusa za formiranje elektrospreja u klasičnom ESI izvoru iona. Korištenje obložne tekućine nadopunjuje nativni CE protok do reda veličine nekoliko mikrolitara po minuti što je dovoljno za stabilnu nebulizaciju. Ipak, ova robusnost ima svoju cijenu u smislu značajnog razrjeđivanja nativnog CE protoka što ugrožava osjetljivost. S tim na umu, kod razvoja CE-MS metoda s koaksijalnim sučeljem potrebno je detaljno optimizirati sastav i protok obložne tekućine kao i ostale parametre ionskog izvora MS-a.

Drugo često sučelje u CE-MS tehnici je ono bez obložne tekućine (engl. *sheathless*) koje se zbog svoje najčešće izvedbe ponekad naziva i sučeljem s poroznim vrhom (72). Na ovaj se način zaobilazi razrjeđenje nativnog CE protoka uz alternativne mehanizme zatvaranja strujnog kruga što osigurava da analiti u MS ulaze u svojoj izvornoj CE koncentraciji, maksimizirajući time osjetljivost metode. U ovom dizajnu, krajnji dio kvarcne kapilare kemijski se jetka (obično fluorovodičnom kiselinom) kako bi se smanjila debljina stijenke sve

dok ne postane porozna za male ione, ali ostane nepropusna za tekućinu i velike analite. Taj je porozni dio uronjen u spremnik vodljive tekućine. Porozna stijenka omogućuje protok električne struje do uzemljenog spremnika dok tok uzorka teče nerazrijeđen do vrha kapilare odnosno nano-ESI ionskog izvora. Iako sučelja bez obložne tekućine nude poboljšanja osjetljivosti do par redova veličine u usporedbi s koaksijalnim sučeljem, ona su općenito krhkija i zahtijevaju složeniju predobradu kapilare te strožu kontrolu uvjeta razdvajanja budući da elektroforetski pufer mora biti u potpunosti kompatibilan s procesom ionizacije. Vrlo brzo nakon razvoja koaksijalnog CE-MS sučelja razvijeno je i sučelje s tekućim spojem (engl. *liquid junction*). Ono se izvodi spajanjem CE kapilare i ESI igle na suprotne krajeve čeličnog spoja u obliku slova T. U prazninu između njih se zatim pod tlakom doprema tekućina koja zatvara strujni krug, ali također razrjeđuje nativni CE protok (73–75).

Jedno od recentnijih CE-MS sučelja je ono u kojem se obložna tekućina doprema elektrokinetički umjesto mehanički (76–78). Na taj se način može smanjiti razrjeđenje nativnog CE protoka, ali ga je i dalje teško u potpunosti izbjeći. Ipak, razvojem ovog sučelja i korištenjem najosjetljivijih MS instrumenata, mogu se postići osjetljivosti usporedive sa sučeljem bez obložne tekućine, ali uz značajniju robusnost. Primjerice, nedavno su Amenson-Lamar i suradnici ovim sučeljem odredili 1 zeptomol angiotenzina što odgovara otprilike svega 600 molekula (79).

Posebnu skupinu CE-MS sučelja čine mikrofluidička, odnosno sučelja zasnovana na čipu, kod kojih su CE i ionski izvor integrirani unutar minijaturiziranog uređaja (80,81). U ovakvim sustavima razdvajanje, upravljanje protokom i formiranje elektrospreja odvijaju se unutar precizno definiranih mikrokanala, čime se minimalizira mrtvi volumen i potreba za ručnim poravnanjem kapilare i emitera. Mikrofluidička CE-MS sučelja najčešće rade u nano-ESI režimu, uz vrlo niske protoke i ograničeno razrjeđenje analita, dok fiksna geometrija sustava osigurava veliku ponovljivost i robusnost rada. Iako u pravilu ne dosežu maksimalnu osjetljivost optimiziranih sučelja bez obložne tekućine, mikrofluidički sustavi predstavljaju dobar kompromis između osjetljivosti, stabilnosti i jednostavnosti primjene, osobito u rutinskim i translacijskim analizama, ali zahtijevaju vještine pripreme i izrade takvih sustava.

Alternativni pristup sprezanju CE i MS predstavlja CE-MALDI-MS tehnika, kod koje se razdvajanje i detekcija ne odvijaju u potpunosti *online*. U ovom slučaju, izlaz CE kapilare se u pravilnim vremenskim razmacima nanosi na MALDI pločicu, često uz istodobno ili naknadno dodavanje matrice, nakon čega slijedi analiza laserskom desorpcijom/ionizacijom. Takav pristup u potpunosti uklanja potrebu za održavanjem stabilnog elektrospreja te omogućuje znatno veću toleranciju prema nehlapljivim elektroforetskim puferima. Dodatna prednost CE-MALDI-MS tehnike je mogućnost višestruke analize istih frakcija, uključujući ponovljene MS/MS eksperimente, dok su glavni nedostaci smanjena protočnost i gubitak vremenski kontinuirane detekcije u usporedbi s *online* CE-ESI-MS sustavima. U Tablici 4. prikazane su neke karakteristike različitih dostupnih CE-MS sučelja.

Tablica 4. Prikaz karakteristika različitih dostupnih CE-MS sučelja

Sučelje	Osjetljivost	Robusnost	Razrjeđenje	Primjena
Koaksijalno sučelje s obložnom tekućinom	Srednja	Vrlo velika	Da	Rutinske i ciljane analize
Sučelje s poroznim vrhom	Vrlo velika	Mala	Ne	<i>Single cell</i> i intaktne MS analize
Sučelje s tekućim spojem	Mala do srednja	Srednja	Da	Rutinske i ciljane analize
Sučelje s elektrokinetički dopremanom obložnom tekućinom	Srednja do velika	Srednja do velika	Malo	Različite omike
Mikrofluidično CE-MS sučelje	Srednja do velika	Velika	Malo	Rutinske i kliničke analize
CE-MALDI sučelje	Srednja	Velika	Varijabilno	Peptidno mapiranje i MS <i>imaging</i>

Iako je ESI ionski izvor daleko najrašireniji način sprezanja CE i MS, posljednjih godina razvijeni su i alternativni pristupi koji nastoje zaobići neka od temeljnih ograničenja CE-ESI-MS tehnike, poput osjetljivosti na sastav elektroforetskog pufera, potrebe za stabilnim elektrosprejem ili razrjeđenja nativnog CE protoka. Ta se sprezanja uglavnom razvijaju za

specifične analitičke probleme te su zasad većinom ograničena na istraživačke i specijalizirane primjene. Jedno od značajnijih alternativnih spreznja je CE-ICP-MS, u kojem se CE spreže sa spektrometrijom masa s induktivno spregnutom plazmom (engl. *inductively coupled plasma*, ICP). Za razliku od molekulskih MS tehnika, ICP-MS omogućuje elementarnu analizu te je stoga posebno pogodna za analize metala i metaloida, uključujući komplekse metala i liganda kao i biomolekula s metalnim ionima. Ipak, zbog destruktivne prirode plazme, CE-ICP-MS ne pruža informacije o molekulskoj masi ili strukturi te zahtijeva pažljivo prilagođavanje protoka i sastava otapala. Osim ICP-MS, istražuju se i spreznja CE s alternativnim ionskim izvorima poput kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionisation*, APCI) ili fotoionizacije pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure photoionisation*, APPI) (82,83). Ovi pristupi potencijalno nude veću toleranciju prema određenim nehlapljivim komponentama pufera i manju ovisnost o stabilnosti kapljica u odnosu na ESI. No, njihova je primjena u CE sustavima zasad ograničena zbog zahtjeva za većim protocima i niže učinkovitosti ionizacije za vrlo polarne i ionske analite, koji čine većinu tipičnih CE uzoraka. Zanimljivo je i spreznje CE sa spektrometrijom masa ionske mobilnosti (CE-IM-MS). U slučaju CE-IM-MS, ionska mobilnost ne predstavlja alternativni ionski izvor, već dodatnu dimenziju razdvajanja koja se nadovezuje na CE i MS, omogućujući razdvajanje izobara i konformacijskih izomera. Takvi višedimenzijski sustavi pokazuju značajan potencijal u analizi složenih bioloških uzoraka, no zahtijevaju složenu instrumentalnu konfiguraciju i naprednu obradu podataka. Zaključno, iako se većina praktičnih CE-MS primjena i dalje temelji na ESI ionizaciji, razvoj alternativnih i hibridnih spreznja ukazuje na kontinuiranu evoluciju ove tehnike. Ta nova rješenja uglavnom su usmjerena na specifične analitičke niše, poput elementarne analize, višedimenzijskog razdvajanja ili povećane tolerancije prema kompleksnim matricama te predstavljaju važan smjer budućeg razvoja CE-MS tehnike.

1.5. Zelena analitička kemija

Analitička kemija je znanstvena disciplina koja se bavi identifikacijom, određivanjem i karakterizacijom tvari u različitim uzorcima. Tradicionalno, analitičke metode su davale prioritet točnosti, preciznosti i osjetljivosti, često na štetu sigurnosti okoliša i ljudi. Široko rasprostranjena upotreba toksičnih reagensa, hlapljivih organskih otapala i energetski zahtjevni instrumenti izazvali su zabrinutost u vezi s utjecajem na okoliš i održivošću rutinskih analitičkih procesa. Sve veći fokus modernog društva na održivost i zaštitu okoliša zahtijeva evoluciju analitičke kemije kako bi se uskladila s globalnim ciljevima održivosti. Ova promjena dovela je do niza koncepata pri čemu je najistaknutija zelena analitička kemija (engl. *green analytical chemistry*, GAC) i, u novije vrijeme, proširenja poput plave analitičke kemije (engl. *blue analytical chemistry*) koji nastoje ugraditi ekološka, ekonomska i praktična razmatranja u razvoj analitičkih metoda. Ovi koncepti predstavljaju transformativne okvire koji vode analitičare prema metodama koje su ne samo znanstveno robusne već i ekološki i socioekonomski odgovorne.

1.5.1. Zelena analitička kemija

Zelena analitička kemija nastala je kao odgovor na širi pokret zelene kemije, koji je formaliziran 1990-ih kako bi se smanjio utjecaj kemijskih procesa na okoliš (84). GAC prilagođava ove principe održivosti posebno za analitičku znanost pri čemu naglašava smanjenje ili uklanjanje opasnih tvari, minimiziranje otpada, energetske učinkovitost te zaštitu ljudskog zdravlja i ekosustava tijekom analitičkog rada. Dok se rani rad na zelenoj kemiji usredotočio na sintetske procese, zelena analitička kemija sada predstavlja zasebnu disciplinu. Njezine temeljne ideje iznesene su u udžbenicima, pregledima i izvješćima odbora, koji ističu etičku i praktičnu nužnost održivih analitičkih metoda.

Konceptualni okvir GAC-a često se izražava kroz skup principa koji vode razvoj metoda prema održivosti. Najčešće se navodi 12 principa GAC-a koji su sažeti u Tablici 5. (85).

Tablica 5. Prikaz 12 principa zelene analitičke kemije

Princip zelene analitičke kemije	
1	Treba primijeniti izravne analitičke tehnike kako bi se izbjegla obrada uzoraka.
2	Cilj je minimalna količina uzorka i minimalan broj uzoraka.
3	Treba provoditi <i>in situ</i> mjerenja.
4	Integracija analitičkih procesa i operacija štedi energiju i smanjuje upotrebu reagensa.
5	Treba odabrati automatizirane i minijaturizirane metode.
6	Treba izbjegavati derivatizaciju.
7	Treba izbjegavati stvaranje velike količine analitičkog otpada i osigurati pravilno upravljanje analitičkim otpadom.
8	Metode s više analita ili više parametara su poželjnije u odnosu na metode koje koriste jedan analit.
9	Potrošnju energije treba svesti na minimum.
10	Treba dati prednost reagensima dobivenim iz obnovljivih izvora.
11	Toksične reagense treba ukloniti ili zamijeniti.
12	Treba povećati sigurnost analitičara.

Specifičnosti ovih principa razvijale su se kako je područje sazrijevalo, ali njihov glavni cilj ostaje učiniti analitičku praksu manje štetnom za ljude i planet bez ugrožavanja analitičkih performansi. Kako bi implementirali zelene principe, analitički kemičari koriste različite strategije, uključujući miniaturizaciju pripreme uzoraka i analitičkih sustava kako bi se smanjila upotreba otopina i materijala, korištenje alternativnih otapala poput vode, ionskih tekućina i superkritičnog CO₂ ili metode pripreme uzoraka bez otapala te energetski učinkovite analitičke metode. Zelena analitička kemija potiče i praćenje procesa u stvarnom vremenu, smanjujući potrebu za transportom uzoraka ili serijskim testiranjem.

Tradicionalni kriteriji učinkovitosti u analitičkoj kemiji kao što su preciznost, točnost i osjetljivost pružaju nepotpunu sliku održivosti metode, dok zeleni analitički principi pružaju samo kvalitativne metrike zelenosti metoda. Kako bi se to riješilo, razvijene su različite GAC metrike i alati za procjenu zelenosti, kao što su NEMI (engl. *national environmental methods*

index), GAPI (engl. *green analytical procedure index*), *Analytical Eco-Scale*, *complex GAPI*, *modified GAPI*, AGREE (engl. *analytical greenness metric*) i AGREEprep (engl. *analytical greenness metric for sample preparation*) (86–90).

1.5.2. Plava analitička kemija

Iako se GAC u osnovi bavi održivošću okoliša, analitička praksa u stvarnom svijetu također zahtijeva da metode budu isplative, vremenski učinkovite i operativno jednostavne. Pojam plave analitičke kemije nedavno se pojavio kao komplementarna dimenzija koja eksplicitno uključuje praktičnu i ekonomsku izvedivost u procjenu održivosti. U ovom proširenom pogledu, analitičke metode se ocjenjuju ne samo s obzirom na svoje zelene attribute (utjecaj na okoliš) već i zbog svojih plavih atributa u koje pripadaju operativna jednostavnost, troškovi, vremenska učinkovitost, pristupačnost i jednostavnost implementacije. Ovi kriteriji osiguravaju da su ekološki prihvatljive metode također praktične u rutinskim laboratorijskim okruženjima, uključujući one s ograničenim resursima.

Najčešće spominjani alat koji uključuje plave aspekte je RGB-12 (engl. *Red-Green-Blue-12 Index*) model evaluacije analitičke metode. U ovom modelu crvena predstavlja ključne analitičke performanse koji su obično obuhvaćeni validacijskim parametrima, zelena predstavlja održivost, odnosno utjecaj na okoliš, dok plava predstavlja praktičnost i ekonomska razmatranja (91).

Radi lakše kvantifikacije plavosti metode, razvijenu su alati kao što je BAGI (engl. *blue applicability grade index*) (92). Ovaj alat u obzir uzima vrstu analize, broj analita i uzoraka koji se mogu istovremeno analizirati, obrat uzoraka, održivost korištenih materijala, stupanj automatizacije i količinu uzorka. Uključivanje plavih metrika u sveobuhvatne evaluacije potiče dizajn analitičkih metoda koje su ne samo održive i znanstveno robusne, već i operativno učinkovite i dostupne, što je ključno za široko prihvaćanje i utjecaj u stvarnom svijetu.

1.6. Pregled dosad objavljenih analitičkih metoda za odabrane lijekove

U posljednjem desetljeću razvijen je i validiran niz analitičkih metoda za određivanje inhibitora CDK4/6 i PI3K, inhibitora aromataze te selektivnih degradatora estrogenskih receptora, kao i drugih srodnih antitumorskih lijekova koji se primjenjuju u terapiji HR+/HER2- raka dojke. Razvoj navedenih metoda ponajprije je bio potaknut potrebama farmakokinetičkih ispitivanja i terapijskog praćenja lijekova, ali i zahtjevima kontrole kvalitete farmaceutskih oblika.

Dosad je objavljeno više analitičkih metoda za određivanje pojedinačnih inhibitora CDK4/6 (93–101), ALP (102–107), ANA (108–110), LET (111–113) ili FUL (114–117). Što se tiče određivanja ovih lijekova u terapijskim kombinacijama, objavljene su analitičke metode za kombinaciju PAL, RIB i LET (118,119), ANA i LET (120–123), ANA, LET i FUL (124), LET i PAL (125), LET i ABE (126,127), RIB, PAL i ABE (128–130), PAL i RIB (131), PAL i ABE (132), RIB, PAL, ABE i LET (133). Međutim, svega nekoliko metoda opisuje simultanu analizu RIB, PAL, ABE, ANA, LET i FUL (134–137).

Iz dostupne literature razvidno je da je dio metoda razvijen i validiran na biološkim uzorcima različitih životinja, što ograničava njihovu izravnu primjenjivost u kontekstu terapijskog praćenja lijekova u ljudi. U pogledu primijenjenih analitičkih tehnika, LC-MS predstavlja dominantan pristup u određivanju koncentracija navedenih lijekova. Za kromatografsko razdvajanje najčešće je korištena oktadecilna (C18) stacionarna faza, uz tek nekoliko iznimaka (98,100,101,117,122,130). Mobilna faza u pravilu se sastojala od smjese vode i metanola ili acetonitrila, uz dodatak odgovarajućih kiselina ili lužina. Najčešće korištena vrsta ionizacije u objavljenim metodama je ESI, uz tandemsku spektrometriju masa (MS/MS). Za pouzdano određivanje, u većini objavljenih metoda, kao unutarnji standardi korišteni su izotopno obilježeni analozi ispitivanih spojeva. U svega nekoliko primjera, kao unutarnji standardi korišteni su analitima strukturno slični spojevi, uz uvjet da se ne koriste zajedno u terapiji (94,109,111,120,121).

Nadalje, većina dosad objavljenih metoda za pripremu složenih bioloških uzoraka temelji se na taloženju proteina (engl. *protein precipitation*, PPT), dok se u manjem broju radova primjenjuju ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase extraction*, SPE) (93,95,121,131,132) ili tekućinska ekstrakcija (engl. *liquid-liquid extraction*, LLE) (96,108–110,114,115,117,122,127).

Do trenutka provedbe ovog istraživanja u literaturi nisu bile dostupne metode za analizu farmaceutskih oblika inhibitora CDK4/6 i PI3K. Također, u literaturi nije opisana niti jedna CE metoda za određivanje bilo kojeg od odabranih analita, u bilo koju svrhu, u bilo kojem uzorku.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Razvoj suvremene onkološke terapije obilježen je prijelazom s nespecifičnih citotoksičnih lijekova na ciljne terapije koje selektivno djeluju na ključne molekulske mehanizme tumorske patogeneze. U liječenju HR+ raka dojke, inhibitori CDK4/6 i PI3K pokazali su značajnu kliničku učinkovitost i postali sastavni dio standardne terapije. Međutim, njihova široka primjena otvorila je niz farmakokinetičkih i analitičkih izazova povezanih s uskom terapijskom širinom, izraženom interindividualnom varijabilnošću te čestim i klinički relevantnim nuspojavama.

Navedene karakteristike nameću potrebu za razvojem osjetljivih i selektivnih analitičkih metoda koje omogućuju određivanje ovih lijekova u biološkim uzorcima u svrhu terapijskog praćenja lijekova, ali i u njihovim farmaceutskim oblicima u okviru kontrole kvalitete farmaceutskih proizvoda.

Zbog bitnih razlika u analitičkim zahtjevima, kompleksnosti matrice i regulatornim kriterijima, ne postoji jedinstvena metoda koja bi jednako učinkovito zadovoljila potrebe kliničke bioanalize i farmaceutske kontrole kvalitete.

Opći cilj ovog istraživanja stoga je razviti, validirati i primijeniti nove CE-DAD i CE-MS/MS metode za analizu ABE, RIB, PAL, ALP, ANA, LET i FUL u farmaceutskim oblicima i uzorcima plazme pacijentica. To obuhvaća sljedeće specifične ciljeve:

- Razviti sorbens temeljen na polimetakrilatnom polimeru za pripremu uzorka odabranih lijekova.
- Ispitati kompatibilnost i učinkovitost različitih metoda pripreme uzorka plazme uz CE-MS/MS tehniku.
- Razviti CE-DAD i CE-MS/MS metode za analizu odabranih lijekova u farmaceutskim oblicima i uzorcima plazme.
- Validirati sve novorazvijene metode u skladu s međunarodnim smjernicama.
- Primijeniti CE-DAD metode za analizu farmaceutskih oblika lijekova.
- Primijeniti CE-MS/MS metode za analizu uzoraka plazme pacijentica s rakom dojke.
- Ekološki i ekonomski evaluirati sve navedene metode.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Analitički standardi

- 4-aminobenzojeva kiselina, >99 % – Fluka (Buchs, Švicarska)
- Abemaciclib, >98 % – Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)
- Abemaciclib-D₈ (D₈-ABE), >95 % – Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)
- Alpelisib, >98 % – MedChemExpress (Princeton, NJ, SAD)
- Anastrozol, >98 % – Tokyo Chemical Industry (Tokio, Japan)
- Anastrozol-D₁₂ (D₁₂-ANA), >95 % – Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)
- Benzimidazol, >97 % – MilliporeSigma (Burlington, MA, SAD)
- Fulvestrant, >97 % – MilliporeSigma (Burlington, MA, SAD)
- Fulvestrant-D₃ (D₃-FUL), 96 % – Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)
- Letrozol, >98 % – Tokyo Chemical Industry (Tokio, Japan)
- Palbociclib, >98 % – Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)
- Palbociclib-D₄ (D₄-PAL), >93 % – Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)
- Ribociclib, >98 % – Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada) i BioVision (San Francisco, CA, SAD)
- Ribociclib-D₆ hidroklorid (D₆-RIB), >95 % – Toronto Research Chemicals (Toronto, Kanada)
- Diazepam, >98 % – Jadran Galenski Laboratorij (Rijeka, Hrvatska)
- Oksazepam, >98 % – Jadran Galenski Laboratorij (Rijeka, Hrvatska)
- Kinin, 94 % – MilliporeSigma (Burlington, MA, SAD)
- Imidazol, >99 % – Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, SAD)
- Benzokain, >99 % – MilliporeSigma (Burlington, MA, SAD)

3.1.2. Farmaceutski oblici

- Verzenio filmom obložene tablete, 100 mg abemacicliba po tableti – Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN, SAD)
- Kisqali filmom obložene tablete, 200 mg ribocikliba po tableti – Novartis (Basel, Švicarska)
- Ibrance filmom obložene tablete, 125 mg palbocikliba po tableti – Pfizer (New York, NY, SAD)
- Piqray filmom obložene tablete, 50 mg alpelisiba po tableti – Novartis (Basel, Švicarska)
- Piqray filmom obložene tablete, 200 mg alpelisiba po tableti – Novartis (Basel, Švicarska)

3.1.3. Otapala, soli, puferi, kiseline i lužine

- 2-hidroksietil-metakrilat, >97 % – Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, SAD)
- Acetonitril za tekućinsku kromatografiju – VWR International (Radnor, PA, SAD)
- Acetonitril za spektrometriju masa – Carlo Erba Reagents (Milano, Italija)
- Amonijev hidroksid 25 % – Alkaloid (Skoplje, Sjeverna Makedonija)
- Azobisizobutironitril, >98 % – MilliporeSigma (Burlington, MA, SAD)
- Etanol za spektrometriju masa – Carlo Erba Reagents (Milano, Italija)
- Etilen-glikol-dimetakrilat, >97 % – Tokyo Chemical Industry (Tokio, Japan)
- Fosfatni pufer 50 mM pH 2,5 – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Fosforna kiselina – T. T. T. (Sveta Nedelja, Hrvatska)
- Kloroform – Honeywell Research Chemicals (Wabash, IN, SAD)
- Klorovodična kiselina, 37 % – VWR (Radnor, PA, SAD)
- Metanol za tekućinsku kromatografiju – VWR International (Radnor, PA, SAD) i Carlo Erba Reagents (Milano, Italija)
- Metakrilna kiselina, >99 % – Tokyo Chemical Industry (Tokio, Japan) i MilliporeSigma (Burlington, MA, SAD)
- Metanol za spektrometriju masa – Carlo Erba Reagents (Milano, Italija)

- Mravlja kiselina – Kemika (Zagreb, Hrvatska) i Carlo Erba Reagents (Milano, Italija)
- Natrijev dodecil sulfat – MilliporeSigma (Burlington, MA, SAD)
- Natrijeva lužina 1 M – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Natrijev tetraborat 50 mM pH 9,3 – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Otopina KCl 3 M za pH elektrode – Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska)
- Otopina referentnih spojeva u acetonitrilu, ESI-L Low Concentration Tuning Mix – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Pentadekafluoroktanska kiselina – Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, SAD)
- Propan-2-ol za spektrometriju masa – Carlo Erba Reagents (Milano, Italija)
- Tetrahidrofuran – MilliporeSigma (Burlington, MA, SAD)

3.1.4. Instrumenti

- Analitička vaga s mogućnošću očitavanja 0,001 mg, MX5 – Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska)
- Analitička vaga s mogućnošću očitavanja 0,01 mg, AG245 – Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska)
- Analitička vaga s mogućnošću očitavanja 0,01 mg, XSR105DU – Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska)
- Centrifuga Mini G, polumjera rotora 5 cm, brzine 6000 rpm – IKA (Staufen, Njemačka)
- Centrifuga MiniSpin, polumjera rotora 6 cm, brzine do 10200 rpm – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- Centrifugalni vakuumski uparivač Concentrator plus – Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- Generator dušika XE35i – Peak Scientific (Inchinnan, UK)
- Instrument za HPLC Agilent 1100 s kvarternom pumpom i DAD detektorom – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Instrument za UHPLC Agilent 1290 Infinity II s binarnom pumpom – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Izokratna pumpa 1260 Infinity II – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)

- Orbitalna tresilica-inkubator ES-20/60 – Biosan (Riga, Latvija)
- pH elektroda LE438 – Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska)
- pH elektroda LE422 – Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska)
- pH metar FiveEasy – Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska)
- Razdjelnik protoka 1:100 za izokratnu pumpu – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Spektrometar masa Agilent 6470B s JetStream ESI izvorom i QQQ analizatorom – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Sustav za infracrvenu spektroskopiju s Fourierovom transformacijom FTIR Spectrum Two – PerkinElmer (Shelton, CT, SAD)
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic S30H – Elma Schmidbauer (Singen, Njemačka)
- Uređaj za kapilarnu elektroforezu 7100 – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Uređaj za kapilarnu elektroforezu G1600A – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Uređaj za određivanje veličine i zeta-potencijala nanočestica i mikročestica primjenom dinamičkog raspršenja svjetlosti ZetaSizer Ultra – Malvern Panalytical (Malvern, UK)
- Uređaj za pročišćavanje vode Milli-Q IQ 7100 – Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Uređaj za pročišćavanje vode Milli-Q IQ 7015 – Merck (Darmstadt, Njemačka)
- Vrtložna miješalica Vortex 1 – IKA (Staufen, Njemačka)
- Vrtložna miješalica Vortex 3 – IKA (Staufen, Njemačka)

3.1.5. Pribor

- Bočice za uzorkovanje za HPLC, 2 mL – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Bočice za uzorkovanje za kapilarnu elektroforezu, 1 mL, polipropilenske – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Bočice za uzorkovanje za kapilarnu elektroforezu s umetkom, 250 µL, polipropilenske – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Injekcijski filteri, PTFE, veličine pora 0,2 µm – VWR International (Radnor, PA, SAD)

- Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 70,0 cm, unutarnjeg promjera 50 μm – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Kapilara od izvučenog kvarca duljine 75,0 cm, unutarnjeg promjera 50 μm – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 37,0 cm, duljine do detektora 28,5 cm, unutarnjeg promjera 50 μm – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Kapilara od izvučenog kvarca ukupne duljine 48,5 cm, duljine do detektora 40,0 cm, unutarnjeg promjera 50 μm – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Kromatografska kolona Gemini C18, 150×4,6 mm, 5 μm – Phenomenex (Torrance, CA, SAD)
- Kromatografska kolona Poroshell 120-EC-C18, 50×3,0 mm, 2,7 μm – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, SAD)
- Mikropipete volumena 20, 200, 1000 μL i 20 mL – Rainin (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD)
- Nastavci za mikropipete volumena 20, 200, 1000 μL i 20 mL – Rainin (Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD)
- Plastične epruvete volumena 0,5, 1,5 i 2 mL – Deltalab (Barcelona, Španjolska)
- Plastične epruvete volumena 15 mL – Isolab (Eschau, Njemačka)
- Plastične kapalice volumena 3 mL – Isolab (Eschau, Njemačka)
- Vacutainer epruvete s $\text{K}_2\text{-EDTA}$ antikoagulansom volumena 5 mL – Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, SAD)

3.1.6. Računalni programi

- ^{3D}CE/MSD ChemStation, verzija A 10.02 – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
- Agilent Chemstation 10 – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
- Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
- Agilent MassHunter Quantitative Analysis – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
- Agilent MassHunter Optimizer – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
- Agilent MassHunter Source Optimizer – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
- AGREE v. 0.5 2020 – Pena-Pereira i suradnici (Vigo, Španjolska)
- AGREEprep 2022 – Wojnowski i suradnici (Gdanjsk, Poljska)
- BAGI 2023 – Manousi i suradnici (Solun, Grčka)
- Chemicalize – ChemAxon (Budimpešta, Mađarska)
- GraphPad Prism 8 – GraphPad Software (Boston, MA, USA)
- Microsoft Excel u okviru paketa Office 365 – Microsoft (Redmond, WA, USA)
- OpenLab ChemStation – Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
- SwissADME – Swiss Institute of Bioinformatics (Švicarska)

3.2. Metode

3.2.1. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute s detektorom niza dioda za određivanje CDK4/6 inhibitora u ljekovitim oblicima

3.2.1.1. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine BEN, ABE i RIB pripremljene su otapanjem analitičkog standarda u MeOH do konačne koncentracije od 1 mg/mL, dok je standardna otopina PAL pripremljena otapanjem analitičkog standarda u smjesi ACN i vode (50:50, V/V) s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline do konačne koncentracije od 0,25 mg/mL. Sve standardne otopine čuvane su u hladnjaku na 4 °C te su se pokazale stabilne u tim uvjetima barem 2 mjeseca.

Radne otopine pripremljene su razrjeđivanjem odgovarajućih volumena standardnih otopina kako bi se dobila otopina BEN, ABE, RIB i PAL u smjesi MeOH, vode i ACN (50:40:10, V/V/V) željene koncentracije. Sve radne otopine pripremane su netom prije analize.

3.2.1.2. Priprema uzoraka

U svrhu analize gotovih ljekovitih oblika, deset tableta, odnosno kapsula ABE, RIB ili PAL izvagano je te potom smrvljeno u tarioniku tučkom do finog, homogeniziranog praška. U slučaju ABE i RIB, količina praška koja odgovara 5 mg djelatne tvari zajedno s 5 mg BEN izvagana je i prenesena u odmjernu tikvicu od 50 mL u koju je dodano 20 mL MeOH. U slučaju PAL, količina praška koja odgovara 1,25 mg djelatne tvari zajedno s 1,25 mg BEN izvagana je i prenesena u odmjernu tikvicu od 50 mL u koju je dodano 10 mL vode i 10 mL ACN. Potom su odmjerne tikvice s uzorcima sonicirane na ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega su nadopunjene do oznake MeOH u slučaju ABE i RIB, odnosno ACN, vodom i mravljom kiselinom u slučaju PAL kako bi se dobila smjesa ACN i vode (50:50, V/V) s 0,1 % mravlje kiseline. Konačno, uzorci su filtrirani kroz PTFE filtre veličine pora 0,2 µm te analizirani istovjetno standardnim otopinama.

3.2.1.3. Uvjeti CE analize

Eksperimenti su provedeni na Agilent 7100 CE uređaju za kapilarnu elektroforezu s detektorom niza dioda. Za kontrolu instrumenta korišten je računalni program OpenLab ChemStation. Analize su provedene na nepresvučenoj kvarcnoj kapilari, unutarnjeg promjera 50 µm, ukupne duljine 48 cm (duljina do detektora 40 cm) te produljenim optičkim putem od 150 µm.

Prije prvog korištenja, kapilara je isprana 1 M NaOH tijekom 30 minuta, vodom tijekom 10 minuta, 1 M HCl tijekom 30 minuta, vodom tijekom 10 minuta, 10 % fosfornom kiselinom tijekom 30 minuta, vodom tijekom 10 minuta te elektroforetskim puferom tijekom 20 minuta. Na početku svakog radnog dana, kapilara je isprana 10 % fosfornom kiselinom tijekom 10 minuta, vodom tijekom 10 minuta te elektroforetskim puferom tijekom 20 minuta. Prije svake analize, kapilara je isprana elektroforetskim puferom tijekom 5 minuta te je prije injektiranja vrh kapilare uronjen u vodu kako bi se isprala vanjska stijenka kapilare kao i elektrode. Na kraju svakog radnog dana, kapilara je isprana vodom tijekom 20 minuta te je pohranjena u vodi do sljedeće analize.

Kao elektroforetski pufer korišten je fosfatni pufer koncentracije 50 mM pH 2,9 te je korišteni pufer mijenjan svakih 5 analiza. Sve otopine su filtrirane kroz PTFE injekcijske filtre veličine pora 0,2 µm prije korištenja. Uzorci su injektirani hidrodinamički tijekom 5 sekundi pri tlaku od 50 mbar. Temperatura kapilare bila je 30 °C dok je primijenjeni napon razdvajanja iznosio 27,5 kV. Za detekciju je korištena valna duljina od 270 nm. Ukupno vrijeme analize bilo je 4 minute.

3.2.2. Metode kapilarne elektroforeze i tekućinske kromatografije spregnute s detektorom niza dioda za određivanje alpelisiba u ljekovitim oblicima

3.2.2.1. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine ALP i 4-ABA pripremljene su otapanjem analitičkih standarda u MeOH do konačne koncentracije od 0,5 mg/mL. Sve standardne otopine čuvane su u hladnjaku na 4 °C te su se pokazale stabilne u tim uvjetima barem 2 mjeseca.

Radne otopine pripravljene su razrjeđivanjem odgovarajućih volumena standardnih otopina kako bi se dobile otopine ALP u smjesi MeOH i vode (50:50, V/V) koncentracija 5, 10, 40, 50, 60, 75 i 100 µg/mL pri čemu je u svakoj otopini bilo 50 µg/mL 4-ABA kao unutarnjeg standarda. Sve radne otopine pripremane su netom prije analize.

3.2.2.2. Priprema uzoraka

U svrhu analize gotovih ljekovitih oblika, tablete ALP izvagane su te potom smrvljene u tarioniku tučkom do finog, homogeniziranog praška. Zatim je količina praška koja odgovara 2,5 mg djelatne tvari zajedno s 2,5 mg 4-ABA izvagana i prenesena u odmjernu tikvicu od 10 mL u koju je dodano 7 mL MeOH. Odmjerne tikvice s uzorcima vorteksirane su tijekom 5 minuta te su potom sonicirane na ultrazvučnoj kupelji tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega su nadopunjene do oznake MeOH. Konačno, alikovti ekstrakata su centrifugirani tijekom 3 minute pri 10000 rpm te su bistri supernatanti razrijeđeni 5 puta do sastava MeOH-voda (50:50, V/V).

3.2.2.3. Uvjeti analize

CE eksperimenti su provedeni na Agilent G1600A uređaju za kapilarnu elektroforezu s detektorom niza dioda. Za kontrolu instrumenta korišten je računalni program ^{3D}CE/MSD ChemStation. Analize su provedene na nepresvučenoj kvarcnoj kapilari, unutarnjeg promjera 50 µm i ukupne duljine 37 cm (duljina do detektora 28,5 cm).

Prije prvog korištenja, kapilara je isprana MeOH tijekom 10 minuta, 1 M NaOH tijekom 30 minuta, vodom tijekom 10 minuta te elektroforetskim puferom tijekom 20 minuta. Na početku svakog radnog dana, kapilara je isprana 0,1 M NaOH tijekom 10 minuta, vodom tijekom 10 minuta te elektroforetskim puferom tijekom 10 minuta. Prije svake analize, kapilara je isprana elektroforetskim puferom tijekom 3 minute dok je poslije svake analize isprana 0,1 M NaOH tijekom 2 minute. Na kraju svakog radnog dana, kapilara je isprana vodom tijekom 20 minuta te je pohranjena u vodi do sljedeće analize.

Kao elektroforetski pufer korišten je natrijev tetraborat koncentracije 25 mM pH 9,3 te je korišteni pufer mijenjan svakih 10 analiza. Sve otopine su filtrirane kroz PTFE injekcijske filtre veličine pora 0,2 µm prije korištenja. Uzorci su injektirani hidrodinamički tijekom 6 sekundi

pri tlaku od 50 mbar. Temperatura kapilare bila je 30 °C dok je primijenjeni napon razdvajanja iznosio 30 kV. Za detekciju je korištena valna duljina od 216 nm. Ukupno vrijeme analize bilo je 3 minute.

HPLC eksperimenti su provedeni na kromatografskom sustavu Agilent 1100 opremljenom s kvarternom pumpom te detektorom niza dioda. Za kontrolu instrumenta korišten je računalni program Agilent ChemStation za LC sustave. Razdvajanje je provedeno koristeći Gemini kromatografsku kolonu s C18 stacionarnom fazom (150 × 4,6 mm, 5 μm), termostatiranu na 25 °C.

Kao mobilna faza A korištena je voda s 0,1 % mravlje kiseline (V/V), kao mobilna faza B korišten je MeOH s 0,1 % mravlje kiseline (V/V), dok su uvjeti gradijentne analize prikazani su u Tablici 6. Protok mobilne faze iznosio je 1 mL/min, temperatura kolone bila je 25 °C, dok je volumen injektiranja bio 20 μL. Za detekciju je korištena valna duljina od 315 nm, a ukupno vrijeme analize bilo je 16 minuta.

Tablica 6. Uvjeti gradijentne analize za HPLC metodu

t (min)	φ (A) (%)	φ (B) (%)
0	70	30
7	0	100
10	0	100
10,5	70	30
16	70	30

3.2.3. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute sa spektrometrijom masa za određivanje šest lijekova u ljudskoj plazmi

3.2.3.1. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine LET, ANA, RIB, ABE i FUL pripremljene su otapanjem analitičkog standarda u MeOH do konačne koncentracije od 0,5 mg/mL, dok je standardna otopina PAL

pripremljena otapanjem analitičkog standarda u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline do konačne koncentracije od 0,5 mg/mL. Standardne otopine ANA-D₁₂, PAL-D₄ i FUL-D₃ pripremljene su otapanjem analitičkog standarda u MeOH do konačne koncentracije od 10 µg/mL. Sve standardne otopine čuvane su u hladnjaku na 4 °C te su se pokazale stabilne u tim uvjetima barem 2 mjeseca.

Radne otopine pripremljene su razrjeđivanjem odgovarajućih volumena standardnih otopina kako bi se dobila otopina LET, ANA, PAL, RIB, ABE i FUL u smjesi metanola i vode (32:68, V/V) željene koncentracije. Sve radne otopine pripremane su netom prije analize.

Elektroforetski pufer pripremljen je otapanjem PFOA u smjesi metanola i vode te titracijom s 5 M NH₄OH kako bi se dobio amonijev perfluoroktanoat (APFO) prividnog pH 10,50 te konačnog sastava metanol i voda (32:68, V/V).

3.2.3.2. Uvjeti MEKC metode

Prije prvog korištenja, kapilara je isprana s 1 M NaOH tijekom 30 minuta, vodom tijekom 30 minuta te elektroforetskim puferom tijekom 30 minuta. Na početku svakog radnog dana, kapilara je isprana s 5 M NH₄OH tijekom 5 minuta, vodom tijekom 5 minuta te elektroforetskim puferom tijekom 20 minuta. Prije svake analize, kapilara je isprana elektroforetskim puferom tijekom 5 minuta te je vrh kapilare nakratko uronjen u bočicu s vodom kako bi se isprala vanjska strane kapilare te poboljšala ponovljivost. Na kraju svakog radnog dana, kapilara je isprana vodom tijekom 20 minuta te je pohranjena u vodi do sljedeće analize. Elektroforetski pufer mijenjan je svake 3 analize. Sve otopine su filtrirane kroz PTFE injekcijske filtre veličine pora 0,2 µm prije korištenja. Analize su provedene na nepresvučenoj kvarcnoj kapilari, unutarnjeg promjera 50 µm i ukupne duljine 75 cm.

Uzorci su injektirani hidrodinamički tijekom 60 sekundi pri tlaku od 50 mbar. Temperatura kapilare bila je 30 °C dok je primijenjeni napon razdvajanja iznosio 25 kV. Tijekom analize primijenjen je i dodatni hidrodinamički tlak od 70 mbar. Ukupno vrijeme analize bilo je 17 minuta.

3.2.3.3. Uvjeti MS metode

Spektrometar masa korišten je u pozitivnom ESI modu uz praćenje višestrukih reakcija (engl. *multiple reaction monitoring*, MRM). U Tablici 7. prikazani su odabrani ionski prijelazi, odgovarajuće optimizirane kolizijske energije te optimizirani fragmentorski naponi.

Tablica 7. Odabrani kvantifikacijski i kvalifikacijski ionski prijelazi, odgovarajuće optimizirane kolizijske energije te optimizirani fragmentorski naponi analita

Analit	Fragmentorski napon (V)	Kvantifikacijski ion		Kvalifikacijski ion	
		Prijelaz (<i>m/z</i>)	Kolizijska energija (eV)	Prijelaz(<i>m/z</i>)	Kolizijska energija (eV)
LET	90	286,0 → 217,0	9	286,0 → 190,0	37
ANA	140	294,1 → 225,1	25	294,1 → 210,0	41
PAL	185	448,2 → 380,0	33	448,2 → 319,5	49
RIB	195	435,2 → 322,4	37	435,2 → 251,9	51
ABE	140	507,2 → 393,0	21	507,2 → 176,8	105
FUL	145	607,4 → 589,5	17	607,4 → 467,2	25
ANA-D ₁₂	100	306,2 → 237,3	24	306,2 → 219,1	40
PAL-D ₄	161	452,2 → 384,0	33	452,2 → 366,0	44
FUL-D ₃	125	610,3 → 592,0	16	610,3 → 468,4	25

Korišteni Agilent Jet Stream (AJS) parametri bili su temperatura obložnog plina od 250 °C, brzina protoka obložnog plina od 5 L/min te napon mlaznice od 2000 V. Kao obložna tekućina korištena je 70 % MeOH u vodi s dodatkom 0,2 % mravlje kiseline te je ista dostavljana do raspršivača brzinom od 10 µL/min. Temperatura plina za sušenje bila je 350 °C uz brzinu protoka od 9 L/min, tlak raspršivača bio je 12 psi, dok je napon ESI kapilare bio 2500 V. Dodatno, kako bi se spriječila nestabilnost električne struje uslijed povlačenja mjehurića

zraka prilikom injekcije zbog podtlaka koji stvara raspršivač, tlak raspršivača bio je postavljen na 1 psi tijekom injekcijske faze.

3.2.3.4. Prikupljanje uzoraka

Venska krv zdravih dobrovoljaca i bolesnica prikupljena je u epruvete s K_2 -EDTA antikoagulansom. Plazma je sakupljena nakon centrifugiranja pri 1500 g tijekom 10 minuta te je pohranjena na $-18\text{ }^\circ\text{C}$ do analize. Prije provedbe eksperimenata, plazma je odmrznuta na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta. Od svih sudionika u istraživanju prikupljen je informirani pristanak. Istraživanje je odobreno od strane Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (klasa 004-01/24-03/01, ur. broj 251-62-03-24-8, od 1. veljače 2024.) i Povjerenstva za etičnost Kliničkog bolničkog centra Zagreb (broj odobrenja 02/21-JG, od 20. kolovoza 2019.).

3.2.3.5. Priprema uzoraka

Uzorci plazme obogaćeni standardom analita pripremljeni su dodatkom radnih otopina standarda u slijepe uzorke plazme u volumnom omjeru 1:9. Zatim je u 150 μL plazme obogaćene analitom ili slijepog uzorka plazma dodano 10 μL standardne otopine unutarnjih standarda ANA- D_{12} , PAL- D_4 i FUL- D_3 . Nakon toga, u smjesu je dodano 590 μL ACN kako bi se istaložili proteini plazme. Smjesa je potom vrtložno miješana tijekom 10 sekundi te centrifugirana tijekom 5 minuta pri 4300 g. Nakon toga, sakupljeno je 700 μL supernatanta koji je uparen do suha u struji dušika koristeći koncentrator. Suhi ostaci nakon uparavanja otopljeni su u 100 μL vode. Zatim je DLLME proveden dodatkom 50 μL propan-2-ola i 100 μL kloroforma, jakim miješanjem vrhom pipete 10 puta te vrtložnim miješanjem tijekom 10 sekundi. Nakon centrifugiranja tijekom 5 minuta pri 4300 g, donji, organski sloj je sakupljen te uparen do suha u struji dušika. Netom prije analize, suhi ostatak je resuspendiran u 25 μL smjese metanola i vode (32:68, V/V).

3.2.4. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute sa spektrometrijom masa za određivanje alpelisiba i fulvestranta u ljudskoj plazmi

3.2.4.1. Priprema standardnih otopina

Standardne otopine ALP i FUL pripremljene su otapanjem analitičkih standarda u MeOH do konačne koncentracije od 0,5 mg/mL, dok je standardna otopina D₃-FUL pripremljena otapanjem analitičkog standarda u MeOH do konačne koncentracije od 100 µg/mL. Sve standardne otopine čuvane su u hladnjaku na 4 °C te su se pokazale stabilne u tim uvjetima barem tri mjeseca.

Radne otopine pripremljene su razrjeđivanjem odgovarajućih volumena standardnih otopina kako bi se dobila otopina ALP i FUL u smjesi metanola i vode (25:75, V/V) željene koncentracije. Sve radne otopine pripremane su netom prije analize.

Elektroforetski pufer pripremljen je otapanjem PFOA u smjesi metanola i vode te titracijom s 5 M NH₄OH kako bi se dobio amonijev perfluoroktanoat (APFO) prividnog pH 9,75 te konačnog sastava MeOH i voda (25:75, V/V).

3.2.4.2. Uvjeti MEKC metode

Prije prvog korištenja, kapilara je isprana s 1 M NaOH tijekom 30 minuta, vodom tijekom 30 minuta te elektroforetskim puferom tijekom 30 minuta. Na početku svakog radnog dana, kapilara je isprana s 5 M NH₄OH tijekom 5 minuta, vodom tijekom 5 minuta te elektroforetskim puferom tijekom 20 minuta. Prije svake analize, kapilara je isprana s 5 M NH₄OH tijekom 2 minute, elektroforetskim puferom tijekom 3 minute te je vrh kapilare nakratko uronjen u bočicu s vodom kako bi se isprala vanjska strane kapilare te poboljšala ponovljivost. Na kraju svakog radnog dana, kapilara je isprana vodom tijekom 20 minuta te je pohranjena u vodi do sljedeće analize. Elektroforetski pufer mijenjan je svake 3 analize. Sve otopine su filtrirane kroz PTFE injekcijske filtre veličine pora 0,2 µm prije korištenja. Analize su provedene na nepresvučenoj kvarcnoj kapilari, unutarnjeg promjera 50 µm i ukupne duljine 70 cm. Optimalan sastav elektroforetskog pufera bio je 50 mM APFO pri prividnom pH 9,75 u smjesi MeOH i vode (25:75, V/V). Uzorci su injektirani hidrodinamički tijekom 60 sekundi pri tlaku od 50 mbar. Temperatura kapilare bila je 30 °C dok je primijenjeni napon

razdvajanja iznosio 30 kV. Tijekom analize primijenjen je i dodatni hidrodinamički tlak od 100 mbar. Ukupno vrijeme analize bilo je 12 minuta.

3.2.4.3. Uvjeti MS metode

Spektrometar masa korišten je u pozitivnom ESI modu uz MRM način rada. U tablici 8. prikazani su odabrani ionski prijelazi, odgovarajuće optimizirane kolizijske energije te optimizirani fragmentorski naponi.

Tablica 8. Odabrani kvantifikacijski i kvalifikacijski ionski prijelazi, odgovarajuće optimizirane kolizijske energije te optimizirani fragmentorski naponi analita

Analit	Fragmentorski napon (V)	Kvantifikacijski ion		Kvalifikacijski ion	
		Prijelaz (<i>m/z</i>)	Kolizijska energija (eV)	Prijelaz(<i>m/z</i>)	Kolizijska energija (eV)
ALP	140	442,2 → 328,1	25	442,2 → 288,1	50
FUL	145	607,4 → 589,5	17	607,4 → 467,2	25
FUL-D ₃	125	610,3 → 592,0	16	610,3 → 468,4	25

Korišteni AJS parametri bili su temperatura obložnog plina od 250 °C, brzina protoka obložnog plina od 5 L/min te napon mlaznice od 2000 V. Kao obložna tekućina korištena je 50 % MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline te je ista dostavljana do raspršivača brzinom od 3 µL/min. Temperatura plina za sušenje bila je 300 °C uz brzinu protoka od 9 L/min, tlak raspršivača bio je 10 psi, dok je napon ESI kapilare bio 2500 V. Dodatno, kako bi se spriječila nestabilnost električne struje uslijed povlačenja mjehurića zraka prilikom injekcije zbog podtlaka koji stvara raspršivač, tlak raspršivača bio je postavljen na 1 psi tijekom injekcijske faze.

3.2.4.4. Priprema uzoraka

Uzorci plazme prikupljeni su na način kako je opisano u poglavlju 3.3.3.4. te uz istovjetna etička odobrenja.

Uzorci plazme obogaćeni standardom analita pripremljeni su dodatkom radnih otopina standarda u slijepe uzorke plazme u volumnom omjeru 1:14. Zatim je u 150 μL plazme obogaćene analitom ili slijepog uzorka plazma dodano 10 μL standardne otopine unutarnjeg standarda FUL-D₃. Nakon toga, u smjesu je dodano 590 μL ACN kako bi se istaložili proteini plazme. Smjesa je potom vrtložno miješana tijekom 10 sekundi te centrifugirana tijekom 5 minuta pri 4300 g. Nakon toga, sakupljeno je 720 μL supernatanta koji je uparen do suha u struji dušika koristeći koncentrator. Suhi ostaci nakon uparavanja otopljeni su u 150 μL vode. Zatim je SE-LLME proveden dodatkom 20 μL 50 mM PFOA u smjesi MeOH i vode (25:75, V/V) i 50 μL kloroforma te jakim miješanjem vrhom pipete 15 puta. Nakon centrifugiranja tijekom 5 minuta pri 4300 g, 45 μL donjeg, organskog sloj je sakupljeno te upareno do suha u struji dušika. Netom prije analize, suhi ostatak je resuspendiran u 15 μL smjese MeOH i vode (25:75, V/V).

3.2.5. Disperzivna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi za određivanje alpelisiba u ljudskoj plazmi metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute sa spektrometrijom masa

3.2.5.1. Uvjeti UHPLC-MS/MS metode

UHPLC eksperimenti su provedeni na kromatografskom sustavu Agilent 1290 opremljenom s binarnom pumpom te spektrometrom masa Agilent 6470B temeljenog na trostrukom kvadrupolu. Za kontrolu instrumenta korišten je računalni program Masshunter. Razdvajanje je provedeno koristeći Poroshell 120-EC-C18 kromatografsku kolonu (50 × 3,0 mm, 2,7 μm), termostatiranu na 25 °C.

Kao mobilna faza A korištena je voda s 0,1 % mravlje kiseline (V/V), kao mobilna faza B korišten je acetonitril s 0,1 % mravlje kiseline (V/V), dok su uvjeti gradijentne analize prikazani su u Tablici 9. Protok mobilne faze bio je 0,5 mL/min, temperatura autosamplera održavana

je na 10 °C, dok je na kromatografsku kolonu injektirano 10 µL uzorka. Ukupno vrijeme analize bilo je 5 min.

Tablica 9. Uvjeti gradijentne analize za UHPLC metodu

t (min)	φ (A) (%)	φ (B) (%)
0	65	35
0,8	65	35
3	0	100
3,5	0	100
3,6	65	35
5	65	35

Spektrometar masa korišten je u pozitivnom ESI modu uz MRM način rada. Kako bi se procijenilo uklanjanje fosfolipida tijekom pripreme uzorka, uz praćenje ALP-a, praćena su i dva reprezentativna fosfolipidna prijelaza. Naime, praćeni su prijelazi široko prisutnog 1-stearoil-sn-glicero-3-fosfokolina (LPC 18:0) i generičkog fosfokolinskog fragmenta u fragment koji sadrži samo fosfokolinsku strukturu. Specifični MRM prijelazi, zajedno s njihovim odgovarajućim optimiziranim fragmentorskim naponima i parametrima kolizijske energije za ALP i dva fosfolipida, prikazani su u Tablici 10. Vrijeme zadržavanja postavljeno je na 125 ms za sve prijelaze.

Tablica 10. Odabrani kvantifikacijski i kvalifikacijski ionski prijelazi, odgovarajuće optimizirane kolizijske energije te optimizirani fragmentorski naponi analita

Analit	Fragmentorski napon (V)	Prijelaz (m/z)	Kolizijska energija (eV)
ALP	140	442,2 → 328,1 (kvantifikator)	25
ALP	140	442,2 → 288,1 (kvalifikator)	50
LPC 18:0	100	524,4 → 184,4	30
Generički fosfokolinski fragment	100	396,4 → 184,4	30

Korišteni AJS parametri bili su temperatura obložnog plina od 250 °C, brzina protoka obložnog plina od 5 L/min te napon mlaznice od 1500 V. Temperatura plina za sušenje bila je 300 °C uz brzinu protoka od 7 L/min, tlak raspršivača bio je 15 psi, dok je napon ESI kapilare bio 4000 V.

3.2.5.2. Sinteza hibridnog HEMA-MAA polimetakrilatnog sorbensa

Sinteza hibridnog HEMA–MAA polimetakrilatnog sorbensa provedena je u jednom koraku postupkom slobodno-radikalske taložne polimerizacije, metodološki utemeljenim na pristupu koji se rutinski primjenjuje u sintezi molekularni utisnutih polimera. Kao funkcionalni monomeri korišteni su metakrilna kiselina (MAA) i 2-hidroksietil-metakrilat (HEMA), dok je etilen-glikol-dimetakrilat (EGDMA) primijenjen kao umreživač, a 2,2'-azobisisobutironitril (AIBN) kao termički radikalski inicijator.

U epruveti volumena 2 mL otopljeno je 4,68 mg MAA, 1,77 mg HEMA i 43,55 mg EGDMA u 952,3 µL acetonitrila (ACN) kao porogenog otapala. Odabrani sustav otapala omogućio je dobru topljivost početnih reagensa, ali i ograničenu topljivost nastalog polimera, čime su osigurani uvjeti pogodni za taložnu polimerizaciju. Nakon postizanja homogene otopine, u reakcijsku smjesu dodano je 0,75 mg AIBN-a, uz blago miješanje kako bi se osigurala ravnomjerna distribucija inicijatora. Reakcijska smjesa inkubirana je pri 62 °C tijekom 24 sata, pri čemu je temperatura odabrana s obzirom na temperaturu razgradnje AIBN-a i potrebu za stabilnim i kontroliranim tijekom polimerizacije. Omjer funkcionalnih monomera (MAA i HEMA) i umreživača (EGDMA) iznosio je 3:10, što predstavlja tipičan i literaturno prihvaćen omjer za sintezu vrlo umreženih polimetakrilatnih sorbensa s mehanički stabilnom strukturom. Ukupni maseni udio metakrilatnih komponenti u reakcijskoj smjesi iznosio je 5 %, čime su ostvareni uvjeti karakteristični za taložnu polimerizaciju, uz izbjegavanje formiranja kontinuirane monolitne faze. Takav sastav reakcijske smjese pogoduje nastanku diskretnih polimernih čestica s reproducibilnim morfološkim svojstvima. Nakon završetka polimerizacije, dobiveni polimerni sorbens odvojen je od reakcijskog medija te dvaput ispran s po 1 mL acetonitrila radi uklanjanja neizreagiranih monomera, ostataka inicijatora i drugih topljivih nusprodukata. Oprani sorbens osušen je u inkubatoru pri 40 °C te

je u tom obliku korišten za daljnju fizikalno-kemijsku karakterizaciju i primjenu u sorpcijskim ispitivanjima.

3.2.5.3. Priprema uzoraka

Prije provođenja disperzivne mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *dispersive solid-phase microextraction*, DSPME), provedeno je taloženje proteina. U tu svrhu, u 100 μL uzorka obogaćene ili kliničke plazme dodano je 400 μL ACN-a, nakon čega je smjesa vorteksirana tijekom 10 s. Uzorci su zatim centrifugirani pri 4300 g tijekom 5 minuta, nakon čega je cjelokupni supernatant pažljivo prikupljen i uparen do suha. Suhi ostatak rekonstituiran je u 1 mL smjese metanola i vode (5:95, V/V), čime su osigurani uvjeti kompatibilni s vezanjem analita na sorbent tijekom DSPME postupka. Uvođenje koraka isparavanja i ponovne rekonstitucije bilo je nužno radi uklanjanja ostatnog ACN-a, koji bi u protivnom mogao narušiti interakcije između sorbensa i analita te smanjiti učinkovitost ekstrakcije. Nakon rekonstitucije, dodano je 2 mg sorbensa u praškastom obliku, a dobivena suspenzija kratko je sonicirana tijekom 30 s radi dispergiranja sorbensa, zatim kratko vorteksirana i inkubirana 30 minuta u inkubatoru pri 25 °C i orbitalnoj brzini od 170 okr/min, kako bi se omogućilo uspostavljanje ravnoteže vezanja analita na sorbens. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana pri 4300 g tijekom 2 minute, a supernatant je odbačen. Sorbens s vezanim analitom zatim je podvrgnut postupku ispiranja dodavanjem 500 μL ultračiste vode, kratkim vorteksiranjem i inkubacijom tijekom 5 minuta u inkubatoru pri 25 °C i 170 okr/min, s ciljem uklanjanja zaostalih interferenata slabo vezanih za površinu sorbensa. Nakon centrifugiranja, otopina za ispiranje je odbačena. Elucija ALP sa sorbensa provedena je sukcesivno u tri ponavljanja, dodavanjem 1 mL acetonitrila u svakom koraku, prema istom postupku miješanja i inkubacije kao i u prethodnim fazama. Sve elucijske frakcije su prikupljene i homogenizirane u jedinstveni uzorak. Dobiveni eluens zatim je razrijeđen jednakim volumenom ultračiste vode, a volumen od 10 μL injektiran je u UHPLC–MS/MS sustav radi kvantitativne analize.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute s detektorom niza dioda za određivanje CDK4/6 inhibitora u ljekovitim oblicima

4.1.1. Razvoj CE metode

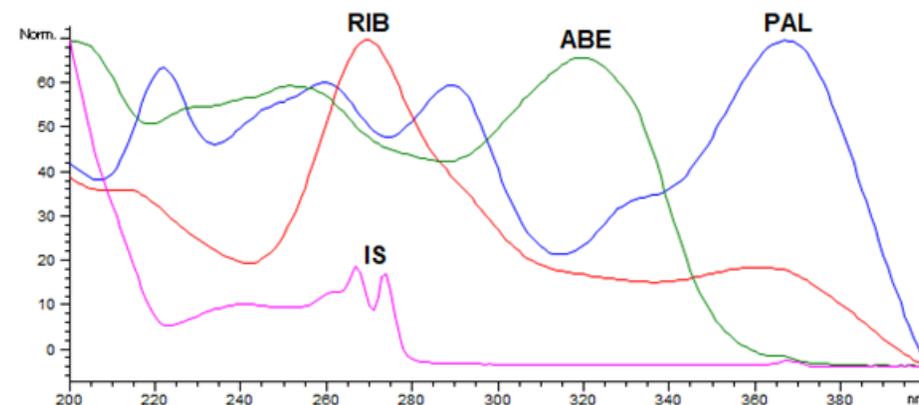
Cilj razvoja CE metode bio je postići odgovarajuće razdvajanje triju inhibitora CDK4/6 i unutarnjeg standarda, uz optimalne karakteristike elektroforetskih vrhova u smislu oblika i simetrije, istovremeno osiguravajući što kraće vrijeme analize u skladu s načelima zelene kemije.

4.1.1.1. Odabir unutarnjeg standarda

Prilikom razvoja CE metoda, uobičajena je praksa uključivanja unutarnjih standarda (engl. *internal standard*, IS) radi povećanja točnosti, preciznosti i robusnosti analitičkih rezultata. IS kompenzira varijacije povezane s injektiranjem uzorka i elektroforetskim uvjetima, čime se postiže veća ponovljivost i pouzdanost mjerenja. Jedan od najvažnijih čimbenika za postizanje zadovoljavajuće učinkovitosti metode jest preciznost injektiranja, odnosno kontrola volumena injektiranog uzorka. U CE se tipično injektiraju iznimno mali volumeni reda veličine nekoliko nanolitara, što se postiže primjenom hidrodinamičkih ili elektrokinetičkih tehnika injektiranja uzorka. Za razliku od HPLC-a, u CE instrumentima ne postoji sustav injektora s petljom (engl. *loop*) koji bi osigurao konstantan volumen injektiranja, što dodatno naglašava važnost korištenja IS.

U preliminarnim ispitivanjima, ispitano je više potencijalnih kandidata za IS na temelju procjene sličnosti omjera naboja i hidrodinamičkog polumjera s ispitivanim analitima. Tako su ispitani diazepam, oksazepam, kinin, imidazol, benzokain, 4-aminobenzojeva kiselina i benzimidazol s ciljem pronalaska spoja koji pokazuje elektroforetsko ponašanje kompatibilno s analitima, dobro razdvajanje od ostalih elektroferogramskih vrhova te, ako je moguće, da svojim migracijskim vremenom ne produljuje analizu. Među ispitivanim spojevima, benzimidazol (BEN) se pokazao najprikladnijim budući da je generirao uski i simetričan vrh, migrirao je u blizini analita od interesa, pokazivao slična UV apsorpcijska svojstva te je bio dobro razlučen od blisko migrirajućeg vrha ABE, što je omogućilo pouzdano

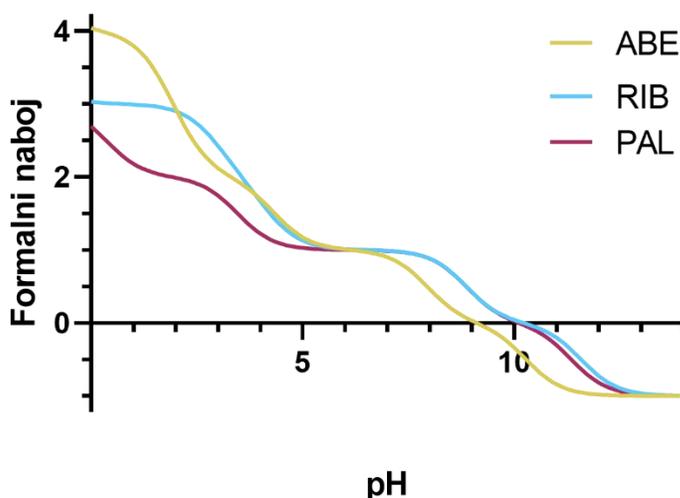
dokazivanje i određivanje (Slika 1). Dodavanje BEN kao unutarnjeg standarda u svaki uzorak prilikom razvoja metode rezultiralo je znatnim poboljšanjem ponovljivosti površina elektroforetskih vršaka u serijama ponovljenih mjerenja.



Slika 1. Preklopljeni apsorpcijski UV-Vis spektri unutarnjeg standarda benzimidazola (IS), abemacikliba (ABE), ribocikliba (RIB) i palbocikliba (PAL)

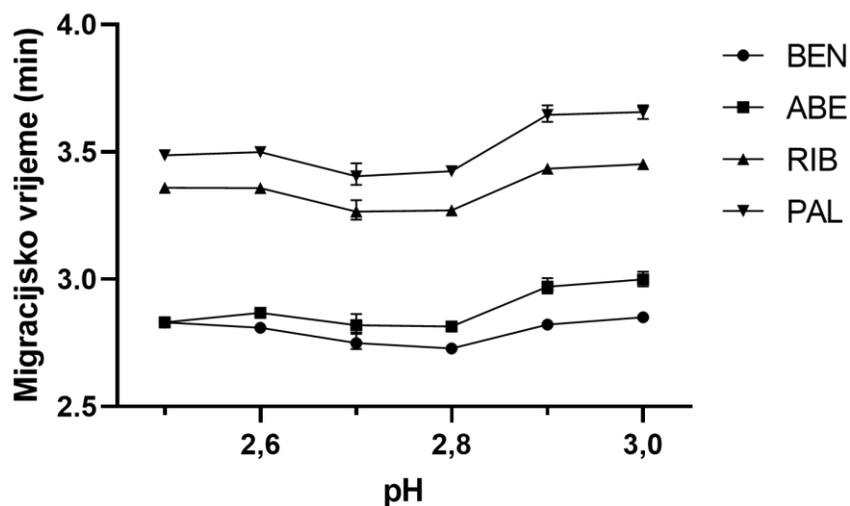
4.1.1.2. Optimizacija pH elektroforetskog pufera

Budući da su ABE, RIB i PAL lijekovi bazičnih svojstava, kapilarna zonska elektroforeza (engl. *capillary zone electrophoresis*, CZE) koristeći kiseli elektroforetski pufer tehnika je odabira za njihovo razdvajanje. CZE predstavlja najjednostavniji oblik kapilarne elektroforeze, pri čemu do razdvajanja analita dolazi samo na temelju razlika u njihovim brzinama migracije. S obzirom na njihova kemijska svojstva, očekuje se da će analiti pri pH vrijednostima do otprilike 10 biti pozitivno nabijeni te će posljedično migrirati ispred EOF-a i omogućiti kratko vrijeme analize. Koristeći računalni program Chemicalize (Chemaxon, Budimpešta, Mađarska), procijenjen je formalni naboj analita u ovisnosti o pH elektroforetskog pufera (Slika 2) kao i dimenzije molekula (39).



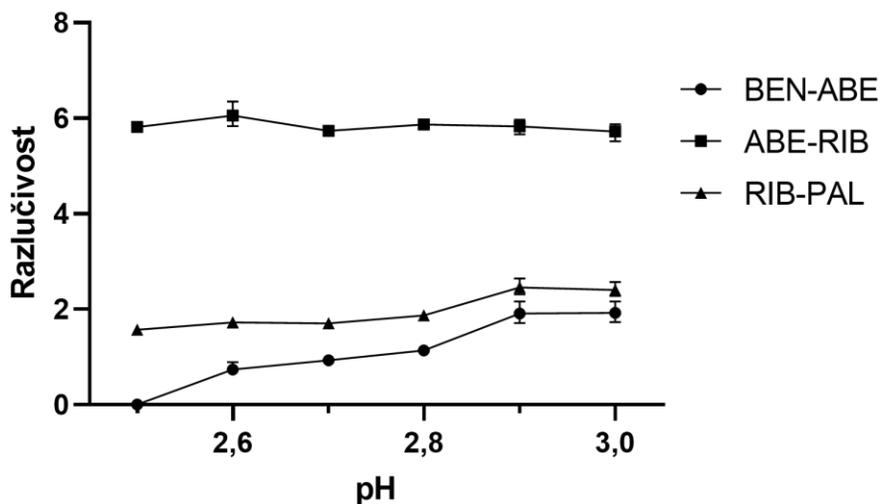
Slika 2. Ovisnost formalnih naboja abemacikliba (ABE), ribocikliba (RIB) i palbocikliba (PAL) o pH vrijednosti elektroforetskog pufera prema računalnom programu Chemicalize (39).

Budući da su molekule ABE, RIB i PAL usporedivih dimenzija, razlike u njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti bit će prvenstveno posljedica različitog formalnog naboja. S tim na umu, za najbolje razdjeljivanje ovih analita potrebno je odrediti pH elektroforetskog pufera pri kojemu su razlike u formalnim nabojima analita maksimalne. Iz Slike 2 vidi se da je optimalna pH vrijednost elektroforetskog pufera između 2,5 i 3,0 što je i potvrđeno preliminarnim ispitivanjima budući da je dobiveno najbolje razdjeljivanje i oblik elektroforetskih vrhova. Ipak, u svrhu preciznije optimizacije pH elektroforetskog pufera, sistematično je ispitan utjecaj pH u rasponu od 2,5 do 3,0 na razlučivost elektroferogramskih vrhova kao i vrijeme migracije. Ispitivanje utjecaja pH je provedeno koristeći fosfatni pufer koncentracije 50 mM, temperaturu kapilare od 30 °C te napon razdvajanja od 27,5 kV. S porastom pH elektroforetskog pufera, opaženo je povećanje migracijskih vremena što je u skladu s očekivanjima (Slika 3).



Slika 3. Ovisnost migracijskih vremena benzimidazola (BEN), abemacikliba (ABE), ribocikliba (RIB) i palbocikliba (PAL) o pH elektroforetskog pufera. Koncentracija fosfatnog pufera 50 mM, temperatura kapilare 30 °C i napon razdvajanja 27,5 kV. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Također, s porastom pH elektroforetskog pufera opažen je i porast razlučivosti između svih analita. Ipak, tek pri pH 2,9 razlučivost između BEN i ABE postiže vrijednosti veće od 1,5 koliko je potrebno za razdvajanje vrhova pri baznoj liniji (Slika 4).



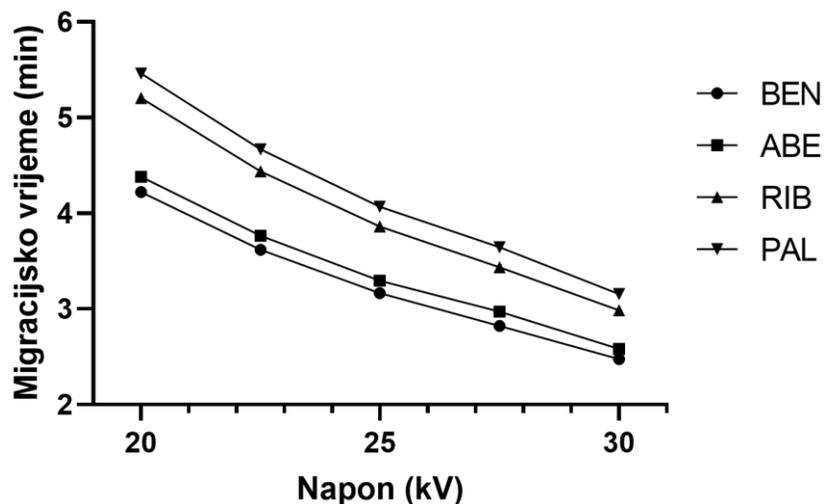
Slika 4. Ovisnost razlučivosti između benzimidazola (BEN), abemacikliba (ABE), ribocikliba (RIB) i palbocikliba (PAL) o pH elektroforetskog pufera. Koncentracija fosfatnog pufera 50

mM, temperatura kapilare 30 °C i napon razdvajanja 27,5 kV. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Iz Slika 3 i 4 vidljivo je da su razlučivosti i migracijska vremena vrlo slični pri pH 2,9 i 3,0. Ipak, pri pH 2,9 opaženi su bolji oblici elektroferogramskih vršaka te neznatno bolje razdvajanje između ABE i RIB te RIB i PAL. S tim na umu, pH elektroforetskog pufera od 2,9 odabran je kao optimalan za daljnja ispitivanja.

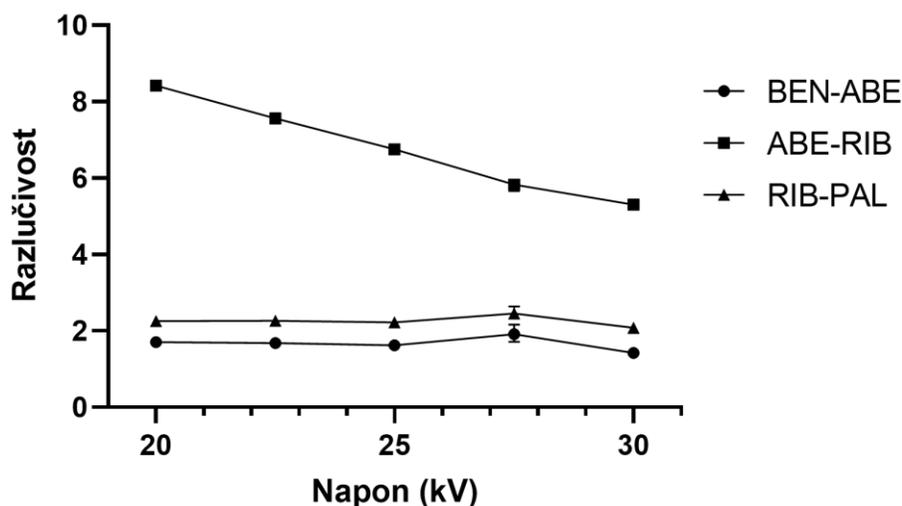
4.1.1.3. Optimizacija napona razdvajanja

S ciljem dodatne optimizacije razlučivosti i migracijskih vremena, ispitan je utjecaj napona razdvajanja u rasponu od 20 do 30 kV. Očekivano, povećanjem napona razdvajanja došlo je do smanjenja migracijskih vremena budući da je elektroforetska pokretljivost proporcionalna jakosti primijenjenog električnog polja (Slika 5). Tako je vrijeme analize pri naponu razdvajanja 20 kV bilo 5,46 minuta, dok je pri 30 kV bilo samo 3,15 minuta.



Slika 5. Ovisnost migracijskih vremena benzimidazola (BEN), abemacikliba (ABE), ribocikliba (RIB) i palbocikliba (PAL) o naponu razdvajanja. Koncentracija fosfatnog pufera 50 mM pri pH 2,9 i temperatura kapilare 30 °C. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

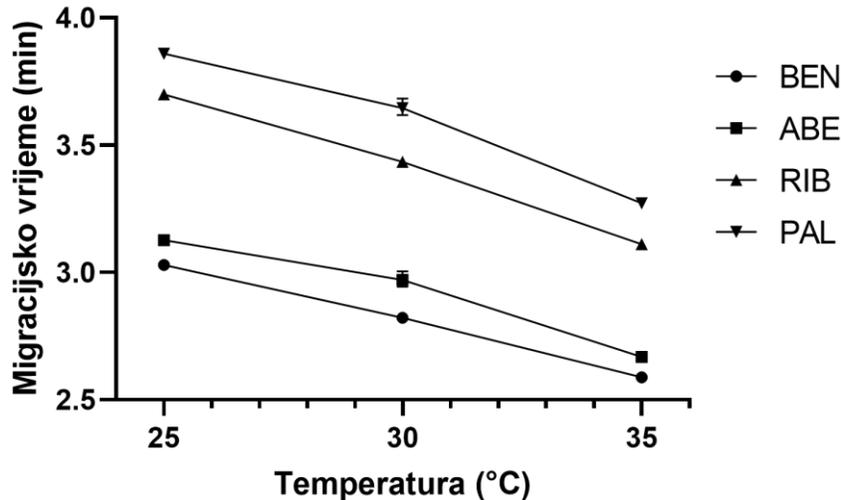
S druge strane, povećanje napona razdvajanja nije imalo značajan utjecaj na razdvajanje ABE i RIB te RIB i PAL. Opažen je učinak smanjenja razlučivosti između ABE i RIB povećanjem napona razdvajanja, primarno zbog značajnog smanjenja njihovih migracijskih vremena (Slika 6). Ipak, vrijednost razlučivosti između ABE i RIB je najmanje značajna budući da je i pri najnepovoljnijem naponu razdvajanja iznosila 5,31, što je znatno iznad vrijednosti 1,5 koliko je potrebno za razdvajanje vrhova pri baznoj liniji. Najmanja razlučivost bila je između BEN i ABE te je promatranje te vrijednosti bilo odlučujuće prilikom konačnog odabira optimalnog napona razdvajanja. Kako je razlučivost između BEN i ABE iznosila 1,91 pri 27,5 kV, a 1,42 pri 30 kV, napon razdvajanja od 27,5 kV odabran je kao optimalan za daljnje eksperimente kao kompromis između najboljeg razdvajanja analita i trajanja analize. Također, veliki naponi razdvajanja kao što je 30 kV, a posebice kod vrlo nabijenih puferskih aniona kao što je fosfat, mogu uzrokovati električne struje relativno velike jakosti koje pak povećavaju Jouleovo zagrijavanje te mogu uzrokovati nepoželjni temperaturni gradijent unutar kapilare.



Slika 6. Ovisnost razlučivosti između benzimidazola (BEN), abemacikliba (ABE), ribocikliba (RIB) i palbocikliba (PAL) o naponu razdvajanja. Koncentracija fosfatnog pufera 50 mM pri pH 2,9 i temperatura kapilare 30 °C. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

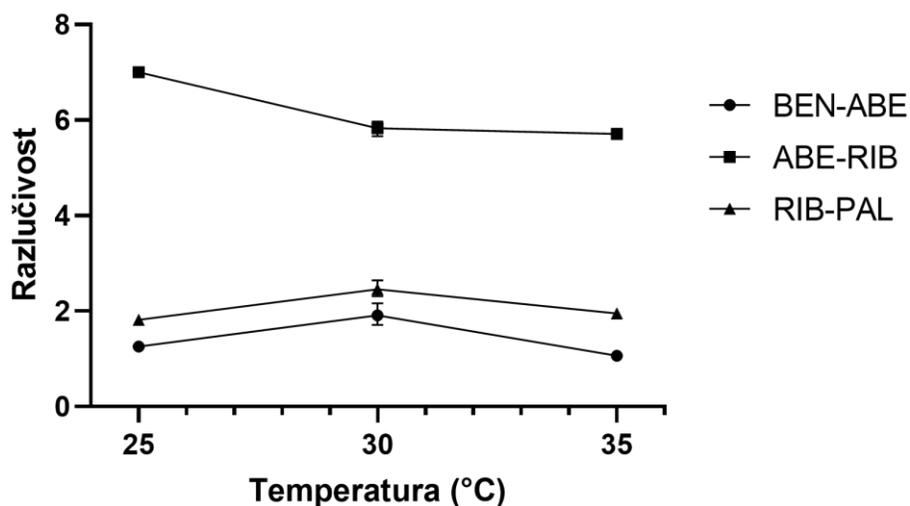
4.1.1.4. Optimizacija temperature kapilare

Konačno, ispitan je i utjecaj temperature kapilare na razdvajanja i migracijska vremena analita u rasponu od 25 do 35 °C. Povećanje temperature mijenja viskoznost elektroforetskog pufera te time povećava jakost EOF-a zbog čega su i migracijska vremena analita kraća. Takav je utjecaj povećanja temperature opažen i prilikom razvoja ove metode (Slika 7).



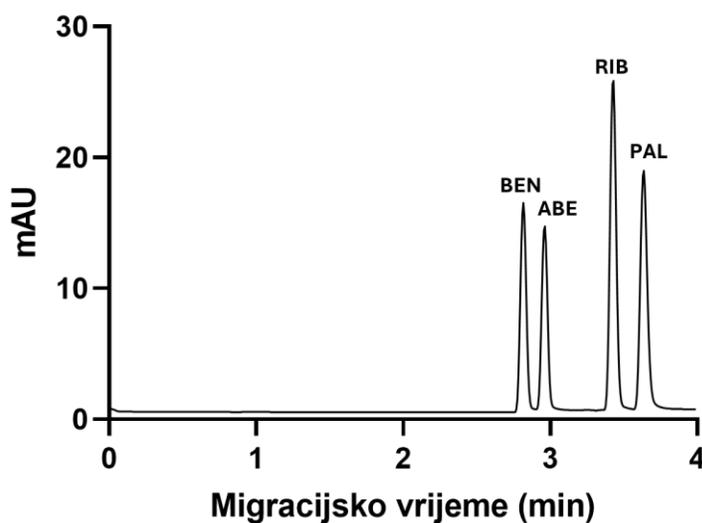
Slika 7. Ovisnost migracijskih vremena benzimidazola (BEN), abemacikliba (ABE), ribocikliba (RIB) i palbocikliba (PAL) o temperaturi kapilare. Koncentracija fosfatnog pufera 50 mM pri pH 2,9 i napon razdvajanja 27,5 kV. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Ipak, kao što je vidljivo iz Slike 8, temperatura kapilare od 30 °C pokazala je najbolju razlučivost analita uz neznatno dulju analizu (3,65 minuta) u odnosu na temperaturu kapilare od 35 °C (3,27 minuta). Zbog toga je temperatura od 30 °C odabrana kao optimalna.



Slika 8. Ovisnost razlučivosti između benzimidazola (BEN), abemacikliba (ABE), ribocikliba (RIB) i palbocikliba (PAL) o temperaturi kapilare. Koncentracija fosfatnog pufera 50 mM pri pH 2,9 i napon razdvajanja 27,5 kV. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Na Slici 9. prikazan je elektroferogram standardne otopine BEN, ABE, RIB i PAL pri optimiziranim elektroforetskim uvjetima.



Slika 9. Elektroferogram standardne otopine benzimidazola (BEN), abemacikliba (ABE), ribocikliba (RIB) i palbocikliba (PAL) koncentracije 50 $\mu\text{g/mL}$ pri optimalnim uvjetima (50 mM

fosfatni pufer pri pH 2,9, napon razdvajanja 27,5 kV, temperatura kapilare 30 °C, detekcija pri $\lambda = 270$ nm, injektiranje tijekom 5 s pri tlaku 50 mbar).

4.1.2. Validacija metode

Razvijena CE metoda validirana je prema važećim smjernicama ICH Q2(R2) za validaciju analitičkih metoda s obzirom na selektivnost, linearnost, točnost i preciznost, robusnost i granice određivanja i dokazivanja (138).

4.1.2.1. Selektivnost metode

Selektivnost metode ispitana je određivanjem faktora čistoće vrhova (engl. *peak purity*) u elektroferogramima standardnih otopina i farmaceutskih oblika BEN, ABE, RIB i PAL koristeći računalni program OpenLab CDS ChemStation Edition. Faktori čistoće vrhova elektroferograma standardnih otopina iznosili su 999,5 za BEN, 999,8 za ABE, 999,3 za RIB te 999,1 za PAL, dok su faktori čistoće vrhova elektroferograma gotovih ljekovitih oblika iznosili 999,1 za ABE, 998,4 za RIB te 998,7 za PAL. Navedeni rezultati ukazuju na ujednačenost UV-Vis apsorpcijskih spektara u različitim vremenskim točkama elektroferogramskih vrhova što znači da analiti ne komigriraju jedni s drugima kao ni s pomoćnim tvarima u gotovim ljekovitim oblicima. Time je dokazana selektivnost metode za određivanje ABE, RIB i PAL.

4.1.2.2. Linearnost i granice dokazivanja i određivanja

Rezultati ispitivanja linearnosti prikazani su u Tablici 11. Kalibracijske krivulje konstruirane su koristeći 5 koncentracijskih razina u rasponu od 10 do 100 $\mu\text{g/mL}$. Vidljivo je kako kalibracijski pravci za sve analite pokazuju značajnu linearnost ($R \geq 0,9976$) u kalibracijskom rasponu metode.

Tablica 11. Rezultati ispitivanja linearnosti razvijene CE metode koristeći po tri kalibracijske krivulje unutar istog dana

Analit	Kalibracijski raspon ($\mu\text{g/mL}$)	Nagib (RSD %)	Odsječak	R
ABE	10–100	0,01842 (0,54)	0,01186	$\geq 0,9976$
RIB	10–100	0,03629 (0,39)	-0,01673	$\geq 0,9981$
PAL	10–100	0,02857 (0,44)	-0,01614	$\geq 0,9987$

Iako za metode namijenjene određivanju sadržaja ICH smjernice ne zahtijevaju određivanje granica dokazivanja (engl. *limit of detection*, LOD) i granica određivanja (engl. *limit of quantification*, LOQ), prilikom validacije ipak su informativno određeni ti parametri. LOD je određen kao ona koncentracija analita pri kojoj je omjer signala i šuma jednak 3:1, dok je LOQ određen kao ona koncentracija analita pri kojoj je omjer signala i šuma jednak 10:1. Tako izračunati LOD i LOQ iznosili su 0,25 i 0,83 $\mu\text{g/mL}$ za ABE, 0,08 i 0,26 $\mu\text{g/mL}$ za RIB te 0,11 i 0,36 $\mu\text{g/mL}$ za PAL.

4.1.2.3. Točnost i preciznost

Točnost metode izražena je odstupanjem od nominalne koncentracije, a ispitana je usporedbom izračunatih koncentracija ispitivanih otopina koristeći svježe pripremljen kalibracijski pravac s poznatim koncentracijama standardnih otopina. Ispitivanje točnosti je sukladno ICH smjernicama za validaciju metoda za određivanje sadržaja provedeno na koncentracijskim razinama 80 % (40 $\mu\text{g/mL}$), 100 % (50 $\mu\text{g/mL}$) i 120 % (60 $\mu\text{g/mL}$) od koncentracije na kojoj će se primjenjivati metoda. Za svaku koncentracijsku razinu pripremljene su otopine u triplikatu. S druge strane, preciznost je ispitana kao ponovljivost (engl. *repeatability*) i srednja preciznost (engl. *intermediate precision*) te je iskazana RSD vrijednostima analitičkih prinosa između ponovljenih mjerenja. Ponovljivost je ispitana usporedbom ponovljenih ispitivanja na tri koncentracijske razine u triplikatu, dok je srednja preciznost ispitana usporedbom ukupno devet ponovljenih mjerenja na srednjoj koncentracijskog razini kroz tri različita dana. Rezultati ispitivanja točnosti i preciznosti prikazani su Tablici 12. Mala odstupanja od nominalnih koncentracija te male RSD vrijednosti

između ponovljenih mjerenja ukazuju na zadovoljavajuću točnost i preciznost razvijene metode.

Tablica 12. Rezultati ispitivanja točnosti i preciznosti razvijene CE metode

Analit	γ ($\mu\text{g/mL}$)	Odstupanje (%)	Ponovljivost (RSD %) ($N = 3$)	Srednja preciznost (RSD %) ($N = 9$)
ABE	40	2,8	2,3	4,0
	50	5,0	1,4	
	60	1,1	1,5	
RIB	40	-0,6	2,3	2,9
	50	1,9	1,0	
	60	4,3	0,8	
PAL	40	-1,6	2,2	1,6
	50	0,1	2,5	
	60	1,6	2,0	

4.1.2.4. Robusnost

Robusnost metode ispitana je sistematičnim promjenama jednog po jednog elektroforetskog parametra te je iskazana RSD vrijednostima omjera površina elektroforetskih vrhova analita i IS te migracijskih vremena analita između analiza pri optimalnim i izmijenjenim uvjetima analize. Konkretno, mijenjani su parametri pH elektroforetskog pufera ($2,9 \pm 0,1$), napon razdvajanja ($27,5 \pm 2,5$ kV) i temperatura kapilare (30 ± 5 °C). Rezultati su prikazani u Tablici 13.

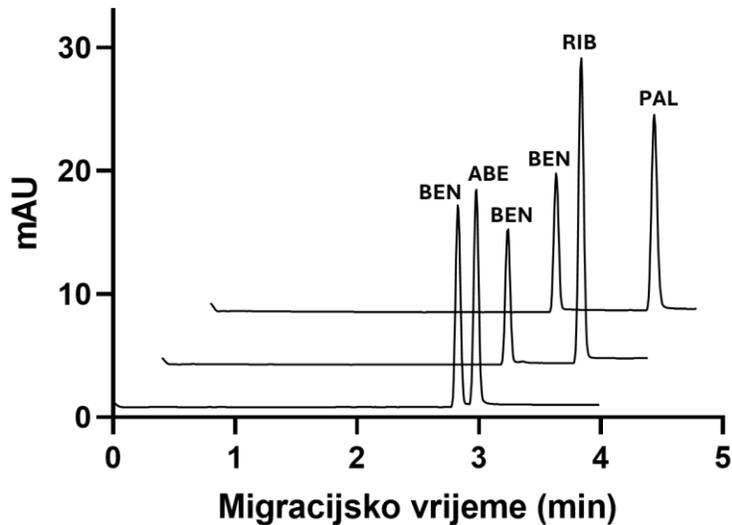
Tablica 13. Rezultati ispitivanja robusnosti razvijene CE metode ($N = 9$ po parametru, 3 za povećanje i 3 za smanjenje)

Parametar		Analit		
		ABE	RIB	PAL
pH elektroforetskog pufera ($2,9 \pm 0,1$)	RSD migracijskih vremena (%)	0,8	0,4	0,6
	RSD IS-korigiranih površina vršaka (%)	0,7	0,8	1,4
Napon razdvajanja ($27,5 \pm 2,5$ kV)	RSD migracijskih vremena (%)	10,0	10,5	10,3
	RSD IS-korigiranih površina vršaka (%)	0,8	0,2	0,5
Temperatura kapilare (30 ± 5 °C)	RSD migracijskih vremena (%)	6,6	7,1	6,8
	RSD IS-korigiranih površina vršaka (%)	1,4	1,2	1,6

Vidljivo je kako promjene napona razdvajanja i temperature kapilare značajno mijenjaju migracijska vremena analita, dok u slučaju malih promjena pH elektroforetskog pufera ne dolazi do značajne promjene migracijskih vremena što je u skladu s očekivanjima. U svim ispitivanjima promjenom elektroforetskih parametara nije došlo do značajne promjene u IS-korigiranim površinama elektroforetskih vrhova što opravdava korištenje IS. Kako su napon razdvajanja i temperatura kapilare dobro kontrolirani od strane samog CE instrumenta, prilikom primjene metode ne očekuju se značajne promjene migracijskih vremena ili površina elektroforetskih vrhova čime je demonstrirana robusnost metode.

4.1.3. Primjena metode

Novorazvijena i validirana metoda primijenjena je na gotove lijekovite oblike ABE (tablete Verzenios 100 mg), RIB (tablete Kisqali 200 mg) i PAL (kapsule Ibrance 125 mg). Dobiveni elektroferogrami prikazani su na Slici 14.



Slika 14. Preklopljeni elektroferogrami gotovih lijekovitih oblika abemacicliba (ABE), ribocicliba (RIB) i palbocicliba (PAL) uz dodani benzimidazol (BEN) koncentracija 50 $\mu\text{g/mL}$ pri optimalnim uvjetima (50 mM fosfatni pufer pri pH 2,9, napon razdvajanja 27,5 kV, temperatura kapilare 30 $^{\circ}\text{C}$, detekcija pri $\lambda = 270 \text{ nm}$, injektiranje tijekom 5 s pri tlaku 50 mbar).

Prilikom analize nisu uočene interferencije pomoćnih tvari s elektroforetskim vrhovima analita. Kvantitativno određivanje provedeno je usporedbom površine vrha korigirane unutarnjim standardom određenog inhibitora CDK4/6 u njegovom odgovarajućem farmaceutskom obliku i odgovarajuće korigirane površine vrha u standardnoj otopini poznate koncentracije. Analitički prinosi bili su u skladu s deklariranim sadržajem, s prosječnim iskorištenjima od $99,7 \pm 3,0 \%$ za ABE, $101,7 \pm 2,7 \%$ za RIB i $99,1 \pm 2,6\%$ za PAL. Stoga se predložena metoda može koristiti za određivanje sadržaja u gotovim lijekovitim oblicima ovih lijekova. Nadalje, trenutno ne postoje službene monografije ni za jedan od CDK4/6 inhibitora

ni u jednoj farmakopeji te se stoga ova metoda predlaže kao brzo, jeftino i zeleno rješenje za određivanje ovih lijekova u kontroli kvalitete i za industriju i za regulatorne agencije.

4.2. Metode kapilarne elektroforeze i tekućinske kromatografije spregnute s detektorom niza dioda za određivanje alpelisiba u ljekovitim oblicima

4.2.1. Razvoj CE metode

Razvoj CZE metode proveden je sustavno, uzimajući u obzir ključne parametre koji utječu na razdvajanje: izbor unutarnjeg standarda (IS), sastav i pH pufera, koncentracija pufera, naponom razdvajanja i temperatura kapilare. Optimizacija svakog parametra provedena je uz istovremeno praćenje vremena migracije, oblika vrhova, razlučivosti između ALP i IS te stabilnosti EOF-a.

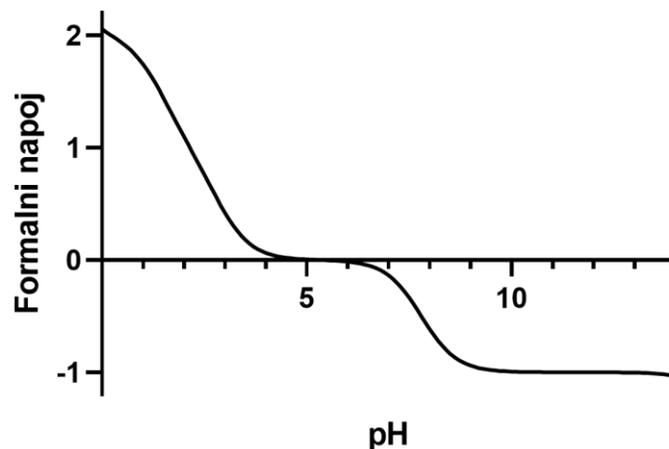
4.2.1.1. Odabir unutarnjeg standarda

U preliminarnim ispitivanjima, ispitano je više potencijalnih kandidata za IS na temelju procjene sličnosti omjera naboja i hidrodinamičkog polumjera s ispitivanim analitom. Tako su ispitani diazepam, 4-aminobenzojeva kiselina i benzimidazol s ciljem pronalaska spoja koji pokazuje elektroforetsko ponašanje kompatibilno s ALP, dobro razdvajanje od elektroforetskog vrha ALP te da, ako je moguće, svojim migracijskim vremenom ne produljuje analizu. Kao najprikladniji IS pokazala se 4-aminobenzojeva kiselina (4-ABA) budući da je generirala uski i simetričan vrh koji je bio dobro razlučen od vrha ALP, što je omogućilo pouzdano dokazivanje i određivanje. Dodavanje 4-ABA kao unutarnjeg standarda u svaki uzorak rezultiralo je znatnim poboljšanjem ponovljivosti površina elektroforetskih vršaka u serijama ponovljenih mjerenja.

4.2.1.2. Optimizacija koncentracije elektroforetskog pufera

Kao i kod prethodno opisane metode, prvi korak u razvoju CE metode je odabir elektroforetske tehnike te optimizacija elektroforetskog pufera. Koristeći računalni program Chemicalize procijenjen je formalni naboj ALP u ovisnosti o pH elektroforetskog pufera kako bi se odabralo optimalno područje pH vrijednosti elektroforetskog pufera (39). Iz Slike 15.

vidljivo je kako je ALP pozitivno nabijen pri pH vrijednostima nižima od 4, dok je negativno nabijen pri pH vrijednostima višima od 6.

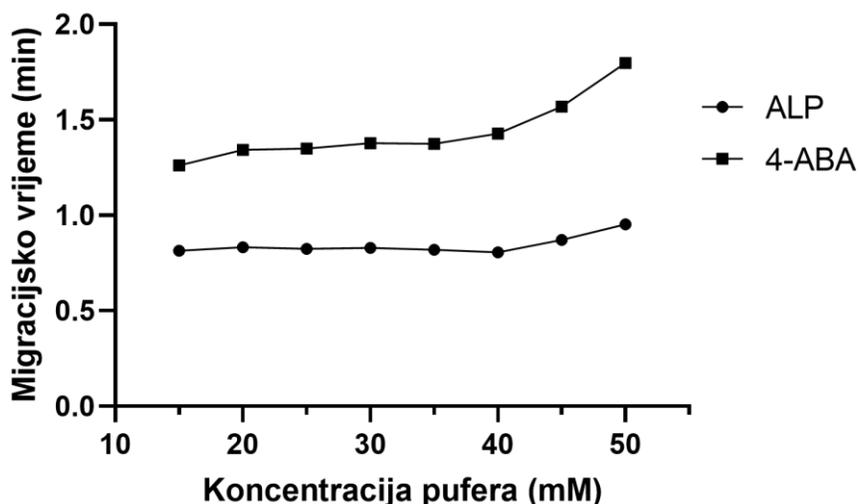


Slika 15. Ovinost formalnog naboja alpelisiba o pH vrijednosti elektroforetskog pufera prema računalnom programu Chemicalize (39).

Međutim, kako je značajan formalni pozitivni naboj ALP vidljiv tek pri vrlo malim pH vrijednostima te uzimajući u obzir činjenicu da su analize općenito brže pri bazičnim pH vrijednostima zbog toga što je EOF većeg iznosa, kao optimalna elektroforetska tehnika odabrana je CZE u lužnatim uvjetima.

Kao početni elektroforetski pufer odabran je boratni pufer pri pH 9,3. Prvotno je ispitan utjecaj koncentracije boratnog pufera na razlučivost elektroforetskih vrhova ALP i IS kao i na njihova migracijska vremena. Kod CE analiza, povećanje koncentracije elektroforetskog pufera, odnosno povećanje ionske jakosti elektrolita smanjit će jakost EOF-a te time produžiti analizu. Također, prevelika koncentracija pufera povećat će jakost električne struje te dovesti do pojačanog Jouleovog zagrijavanja. S druge strane, premala koncentracija pufera može uzrokovati nestabilnosti EOF-a i jakosti električne struje te poremetiti oblik elektroforetskih vrhova. Ispitivanje utjecaja koncentracije pufera stoga je provedeno u rasponu od 15 do 50 mM pri pH 9,3, temperaturi kapilare od 30 °C te naponu razdvajanja od 30 kV. Pri svim ispitanim uvjetima, oblici i simetrija elektroforetskih vrhova bili su zadovoljavajući, dok su razlučivosti između ALP i IS bile veće od 32 te time nisu predstavljale analitički izazov. Iz Slike 16 vidljivo je kako koncentracija boratnog pufera slabo utječe na

migracijska vremena analita sve do koncentracije od 45 mM kada vremena značajnije rastu. Ipak, kako bi se izbjegli prethodno spomenuti negativni utjecaji premale koncentracije pufera na analize, kao optimalna koncentracija pufera za daljnje analize odabrana je 25 mM.

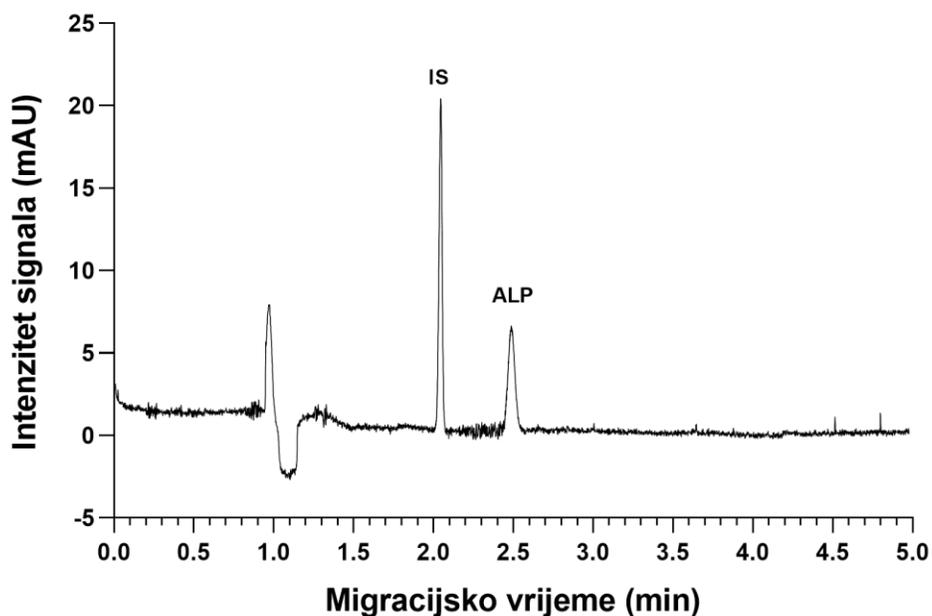


Slika 16. Ovisnost migracijskih vremena alpelisiba (ALP) i 4-aminobenzojeve kiseline (4-ABA), o koncentraciji boratnog pufera, pH 9,3, napon razdvajanja 30 kV i temperatura kapilare 30 °C. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

4.2.1.3. Ispitivanje utjecaja dodatka modifikatora elektroforetskog pufera

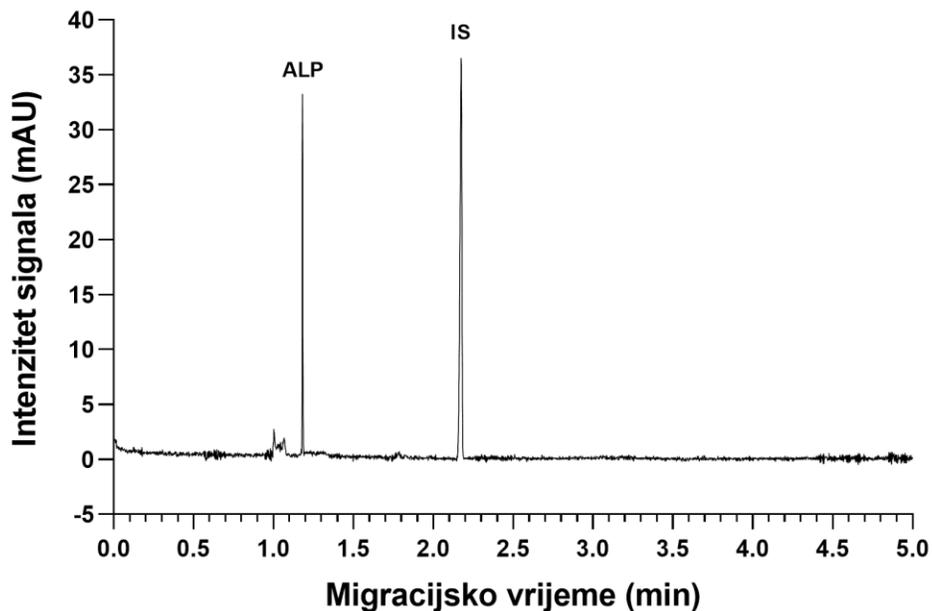
Iako su analize koristeći CZE metodu pri optimalnoj koncentraciji boratnog pufera bile vrlo kratke, budući da se radi o prvoj CE metodi za ALP, ispitan je i utjecaj dodatka modifikatora elektroforetskog pufera na razlučivost i migracijska vremena. Tako je ispitan dodatak SDS-a u elektroforetski pufer u rasponu koncentracija od 20 do 30 mM. Budući da je ta koncentracija iznad CMC vrijednosti SDS-a, dolazi do promjene tehnike te više ne govorimo o CZE metodi, već MEKC metodi u kojoj pseudostacionarnu fazu čine micelle SDS-a. Očekivano, promjenom CE tehnike iz CZE u MEKC došlo je do povećanja migracijskih vremena, budući da analiti uklapanjem u negativno nabijene micelle SDS-a migriraju nakon EOF-a (Slika 17). Ipak, trajanje analize je i dalje kratko te se ovakva MEKC metoda može primijeniti u slučaju analize ALP istovremeno s neutralnim analitima. Zanimljivo je da je došlo i do promjene redoslijeda migracije 4-ABA i ALP u odnosu na CZE metodu što upućuje na to

da ALP stupa u snažnije interakcije s micelama SDS-a, odnosno da se relativno više uklapa u iste.



Slika 17. Elektroferogram standardne otopine 4-aminobenzojeve kiseline (4-ABA) i alpelisiba (ALP) koncentracija 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ uz dodatak 20 mM SDS. Koncentracija boratnog pufera 25 mM pri pH 9,3, napon razdvajanja 30 kV, temperatura kapilare 30 $^{\circ}\text{C}$, detekcija pri $\lambda = 216 \text{ nm}$, injektiranje tijekom 6 s pri tlaku 50 mbar.

Nadalje, ispitan je dodatak organskog otapala kao modifikatora u elektroforetski pufer. Dodatak organskog otapala u elektroforetski pufer mijenja dielektričnu konstantu kao i viskoznost otapala te time na složen način djeluje na promjenu EOF-a najčešće ga smanjujući u odnosu na elektroforetski pufer bez organskog otapala. Također, organsko otapalo može promijeniti stupanj ionizacije te samim time i elektroforetsku pokretljivost samog analita. Zbog toga je utjecaj dodatka organskog otapala kao modifikatora zahtjevno teorijski predvidjeti te se najčešće ispituje eksperimentalno od slučaja do slučaja. Konkretno, u ovom je slučaju u elektroforetski pufer dodano 10 % MeOH.

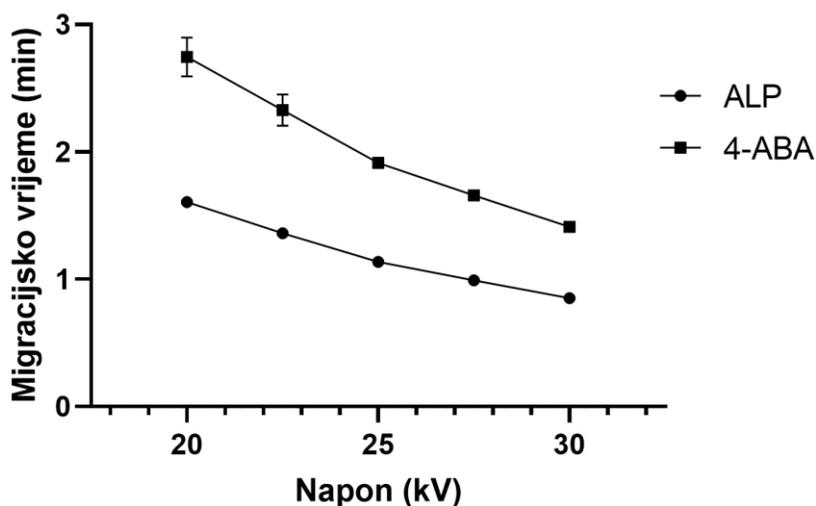


Slika 18. Elektroferogram standardne otopine 4-aminobenzojeve kiseline (4-ABA) i alpelisiba (ALP) uz dodatak 10 % MeOH. Koncentracija boratnog pufera 25 mM pri pH 9,3, napon razdvajanja 30 kV, temperatura kapilare 30 °C, detekcija pri $\lambda = 216$ nm, injektiranje tijekom 6 s pri tlaku 50 mbar.

U skladu s očekivanjima, iz Slike 18. vidljivo je kako je dodatkom MeOH u elektroforetski pufer došlo do značajnog povećanja migracijskih vremena ALP i 4-ABA te je za daljnje eksperimente kao optimalan elektroforetski pufer odabran 25 mM boratni pufer pri pH 9,3, bez dodatka organskih otapala ili surfaktanata.

4.2.1.4. Optimizacija napona razdvajanja

Nadalje, dodatno je ispitan i utjecaj napona razdvajanja u rasponu od 20 do 30 kV na migracijska vremena analita i unutarnjeg standarda. Kao što je i očekivano, povećanjem napona razdvajanja došlo je do smanjenja migracijskih vremena budući da je elektroforetska pokretljivost proporcionalna jakosti primijenjenog električnog polja (Slika 19). Tako je vrijeme analize pri naponu razdvajanja 20 kV bilo 2,75 minuta, dok je pri 30 kV bilo tek 1,41 minutu.

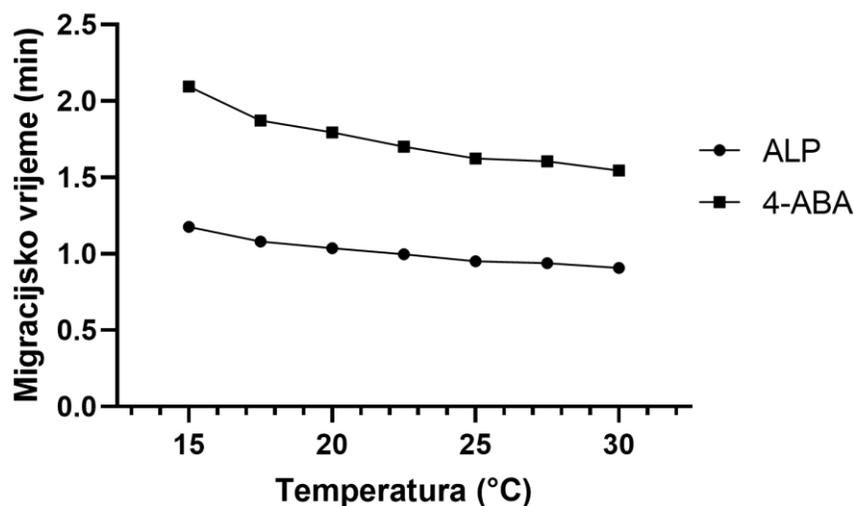


Slika 19. Ovisnost migracijskih vremena alpelisiba (ALP) i 4-aminobenzojeve kiseline (4-ABA), o naponu razdvajanja. Koncentracija boratnog pufera 25 mM pH 9,3 i temperatura kapilare 30 °C. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Budući da ni pri naponu razdvajanja od 30 kV nisu opažene vrlo velike električne struje (bile su manje od 110 μ A) koje bi značajno povećale Jouleovo zagrijavanje, taj je napon odabran kao optimalan za ovu metodu.

4.2.1.5. Optimizacija temperature kapilare

Konačno, ispitan je i utjecaj temperature kapilare na migracijska vremena analita i unutarnjeg standarda u rasponu od 15 do 30 °C. Povećanje temperature mijenja viskoznost elektroforetskog pufera te time povećava jakost EOF-a zbog čega su i migracijska vremena analita kraća. Takav je utjecaj povećanja temperature opažen i prilikom razvoja ove metode. Kao što je vidljivo iz Slike 20, temperatura kapilare od 30 °C pokazala je najkraće vrijeme analize. Zbog toga je temperatura od 30 °C odabrana kao optimalna.



Slika 20. Ovisnost migracijskih vremena alpelisiba (ALP) i 4-aminobenzojeve kiseline (4-ABA), o temperaturi kapilare. Koncentracija boratnog pufera 25 mM pH 9,3 i napon razdvajanja 30 kV. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

4.2.2. Validacije CE metode

Razvijena CE metoda validirana je prema važećim smjernicama ICH Q2(R2) za validaciju analitičkih metoda s obzirom na selektivnost, linearnost, točnost i preciznost, robusnost te granice određivanja i dokazivanja (138).

4.2.2.1. Selektivnost metode

Selektivnost metode ispitana je određivanjem faktora čistoće vrhova (engl. *peak purity*) u rasponu od 200 do 400 nm u elektroferogramima standardnih otopina i gotovih ljekovitih oblika ALP koristeći softver OpenLab ChemStation. Faktori čistoće vrhova u elektroferogramu standardnih otopina iznosili su od 998,9 do 1000,0 što ukazuje na ujednačenost UV-Vis apsorpcijskih spektara u različitim vremenskim točkama elektroferogramskih vrhova što pak znači da ALP i IS ne komigriraju međusobno kao ni s pomoćnim tvarima u gotovim ljekovitim oblicima. Time je dokazana selektivnost metode za određivanje ALP.

4.2.2.2. Linearnost

Linearnost je ispitana u kalibracijskom rasponu od 10 do 100 µg/mL. Prosječan nagib kalibracijskih krivulja bio je 0,0051 s prosječnim odsječkom na osi y od -0,0252. Koeficijent korelacije R za sve je pravce bio veći od 0,9986 ukazujući na značajnu linearnost metode u kalibracijskom rasponu.

Unatoč tome što ICH smjernice za metode određivanja sadržaja ICH ne zahtijevaju određivanje LOD i LOQ, prilikom validacije ipak su informativno određeni ti parametri. LOD je određen kao ona koncentracija analita pri kojoj je omjer signala i šuma jednak 3:1, dok je LOQ određen kao ona koncentracija analita pri kojoj je omjer signala i šuma jednak 10:1. Tako izračunati LOD i LOQ za ALP iznosili su 1,67 i 5,00 µg/mL.

4.2.2.3. Točnost i preciznost

Točnost metode izražena je odstupanjem od nominalne koncentracije, a ispitana je usporedbom izračunatih koncentracija ispitivanih otopina koristeći svježe pripremljen kalibracijski pravac s poznatim koncentracijama standardnih otopina. Ispitivanje točnosti je sukladno ICH smjernicama za validaciju metoda za određivanje sadržaja provedeno na koncentracijskim razinama 80 % (40 µg/mL), 100 % (50 µg/mL), 120 % (60 µg/mL) od koncentracije na kojoj će se primjenjivati metoda. Za svaku koncentracijsku razinu pripremljene su otopine u triplikatu. S druge strane, preciznost je ispitana kao ponovljivost i srednja preciznost te je iskazana RSD vrijednostima analitičkih prinosa između ponovljenih mjerenja. Ponovljivost je ispitana usporedbom ponovljenih ispitivanja na tri koncentracijske razine u heksaplikatu, dok je srednja preciznost ispitana usporedbom ukupno devet ponovljenih mjerenja na svakoj koncentracijskog razini kroz tri različita dana. Rezultati ispitivanja točnosti i preciznosti opisani su u Tablici 14. Mala odstupanja od nominalnih koncentracija te RSD vrijednosti između ponovljenih mjerenja ukazuju na zadovoljavajuću točnost i preciznost razvijene metode.

Tablica 14. Rezultati ispitivanja točnosti i preciznosti razvijene CE metode

Analit	γ ($\mu\text{g/mL}$)	Odstupanje (%)	Ponovljivost (RSD %) ($N = 6$)	Srednja preciznost (RSD %) ($N = 9$)
ALP	40	3,0	1,3	5,0
	50	0,9	0,7	3,9
	60	2,3	1,1	5,9

4.2.2.4. Robusnost

Robusnost je klasičan nedostatak CE tehnike te ju je stoga važno ispitati prilikom razvoja CE metoda. U ovom istraživanju robusnost je ispitana sistematičnim promjenama jednog po jednog elektroforetskog parametra te je iskazana RSD vrijednostima omjera površina elektroferogramskih vrhova analita i IS te migracijskih vremena analita između analiza pri optimalnim i promijenjenim uvjetima analize. Konkretno, mijenjani su parametri koncentracija elektroforetskog pufera (25 ± 1 mM), napon razdvajanja ($30 - 1$ kV) i temperatura kapilare (30 ± 1 °C). Rezultati su prikazani u Tablici 15.

Tablica 15. Rezultati ispitivanja robusnosti razvijene CE metode ($N = 6$ po parametru, 3 za povećanje i 3 za smanjenje)

Parametar	Analit	
	ALP	
Koncentracija elektroforetskog pufera (25 ± 1 mM)	RSD migracijskih vremena (%)	0,7
	RSD IS-korigiranih površina vršaka (%)	1,5
Napon razdvajanja ($30 - 1$ kV)	RSD migracijskih vremena (%)	4,3
	RSD IS-korigiranih površina vršaka (%)	3,2
Temperatura kapilare (30 ± 1 °C)	RSD migracijskih vremena (%)	1,1
	RSD IS-korigiranih površina vršaka (%)	1,5

Iz Tablice 15. je vidljivo kako promjena napona razdvajanja najviše utječe na migracijsko vrijeme i površinu analita. Ipak, napon razdvajanja dobro je kontroliran od strane CE instrumenta te se prilikom primjene metode ne očekuju značajne promjene migracijskih vremena ili površina vrhova čime je demonstrirana robusnost metode.

4.2.3. Unakrsna validacija CE i HPLC metoda

Kako bi se dodatno potkrijepila praktična primjenjivost predložene CE metode u kontekstu farmaceutske industrije i regulatornog nadzora, provedena je opsežna unakrsna validacija u kojoj su se uspoređivale karakteristike CE metode i novorazvijene HPLC metode pri čemu potonja služi kao utvrđeni zlatni standard. Ova usporedba usredotočila se na ključne metrike validacije kako bi se osiguralo da je novopredložena metoda usklađena s međunarodno prihvaćenim analitičkim mjerilima kvalitete. Rezultati, sažeti u Tablicama 16 i 17, pokazuju da obje metode pokazuju zadovoljavajuću preciznost, što dokazuju male RSD vrijednosti, i prihvatljivu točnost, što se odražava u minimalnom odstupanju od nominalnih koncentracija.

Tablica 16. Usporedba preciznosti i točnosti CE i HPLC metoda ($N = 3$ po koncentracijskoj razini)

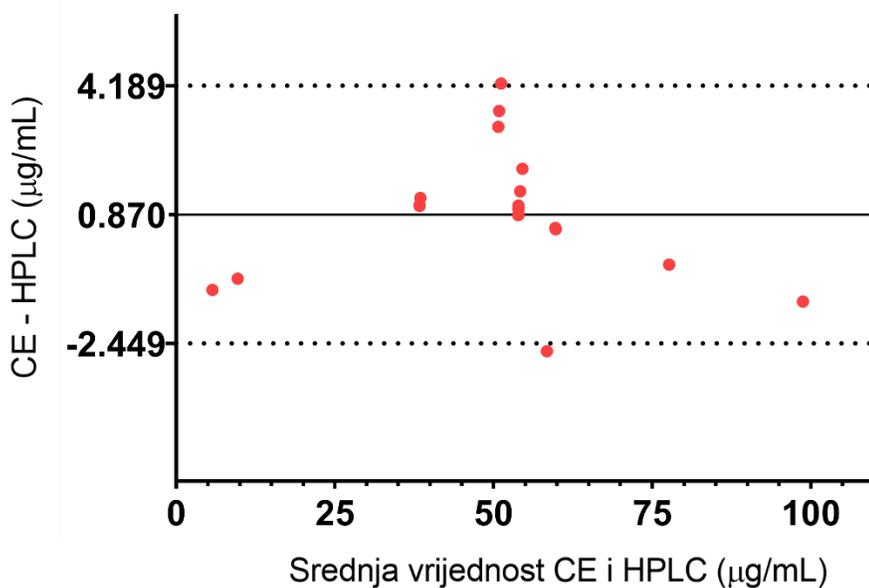
Analit	γ ($\mu\text{g/mL}$)	CE		HPLC	
		RSD (%)	Odstupanje (%)	RSD (%)	Odstupanje (%)
ALP	40	0,4	-2,6	0,2	-4,6
	50	0,9	5,5	0,3	-0,1
	60	2,9	-1,6	0,4	1,4

Tablica 17. Sažetak ključnih rezultata unakrsne validacije CE i HPLC metoda

Validacijski parametar	CE	HPLC
Raspon linearnosti	10 – 100 µg/mL	10 – 100 µg/mL
Težinski faktor	1/x ²	1/x ²
Nagib krivulje	0,00414	0,0253
Odsječak pravca	0,0001096	-0,0281
Koeficijent korelacije	0,9988	0,9988
Granica dokazivanja (µg/mL) ^a	1,67	0,06
Granica određivanja (µg/mL) ^b	5,00	0,20

^aIskazano kao ona koncentracija pri kojoj je omjer signala i šuma 3:1. ^bIskazano kao ona koncentracija pri kojoj je omjer signala i šuma 10:1.

Općenito, ovi rezultati ukazuju na to da su parametri validacije CE i HPLC vrlo usporedivi, čime se podržava prikladnost bilo koje tehnike za namjeravano određivanje sadržaja. Kako bi se procijenila ekvivalencija metoda, identični uzorci, uključujući kalibracijske standarde ($N = 7$) uzorke kontrole kvalitete ($N = 6$) i ekstrakte iz gotovih lijekovitih oblika ($N = 6$), analizirani su istovremeno korištenjem CE i HPLC metoda. Potom je slaganje između dvaju skupova podataka ispitano Bland-Altmanovom analizom (Slika 21).

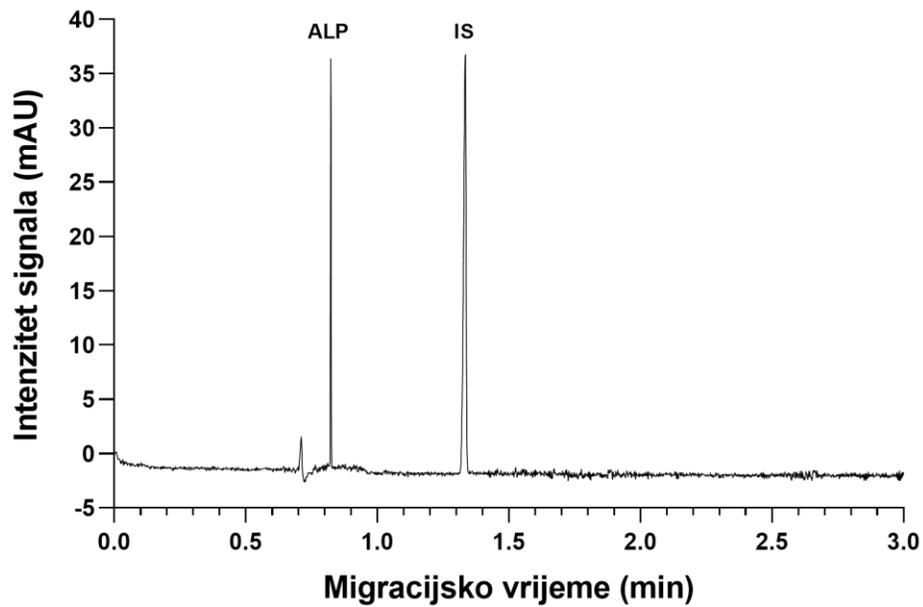


Slika 21. Bland-Altmanov prikaz rezultata dobivenih objema metodama (razlika izmjerenih koncentracija CE i HPLC metodama u odnosu na srednju vrijednost obje metode). Prosječna vrijednost razlika bila je 0,870 µg/mL, 95 %-tni interval pouzdanosti bio je -2,449–4,189 µg/mL uz p-vrijednost (parni t-test) od 0,6390, $N = 19$.

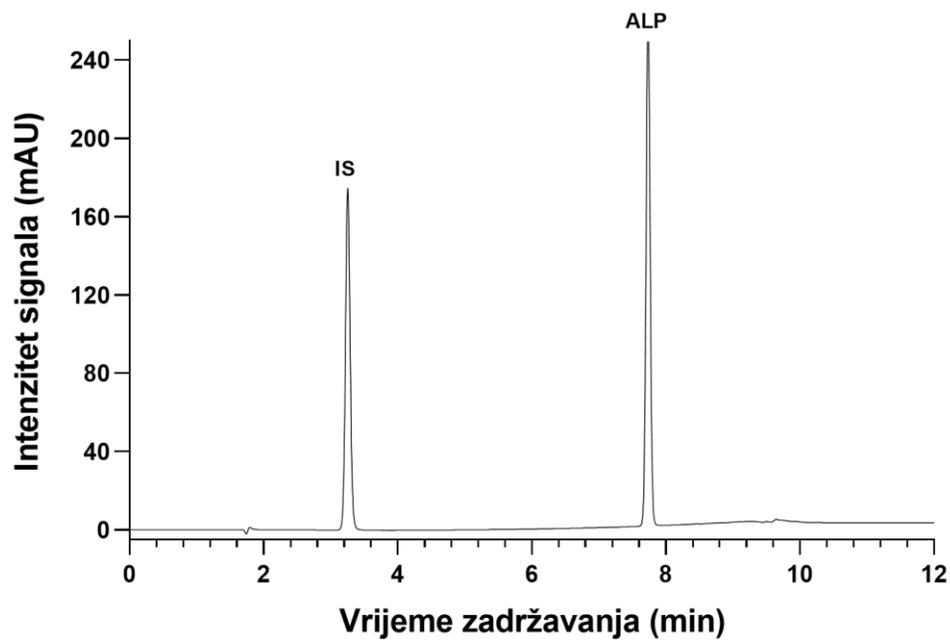
Vidljivo je kako su uočene razlike između metoda za sve analizirane uzorke ostale znatno niže od intrinzične varijabilnosti dokumentirane tijekom postupaka validacije pojedinačnih metoda. Štoviše, uski 95 %-tni interval pouzdanosti naglašava minimalnu disperziju točaka i dodatno potvrđuje odsutnost značajne analitičke razlike između dvije metode. Time ovi rezultati potvrđuju primjenjivost obje tehnike za pouzdano određivanje ALP-a u njegovom gotovom ljekovitom obliku.

4.2.4. Primjena metoda

Razvijena i validirana CE metoda primijenjena je na gotovi ljekoviti oblik ALP-a (Piqray 50 mg filmom obložene tablete) kako bi se odredio njegov sadržaj. Pronađene koncentracije ALP-a bile su u skladu s deklariranim sadržajem, s prosječnim analitičkim prinosom od $98,7 \pm 1,2$ %. Zatim su i CE i HPLC metode primijenjene na drugi gotovi ljekoviti oblik ALP-a (Piqray 200 mg filmom obložene tablete) kako bi se ispitalo postoje li razlike u njihovoj primjenjivosti na analizu ALP-a u stvarnim uzorcima (Slike 22 i 23). Pri tome nisu uočene interferencije pomoćnih tvari s vrhovima analita. Obje metode su pronašle slične koncentracije ALP-a u istom uzorku s relativnim koncentracijama (CE prema HPLC) u rasponu od 99,7 do 102,1 %.



Slika 22. Elektroferogram ekstrakta tablete alpelisiba (ALP) i unutarnjeg standarda (IS) otopine pri 50 $\mu\text{g/mL}$. Koncentracija boratnog pufera 25 mM pri pH 9,3, napon razdvajanja 30 kV, temperatura kapilare 30 $^{\circ}\text{C}$, detekcija pri $\lambda = 216 \text{ nm}$, injektiranje tijekom 6 s pri tlaku 50 mbar.



Slika 23. Kromatogram ekstrakta tablete alpelisiba (ALP) i unutarnjeg standarda (IS) otopine pri 50 $\mu\text{g/mL}$.

4.3. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute sa spektrometrijom masa za određivanje šest lijekova u ljudskoj plazmi

4.3.1. Optimizacija MEKC metode

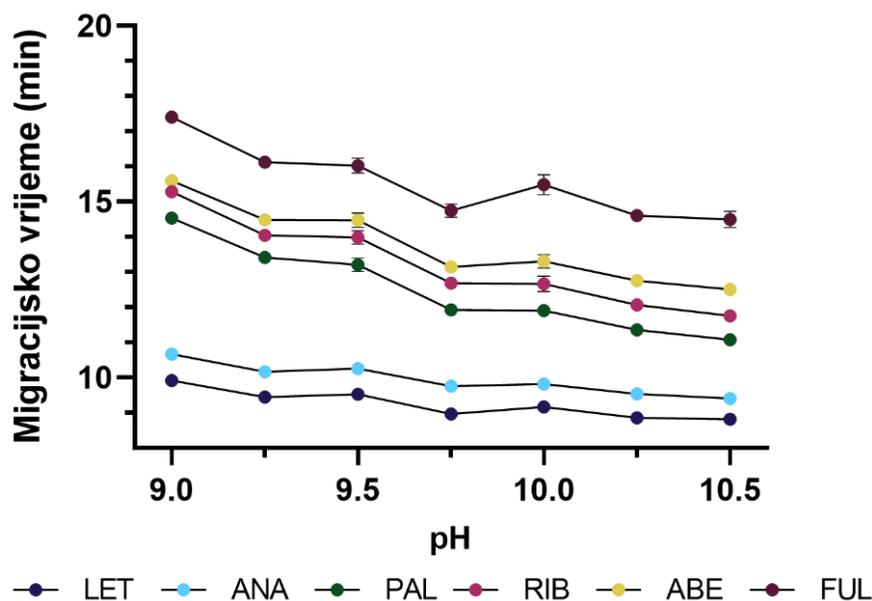
Cilj razvoja MEKC metode bio je postići odgovarajuće razdvajanje ribocikliba, plabocikliba, abemacicliba, anastrozola, letrozola i fulvestranta, uz optimalne karakteristike elektroforetskih vrhova u smislu oblika i simetrije, istovremeno osiguravajući što kraće vrijeme analize.

Iako nisu svi analiti potpuno neutralni pri bazičnom pH, ne postoji jedinstvena pH vrijednost pri kojoj bi razlike elektroforetske pokretljivosti analita bile dovoljne za odabir CZE tehnike. Stoga je MEKC je odabrana kao prikladna tehnika za ovu metodu. Razdvajanje neutralnih analita u MEKC-u temelji se na različitoj raspodjeli analita između nabijenih micela koje tvore pseudostacionarnu fazu te elektroforetskog pufera. Kako su svi analiti slabo topljivi u vodi, nužan je dodatak organskog otapala u elektroforetski pufer kako ne bi došlo do taloženja ili značajne adsorpcije analita na unutarnju stijenku kapilare. Preliminarna ispitivanja te iskustvo istraživačke skupine pokazalo je kako je MeOH optimalno organsko otapalo za ove analite. Stoga je početni sastav elektroforetskog pufera bio 30 % MeOH u APFO puferu. Parametri koji su sistematično ispitani tijekom razvoja metode su pH elektroforetskog pufera, koncentracija APFO u elektroforetskom puferu, kvalitativni i kvantitativni sastav elektroforetskog pufera, trajanje hidrodinamičkog injektiranja, dodatni hidrodinamički tlak tijekom analize, temperatura kapilare, napon razdvajanja kao i parametri *sweeping online* ukoncentriravanja uzorka.

4.3.1.1. Optimizacija pH elektroforetskog pufera

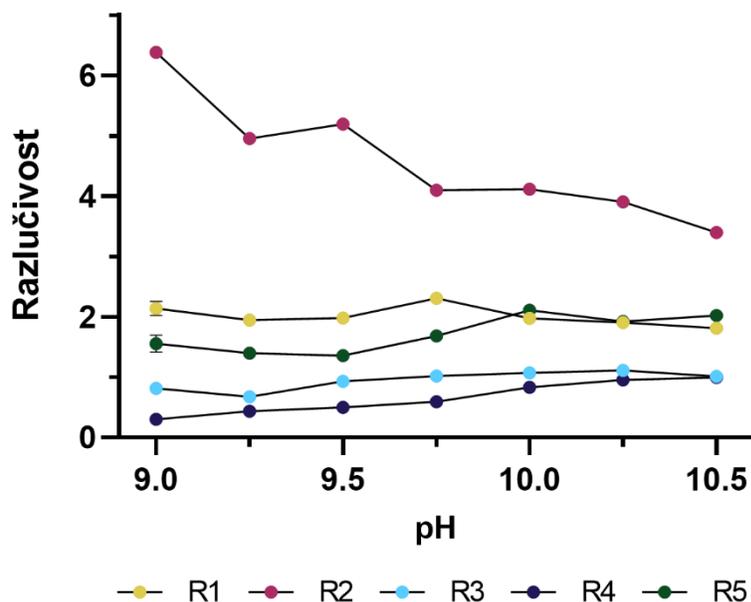
Utjecaj pH elektroforetskog pufera ispitan je u rasponu od 9,00 do 10,50. U slučaju potpuno neutralnih analita, pH elektroforetskog pufera u MEKC analizi ne bi značajno utjecao na razdvajanje analita i trajanje analize budući da ne bi utjecao na raspodjelu analita u pseudostacionarnu fazu. Ipak, pri ispitivanom pH, ABE, RIB, PAL i FUL nisu potpuno nenabijeni pa tako promjene pH mijenjaju stupanj njihove raspodjele u pseudostacionarnu fazu kao i njihove inherentne elektroforetske pokretljivosti. To objašnjava zašto je

povećanjem pH elektroforetskog pufera došlo do značajnih promjena u razlučivosti i migracijskim vremenima analita. Kao što je očekivano, povećanjem pH vrijednosti smanjila su se migracijska vremena svih analita te je najkraća analiza postignuta pri pH 10,50 (Slika 24).



Slika 24. Ovisnost migracijskih vremena letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o pH elektroforetskog pufera. Koncentracija APFO 125 mM u 30 % MeOH, temperatura kapilare 25 °C i napon razdvajanja 25 kV, hidrodinamičko injektiranje tijekom 30 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

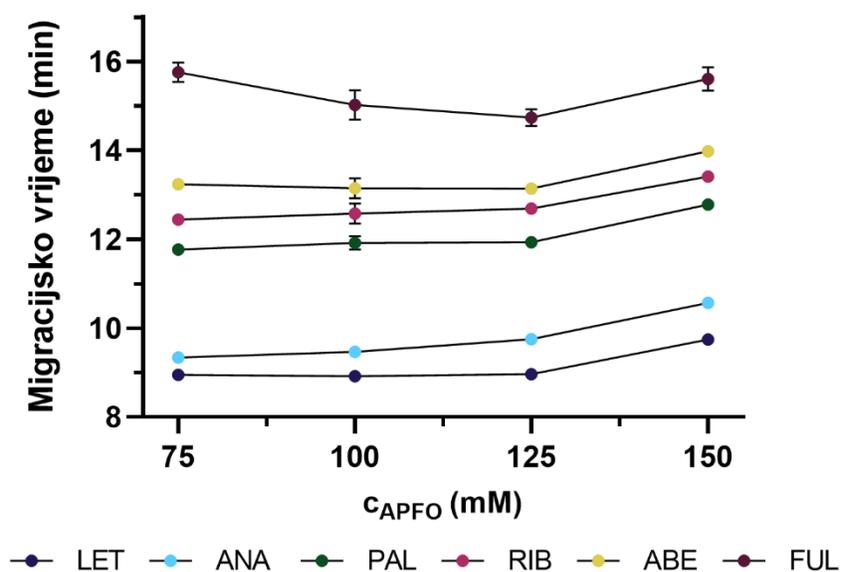
Što se tiče razlučivosti, najbolji rezultati postignuti su pri pH vrijednostima 10,25 i 10,50 (Slika 25). Zbog dvosmislenih rezultata, kao odlučujući faktor uzeta je najmanja razlučivost, ona između RIB i ABE. Kako je pri pH 10,25 ta razlučivost iznosila 0,951, dok je pri pH 10,50 bila 0,995, pH vrijednost od 10,50 uzeta je kao optimalna za daljnju optimizaciju. Moguće je da bi razlučivost bila i bolja pri pH vrijednostima iznad 10,50, ali ti eksperimenti nisu provedeni jer bi veće pH vrijednosti bile izvan puferskog područja amonijačnog pufera te bi se tako smanjila stabilnost pH vrijednosti tijekom analize, odnosno ponovljivost postupka.



Slika 25. Ovisnost razlučivosti između LET i ANA (R1), ANA i PAL (R2), PAL i RIB (R3), RIB i ABE (R4) te ABE i FUL (R5) o pH elektroforetskog pufera. Koncentracija APFO 125 mM u 30 % MeOH, temperatura kapilare 25 °C i napon razdvajanja 25 kV, hidrodinamičko injektiranje tijekom 30 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

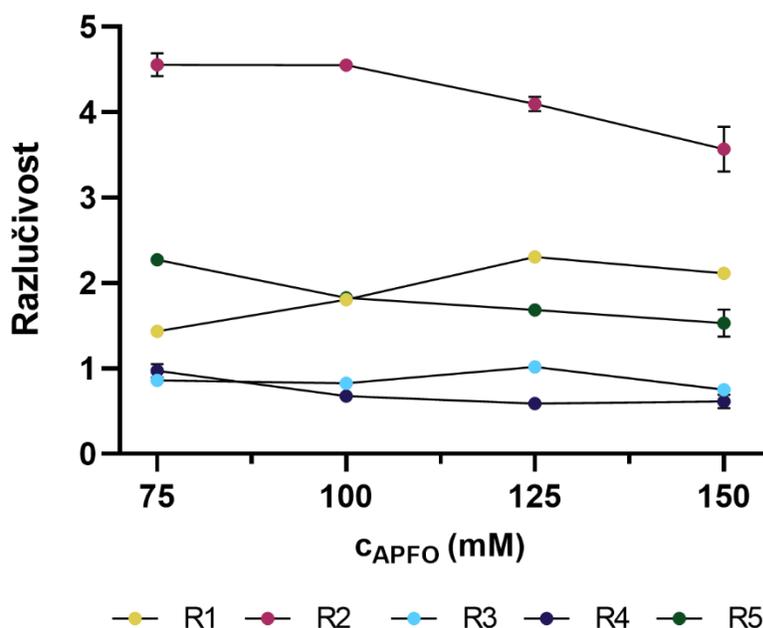
4.3.1.2. Optimizacija koncentracije APFO

Utjecaj koncentracije APFO u elektroforetskom puferu ispitan je u rasponu od 75 do 150 mM. Naime, CMC perfluorooktanoatnog aniona iznosi oko 25 mM u čistoj vodi (58,59). S druge strane, preliminarna ispitivanja u okviru ovog rada pokazala su da čak i koncentracija APFO od 50 mM nije dovoljna za potpuno formiranje micela u smjesi s velikim udjelom MeOH. Razlog tomu može biti dodatak organskog otapala u vodu čime se efektivno povećava CMC. Povećanjem koncentracije APFO produljuje se migracijsko vrijeme većine analita, ali ta promjena nije značajna (Slika 26).



Slika 26. Ovisnost migracijskih vremena letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o koncentraciji APFO u elektroforetskom puferu. pH elektroforetskog pufera 10,50, udio MeOH u puferu 30 %, temperatura kapilare 25 °C i napon razdvajanja 25 kV, hidrodinamičko injektiranje tijekom 30 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

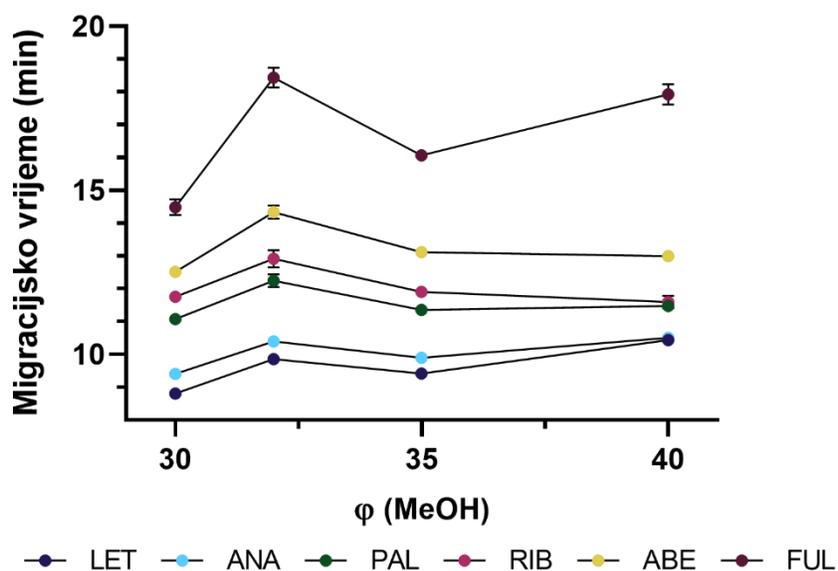
Što se tiče razlučivosti, kao odlučujući faktori odabrane su razlučivosti između PAL i RIB te između RIB i ABE. Kompromis između optimalnih vrijednosti ovih dvaju razlučivosti postiže se pri koncentraciji APFO od 125 mM te je taj uvjet odabran kao optimalan za daljnje analize (Slika 27). Dodatno, koncentracija APFO od 150 mM davala je jakosti električne struje veće od 50 μ A, što je preporučena gornja granica za većinu CE-MS sustava.



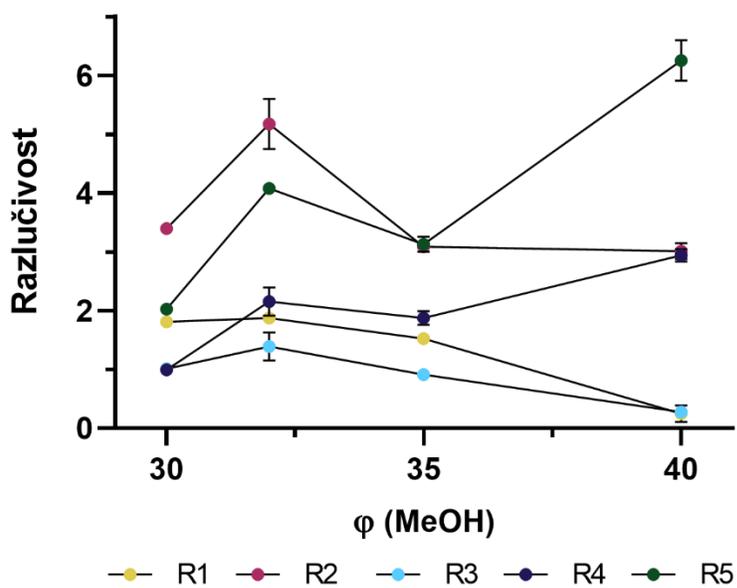
Slika 27. Ovisnost razlučivosti između LET i ANA (R1), ANA i PAL (R2), PAL i RIB (R3), RIB i ABE (R4) te ABE i FUL (R5) o koncentraciji APFO u elektroforetskom puferu. pH elektroforetskog pufera 10,50, udio MeOH u puferu 30 %, temperatura kapilare 25 °C i napon razdvajanja 25 kV, hidrodinamičko injektiranje tijekom 30 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

4.3.1.3. Optimizacija sastava elektroforetskog pufera i dodatnog hidrodinamičkog tlaka tijekom analize

Učinak kvantitativnog sastava dodanih organskih modifikatora u elektroforetski pufer ispitan je dodatkom MeOH u rasponu volumnih udjela od 20 do 40 %. Utjecaj volumnog udjela dodanog MeOH na migracijska vremena i razlučivosti analita je kompleksan, ali su najbolje vrijednosti razlučivosti postignute za volumni udio od 32 %, dok su migracijska vremena pri tom uvjetu prihvatljiva (Slike 28 i 29). Pri volumnom udjelu MeOH od 40 % uočeno je značajno pogoršanje razlučivost između nekih analita, vjerojatno zbog ranije spomenute interferencije s formiranjem micela. Zbog toga, optimalan sastav pufera za daljnje analize je smjesa MeOH i vode u omjeru 32:68 (V/V).



Slika 28. Ovisnost migracijskih vremena letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o volumnom udjelu MeOH u elektroforetskom puferu. Koncentracija APFO 125 mM pri pH 10,50, temperatura kapilare 25 °C i napon razdvajanja 25 kV, hidrodinamičko injektiranje tijekom 30 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).



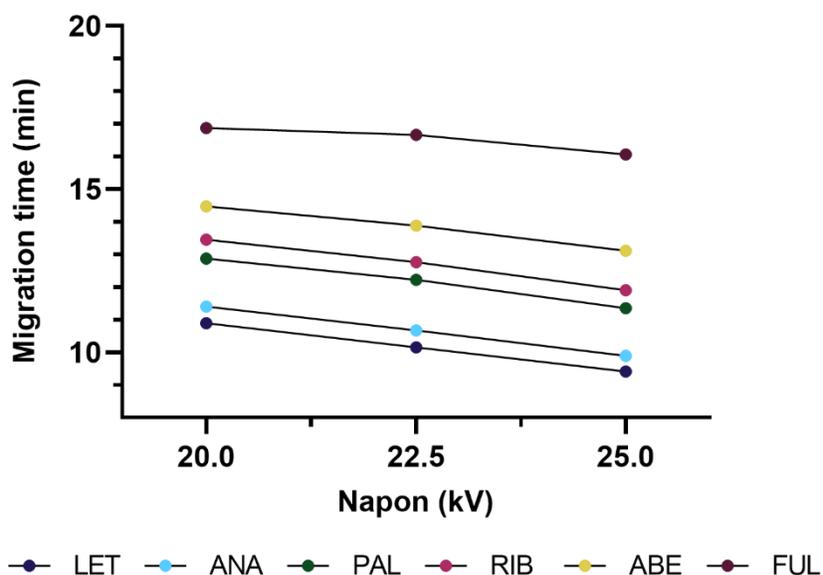
Slika 29. Ovisnost razlučivosti između LET i ANA (R1), ANA i PAL (R2), PAL i RIB (R3), RIB i ABE (R4) te ABE i FUL (R5) o volumnom udjelu MeOH u elektroforetskom puferu. Koncentracija APFO 125 mM pri pH 10,50, temperatura kapilare 25 °C i napon razdvajanja 25 kV, hidrodinamičko injektiranje tijekom 30 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Dodatno je ispitan i utjecaj kvalitativnog sastava organskih modifikatora elektroforetskog pufera. Naime, zadržan je kvantitativni sastav od 32 % organskog modifikatora, ali su u elektroforetski pufer uz MeOH dodavane male količine drugih organskih otapala. Konkretno, zadržano je 27 % MeOH uz dodatak 5 % EtOH, propan-2-ola, ACN ili tetrahidrofurana. U svim je slučajevima, a posebno prilikom dodatka ACN-a ili THF-a opažena komigracija nekih analita. Stoga, za daljnje je analize korišten sam MeOH kao organski modifikator.

Nadalje, ispitan je i utjecaj primjene dodatnog hidrodinamičkog tlaka tijekom analize u rasponu od 0 do 100 mbar, što je ujedno i gornja granica instrumenta. Pokazalo se kako povećanje dodatnog hidrodinamičkog tlaka do 70 mbar skraćuje analizu uz zadržavanje separacije analita te je stoga ta vrijednost odabrana kao optimalna.

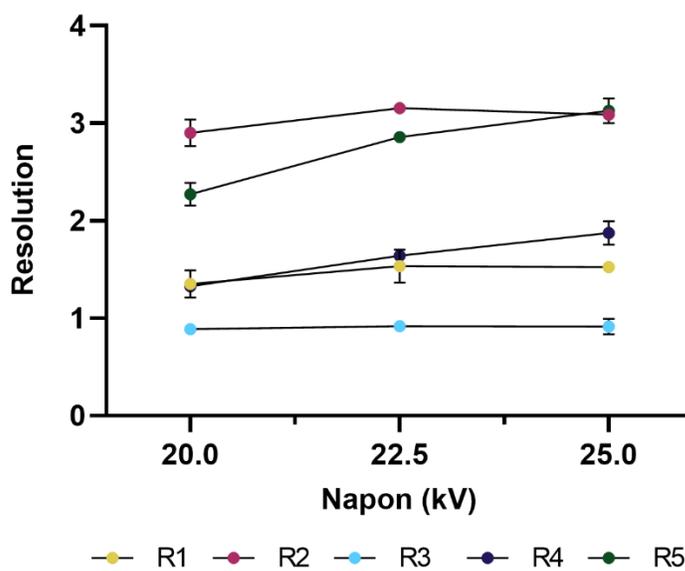
4.3.1.4. Optimizacija temperature kapilare i napona razdvajanja

Utjecaj napona razdvajanja ispitan je u rasponu od 20 do 25 kV. Naponi razdvajanja nisu ispitivani iznad 25 kV budući da je pri tim naponima jakost električne struje bila iznad preporučenih 50 μ A. Očekivano, povećanjem napona razdvajanja došlo je do smanjenja migracijskih vremena svih analita (Slika 30). Najkraća analiza postignuta je pri naponu razdvajanja od 25 kV.



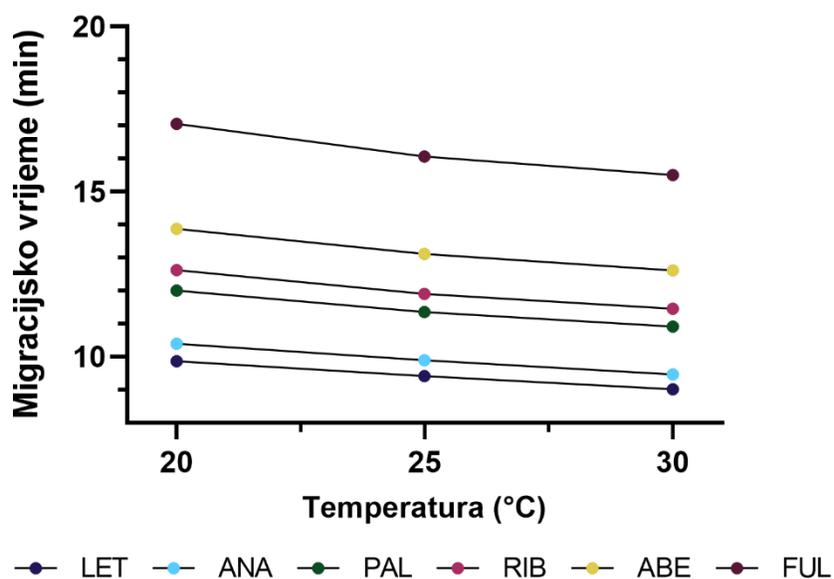
Slika 30. Ovisnost migracijskih vremena letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o naponu razdvajanja. Koncentracija APFO 125 mM u 32 % MeOH pri pH 10,50, temperatura kapilare 25 °C, hidrodinamičko injektiranje tijekom 30 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

S druge strane, razlučivost između analita podjednaka je u cijelom ispitivanom rasponu, uz neznatno bolje rezultate pri naponu razdvajanja od 25 kV (Slika 31). Kako je pri tom naponu razdvajanja ujedno opažena i najkraća analiza, za daljnje eksperimente odabran je napon od 25 kV.



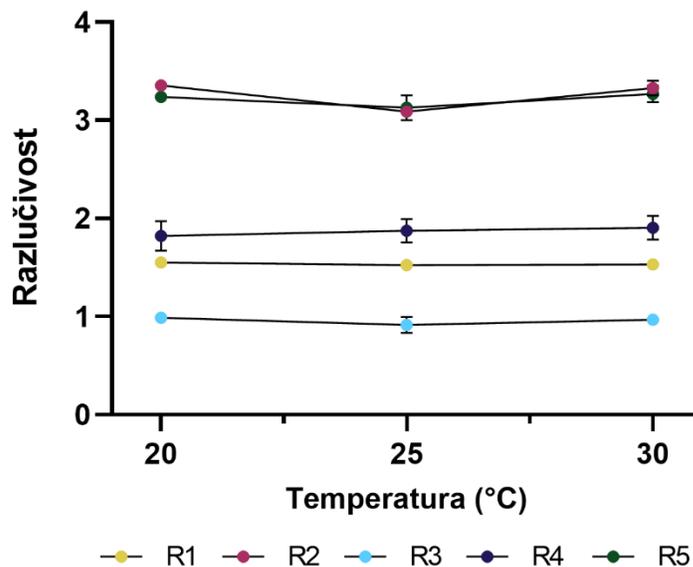
Slika 31. Ovisnost razlučivosti između LET i ANA (R1), ANA i PAL (R2), PAL i RIB (R3), RIB i ABE (R4) te ABE i FUL (R5) o naponu razdvajanja. Koncentracija APFO 125 mM u 32 % MeOH pri pH 10,50, temperatura kapilare 25 °C, hidrodinamičko injektiranje tijekom 30 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Utjecaj temperature kapilare ispitan je u rasponu od 20 do 30 °C. Temperature iznad 30 °C nisu ispitane budući da se u CE-MS sustavu dio kapilare nalazi izvan instrumenata te temperatura u tom dijelu kapilare nije regulirana. Očekivano, povećanjem temperature došlo je do smanjenja migracijskih vremena svih analita radi promjene viskoznosti elektroforetskog pufera (Slika 32). Najkraća analiza postignuta je pri temperaturi kapilare od 30 °C.



Slika 32. Ovisnost migracijskih vremena letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o temperaturi kapilare. Koncentracija APFO 125 mM u 32 % MeOH pri pH 10,50, napon razdvajanja 25 kV, hidrodinamičko injektiranje tijekom 30 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

S druge strane, razlučivost između analita podjednaka je u cijelom ispitivanom rasponu, uz neznatno bolje rezultate pri temperaturi kapilare od 30 °C (Slika 33). Kako je pri toj temperaturi ujedno opažena i najkraća analiza, za daljnje eksperimente kapilara je termostatirana na 30 °C.



Slika 33. Ovisnost razlučivosti između LET i ANA (R1), ANA i PAL (R2), PAL i RIB (R3), RIB i ABE (R4) te ABE i FUL (R5) o temperaturi kapilare. Koncentracija APFO 125 mM u 32 % MeOH pri pH 10,50, napon razdvajanja 25 kV, hidrodinamičko injektiranje tijekom 30 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

4.3.1.5. Optimizacija *sweeping online* ukoncentriravanja uzorka

Dodatno povećanje osjetljivosti metode može se postići različitim tehnikama *online* ukoncentriravanja uzorka. U MEKC metodama najčešća takva tehnika je *sweeping* koja se temelji na ukoncentriravanju neutralnih i hidrofobnih analita u uske zone prolaskom micela iz elektroforetskog pufera u zonu uzorka. Za to je potrebno uzorak pripremiti u otapalu što sličnijem elektroforetskom puferu, ali bez micela. S tim na umu, za ovu je metodu uzorak pripremljen u smjesi MeOH i vode u omjeru 32:68 (V/V), ali bez APFO-a. Na taj je način moguće injektirati znatno veću količinu uzorka u odnosu na klasično hidrodinamičko injektiranje, bez gubitka razdvajanja analita. *Sweeping* je optimiziran hidrodinamičkim injektiranjem uzorka pri 50 mbar, u rasponu od 15 do 80 sekundi. Maksimalno trajanje injektiranja bez gubitka razdvajanja analita opaženo je pri 60 sekundi. Količina uzorka injektirana tijekom 60 sekundi pri 50 mbar može se izračunati iz Hagen-Poiseuilleove jednadžbe:

$$V = \frac{\Delta p A^2 t}{8\pi\mu L} \quad (35)$$

gdje je V volumen injektiranog uzorka, Δp razlika tlakova na krajevima kapilare, A površina unutarnjeg presjeka kapilare, t vrijeme injektiranja, μ dinamička viskoznost elektroforetskog pufera i L duljina kapilare. Iz te se jednadžbe dobiva kako je volumen injektiranog uzorka 68,7 nL što odgovara otprilike 4,7 % volumena kapilare. Za kvantifikaciju povećanja osjetljivost metode uslijed *sweepinga* u odnosu na klasično hidrodinamičko injektiranje, izračunati su faktori povećanja osjetljivosti (engl. *sensitivity enhancement factor*, SEF) na temelju visina elektroforetskih vrhova koristeći sljedeću jednadžbu (139):

$$SEF_{height} = \frac{\frac{\text{visina vrška prilikom sweeping injektiranja}}{\text{koncentracija analita prilikom sweeping injektiranja}}}{\frac{\text{visina vrška prilikom klasičnog injektiranja}}{\text{koncentracija analita prilikom klasičnog injektiranja}}} \quad (36)$$

U usporedbi s klasičnim hidrodinamičkim injektiranjem (5 s pri 50 mbar), *sweeping* injektiranje (60 s pri 50 mbar) rezultiralo je vrijednostima *SEF* od 252 za LET, 207 za ANA, 10,3 za PAL, 173 za RIB, 117 za ABE i 209 za FUL. Vidljivo je kako je primjenom *sweeping online* tehnike ukoncentriravanja uzorka došlo do značajnog povećanja osjetljivosti što je ključno za određivanje očekivanih, vrlo malih koncentracija analita prisutnih u ljudskoj plazmi.

4.3.2. Optimizacija MS/MS metode

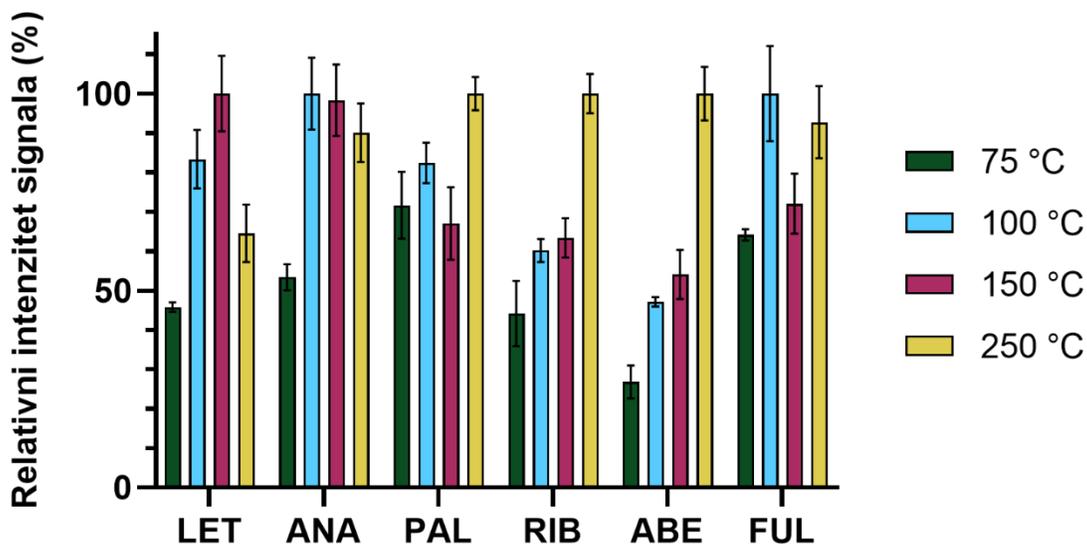
MS/MS uvjeti optimizirani su korištenjem MRM-a u pozitivnom ESI modu. Za sve analite, najzastupljeniji matični ion bio je protonirani molekularni ion $[M+H]^+$. Za svaki matični ion analita odabrana su dva ionska prijelaza. Najintenzivniji prijelaz korišten je za kvantifikaciju, dok je drugi prijelaz, što je moguće specifičniji za dani analit, korišten za kvalifikaciju. U analizi su postavljeni vremenski segmenti s različitim praćenim prijelazima sukladno migracijskim vremenima analita. Vrijeme zadržavanja (engl. *dwel time*) za svaki analit postavljeno je kako bi se postiglo vrijeme ciklusa od 500 ms u svakom segmentu, čime se osigurava dovoljno podatkovnih točaka po elektroforetskom vrhu. Fragmentorski naponi za svaki analit kao i odgovarajuće kolizijske energije i izlazni naponi u kolizijskoj ćeliji za svaki ionski prijelaz optimizirani su izravnim injektiranjem svakog analita bez CE instrumenta kako bi se dobio maksimalan odziv MS detektora. Parametri ionskog izvora optimizirani su

koristeći razvijenu MEKC metodu, budući da neki parametri ionskog izvora poput tlaka raspršivača mogu utjecati na razdvajanje analita, a elektroforetski uvjeti mogu utjecati na ionizaciju analita u izvoru. Obično se optimiziraju klasični ESI parametri poput brzine protoka i temperature plina za sušenje, napona ESI kapilare i tlaka raspršivača. U ovom istraživanju, budući da je korišten Agilent Jet Stream izvor, optimizirani su i dodatni parametri poput brzine protoka i temperature obložnog plina (engl. *sheath gas*) te napon mlaznice. Nadalje, optimizirani su kvalitativni i kvantitativni organski sastav obložne tekućine (engl. *sheath liquid*), koncentracija mravlje kiseline u obložnoj tekućini kao i brzina protoka obložne tekućine. Optimalni parametri odabrani su na temelju intenziteta signala analita.

4.3.2.1. Optimizacija Agilent Jet Stream parametara

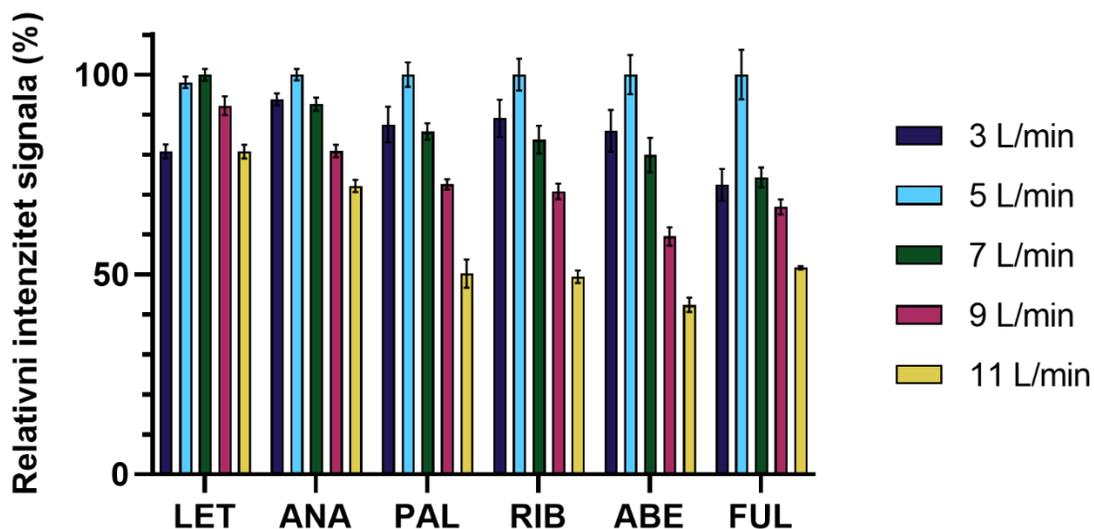
AJS-ESI izvor koristi pregrijani dušik kao obložni plin s ciljem fokusiranja spreja raspršivača čime se povećava desolvacija otapala u spreju, odnosno osjetljivost metode u odnosu na klasičan ESI izvor. Ova se značajka češće koristi u LC-MS metodama gdje se koristi mnogo veći protok mobilne faze u odnosu na CE-MS metode. Do sada je objavljen samo jedan rad koji opisuje optimizaciju AJS-ESI izvora u MEKC-MS/MS metodama (139). Taj izvor opisuje kako AJS-ESI parametri značajno više utječu na osjetljivost metode u odnosu na klasične ESI parametre. S tim na umu, i u ovom je istraživanju prvo ispitan utjecaj tih parametara.

Konkretno, utjecaj temperature obložnog plina na osjetljivost ispitan je u rasponu od 75 do 250 °C, uz protok obložnog plina od 5 L/min i napon mlaznice od 2000 V. Temperatura obložnog plina od 75 °C dovela je do slabe ponovljivosti signala. Zadovoljavajuća osjetljivost za sve analite dobivena je na 250 °C osim za LET, čija je optimalna osjetljivost uočena na 150 °C, vjerojatno zbog njegove termolabilnosti (Slika 34).



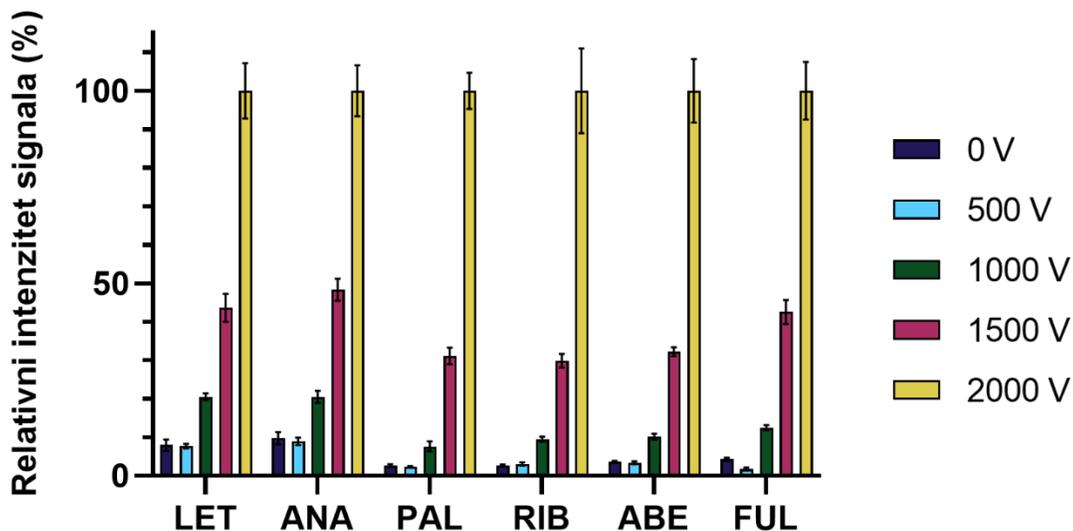
Slika 34. Ovisnost relativnih intenziteta signala letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o temperaturi obložnog plina. Protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 250 °C, protok plina 5 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 4 μ L/min. ($N = 3$, trake pogreška predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Ipak, osjetljivost LET bila je prihvatljiva na 250 °C, stoga su eksperimenti nastavljani s tom temperaturom obložnog plina. To je suprotno prethodnim literaturnim nalazima da niska temperatura obložnog plina pogoduje ionizaciji. Iako niža temperatura obložnog plina smanjuje zonu toplinskog fokusiranja pregrijanog dušika, koji može djelovati kao električni izolator za ione, vrijedi napomenuti da zona toplinskog fokusiranja ovisi i o brzini protoka obložnog plina. Brzina protoka obložnog plina proučavana je u rasponu od 3 do 11 L/min. Najbolja osjetljivost za sve analite postignuta je pri protoku od 5 L/min (Slika 35).



Slika 35. Ovisnost relativnih intenziteta signala letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o brzini protoka obložnog plina. Temperatura obložnog plina 250 °C, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 250 °C, protok plina 5 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 4 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Stoga su se u ovom slučaju relativno veća temperatura obložnog plina od 250 °C i manji protok od 5 L/min pokazali optimalnima. To sugerira da izolacijski učinak zone toplinskog fokusiranja ovisi o svim AJS-ESI parametrima, kao i o naboju iona i količini iona. Stoga bi različite pristupe u optimizaciji AJS-ESI parametara u MEKC-MS/MS sustavima trebalo istraživati od slučaja do slučaja. Konačno, napon mlaznice testiran je u rasponu od 0 do 2000 V. Povećanje napona mlaznice na 2000 V povećalo je osjetljivost za cijeli red veličine (Slika 36).



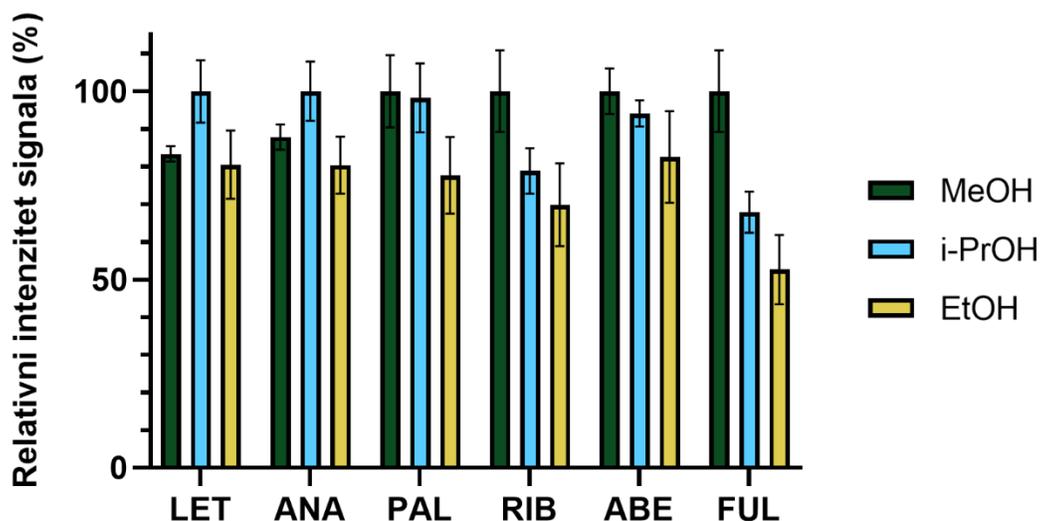
Slika 36. Ovisnost relativnih intenziteta signala letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o naponu mlaznice. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, temperatura plina 250 °C, protok plina 5 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 4 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Ovo značajno poboljšanje moglo bi se objasniti učinkom dodatnog napona primijenjenog na vrh kapilare u prevladavanju prethodno spomenutog učinka električne izolacije pregrijanog dušika. Vrijedi napomenuti da je napon mlaznice posebno koristan u MEKC-MS metodama jer neutralni spojevi, koji se uglavnom analiziraju ovom tehnikom, i inače imaju manji stupanj ionizacije. Ovo istraživanje potvrđuje prethodno objavljene rezultate da desolvacija iona nije kritična pri manjim protocima obložne tekućine kao što su 1–15 μ L/min koji se uglavnom koriste u CE-MS-u te da visoki napon mlaznice u kombinaciji s niskim protokom ili niskom temperaturom obložnog plina najviše koriste CE-MS sustavima (139).

4.3.2.2. Optimizacija sastava i brzine protoka obložne tekućine

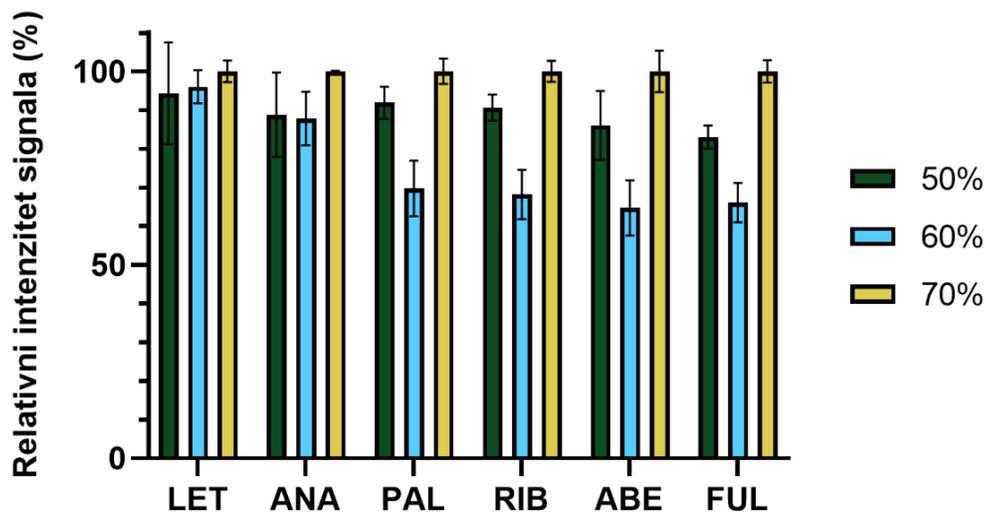
Budući da brzina protoka u CE kapilari nije dovoljna za stvaranje stabilnog spreja za većinu ionskih izvora, u ovoj studiji korišten je koaksijalni spoj obložne tekućine i ionskog izvora. Iako obložna tekućina pomaže u stvaranju stabilnog spreja, u isto vrijeme razrjeđuje analite koji

dolaze iz CE sustava. Stoga je ispitan utjecaj sastava i protoka obložne tekućine na osjetljivost metode. Kvalitativni sastav obložne tekućine optimiziran je miješanjem ACN, MeOH, EtOH ili i-PrOH s vodom i mravljom kiselinom u omjeru 50/49,9/0,1 (V/V/V). MeOH i i-PrOH pokazali su slične intenzitete signala, s tim da je MeOH bio nešto bolji (Slika 37). EtOH i ACN uzrokovali su niže intenzitete signala, pri čemu je LET signal bio značajno prigušen kada je korišten ACN. Stoga je MeOH odabran kao optimalno organsko otapalo.



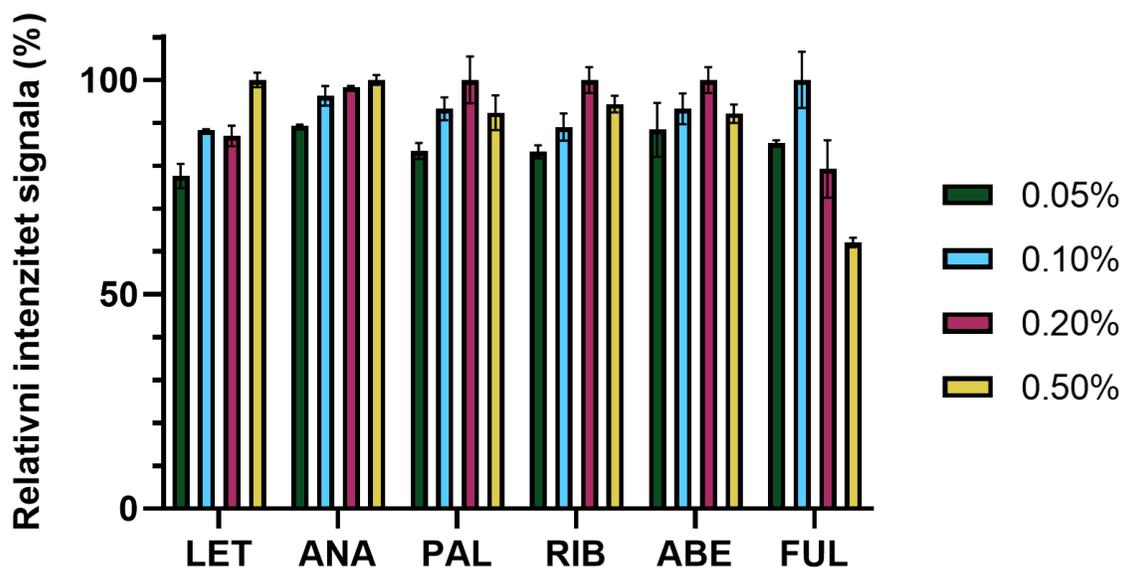
Slika 37. Ovisnost relativnih intenziteta signala letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o organskom otapalu u obložnoj tekućini. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 250 °C, protok plina 5 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % organskog otapala u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 4 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Zatim je kvantitativni sastav obložne tekućine ispitan u rasponu od 50 do 80 % MeOH u vodi s 0,1 % mravlje kiseline. Intenzitet signala rastao je s povećanjem sastava MeOH do 80 %, kada se bazna linija značajno pogoršala (Slika 38). Stoga je u daljnjim eksperimentima korišten 70 % MeOH u vodi.



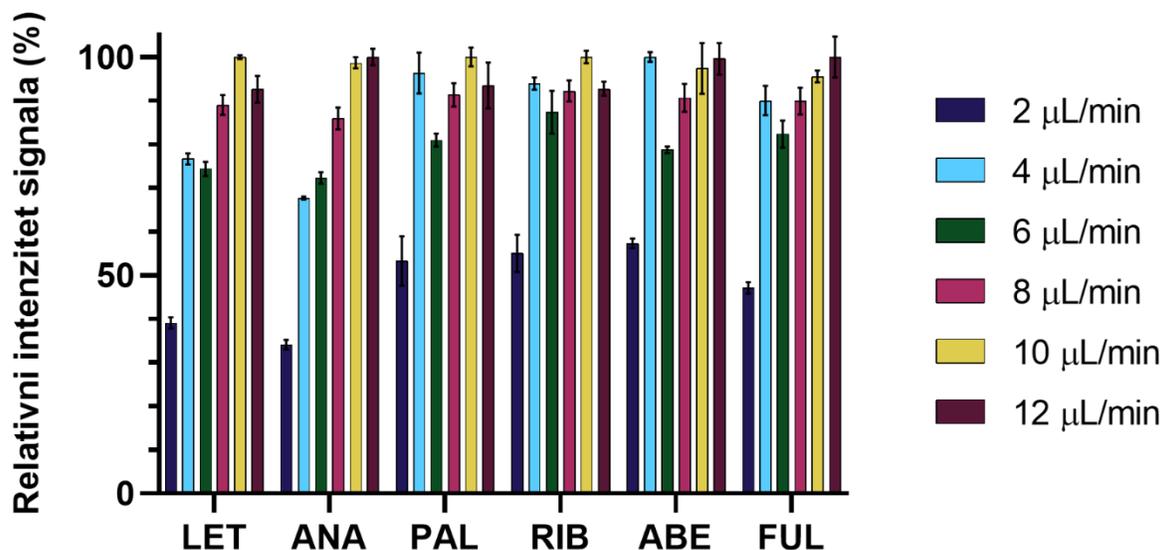
Slika 38. Ovisnost relativnih intenziteta signala letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o volumnom udjelu MeOH u obložnoj tekućini. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 250 °C, protok plina 5 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 4 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Zatim je istražen utjecaj udjela mravlje kiseline u 70 % MeOH u rasponu od 0 do 0,5 %. Obložna tekućina bez mravlje kiseline pokazala je dobru osjetljivost, ali nisku ponovljivost. Osim toga, utjecaj različitih udjela mravlje kiseline u obložnoj tekućini na intenzitet signala nije bio značajan. Ipak, obložna tekućina s 0,2 % mravlje kiseline dala je nešto bolju osjetljivost (Slika 39).



Slika 39. Ovisnost relativnih intenziteta signala letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o volumnom udjelu mravlje kiseline u obložnoj tekućini. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 250 °C, protok plina 5 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 70 % MeOH u vodi s dodatkom mravlje kiseline pri protoku 4 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

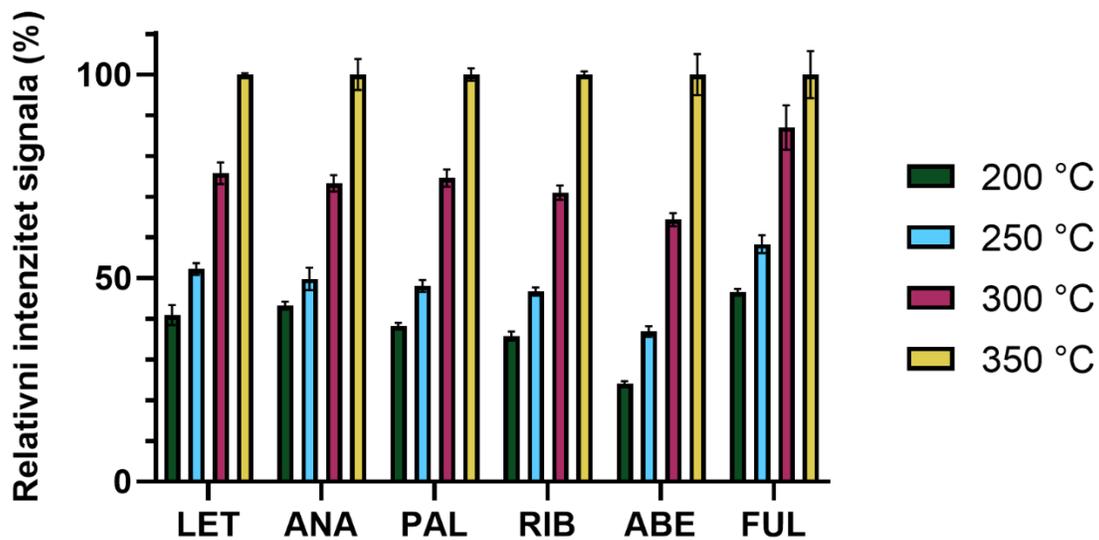
Konačno, brzina protoka obložne tekućine ispitana je u rasponu od 2 do 12 μ L/min. Optimalna osjetljivost postignuta je kada je obložna tekućina dovođena u raspršivač protokom od 10 μ L/min (Slika 40).



Slika 40. Ovisnost relativnih intenziteta signala letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o brzini protoka obložne tekućine. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 250 °C, protok plina 5 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 70 % MeOH u vodi s dodatkom 0,2 % mravlje kiseline. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

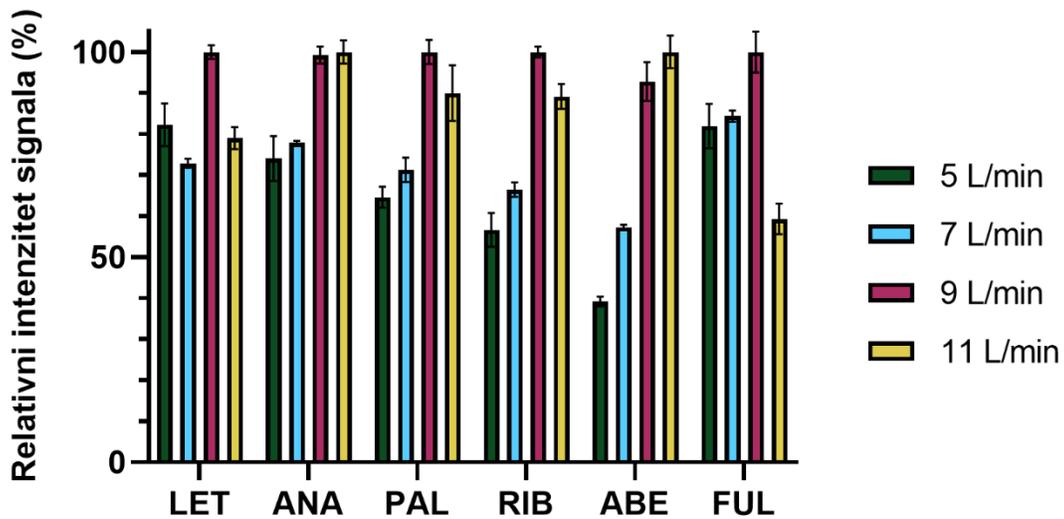
4.3.2.3. Optimizacija ESI parametara

Na kraju, ispitan je utjecaj klasičnih ESI parametara na osjetljivost metode. Prvo je ispitan utjecaj temperature plina za desolvaciju u rasponu od 200 do 350 °C. Nije ispitana temperatura manja od 200 °C kako bi se osigurala hlapljivost pentadekafluorooktanoata te prevenirala supresija iona. Najveći intenzitet signala za sve analite postignut je pri temperaturi od 350 °C te je ta temperatura odabrana za daljnje eksperimente (Slika 41).



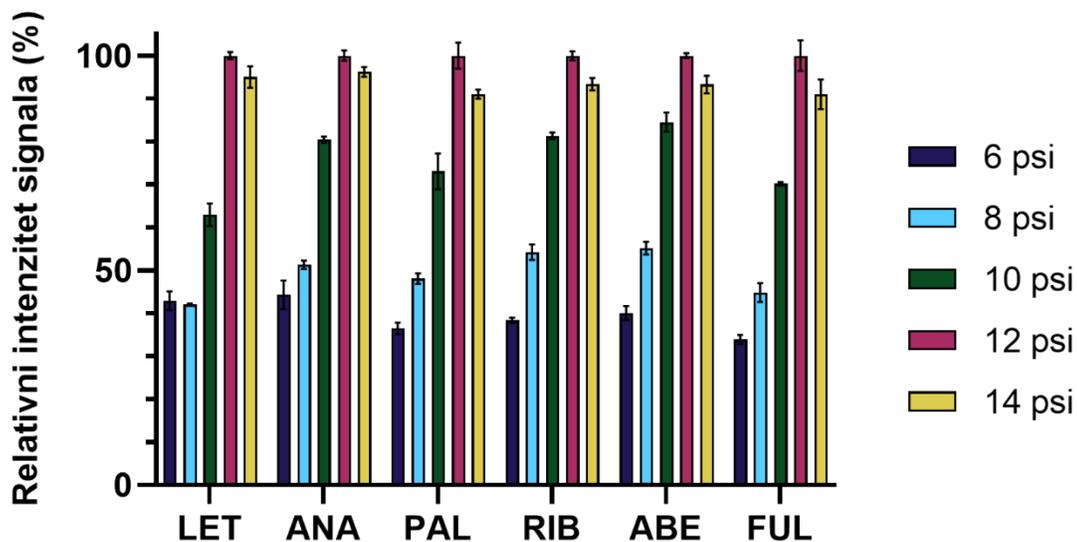
Slika 41. Ovisnost relativnih intenziteta signala letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o temperaturi plina za sušenje. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, protok plina 5 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 70 % MeOH u vodi s dodatkom 0,2 % mravlje kiseline pri protoku 10 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Nakon toga, ispitan je utjecaj brzine protoka plina za desolvaciju u rasponu od 5 do 11 L/min pri čemu je najveći intenzitet signala analita postignut pri 9 L/min te je ta brzina protoka korištena u daljnjim eksperimentima (Slika 42).



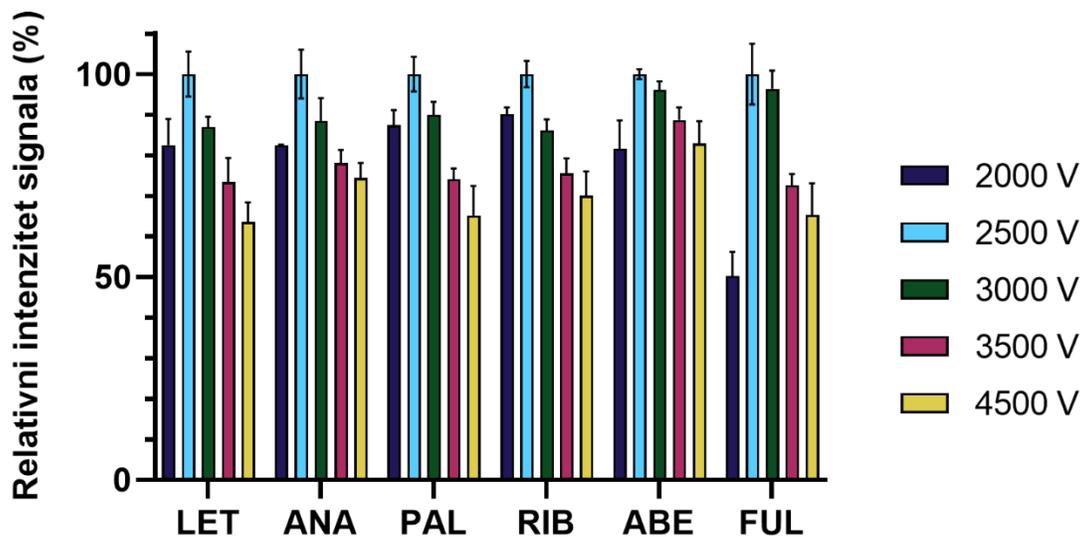
Slika 42. Ovisnost relativnih intenziteta signala letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o protoku plina za sušenje. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 350 °C, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 70 % MeOH u vodi s dodatkom 0,2 % mravlje kiseline pri protoku 10 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Nadalje, ispitan je utjecaj tlaka raspršivača u rasponu od 6 do 14 psi pri čemu je najveći intenzitet signala za sve analite postignut pri tlaku od 12 psi (Slika 43).



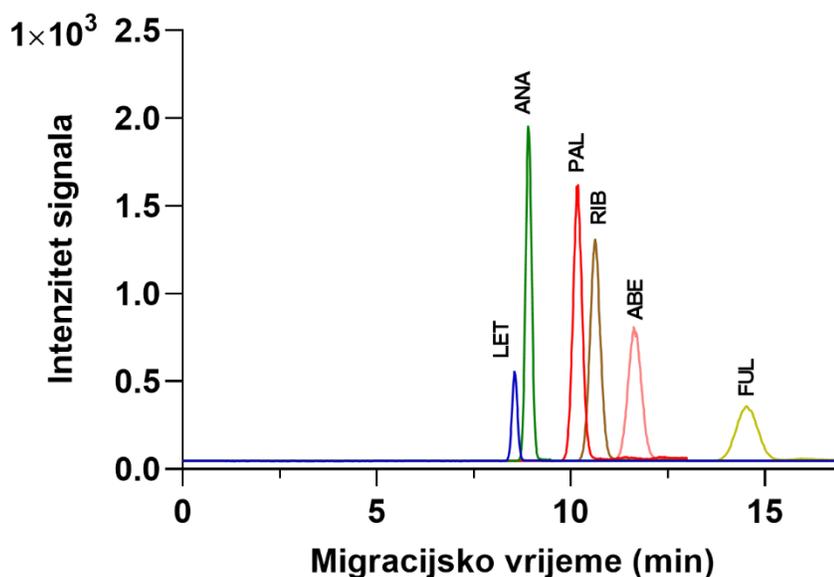
Slika 43. Ovisnost relativnih intenziteta signala letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o tlaku raspršivača. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 350 °C, protok plina 9 L/min, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 70 % MeOH u vodi s dodatkom 0,2 % mravlje kiseline pri protoku 10 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Konačno, ispitan je i utjecaj napona ESI kapilare u rasponu od 2000 do 4500 V te je optimalan intenzitet signala za sve analite opažen pri naponu od 2500 V te je taj napon korišten u daljnjim eksperimentima (Slika 44).



Slika 44. Ovisnost relativnih intenziteta signala letrozola (LET), anastrozola (ANA), palbocikliba (PAL), ribocikliba (RIB), abemacicliba (ABE) i fulvestranta (FUL) o naponu kapilare. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 350 °C, protok plina 9 L/min, tlak raspršivača 12 psi, obložna tekućina: 70 % MeOH u vodi s dodatkom 0,2 % mravlje kiseline pri protoku 10 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Maseni elektroferogram standardne otopine svih šest analita pri optimiziranim MEKC-MS uvjetima dan je na Slici 45.



Slika 45. Reprezentativni maseni elektroferogram pri optimalnim MEKC-MS/MS uvjetima pri koncentracijama 2,5 $\mu\text{g/mL}$ za LET, ANA, PAL i RIB te 5 $\mu\text{g/mL}$ za ABE i FUL.

4.3.3. Optimizacija pripreme uzorka

Ljudska plazma sadrži širok raspon različitih spojeva, od kojih neki mogu značajno utjecati na analizu zbog učinaka matrice ili nekompatibilnosti s instrumentima. Stoga je često kod razvoja bioanalitičke metode potrebna opsežna priprema uzorka. Proteini su komponente plazme koje onemogućuju analizu na većini instrumenata zbog njihovog taloženja u organskim otapalima. Stoga se obično prethodno provodi PPT. U prethodnim istraživanjima analita od interesa, PPT je proveden korištenjem ACN, MeOH, smjese ACN-MeOH, acetona, 70% perklorne kiseline ili 4 M amonijevog sulfata (134,140,141). ACN i aceton rezultirali su dobrim taloženjem proteina s velikim iskorištenjem analita. Međutim, uzorak tretiran acetonom pokazao je veće pjenjenje, što je rezultiralo otežanim rukovanjem uzorkom. Također, testirani su volumni omjeri agensa za PPT i plazme 4:1 i 10:1, a pokazalo se da je 4:1 bolji u slučaju ACN-a. U ovom radu, PPT je proveden dodatkom 600 μL ACN-a u 150 μL plazme. Nakon vrtložnog miješanja i centrifugiranja, 700 μL supernatanta je sakupljeno, upareno do suha i otopljeno u smjesi MeOH i vode omjera 32:68 (V/V). Uzorci pripremljeni na ovaj način uspješno su analizirani razvijenom MEKC-MS/MS metodom, ali ponovljivost kao i

stabilnost električne struje nisu bili zadovoljavajući. To može biti posljedica neuklanjanja svih složenih komponenti plazme koje potom prijanaju na stijenke kapilare tijekom analize uzrokujući neponovljive učinke matrice. Očito je bio potreban dodatni korak pročišćavanja uzorka. U prethodnim studijama istraživačke skupine razvijene su tri DLLME metode za analizu šest lijekova od interesa u uzorcima plazme (140). Najbolji ukupni prinosi postignuti su korištenjem DLLME vodenog uzorka (AqS-DLLME) - metode koja je zahtijevala vrlo male volumene uzorka i opasnih otapala, kao i bez dodatne skupe opreme. Stoga je ova priprema uzorka ispitana i u ovom istraživanju, nakon PPT-a i uparavanja supernatanta. U izvornom radu, AqS-DLLME je proveden otapanjem suhog ostatka nakon PPT-a u 100 μL vode. Zatim je dodana smjesa za ekstrakciju sastavljena od 50 μL i-PrOH i 100 μL CLF-a te je smjesa snažno miješana. Nakon centrifugiranja, cijeli donji sloj je sakupljen, uparen do suha, a suhi ostatak je otopljen u 40 μL 65 % (V/V) MeOH prije analize. Druga organska otapala su također testirana kao dispergeri i ekstraktanti, ali CLF i i-PrOH rezultirali su najboljim iskorištenjem (84,63 – 96,61 %) i zelenošću metode. Stoga je i u ovom radu korištena DLLME smjesa od 50 μL i-PrOH i 100 μL CLF. Prije analize, suhi ostatak nakon DLLME otopljen je u 25 μL smjese MeOH i vode omjera 32:68 (V/V). Na taj način, budući da je u PPT-u korišteno 150 μL plazme, dobiveno je ukoncentriravanje analita za faktor 5,6. U ovom slučaju, moguće je koristiti relativno male količine otapala uzorka jer CE instrument injektira samo nanolitre uzorka, osiguravajući da će u bočici za injektiranje ostati dovoljno uzorka čak i ako je potrebno više injekcija istog uzorka. Konačno, za određivanje analitičkog prinosa pri različitim koncentracijama, provedene su analize pri niskim, srednjim i visokim koncentracijskim razinama u triplikatu te su prosječna iskorištenja prikazana u Tablici 18.

Tablica 18. Prosječni analitički prinosi i pripadajuće RSD vrijednosti za PPT-AqS-DLLME pripremu uzorka ($N = 3$ po koncentracijskoj razini).

Analit	γ (ng/mL)	Analitički prinos (%)	Ponovljivost (RSD %)	Analit	γ (ng/mL)	Analitički prinos (%)	Ponovljivost (RSD %)
	75	99,0	13,0		1250	97,9	7,4
LET	112,5	95,1	4,3	RIB	1875	96,3	7,4
	300	94,3	8,6		5000	89,4	1,1
	50	100,4	0,9		125	97,7	17,3
ANA	75	95,9	0,5	ABE	187,5	104,5	11,0
	200	97,9	0,2		500	104,9	2,2
	75	100,1	2,3		25	101,7	2,5
PAL	112,5	95,0	2,0	FUL	37,5	99,3	2,2
	300	99,6	1,0		100	98,6	3,3

Dobivena iskorištenja i RSD vrijednosti bile su izvrsne, što pokazuje da je PPT nakon čega slijedi AqS-DLLME optimalna priprema uzorka u ovom slučaju.

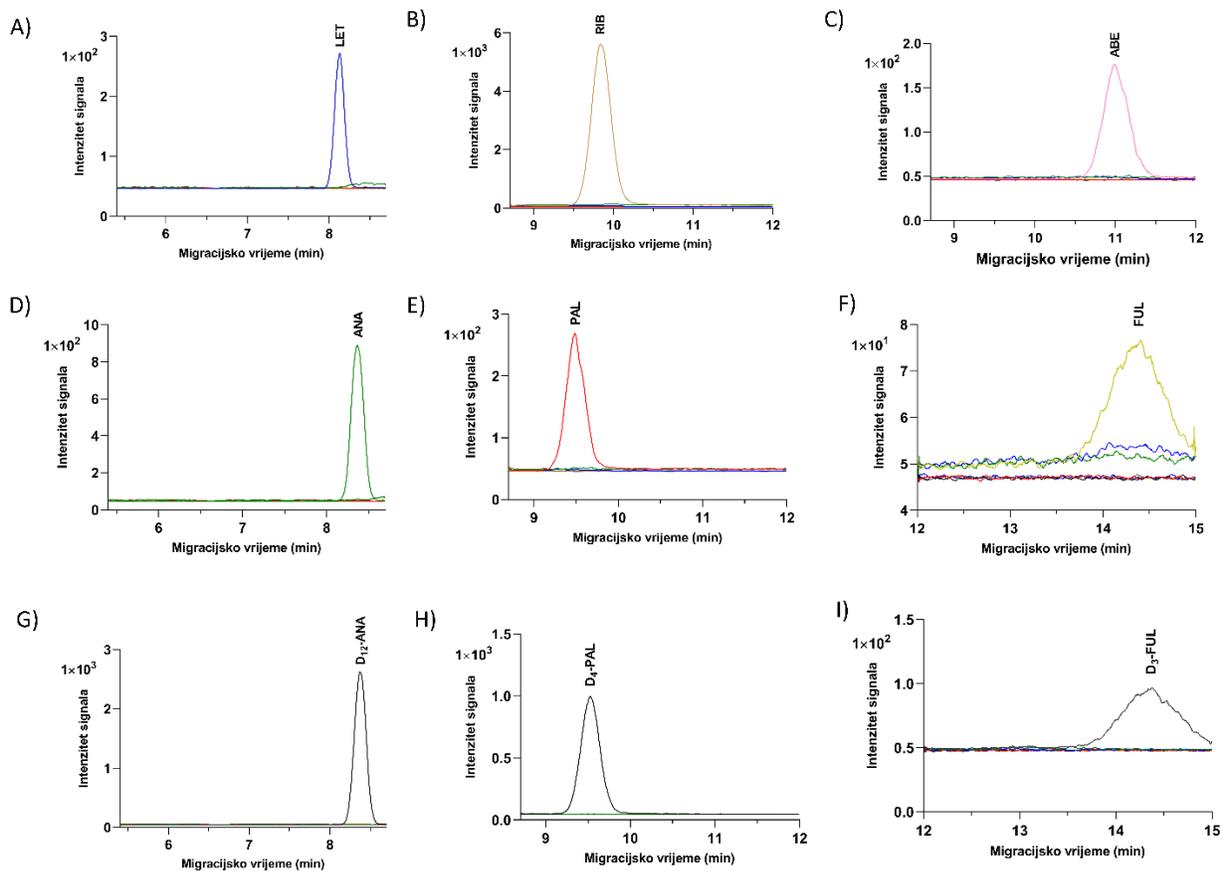
4.3.4. Validacija metode

Razvijena metoda je u cijelosti validirana u skladu sa smjernicama ICH i EMA za validaciju bioanalitičkih metoda s obzirom na selektivnost, specifičnost, učinak matrice, linearnost i kalibracijski raspon, točnost i preciznost, prijenos analita (engl. *carry-over*) i stabilnost (142). Kontrolni uzorci (engl. *quality control*, QC) korišteni u eksperimentima točnosti i preciznosti pripremljeni su na četiri razine koncentracije: donja granica određivanja (LLOQ), niski QC, srednji QC i visoki QC. Učinak matrice i stabilnost ispitani su koristeći niski i visoki QC. Sve smjernice za validaciju bioanalitičkih metoda preporučuju korištenje unutarnjih standarda te njihova odsutnost mora biti opravdana. Deuterirani analozi analita kao unutarnji standardi mogu uvelike poboljšati analitičke performanse metode, ali su s druge strane obično vrlo skupi te kao takvi nisu široko dostupni. Kako bi se smanjio ekonomski teret metode i povećala njezina ekološka prihvatljivost, istražen je pristup s primjenom manje unutarnjih standarda. Zbog strukturne sličnosti i činjenice da analiti migriraju blizu, što osigurava sličan učinak

matrice, neki unutarnji standardi mogu se koristiti za korekciju neodgovarajućih analita. U ovom radu, D₁₂-ANA je korišten za korekciju LET i ANA, D₄-PAL je korišten za korekciju PAL, RIB i ABE, dok je D₃-FUL korišten za korekciju FUL. Iz procjene točnosti i preciznosti metode (Tablica 20), može se vidjeti da su ANA, PAL i FUL pokazali nešto bolju opću točnost i preciznost zbog prisutnosti odgovarajućih deuteriranih standarda. Ipak, točnost i preciznost LET, RIB i ABE također su bile zadovoljavajuće te je stoga ovaj pristup korišten u daljnjim eksperimentima.

4.3.4.1. Selektivnost, specifičnost i prijenos analita

Selektivnost metode ispitana je koristeći plazme iz šest različitih izvora, uključujući vrlo lipemične i hemolizirane plazme. Intenziteti signala bilo kojih interferirajućih spojeva pri migracijskim vremenima analita nisu bili veći od 20 % intenziteta signala analita na LLOQ razini i 5 % intenziteta signala unutarnjeg standarda (Slika 46).



Slika 46. Preklopljeni maseni elektroferogrami svakog analita na LLOQ koncentracijskoj razini i šest različitih slijepih uzoraka plazme na kvantifikacijskim ionskim prijelazima. A) LET, B) RIB, C) ABE, D) ANA, E) PAL, F) FUL, G) D₁₂-ANA, H) D₄-PAL i I) D₃-FUL

Budući da nisu poznati metaboliti ili produkti razgradnje analita s istim molekulskim masama kao analiti, metoda je također vrlo specifična, zbog MRM načina rada. Nadalje, intenziteti signala u slijepom uzorku nakon injekcije najvišeg kalibracijskog standarda nisu bili veći od 20 % intenziteta signala analita i 5 % intenziteta signala unutarnjeg standarda na LLOQ razini, što znači da nema značajnog prijenosa analita.

4.3.4.2. Linearnost i kalibracijski raspon

Linearnost metode ispitana je u kalibracijskim rasponima 30-300 ng/mL za LET, 20-200 ng/mL za ANA, 30-300 ng/mL za PAL, 500-5000 ng/mL za RIB, 50-500 ng/mL za ABE i 10-100 ng/mL za FUL. Kalibracijski rasponi postavljeni su prema opaženim koncentracijama lijekova u kliničkim studijama, odnosno koncentracijama koje se realno očekuju u uzorcima plazme pacijenata. Treba istaknuti da su ovom metodom mogle biti dokazane i koncentracije znatno ispod LLOQ vrijednosti svih analita jer su omjeri signala i šuma na LLOQ razinama bili vrlo veliki, kao što se može vidjeti na Slici 46. Rezultati ispitivanja linearnosti prikazani su u Tablici 19.

Tablica 19. Kalibracijske krivulje te pripadajući parametri linearne regresije za sve analite

Analit	Unutar dana ¹			Između dana ²			R
	Nagib	RSD (%)	Odsječak	Nagib	RSD (%)	Odsječak	
LET	0,002183	2,7	0,021475	0,002542	7,1	-0,019160	0,9802–0,9984
ANA	0,013070	2,5	0,031543	0,015383	5,5	0,016949	0,9945–0,9997
PAL	0,006415	2,3	0,005510	0,007257	3,4	0,003132	0,9941–0,9994
RIB	0,008335	7,5	-0,147830	0,009393	5,8	1,127633	0,9890–0,9984
ABE	0,003744	8,9	-0,019960	0,004096	8,7	0,014977	0,9922–0,9989
FUL	0,031343	1,8	0,094573	0,045093	2,4	0,10633	0,9966–0,9991

$N = 6 - 9$ kalibracijskih točaka po krivulji. ¹ Ponovljivost linearnosti unutar dana izračunata je koristeći tri kalibracijske krivulje u istom danu. ² Ponovljivost linearnosti između dana izračunata je koristeći šest kalibracijskih krivulja tijekom četiri dana.

Kalibracijske krivulje konstruirane su korištenjem linearne regresije s težinskim faktorom $1/x^2$ te IS korekcijom. Točnost povratno izračunatih koncentracija bila je unutar 15 % (20 % za LLOQ) od nominalnih koncentracija za najmanje 75 % i najmanje šest kalibracijskih uzoraka. Unatoč relativno malim RSD vrijednostima nagiba kalibracijskih krivulja između različitih dana, svježe kalibracijske krivulje pripremane su svakodnevno.

4.3.4.3. Točnost i preciznost

Točnost i preciznost procijenjene su korištenjem QC uzoraka pripremljenih u kvintuplikatu na četiri koncentracijske razine. Srednja točnost izražena je kao odstupanje od nominalne koncentracije, dok je preciznost izražena RSD vrijednostima između različitih mjerenja. Analitička odstupanja bila su unutar ± 15 %, a vrijednosti RSD između mjerenja bile su manje od 15 % (20 % za LLOQ). Rezultati su prikazani u Tablici 20.

Tablica 20. Točnost i preciznost ispitane unutar dana ($N = 5$) i između različitih dana ($N = 15$)

Analit	γ (ng/mL)	Unutar dana ($N = 5$)		Između dana ($N = 15$)	
		Odstupanje (%)	RSD (%)	Odstupanje (%)	RSD (%)
LET	30	20,1	3,9	4,1	15,8
	75	9,3	12,4	0,7	11,4
	112,5	-8,6	3,6	-5,2	9,9
	300	8,7	9,2	0,9	9,6
ANA	20	6,6	6,3	2,7	8,3
	50	-1,6	4,1	-4,5	6,7
	75	-4,4	5,0	-5,1	3,7
	200	1,8	4,4	-1,2	6,7
PAL	30	-0,6	4,4	-1,7	6,5
	75	-2,9	3,6	-5,8	6,0
	112,5	-7,6	5,7	-6,7	4,1
	300	-0,9	4,5	-1,5	5,6
RIB	500	-3,1	11,1	0,8	15,1
	1250	0,2	12,6	5,1	10,9
	1875	-7,9	5,3	1,1	10,6
	5000	0,0	8,1	3,0	8,9
ABE	50	10,0	8,2	2,2	8,7
	125	9,0	11,8	0,0	12,1
	187,5	2,1	11,8	-5,7	11,1
	500	-3,5	9,2	-3,0	9,6
FUL	10	2,9	4,5	-2,2	9,7
	25	-4,7	4,4	-5,0	5,8
	37,5	-6,6	5,6	-5,1	4,8
	100	-7,1	4,5	-5,3	6,1

4.3.4.4. Učinak matrice

Učinak matrice (ME) procijenjen je korištenjem plazme iz šest različitih izvora, uključujući vrlo lipemične i hemolizirane plazme. Svaki uzorak plazme pripremljen je u triplikatu, obogaćen niskom i visokom koncentracijom analita nakon ekstrakcijskog postupka te uspoređen sa standardnim otopinama na istim koncentracijskim razinama. Učinak matrice izražen je kao srednje odstupanje od nominalne koncentracije (korištenjem omjera IS-korigiranih koncentracija analita u matrici uzorka i standardnoj otopini) prema sljedećoj jednadžbi:

$$ME (\%) = \left(\frac{\text{Određena koncentracija analita u matrici uzorka}}{\text{Određena koncentracija analita u standardnoj otopini}} - 1 \right) \cdot 100\% \quad (37)$$

Također su izračunate vrijednosti RSD između različitih matrica. Učinci matrice prikazani su u Tablici 21 te su klasificirani kao zanemarivi (apsolutna vrijednost ME manja od 10 %), mali (apsolutna vrijednost ME između 10 i 20 %), srednji (apsolutna vrijednost ME između 20 i 50 %) i snažni (apsolutna vrijednost ME veća od 50 %) (139).

Tablica 21. Srednji učinci matrice i pripadajuće RSD vrijednosti za šest različitih izvora plazme ($N = 3$ po koncentracijskoj razini i izvoru plazme)

Analit	γ (ng/mL)	ME (%)	RSD (%)	Analit	γ (ng/mL)	ME (%)	RSD (%)
LET	75	-17,3	14,0	RIB	1250	20,3	10,6
	300	-1,4	11,9		5000	3,4	12,7
ANA	50	1,3	2,0	ABE	125	52,0	9,1
	200	0,0	3,2		500	1,2	8,2
PAL	75	0,4	2,2	FUL	25	11,8	1,6
	300	-0,9	3,1		100	-0,4	1,6

Izraženiji učinci matrice za LET (mali), FUL (mali), RIB (srednji) i ABE (snažni) uočeni su pri niskoj koncentracijskoj razini, ali su bili reproducibilni između različitih plazmi i stoga ne

predstavljaju analitički problem. Pri visokoj koncentracijskoj razini nisu uočeni značajni učinci matrice.

4.3.4.5. Stabilnost

U preliminarnim ispitivanjima utvrđeno je da su matične otopine stabilne na +4 °C najmanje 2 mjeseca. Prema smjernicama, stabilnost analita u matrici mora se prikazati kao stabilnost tijekom pripreme uzoraka za analizu, kao stabilnost tijekom same analize, odnosno stajanja na autoinjektoru, kao stabilnost prilikom ponovljenog odmrzavanja te kao dugoročna stabilnost prilikom čuvanja. Međutim, u prethodnom radu istraživačke skupine pokazana je stabilnost prilikom ponovljenog odmrzavanja (3 ciklusa odmrzavanja s -18 °C tijekom 30 minuta), dugoročna stabilnost (2 tjedna na -18 °C) i stabilnost prilikom pripreme uzora (2 sata na 25 °C) za isti skup analita i u istoj matrici (141). Stoga je u ovom radu istražena samo stabilnost tijekom same analize budući da autoinjektor CE instrumenta ne hladi uzorke. Za to su QC uzorci pripremljeni u triplikatu pri niskim i visokim koncentracijskim razinama, stavljeni na autoinjektor na 25 °C te analizirani u nultoj vremenskoj točki i nakon 10 sati. Srednje razlike u određenim koncentracijama od nominalne koncentracije nakon 10 sati kao i pripadajuće RSD vrijednosti bile su manje od 15 % na obje razine koncentracije, što dokazuje stabilnost analita na CE autoinjektoru (Tablica 22).

Tablica 22. Rezultati ispitivanja stabilnosti analita na CE autoinjektoru ($N = 3$ po koncentracijskoj razini)

Analit	γ (ng/mL)	Odstupanje (%)	RSD (%)	Analit	γ (ng/mL)	Odstupanje (%)	RSD (%)
LET	75	-0,6	12,6	RIB	1250	-5,6	10,4
	300	-1,7	5,7		5000	-3,4	8,6
ANA	50	2,9	2,5	ABE	125	10,4	4,9
	200	-1,6	6,7		500	3,8	9,6
PAL	75	-3,9	2,2	FUL	25	5,9	7,3
	300	0,8	1,9		100	-0,8	6,2

4.3.5. Primjena metode

U cijelosti validirana MEKC-MS/MS metoda primijenjena je na uzorke plazme šest žena (u dobi od 39 do 75 godina, medijan 56,5 godina) koje se trenutno liječe kombinacijom inhibitora CDK4/6 (PAL, RIB, ili ABE) i endokrine terapije (LET, ANA ili FUL). Uzorci su analizirani u odnosu na svježe pripremljenu kalibracijsku krivulju, a rezultati su prikazani u Tablici 23, dok su maseni elektroferogrami dani u Prilogu S1-S6.

Tablica 23. Određene koncentracije lijekova u uzorcima plazme pacijentica

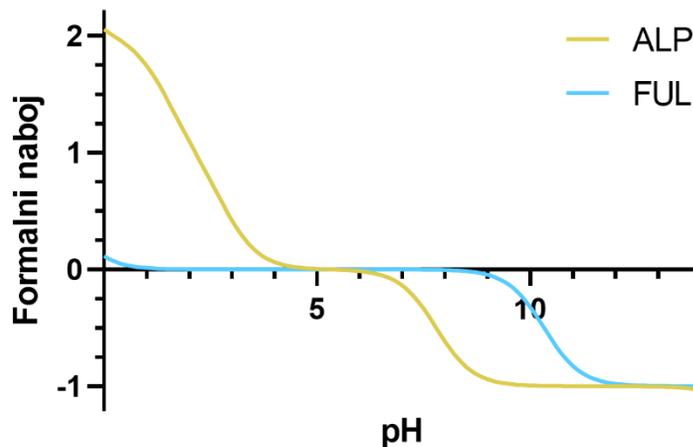
Pacijentica	CDK4/6 inhibitor (doza)	Određena koncentracija (ng/mL)	Endokrina terapija (doza)	Određena koncentracija (ng/mL)
1	RIB (600 mg dnevno)	1323,69	LET (2,5 mg dnevno)	173,76
2	ABE (150 mg dvaput dnevno)	257,54	FUL (500 mg mjesečno)	16,64
3	ABE (150 mg dvaput dnevno)	304,94	LET (2,5 mg dnevno)	143,43
4	RIB (600 mg dnevno)	1209,75	ANA (1 mg dnevno)	45,72
5	PAL (125 mg dnevno)	92,06	FUL (500 mg mjesečno)	14,56
6	RIB (600 mg dnevno)	1000,38	ANA (1 mg dnevno)	43,05

LET, ANA i ABE primjenjuju se oralno kontinuirano – LET i ANA kao pojedinačne dnevne doze, a ABE dva puta dnevno. PAL i RIB se primjenjuju svakodnevno tijekom 21 dana nakon čega slijedi tjedan dana pauze od liječenja kako bi se poboljšala podnošljivost. FUL se primjenjuje jednom mjesečno kao intramuskularna injekcija (143). Svih šest analita uspješno je određeno u plazmi pacijenata unutar kalibracijskog raspona metode te su određene koncentracije u skladu s koncentracijama pronađenim u kliničkim studijama (144–149). Time je pokazana prikladnost razvijene metode za TDM.

4.4. Metoda kapilarne elektroforeze spregnute sa spektrometrijom masa za određivanje alpelisiba i fulvestranta u ljudskoj plazmi

4.4.1. Optimizacija MEKC metode

ALP je pozitivno nabijen ispod pH 4 i negativno iznad pH 6 te bi mogao biti analiziran CZE tehnikom. Međutim, budući da je FUL potpuno nabijen tek iznad pH 12, izvan kapaciteta amonijevog pufera, CZE nije tehnika odabira u ovom slučaju (Slika 47).



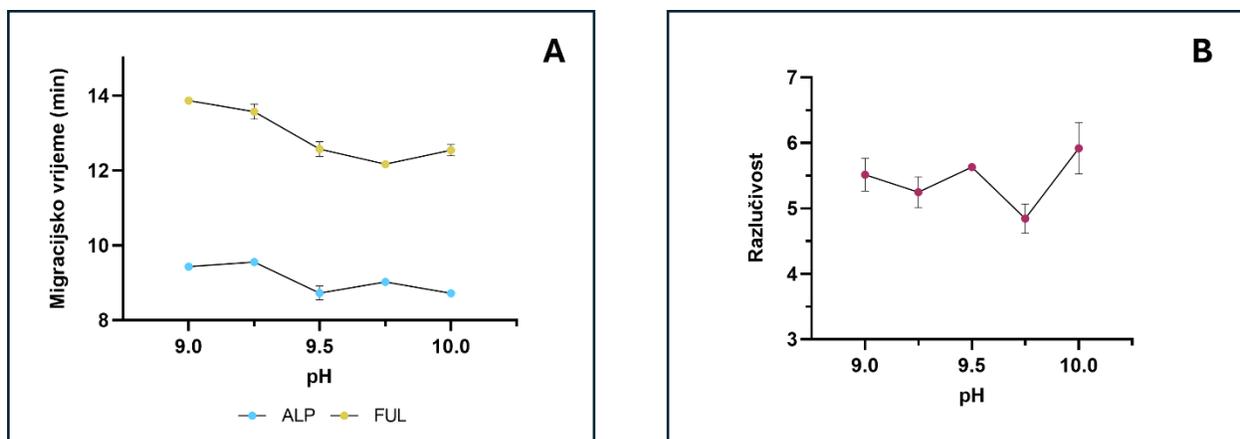
Slika 47. Ovisnost formalnih naboja alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o pH vrijednosti elektroforetskog pufera prema računalnom programu Chemicalize (39).

U teoriji, CZE bi se i dalje mogao provoditi i u kiselom i u bazičnom pH, pri čemu bi FUL migrirao isključivo zbog EOF-a, dok bi ALP migrirao i zbog EOF-a i zbog svoje inherentne elektroforetske pokretljivosti. Međutim, primjenom metode na stvarne uzorke plazme, sve neutralne komponente plazme migrirale bi zajedno s FUL-om te bi se očekivao snažan i nereproducibilan učinak matrice. Sukladno tome, MEKC je odabran kao analitička tehnika izbora za razdvajanje ALP-a i FUL-a. U MEKC-u, odvajanje ALP-a i FUL-a prvenstveno je određeno njihovom različitim raspodjelom između pseudostacionarne faze, sastavljene od anionskih APFO micela, i elektroforetskog pufera. Time se opažaju različita migracijska vremena analita na temelju njihovog različitog afiniteta za micelarnu, odnosno pufersku fazu.

S obzirom na ograničenu topljivost ALP-a i FUL-a u vodi, nužan je dodatak organskog otapala u elektroforetski pufer kako bi se spriječilo taloženje unutar kapilare pri većim koncentracijama analita. Budući da se matične otopine oba analita pripremaju u MeOH, on je odabran kao početni organski modifikator. Osim toga, APFO je bio surfaktant izbora za MEKC metodu zbog svoje kompatibilnosti s MS-om. Početni sastav elektroforetskog pufera sastojao se od smjese MeOH i vodene otopine APFO-a u omjeru 30:70 (V/V). Tijekom razvoja metode, sustavno je optimizirano nekoliko MEKC parametara. Ispitivane varijable uključivale su pH i koncentraciju APFO-a u elektroforetskom puferu, količinu i vrstu organskog modifikatora za elektroforetski pufer, trajanje hidrodinamičkog injektiranja, temperaturu kapilare, napon razdvajanja i primjenu dodatnog hidrodinamičkog tlaka tijekom analize. Odabir optimalnih uvjeta temeljio se na razlučivosti između analita, ukupnom trajanju analize te obliku i simetriji elektroforetskih vrhova.

4.4.1.1. Optimizacija pH elektroforetskog pufera

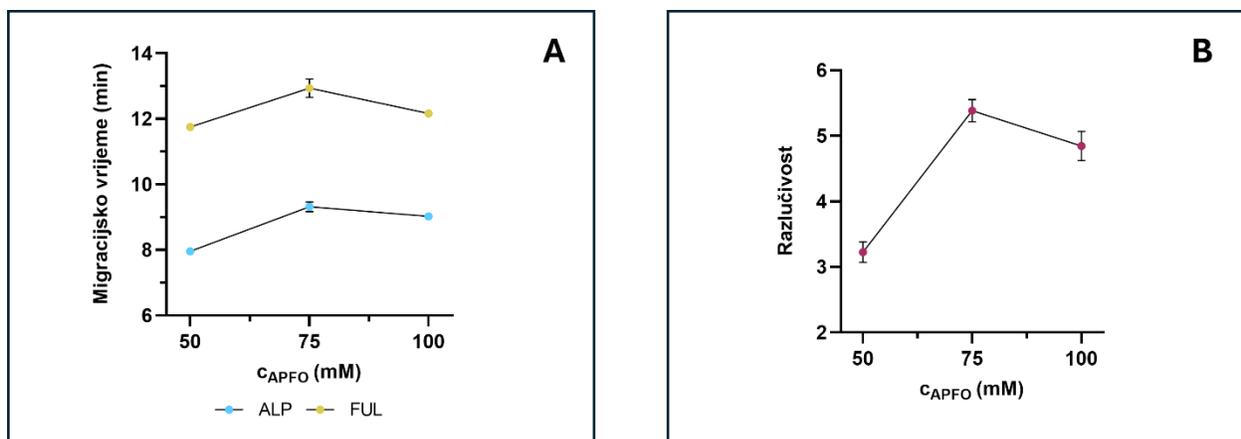
Prvo je ispitan utjecaj pH vrijednosti elektroforetskog pufera u rasponu od 9 do 10, što je unutar kapaciteta amonijevog pufera. U MEKC-u, promjena pH vrijednosti u pravilu ne utječe značajno na inherentne elektroforetske pokretljivosti analita budući da se obično neutralni spojevi analiziraju ovom tehnikom. U ovom slučaju, FUL nije bio nabijen u elektroforetskom puferu te stoga na njega promjena pH vrijednosti ne bi trebala utjecati u istoj mjeri kao na ALP. Međutim, povećanje pH vrijednosti povećava jakost EOF-a, što skraćuje vrijeme analize. Stoga je pri povećanju pH vrijednosti s 9 na 10 uočeno smanjenje ukupnog trajanja analize (Slika 48A). Budući da je razlučivost između ALP i FUL bila dovoljno velika pri svim ispitanim pH vrijednostima, ona se nije smatrala odlučujućim faktorom u određivanju optimalnog pH (Slika 48B). Najkraća analiza dobivena je s pH vrijednošću od 9,75 te je stoga ta vrijednost korištena za daljnje eksperimente.



Slika 48. Ovisnost **A)** migracijskih vremena i **B)** razlučivosti alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o pH elektroforetskog pufera. Koncentracija APFO 100 mM u 30 % MeOH, temperatura kapilare 30 °C i napon razdvajanja 25 kV, dodatan hidrodinamički tlak tijekom analize od 100 mbar, hidrodinamičko injektiranje tijekom 60 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

4.4.1.2. Optimizacija koncentracije APFO

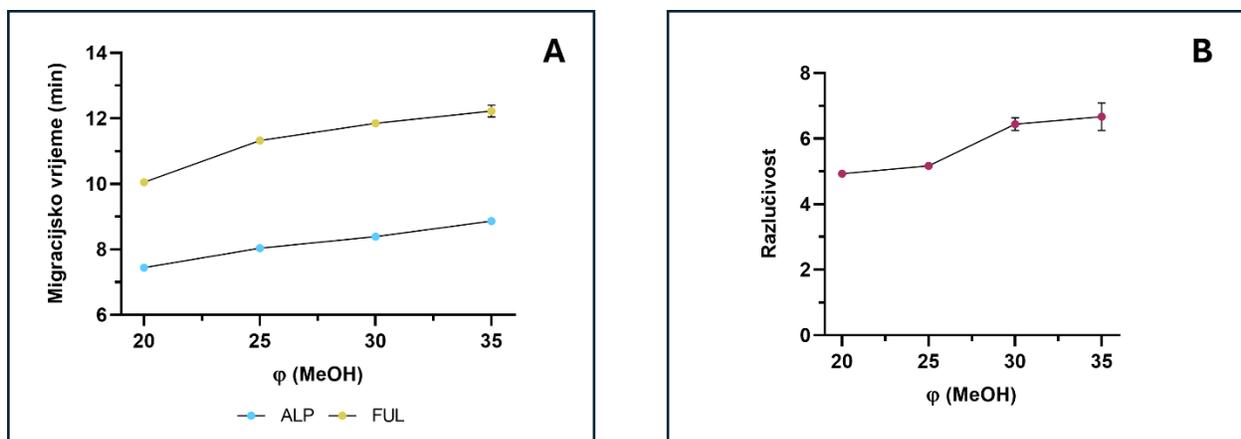
Nakon toga, ispitan je utjecaj koncentracije APFO-a u rasponu od 50 do 100 mM. Poznato je kako je CMC APFO-a u vodenoj otopini približno 25 mM (58,59). Međutim, kao što je opisano u poglavlju 4.3, dodatak organskih otapala u elektroforetski pufer, posebno u većim količinama, može ometati stvaranje micela i efektivno povećati CMC. U ovom slučaju, najkraća analiza dobivena je pri koncentraciji od 50 mM (Slika 49A). Pod tim uvjetima uočena je i najniža razlučivost u iznosu od 3,23 (Slika 49B). Međutim, budući da je ta vrijednost znatno iznad razlučivosti potrebne za razdvajanje elektroforetskih vršaka pri baznoj liniji, to nije bio odlučujući faktor. Ovaj sastav elektroforetskog pufera uzrokovao je električne struje prosječne jakosti od 24 μ A, ostajući znatno ispod preporučenog gornjeg praga od 50 μ A za većinu CE-MS sustava.



Slika 49. Ovisnost **A**) migracijskih vremena i **B**) razlučivosti alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o koncentraciji APFO u elektroforetskom puferu. pH elektroforetskog pufera 9,75, udio MeOH u puferu 30 %, temperatura kapilare 30 °C i napon razdvajanja 25 kV, dodatan hidrodinamički tlak tijekom analize od 100 mbar, hidrodinamičko injektiranje tijekom 60 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

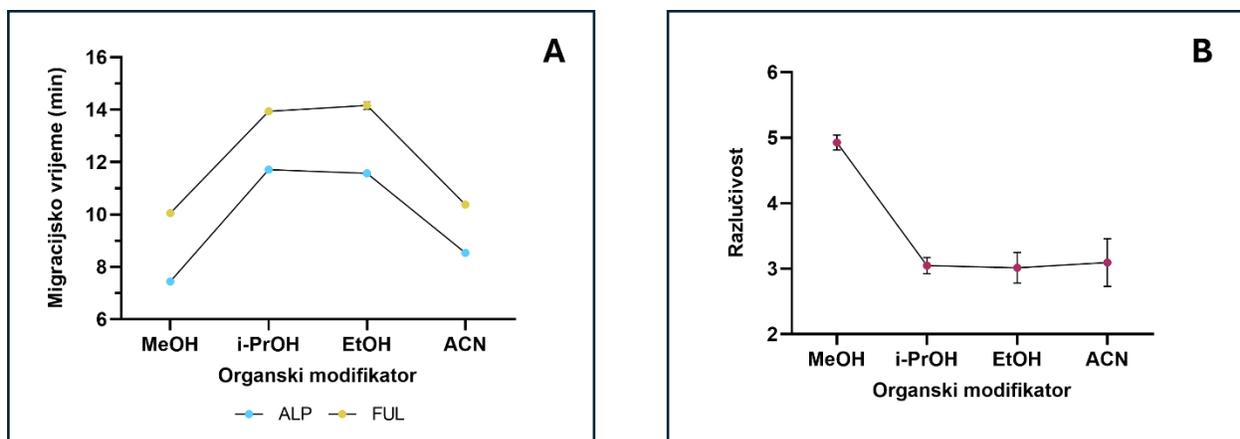
4.4.1.3. Optimizacija sastava elektroforetskog pufera i dodatnog hidrodinamičkog tlaka tijekom analize

Utjecaj različitih volumnih udjela organskih otapala u elektroforetskom puferu ispitan je uz dodatak MeOH kao organskog aditiva, u rasponu od 20 do 35 %. Najkraća analiza dobivena je s elektroforetskim puferom koji sadrži 20 % MeOH. Međutim, pod tim uvjetima povremeno je dolazilo do pada električne struje, moguće zbog taloženja FUL-a unutar kapilare. Na temelju rezultata, elektroforetski pufer s 25 % MeOH odabran je kao optimalni (Slika 50A). Pri tim je uvjetima i razlučivost između ALP i FUL bila zadovoljavajuća (Slika 50B).



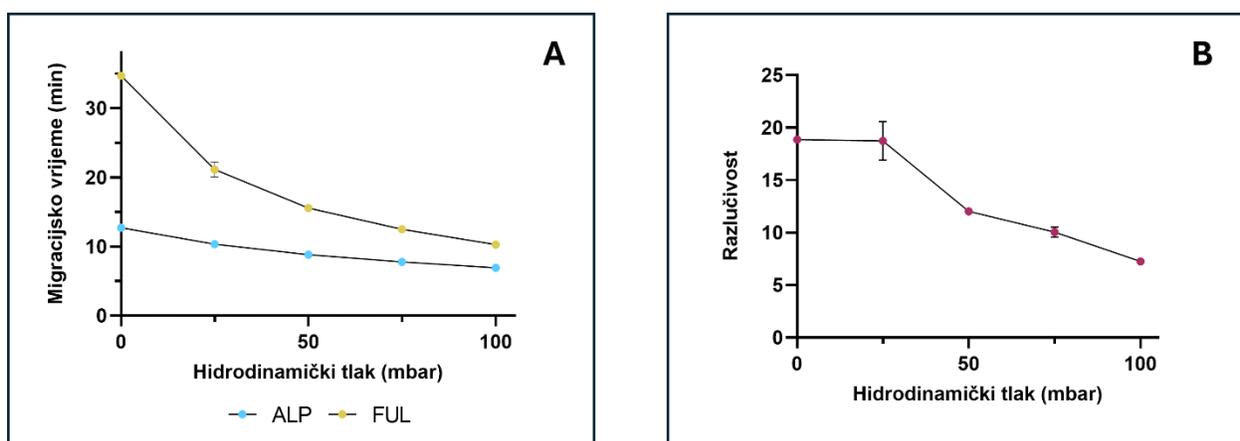
Slika 50. Ovisnost **A**) migracijskih vremena i **B**) razlučivosti alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o volumnom udjelu MeOH u elektroforetskom puferu. pH elektroforetskog pufera 9,75 i koncentracija APFO 50 mM, temperatura kapilare 30 °C i napon razdvajanja 25 kV, dodatan hidrodinamički tlak tijekom analize od 100 mbar, hidrodinamičko injektiranje tijekom 60 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Nadalje, kvalitativni sastav organskih modifikatora ispitan je održavanjem optimalnog kvantitativnog udjela organskih otapala uz zamjenu manjeg udjela MeOH u elektroforetskom puferu alternativnim organskim otapalima. Naime, ispitivani pufer sastojao se od 20:5:75 (V/V/V) MeOH-organskog otapala-APFO u vodenoj otopini, gdje je organsko otapalo bio ACN, EtOH ili i-PrOH. Dodavanje EtOH ili i-PrOH u elektroforetski pufer značajno je produžilo analizu, dok je dodavanje ACN-a pokazalo usporedive rezultate sa samim MeOH. Ipak, korištenje isključivo MeOH kao organskog modifikatora pokazalo je najbolje rezultate u smislu vremena analize i razlučivosti (Slika 51).



Slika 51. Ovisnost **A)** migracijskih vremena i **B)** razlučivosti alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o dodanom organskom modifikatoru u elektroforetski pufer. pH elektroforetskog pufera 9,75 i koncentracija APFO 50 mM, udio organske faze 25 %, temperatura kapilare 30 °C i napon razdvajanja 25 kV, dodatan hidrodinamički tlak tijekom analize od 100 mbar, hidrodinamičko injektiranje tijekom 60 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Dalje je ispitan i utjecaj dodatnog hidrodinamičkog tlaka tijekom analize u rasponu od 0 do 100 mbar. Rezultati su pokazali da povećanje hidrodinamičkog tlaka na maksimalnih 100 mbar značajno smanjuje vrijeme analize bez ugrožavanja učinkovitosti odvajanja (Slika 52). Posljedično, dodatni tlak od 100 mbar korišten je u svim daljnjim analizama.

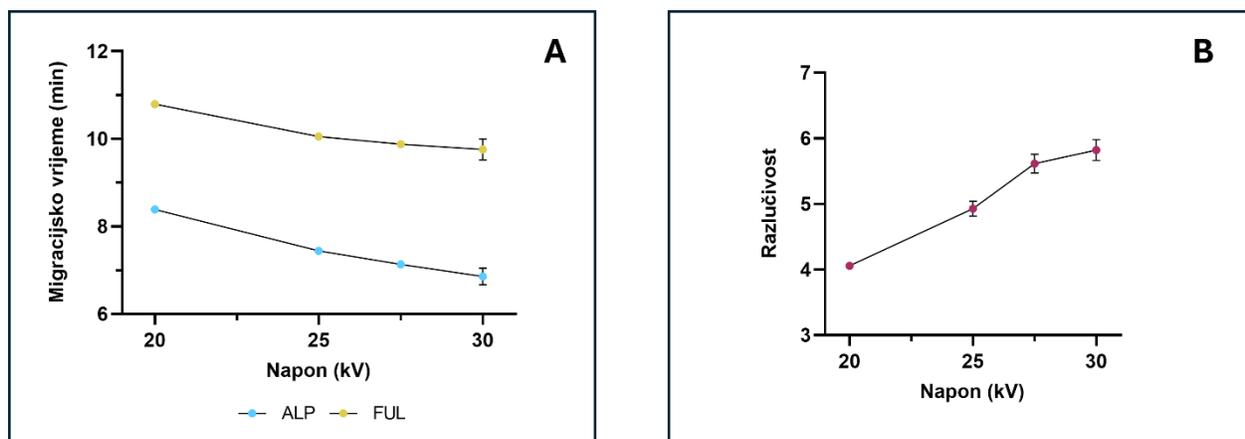


Slika 52. Ovisnost **A)** migracijskih vremena i **B)** razlučivosti alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o dodatnom hidrodinamičkom tlaku tijekom analize. pH elektroforetskog pufera 9,75 i

koncentracija APFO 50 mM, udio MeOH u puferu 30 %, temperatura kapilare 30 °C i napon razdvajanja 25 kV, hidrodinamičko injektiranje tijekom 60 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

4.4.1.4. Optimizacija temperature kapilare i napona razdvajanja

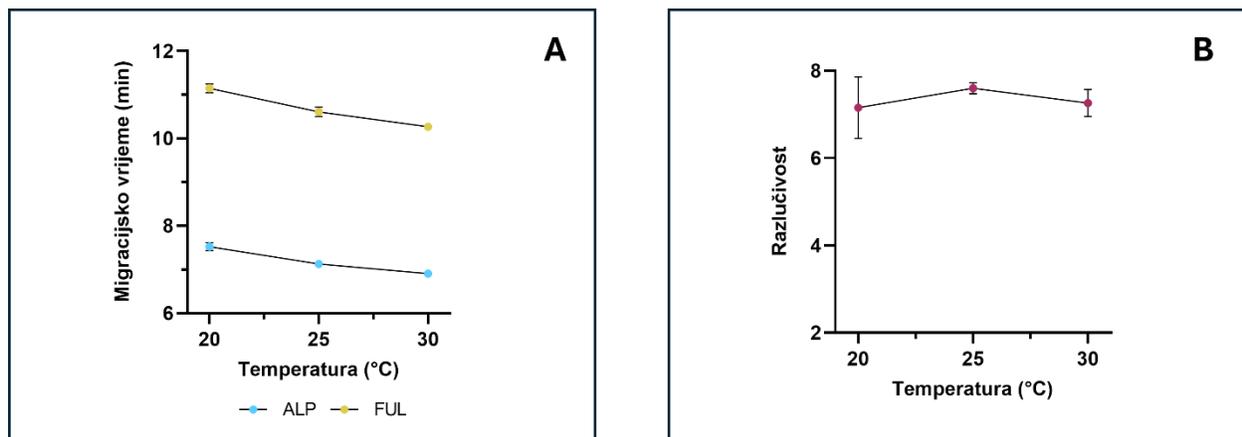
Kao što je već spomenuto, jakost električne struje bila je relativno niska. Zbog toga se napon razdvajanja mogao ispitati do maksimuma instrumenta od 30 kV. S tim na umu, utjecaj primijenjenog napona ispitan je u rasponu od 20 do 30 kV. U skladu s očekivanjima, povećanjem napona došlo je do smanjenja migracijskih vremena te poboljšanja razlučivosti (Slika 53). Kao optimalan napon za daljnje eksperimente odabrano je 30 kV.



Slika 53. Ovisnost **A)** migracijskih vremena i **B)** razlučivosti alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o primijenjenom naponu razdvajanja. pH elektroforetskog pufera 9,75 i koncentracija APFO od 50 mM, udio MeOH u puferu 30 %, temperatura kapilare 30 °C, dodatan hidrodinamički tlak tijekom analize od 100 mbar, hidrodinamičko injektiranje tijekom 60 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

U CE-MS konfiguraciji, dio kapilare proteže se izvan temperaturno kontroliranog okruženja CE instrumenta. Kako bi se spriječilo stvaranje značajnih temperaturnih gradijenata duž kapilare, temperatura kapilare održavana je ispod 30 °C. Stoga je njen utjecaj ispitan u rasponu od 20 do 30 °C. Kao što se i očekivalo, povećanje temperature rezultiralo je kraćim

analizama i boljom rezolucijom, iako učinak nije bio značajan. Ipak, za sve sljedeće analize odabrana je temperatura od 30 °C čime se minimiziralo pretjerano Jouleovo zagrijavanje, a istovremeno izbjeglo nepotrebno produljeno vrijeme analize (Slika 54).



Slika 54. Ovisnost **A**) migracijskih vremena i **B**) razlučivosti alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o temperaturi kapilare. pH elektroforetskog pufera 9,75 i koncentracija APFO od 50 mM, udio MeOH u puferu 30 %, napon razdvajanja 30 kV, dodatan hidrodinamički tlak tijekom analize od 100 mbar, hidrodinamičko injektiranje tijekom 60 s pri 50 mbar. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

4.4.1.5. Optimizacija *sweeping online* ukoncentriravanja uzorka

Jedno od glavnih ograničenja CE je njena znatno niža osjetljivost u odnosu na komplementarne analitičke tehnike. Kao što je već pokazano u poglavlju 4.3, taj se nedostatak može ublažiti primjenom različitih *online* strategija ukoncentriravanja uzorka. Među njima, za MEKC se najčešće koristi *sweeping* tehnika. U ovom istraživanju, *sweeping* je proveden otapanjem analita u smjesi MeOH i vode u omjeru 25:75 (V/V) bez dodatka APFO-a. Optimizacija je provedena mijenjanjem vremena injektiranja od 15 do 60 sekundi pod konstantnim hidrodinamičkim tlakom od 50 mbar. Osjetljivost metode poboljšavala se s povećanjem vremena ubrizgavanja, postižući optimalnu osjetljivost pri 60 sekundi. Slijedom toga, injektiranje od 60 sekundi pri 50 mbar odabrano je kao optimalni uvjet. Na temelju Hagen-Poiseuilleove jednadžbe, to odgovara injektiranom volumenu od otprilike 74 nL, što

predstavlja oko 5,4 % ukupnog volumena kapilare. Kako bi se procijenilo poboljšanje osjetljivosti koje pruža *sweeping* u odnosu na konvencionalno hidrodinamičko injektiranje, izračunati su SEF_{height} prema jednadžbi (36). Usporedbom *sweeping* injektiranja (60 s pri 50 mbar) s klasičnim hidrodinamičkim injektiranjem uzorka otopljenog u elektroforetskom puferu (5 s pri 50 mbar), dobivene su SEF vrijednosti od 109 za ALP i 11,2 za FUL. Ovi rezultati pokazuju značajno povećanje osjetljivosti, što je ključno za detekciju vrlo malih koncentracija ovih lijekova u ljudskoj plazmi. Ovi rezultati dodatno potvrđuju da je *sweeping* učinkovita strategija za povećanje osjetljivosti MEKC metoda uz održavanje učinkovitosti razdvajanja analita.

4.4.2. Optimizacija MS/MS metode

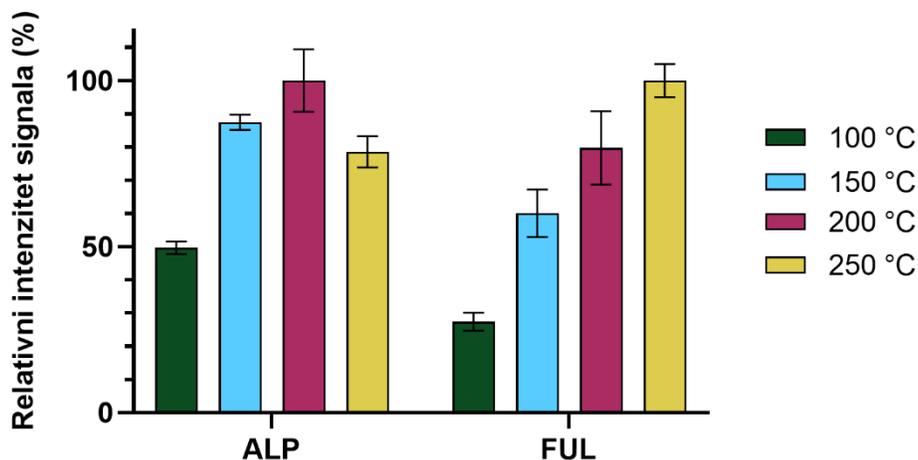
MS parametri optimizirani su korištenjem MRM-a u pozitivnom ESI modu. Najzastupljeniji matični ion za sve analite bio je protonirani molekulni ion $[M+H]^+$. Za svaki spoj odabrana su dva ionska prijelaza iz odgovarajućeg matičnog iona: najzastupljeniji prijelaz korišten je za kvantifikaciju, dok je drugi prijelaz, odabran na temelju svoje specifičnosti za analit, korišten za kvalifikaciju. Svakom analitu dodijeljeni su različiti vremenski segmenti tijekom kojih su praćeni odgovarajući prijelazi. Vrijeme zadržavanja za svaki prijelaz analita prilagođeno je kako bi se postiglo ukupno vrijeme ciklusa od približno 500 ms po akvizicijskom segmentu, čime se osiguralo dovoljno podatkovnih točaka na svakom elektroforetskom vršku za pouzdanu integraciju i određivanje. Optimizacija fragmentorskih napona, kolizijskih energija te izlaznih napona u kolizijskoj ćeliji za svaki prijelaz provedena je izravnim injektiranjem pojedinačnih analita bez CE, kako bi se maksimizirao intenzitet MS signala. ESI parametri su dodatno optimizirani korištenjem MEKC metode, uzimajući u obzir da određene ESI postavke mogu utjecati na razlučivost analita, dok elektroforetski uvjeti mogu utjecati na ionizaciju analita unutar izvora. Standardni ESI parametri, uključujući tlak raspršivača, brzinu protoka i temperaturu plina za desolvaciju te napon kapilare, sustavno su ispitani. Kako je korišten AJS-ESI izvor, optimizirani su i dodatni parametri, uključujući napon mlaznice te brzinu protoka i temperaturu obložnog plina. S obzirom na korištenje CE-MS sučelja s obložnom tekućinom, pažljivo su optimizirani i organski sastav i koncentracija mravlje kiseline obložne tekućine kao i brzina njene dostave u raspršivač. Konačni instrumentalni parametri utvrđeni

su na temelju kriterija maksimiziranja intenziteta signala za ciljane analite, čime se osigurava optimalna osjetljivost i analitičke performanse metode.

4.4.2.1. Optimizacija Agilent Jet Stream parametara

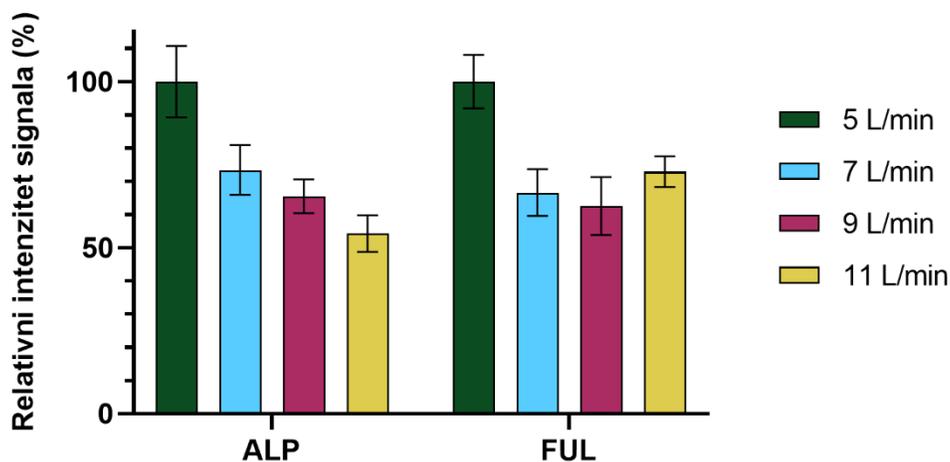
Kao što je već spomenuto u prethodnom istraživanju, AJS-ESI izvor koristi pregrijani dušik za toplinsko fokusiranje spreja raspršivača, čime se povećava desolvacija iona te analitička osjetljivost u usporedbi s konvencionalnim ESI sučeljima. Iako se ova tehnologija rutinski primjenjuje u LC-MS metodama koje rade s relativno većim protocima, njezina integracija unutar MEKC-MS/MS metodologija ostaje relativno nedovoljno istražena. Kao rezultat toga, postoji značajan nedostatak objavljenih studija koje se bave sustavnom optimizacijom AJS-ESI parametara posebno za MEKC primjene, s obzirom na to da je do danas objavljeno samo jedno istraživanje na tu temu (139). To istraživanje, kao i prethodno istraživanje opisano u ovom doktorskom radu u poglavlju 4.3., dosljedno pokazuju da AJS-ESI parametri imaju izraženiji utjecaj na osjetljivost u usporedbi s tradicionalnim ESI parametrima.

Sukladno tome, prvo je ispitan utjecaj temperature obložnog plina u rasponu od 100 do 250 °C, pri čemu su napon mlaznice i brzina protoka obložnog plina održavani konstantnima na 2000 V i 5 L/min. Povećanje temperature obložnog plina općenito je poboljšalo osjetljivost, s optimalnim odzivima za ALP i FUL uočenim na 200 °C, odnosno 250 °C (Slika 55). S obzirom na to da se FUL obično javlja u manjim koncentracijama u plazmi i pokazuje slabiji odziv detektora, uvjeti koji pogoduju njemu smatrani su optimalnima te su daljnji eksperimenti provedeni pri temperaturi obložnog plina od 250 °C.



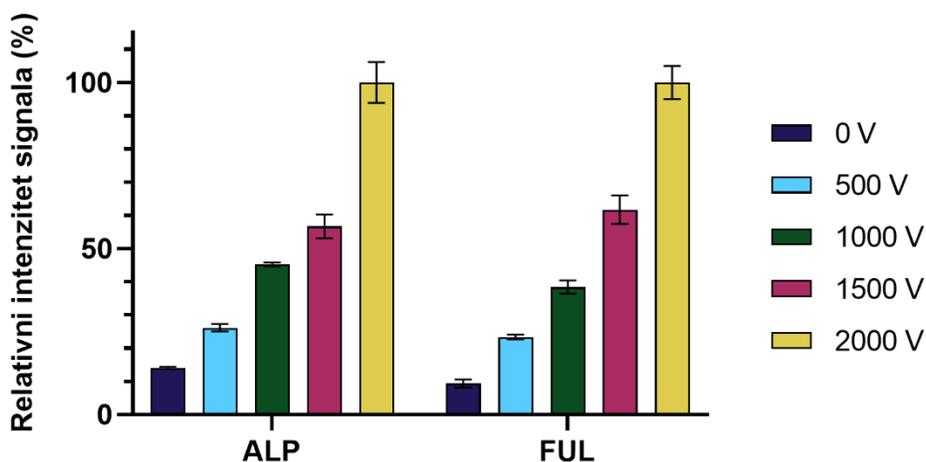
Slika 55. Ovisnost relativnih intenziteta signala alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o temperaturi obložnog plina. Protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 300 °C, protok plina 9 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 4 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Zatim je ispitana brzina protoka obložnog plina u rasponu od 5 do 11 L/min. Optimalna osjetljivost za oba analita postignuta je pri najmanjoj ispitanoj brzini protoka od 5 L/min (Slika 56). Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim nalazima koji pokazuju da učinak izolacije koji stvara zona toplinskog ograničenja ne ovisi samo o temperaturi obložnog plina, već i o drugim AJS-ESI parametrima, kao i faktorima specifičnim za analit poput naboja i zastupljenosti iona. Posljedično, optimizacija AJS-ESI parametara prilikom razvoja MEKC metoda mora se provoditi od slučaja do slučaja kako bi se prilagodila specifičnim analitičkim zahtjevima i fizikalno-kemijskim svojstvima ciljnih analita svojstvenih svakoj metodi.



Slika 56. Ovisnost relativnih intenziteta signala alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o brzini protoka obložnog plina. Temperatura obložnog plina 250 °C, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 300 °C, protok plina 9 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 4 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Konačno, utjecaj napona mlaznice ispitan je u rasponu od 0 do 2000 V. Povećanje napona mlaznice na 2000 V rezultiralo je od 7 do 10 puta većim povećanjem osjetljivosti (Slika 57). Ovo značajno poboljšanje vjerojatno je posljedica dodatnog električnog potencijala na vrhu kapilare, koji pomaže u prevladavanju prethodno spomenutih izolacijskih učinaka pregrijanog dušika u obložnom plinu. Ovo poboljšanje posebno je relevantno u MEKC-MS, gdje se često analiziraju neutralni i slabo ionizirajući spojevi. Opažanje da je na FUL, kao lipofilniji spoj, povećanje napona mlaznice utjecalo više nego na ALP dodatno podupire ovu hipotezu. Ovi nalazi su u skladu s prethodnim izvješćima koja sugeriraju da pri niskim brzinama protoka koje se obično koriste u CE-MS (1-15 $\mu\text{L}/\text{min}$), desolvacija iona nije ograničavajući faktor. Umjesto toga, povećanje osjetljivosti može se postići visokim naponom mlaznice, posebno u kombinaciji sa smanjenim protokom ili temperaturom obložnog plina.

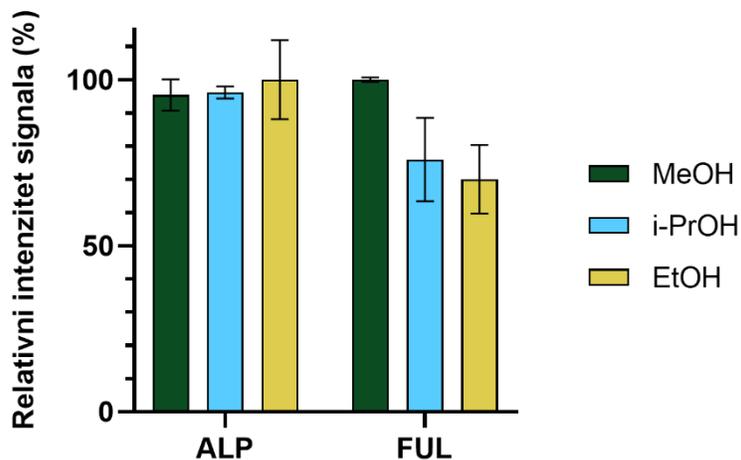


Slika 57. Ovisnost relativnih intenziteta signala alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o naponu mlaznice. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, temperatura plina 300 °C, protok plina 9 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

4.4.2.2. Optimizacija obložne tekućine

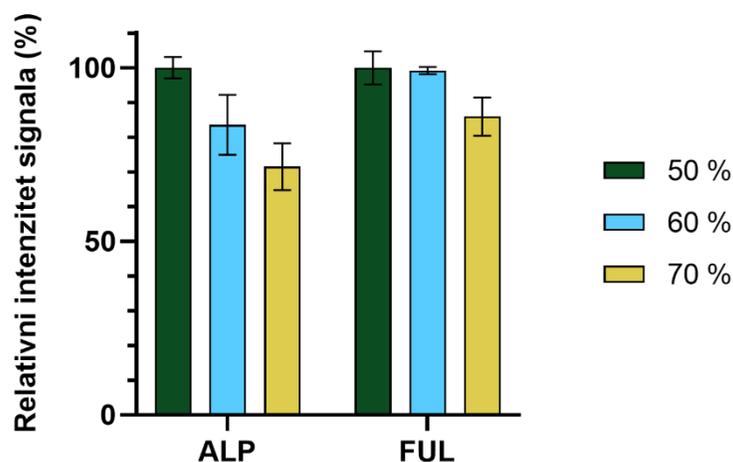
U ovom istraživanju, kao i u prethodnom opisanom u poglavlju 4.3., korišteno je koaksijalno sučelje s obložnom tekućinom za sprezanje CE i MS instrumenata kako bi se omogućilo stabilno stvaranje elektrospreja pri maloj nativnoj brzini protoka CE. Iako obložna tekućina olakšava stabilno stvaranje spreja, neizbježno razrjeđuje protok analita, smanjujući osjetljivost. Stoga su i sastav i brzina protoka obložne tekućine sustavno optimizirani kako bi se poboljšala analitička osjetljivost.

Kako bi se odredilo optimalno organsko otapalo za obložnu tekućinu, ispitana su različita organska otapala (MeOH, EtOH, ACN i i-PrOH) pomiješana s vodom i mravljom kiselinom u fiksnom omjeru 50/49,9/0,1 (V/V/V). Za ALP, MeOH, EtOH i i-PrOH proizveli su usporedivu osjetljivost, s tim da je EtOH pokazao nešto bolje rezultate. Međutim, za FUL je MeOH dao najveći signal (Slika 58). Nasuprot tome, ACN je značajno prigušio intenzitet signala za oba analita te stoga nije dalje razmatran. Sukladno tome, MeOH je odabran kao optimalni organski modifikator.



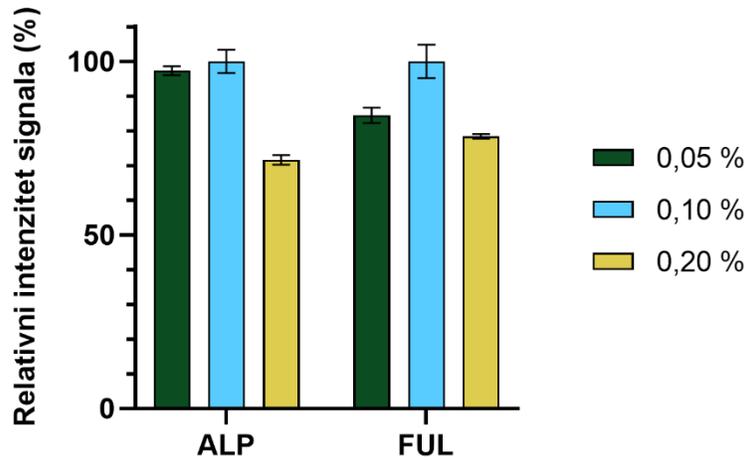
Slika 58. Ovisnost relativnih intenziteta signala alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o organskom otapalu u obložnoj tekućini. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 300 °C, protok plina 9 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % organskog otapala u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 4 μ L/min. ($N = 3$, trake pogreška predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Zatim je kvantitativni sastav tekućine omotača optimiziran mijenjanjem sadržaja MeOH između 50 % i 70 % u vodi koja sadrži 0,1 % mravlje kiseline. Najveća osjetljivost i za ALP i za FUL uočena je pri 50 % MeOH te je stoga taj volumni udio korišten za daljnju optimizaciju (Slika 59).



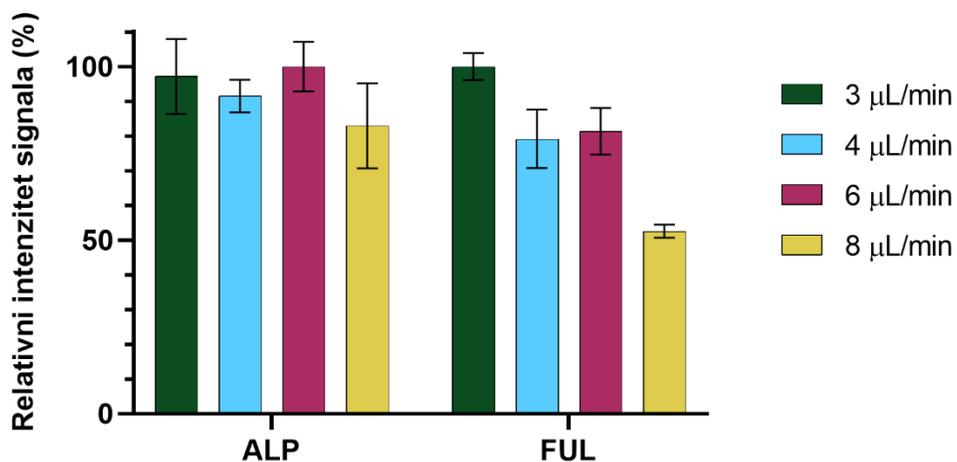
Slika 59. Ovisnost relativnih intenziteta signala alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o volumnom udjelu MeOH u obložnoj tekućini. Temperatura obloznog plina 250 °C, protok obloznog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 300 °C, protok plina 9 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 4 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Nakon toga, ispitan je utjecaj koncentracije mravlje kiseline u smjesi od 50 % MeOH u rasponu od 0 % do 0,2 %, pri čemu je 0,1 % pružilo najveće pojačanje signala za oba analita (Slika 60). Stoga je utvrđeno da je optimizirani sastav obložne tekućine smjesa MeOH, vode i mravlje kiseline u omjeru 50/49,9/0,1 (V/V/V).



Slika 60. Ovisnost relativnih intenziteta signala alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o volumnom udjelu mravlje kiseline u obložnoj tekućini. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 300 °C, protok plina 9 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s dodatkom mravlje kiseline pri protoku 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. ($N = 3$, trake pogreška predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

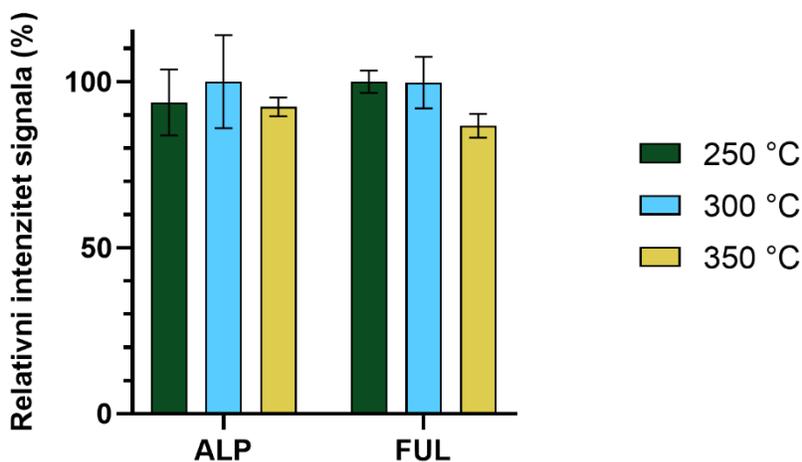
Konačno, učinak brzine protoka obložne tekućine na osjetljivost procijenjen je u rasponu od 3 do 8 $\mu\text{L}/\text{min}$, pri čemu je 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ dalo najviše signale, što je u skladu s hipotezom da smanjeno razrjeđivanje protoka poboljšava učinkovitost ionizacije (Slika 61).



Slika 61. Ovisnost relativnih intenziteta signala alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o brzini protoka obložne tekućine. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 300 °C, protok plina 9 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s 0,1 % dodatkom mravlje kiseline. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

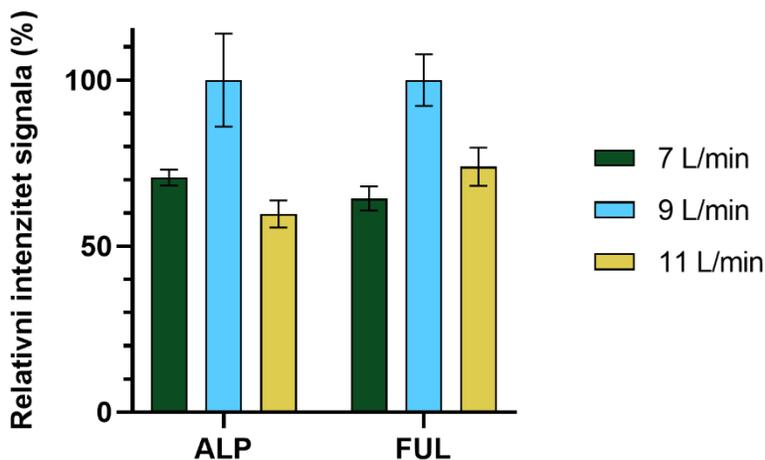
4.4.2.3. Optimizacija ESI parametara

Na kraju, ispitan je i utjecaj klasičnih ESI parametara na osjetljivost metode. Prvo je ispitan utjecaj temperature plina za desolvaciju u rasponu od 250 do 350 °C. Nisu ispitivane temperature manja od 250 °C kako bi se osigurala hlapljivost pentadekafluorooktanoata te prevenirala supresija iona. Na temelju dobivenih rezultata, pokazalo se da je najveći intenzitet signala za oba analita postignut pri temperaturi od 300 °C te je ta temperatura odabrana za daljnje eksperimente (Slika 62).



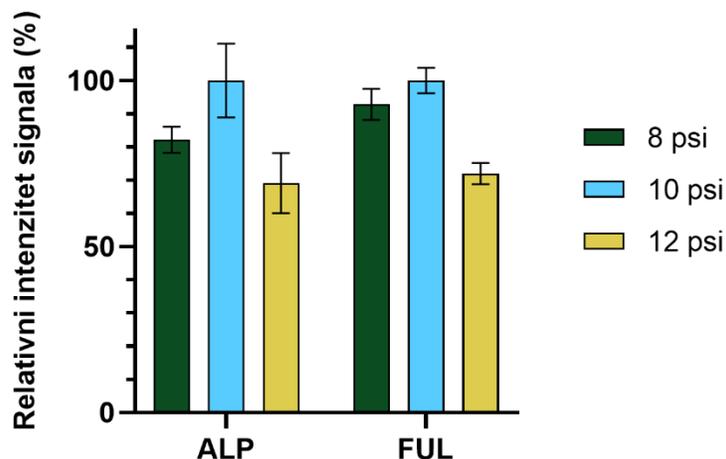
Slika 62. Ovisnost relativnih intenziteta signala alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o temperaturi plina za sušenje. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, protok plina 9 L/min, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 3 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Nakon toga, ispitan je utjecaj brzine protoka plina za desolvaciju u rasponu od 7 do 11 L/min pri čemu je najveći intenzitet signala analita postignut pri 9 L/min te je ta brzina protoka korištena u daljnjim eksperimentima (Slika 63).



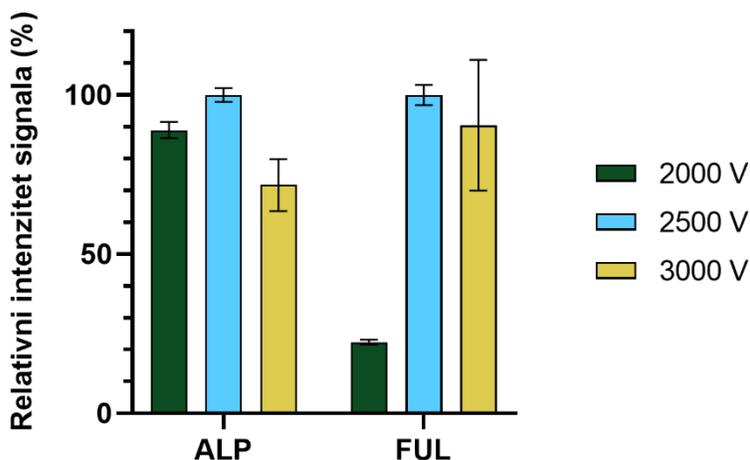
Slika 63. Ovisnost relativnih intenziteta signala alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o brzini protoka plina za sušenje. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 250 °C, tlak raspršivača 10 psi, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 3 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Nadalje, ispitan je utjecaj tlaka raspršivača u rasponu od 8 do 12 psi pri čemu je najveći intenzitet signala za oba analita postignut pri tlaku od 10 psi (Slika 64).



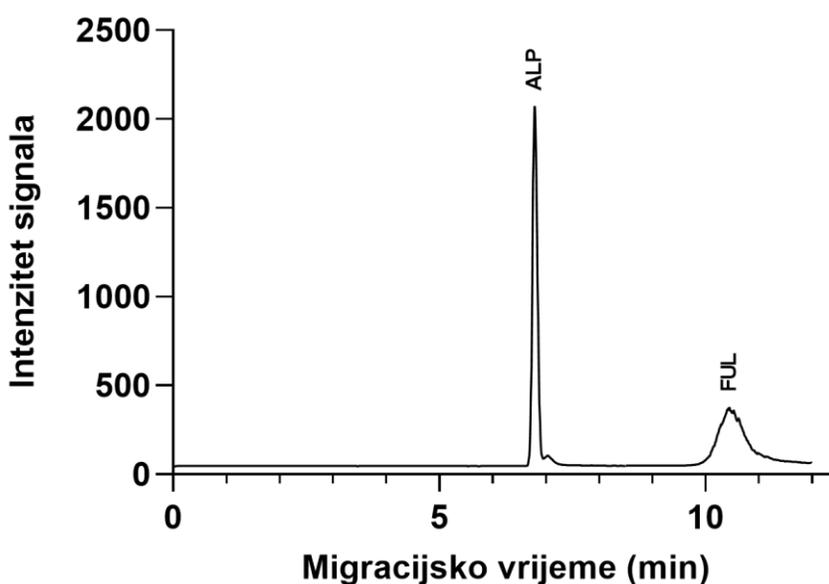
Slika 64. Ovisnost relativnih intenziteta signala alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o tlaku raspršivača. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 250 °C, protok plina 9 L/min, napon kapilare 2500 V, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 3 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Konačno, ispitan je i utjecaj napona ESI kapilare u rasponu od 2000 do 3000 V te je optimalan intenzitet signala za oba analite opažen pri naponu od 2500 V te je taj napon korišten u daljnjim eksperimentima (Slika 65).



Slika 65. Ovisnost relativnih intenziteta signala alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) o naponu kapilare. Temperatura obložnog plina 250 °C, protok obložnog plina 5 L/min, napon mlaznice 2000 V, temperatura plina 250 °C, protok plina 9 L/min, tlak raspršivača 10 psi, obložna tekućina: 50 % MeOH u vodi s dodatkom 0,1 % mravlje kiseline pri protoku 3 μ L/min. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Maseni elektroferogram standardne otopine ALP i FUL pri optimiziranim MEKC-MS uvjetima dan je na Slici 66.



Slika 66. Reprezentativni maseni elektroferogram pri optimalnim MEKC-MS uvjetima pri koncentracijama 100 ng/mL za ALP i 500 ng/mL za FUL.

4.4.3. Optimizacija pripreme uzorka

Krvna plazma, kao složeni uzorak, zahtijeva opsežnu predobradu prije instrumentalne analize. Stoga je u ovom radu u početku proveden PPT kako je opisano u poglavlju 3.3.4.4. kako bi se uklonili proteini i spriječilo njihovo taloženje u organskim otapalima. Međutim, u skladu s prethodnim opažanjima, sama primjena PPT povremeno je rezultirala nestabilnostima električne struje i nereproducibilnim učincima matrice u CE-MS zbog

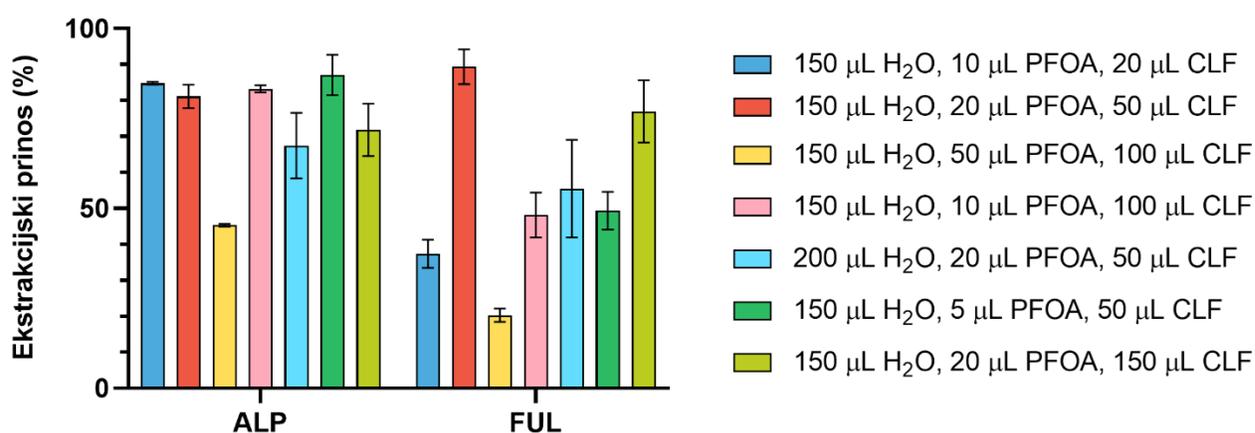
ukoncentriranih zaostalih komponenti plazme. Stoga je bio potreban dodatni korak pripreme uzorka. Kao što je prethodno spomenuto, SE-LLME se ističe kao prikladna tehnika pripreme uzorka za MEKC-MS/MS, prvenstveno zato što MEKC inherentno koristi surfaktante. Surfaktanti poboljšavaju učinkovitost ekstrakcije povećanjem topljivosti ciljnih analita i olakšavanjem prijenosa mase preko granice faza. Time se postižu veći faktori obogaćivanja i poboljšana osjetljivost, posebno za analite s malim koeficijentima razdjeljivanja u tradicionalnim LLME sustavima poput FUL-a. U ovoj studiji, CLF je korišten kao otapalo za ekstrakciju zbog svoje veće gustoće od vode i širokog solubilizacijskog kapaciteta. PFOA, koja se već koristi kao surfaktant za elektroforetski pufer, također je korištena u SE-LLME kako bi se spriječio učinak supresije iona bilo kojeg drugog surfaktanta koji bi zaostao nakon ekstrakcije. Koncentracija PFOA-e je ključna za učinkovitu ekstrakciju analita. Naime, ako je njena koncentracija premala, emulgiranje se neće dogoditi i analiti se možda neće ekstrahirati u CLF. S druge strane, ako je koncentracija PFOA prevelika, posebno ako je iznad CMC-a, došlo bi do formacije micela koje bi solubilizirale analite u vodenom sloju. Budući da konačna koncentracija PFOA-e u smjesi za ekstrakciju ovisi o volumenima svih otapala, uvjeti ekstrakcije pažljivo su optimizirani.

S tim na umu, ispitano je sedam različitih uvjeta ekstrakcije (Tablica 24), pri čemu je svaka ekstrakcija provedena kako je opisano u poglavlju 3.3.4.4., gdje je količina donjeg sloja prikupljena za uparavanje uvijek bila 90 % ukupnog volumena donjeg sloja.

Tablica 24. Pregled sedam različitih ispitanih uvjeta za SE-LLME

Ekstrakcijski uvjet	Opis uvjeta	V(H ₂ O) (μL)	V(50 mM PFOA) (μL)	V(CLF) (μL)	c(PFOA) (mM)
1	Malo PFOA, malo CLF	150	10	20	2,78
2	Srednje PFOA, srednje CLF	150	20	50	4,55
3	Mnogo PFOA, mnogo CLF	150	50	100	8,33
4	Malo PFOA, mnogo CLF	150	10	100	1,92
5	Mnogo vode, srednje PFOA, srednje CLF	200	20	50	3,70
6	Vrlo malo PFOA, srednje CLF	150	5	50	1,22
7	Srednje PFOA, vrlo mnogo CLF	150	20	150	3,13

Ekstrakcijski prinosi za svaki ispitani uvjet izračunati su usporedbom koncentracija analita u uzorcima plazme obogaćenim prije ekstrakcije i uzorcima plazme obogaćenim nakon ekstrakcije. Dobiveni ekstrakcijski prinosi za oba analita u različitim SE-LLME eksperimentima prikazani su na Slici 67. Može se vidjeti da su optimalni uvjeti ekstrakcije za maksimalne prinose ALP i FUL 150 μL H₂O, 20 μL 50 mM PFOA i 50 μL CLF. To odgovara konačnoj koncentraciji PFOA od 4,55 mM što je dovoljno za emulgiranje, a s druge strane je ispod CMC-a PFOA.



Slika 67. Ekstrakcijski prinosi alpelisiba (ALP) i fulvestranta (FUL) pri sedam različitih SE-LLME uvjeta. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Kako bi se ispitao ekstrakcijski prinos optimiziranog SE-LLME postupka na različitim koncentracijskim razinama, analize su provedene pri optimalnim uvjetima u triplikatu na niskim, srednjim i visokim koncentracijskim razinama analita. Srednje vrijednosti ekstrakcijskih prinosa prikazane su u Tablici 25. Dobiveni ekstrakcijski prinosi te odgovarajuća ponovljivost bili su izvrsni, što potvrđuje da PPT nakon kojeg slijedi SE-LLME predstavlja robustan i učinkovit protokol za pripremu uzorka za ovo istraživanje.

Tablica 25. Srednji ekstrakcijski prinosi te pripadajuće RSD vrijednosti za PPT-SE-LLME pripremu uzorka. ($N = 3$ za svaku koncentracijsku razinu)

Analit	γ (ng/mL)	Ekstrakcijski prinos (%)	RSD (%)	Analit	γ (ng/mL)	Ekstrakcijski prinos (%)	RSD (%)
	500	94,2	6,9		25	78,7	5,8
ALP	750	88,4	15,0	FUL	37,5	81,2	1,0
	1500	97,3	6,3		75	101,5	5,7

Integracija PPT-SE-LLME sa *sweepingom* tehnikom dala je impresivne ukupne faktore ukoncentriravanja od 941 za ALP i 96,4 za FUL, što pokazuje veliku učinkovitost kombinirane strategije ukoncentriravanja uzorka. Ovaj jednostavan pristup značajno povećava osjetljivost metode, što ga čini vrlo prikladnim za MEKC-MS/MS analizu uzoraka plazme koji sadrže vrlo niske koncentracije analita od interesa (150,151).

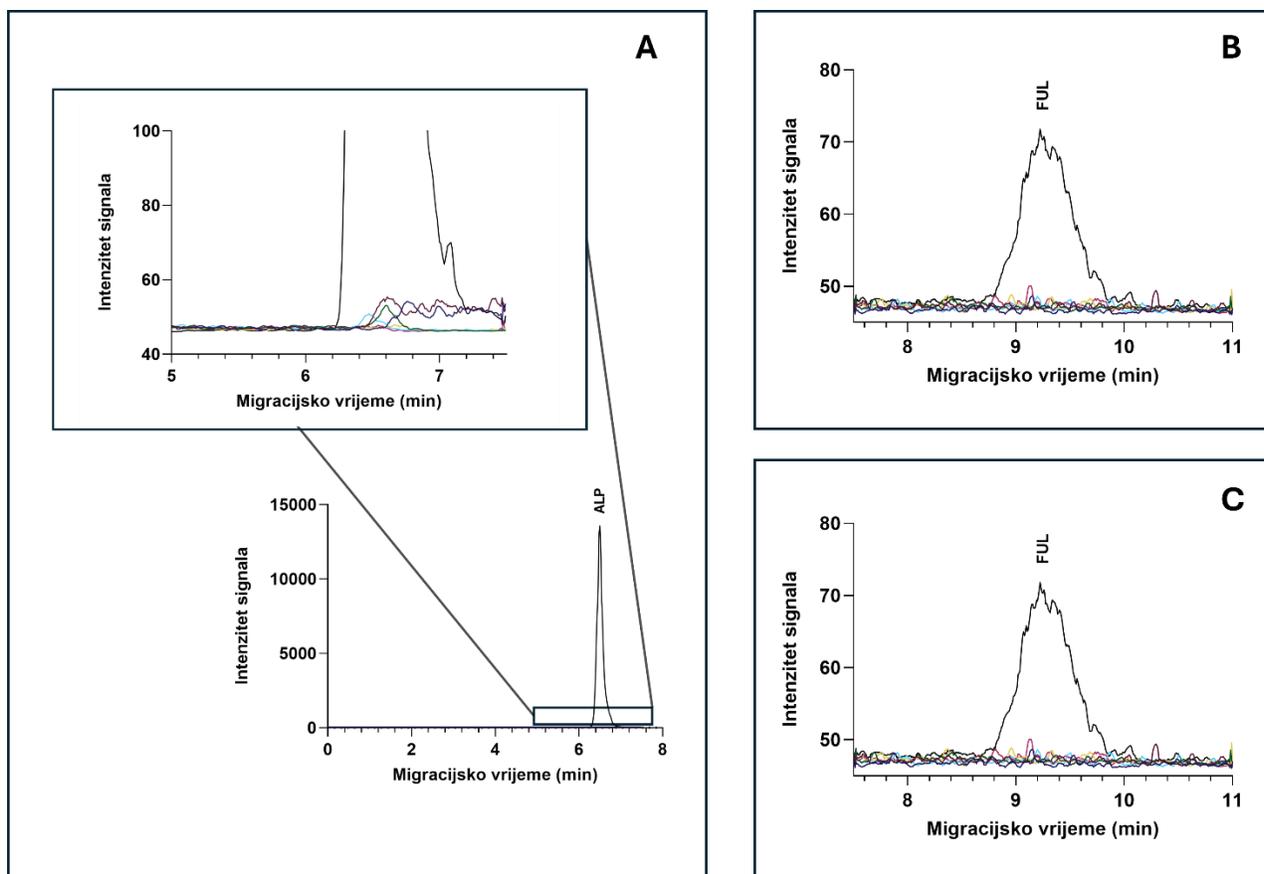
4.4.4. Validacija metode

Razvijena analitička metoda sveobuhvatno je validirana u skladu s ICH i EMA smjernicama za validaciju bioanalitičkih metoda (142). Validacija je obuhvatila procjenu specifičnosti, selektivnosti, linearnosti i kalibracijskog raspona, učinaka matrice, točnosti i preciznosti, stabilnosti, prijenosa analita i integriteta razrjeđivanja. Za ispitivanje točnosti i preciznosti, uzorci kontrole kvalitete (QC) pripremljeni su na četiri koncentracijske razine: donja granica određivanja (LLOQ), niska, srednja i visoka. Za istraživanje stabilnosti i učinaka matrice, QC uzorci pripremljeni su na niskim i visokim razinama koncentracije. Također, smjernice preporučuju upotrebu unutarnjih standarda (IS), a svaka odsutnost mora biti opravdana.

Obično se kao IS koriste izotopno obilježeni (uglavnom deuterirani) analiti jer se očekuje da imaju gotovo isto migracijsko vrijeme, učinak matrice i odziv detektora kao i odgovarajući neobilježeni analit. Stoga je u ovom radu D₃-FUL korišten kao IS za FUL. S druge strane, trenutno ne postoji komercijalno dostupan izotopno obilježeni ALP. Iako nije nemoguće, sinteza deuteriranog ALP izvan je okvira ovoga rada. Stoga su provedeni preliminarni eksperimenti kako bi se ispitalo može li se palbociklib (PAL) koristiti kao IS za ALP. To je zvučalo obećavajuće zbog sličnih molekulskih masa ALP-a i PAL-a (441,5 Da odnosno 447,5 Da) i sličnih migracijskih vremena u razvijenoj metodi (PAL je migrirao manje od minute nakon ALP-a). Međutim, pokazalo se da točnost i preciznost u ovom slučaju nisu bile zadovoljavajuće. Stoga je validacija provedena bez IS-a za ALP. To je opravdano zadovoljavajućom točnošću i preciznošću metode kako je prikazano kasnije.

4.4.4.1. Selektivnost, specifičnost i prijenos analita

Zbog korištenja MRM načina rada, koji omogućuje ciljanu analizu te odsutnosti poznatih metabolita ili produkata razgradnje ALP-a i FUL-a koji dijele identične *m/z* omjere, metoda se smatra vrlo specifičnom. Selektivnost metode procijenjena je analizom uzoraka plazme dobivenih iz šest različitih izvora, uključujući hemolizirane i vrlo lipemične uzorke. Nisu uočeni interferirajući signali koji prelaze 20 % odgovora analita na donjoj granici određivanja (LLOQ) ili 5 % odgovora IS pri migracijskim vremenima analita (Slika 68).



Slika 68. Rezultati ispitivanja selektivnosti prikazani preklopljenim ekstrahiranim ionskim kromatogramima (EIC) **A**) alpelisiba (ALP), **B**) fulvestranta (FUL) i **C**) D₃-fulvestranta (D₃-FUL) pri njihovim odgovarajućim LLOQ koncentracijskim razinama te šest uzoraka slijepa plazme pri njihovim kvantifikatorskim *m/z* prijelazima

4.4.4.2. Linearnost i kalibracijski raspon

Linearnost metode ispitana je u kalibracijskim rasponima od 200–2000 ng/mL za ALP i 10–100 ng/mL za FUL, odabranima na temelju koncentracija analita koje se obično opažaju u kliničkim studijama (150,151). Kalibracijske krivulje generirane su linearnom regresijom koristeći težinski faktor $1/x^2$, uključujući IS korekciju za FUL. Slijedeći ICH smjernice, točnost povratno izračunatih koncentracija bila je unutar $\pm 15\%$ od nominalnih vrijednosti ($\pm 20\%$ za LLOQ) za najmanje 75 %, odnosno najmanje šest, kalibracijskih standarda. Koeficijenti korelacije (*r*) kretali su se od 0,9963 do 0,9986 za ALP i od 0,9972 do 0,9997 za

FUL u svim konstruiranim kalibracijskim krivuljama. Ipak, zbog nedostatka IS za ALP, za svaku analitičku sekvencu, pripremljene su nove kalibracijske krivulje.

4.4.4.3. Učinak matrice

Učinak matrice (ME) je fenomen smanjenja ili povećanja intenziteta signala zbog prisutnosti interferencija iz matrice uzorka i često je prisutan kada se analiziraju složeni uzorci poput krvne plazme. Stoga je obavezno procijeniti ME kako bi se pokazalo da se metoda može reproducibilno koristiti između različitih matrica. U ovom istraživanju, ME je procijenjen analizom plazme iz šest različitih izvora, uključujući hemoliziranu i vrlo lipemičnu plazmu. Za svaki izvor plazme, po tri uzorka su obogaćena niskim i visokim koncentracijama analita nakon pripreme uzorka. Zatim su tako dobivene koncentracije uspoređene sa standardnim otopinama pripremljenim u ekvivalentnim koncentracijama. ME je kvantificiran kao srednja vrijednost odstupanja od nominalne koncentracije, popraćena odgovarajućim RSD vrijednostima, izračunata pomoću jednadžbe (37). Dobiveni ME prikazani su u Tablici 26. Može se vidjeti da postoji zamjetna ionska supresija ALP-a u matricama i na niskim i na visokim koncentracijskim razinama. Međutim, to ne predstavlja analitički problem budući da je postojala zadovoljavajuća ponovljivost između različitih izvora plazme. Učinci matrice za FUL i D₃-FUL bili su usporedivi, pa je stoga ukupni učinak matrice za FUL nakon IS-korekcije bio zanemariv.

Tablica 26. Srednji učinci matrica (ME) i pripadajuće RSD vrijednosti za šest različitih izvora plazme ($N = 3$ po koncentracijskoj razini i izvoru plazme)

Analit	γ (ng/mL)	ME (%)	RSD (%)	Analit	γ (ng/mL)	ME (%)	RSD (%)
ALP	500	-45,3	11,6	FUL	25	0,4	8,1
	1500	-20,6	14,6		75	-1,8	7,5

4.4.4.4. Točnost i preciznost

Točnost i preciznost metode procijenjene su korištenjem QC uzoraka pripremljenih u kvintuplikatu na četiri koncentracijske razine, kao što je prethodno navedeno. Srednja točnost izražena je kao odstupanje od nominalne koncentracije, dok je preciznost izražena RSD vrijednostima između ponavljanja. Sva analitička odstupanja bila su unutar prihvatljivog raspona od $\pm 15\%$, a vrijednosti RSD dosljedno su ostale ispod 15% . Sažetak ovih rezultata prikazan je u Tablici 27.

Tablica 27. Točnost i preciznost ispitane unutar dana ($N = 5$) i između različitih dana ($N = 15$)

Analit	γ (ng/mL)	Unutar dana ($N = 5$)		Između dana ($N = 15$)	
		Odstupanje (%)	RSD (%)	Odstupanje (%)	RSD (%)
ALP	200	-4,5	11,6	-10,3	12,6
	500	-5,0	5,9	-3,0	11,1
	750	9,0	11,9	7,5	11,8
	1500	-5,6	9,7	0,8	10,8
FUL	10	-8,4	2,0	-6,4	7,4
	25	-3,6	1,4	-4,1	8,6
	37,5	2,9	4,7	-2,9	10,3
	75	-1,8	10,2	-5,9	8,3

4.4.4.5. Stabilnost

Tijekom optimizacije metode utvrđeno je da su matične otopine stabilne na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ najmanje tri mjeseca. Međutim, prema smjernicama, stabilnost analita u matrici uzorka mora se dokazati pod različitim uvjetima. Tako se mora demonstrirati stabilnost tijekom analitičke sekvence, stabilnost prilikom pripreme uzorka, stabilnost prilikom ponovljenog odmrzavanja uzorka te dugoročna stabilnost. Sve studije stabilnosti provedene su pripremom QC uzoraka u triplikatu na niskim i visokim koncentracijskim razinama, ostavljanjem uzoraka pod određenim uvjetima, njihovom analizom, a zatim izražavanjem srednjeg odstupanja

dobivenih koncentracija u odnosu na svježe pripremljene uzorake, uz odgovarajuće RSD vrijednosti. Za stabilnost tijekom analitičke sekvence, QC uzorci ostavljeni su na CE autosampleru na 25 °C tijekom 10 sati. Zatim, za stabilnost prilikom pripreme uzorka, QC uzorci su postavljeni na radni stol na 2 sata na 25 °C. Stabilnost pri ponovljenom odmrzavanju, ispitana je izlaganjem QC uzoraka trima ciklusima odmrzavanja od -18 °C do 25 °C tijekom 30 minuta. Vrijeme između svakog ciklusa odmrzavanja bilo je najmanje 12 sati. Konačno, dugoročna stabilnost procijenjena je ostavljanjem QC uzoraka na -18 °C tijekom 2 tjedna. Srednja odstupanja pronađenih koncentracija od nominalne koncentracije bila su manja od 15 % na obje koncentracijske razine, što demonstrira stabilnost analita u različitim uvjetima (Tablica 28).

Tablica 28. Rezultati ispitivanja stabilnosti analita ($N = 3$ po koncentracijskoj razini i vrsti stabilnosti)

Analit	γ (ng/mL)		Tijekom analitičke sekvence	Prilikom pripreme uzorka	Pri ponovljenom odmrzavanju	Dugoročno
ALP	500	Odstupanje (%)	6,0	4,1	-9,8	-0,4
		RSD (%)	7,1	5,1	4,5	4,4
	1500	Odstupanje (%)	11,1	-2,0	-4,0	-9,5
		RSD (%)	4,7	3,3	3,6	8,7
FUL	25	Odstupanje (%)	4,3	2,6	3,7	1,4
		RSD (%)	3,8	3,2	2,8	0,1
	75	Odstupanje (%)	-6,6	-10,3	2,2	-5,5
		RSD (%)	3,8	2,0	2,2	0,5

4.4.4.6. Prijenos analita i integritet prilikom razrjeđenja

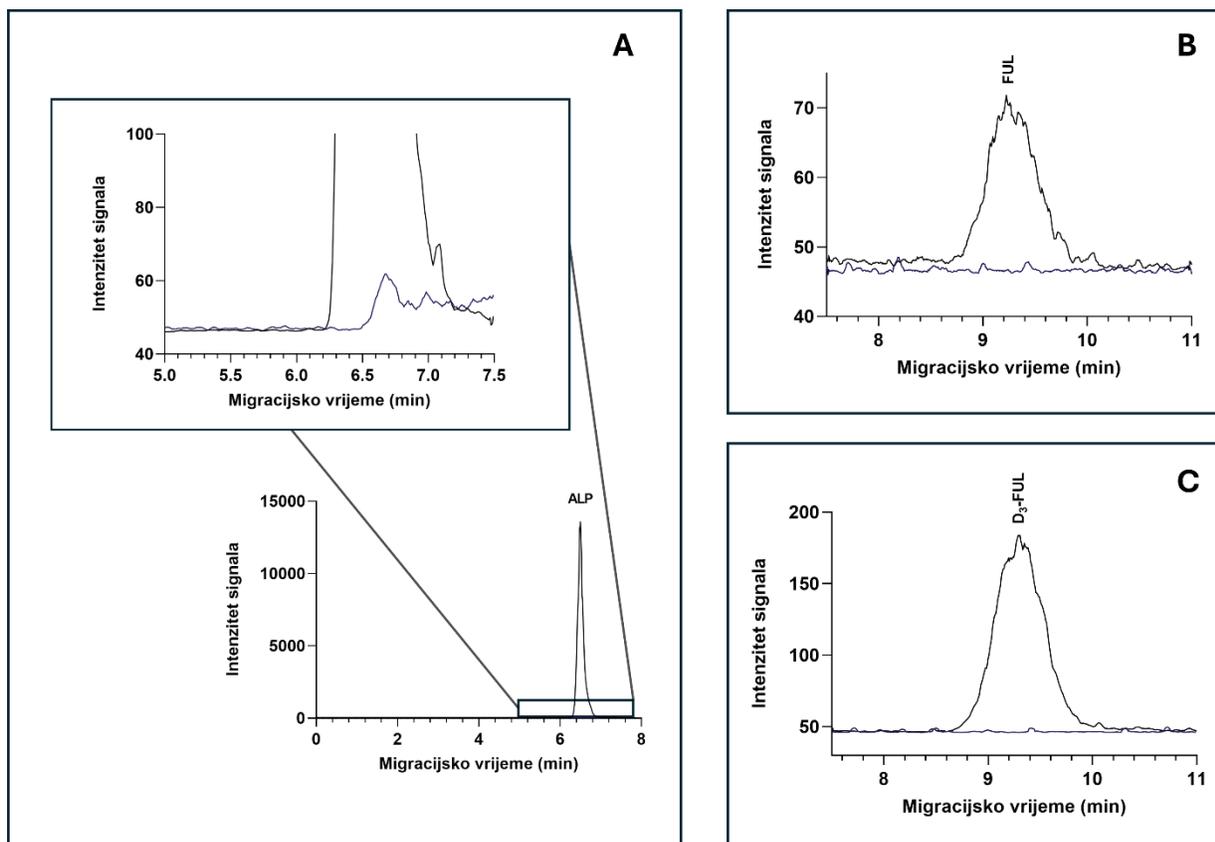
Procjena integriteta prilikom razrjeđenja potrebna je kada se očekuje da bi analit u stvarnom uzorku mogao biti prisutan u koncentracijama većim od gornje granice određivanja (ULOQ) kalibracijskog raspona. Budući da ALP u nekim slučajevima može biti prisutan u ljudskoj plazmi u koncentracijama iznad 2000 ng/mL, istražen je i integritet prilikom razrjeđenja. Cilj je bio pokazati da razrjeđenje ne utječe na točnost i preciznost metode. Za to su QC uzorci pripremljeni u kvintuplikatu u koncentraciji 2,5 puta većoj od ULOQ, koja iznosi 5000 ng/mL za ALP i 250 ng/mL za FUL. Zatim su ti uzorci razrijeđeni slijepom plazmom 5 puta kako bi se koncentracije podesile u sredinu kalibracijskog raspona. Rezultati ispitivanja iskazani su srednjim odstupanjima od nominalnih koncentracija i pripadajućim RSD vrijednostima te su prikazani u Tablici 29. Ove vrijednosti pokazuju da je integritet metode sačuvan prilikom razrjeđenja uzoraka.

Tablica 29. Rezultati ispitivanja integriteta metode nakon peterostrukog razrjeđenja uzorka s koncentracijama ALP i FUL iznad ULOQ koncentracijske razine ($N = 5$)

Analit	Nominalna γ (ng/mL)	Replikat	Izmjerena γ (ng/mL)	Srednje odstupanje (%)	RSD (%)
ALP	1000	1	1097,0	-1,5	7,9
		2	960,7		
		3	880,7		
		4	1047,6		
		5	938,9		
FUL	50	1	48,83	2,7	5,1
		2	48,89		
		3	46,15		
		4	53,22		
		5	48,13		

Kako bi se istražio potencijalni prijenos analita, slijepi uzorci plazme injektirani su izravno nakon standarda najviše koncentracije u kalibracijskoj seriji. Pritom nisu uočeni

interferirajući elektroforetski vrhovi koji odgovaraju ALP ili FUL (Slika 69). Intenziteti signala u tim slijepim uzorcima nakon injektiranja bili su ispod 20 % intenziteta signala u LLOQ uzorcima za analite i ispod 5 % za IS, što potvrđuje odsutnost prijenosa analita i osigurava pouzdanost metode u rutinskoj kliničkoj analizi.



Slika 69. Rezultati ispitivanja prijenosa analita prikazani preklopljenim ekstrahiranim ionskim kromatogramima (EIC) **A**) alpelisiba (ALP), **B**) fulvestranta (FUL) i **C**) D₃-fulvestranta (D₃-FUL) pri njihovim odgovarajućim LLOQ koncentracijskim razinama te uzoraka slijepe plazme injektirane izravno nakon standarda najviše koncentracije u kalibracijskoj seriji pri njihovim kvantifikatorskim *m/z* prijelazima

4.4.5. Primjena metode

Potpuno validirana PPT-SE-LLME *sweeping* MEKC-MS/MS metoda primijenjena je za analizu uzoraka plazme dobivenih od tri pacijentice (u dobi od 42, 62 i 69 godina) koje su bile na kombiniranoj terapiji s ALP i FUL. Uzorci plazme analizirani su u odnosu na svjež

pripremljenu kalibracijsku krivulju. Određene koncentracije ALP i FUL u plazmi, zajedno s odgovarajućim režimima doziranja, sažete su u Tablici 30, dok su maseni elektroferogrami dani u Prilogu S7-S9.

Tablica 30. Izmjerene koncentracije lijekova u uzorcima plazme pacijentica

Pacijentica	ALP doza	Vrijeme od primjene (sati)	Izmjerena γ (ng/mL)	FUL doza	Vrijeme od primjene (dani)	Izmjerena γ (ng/mL)
1	300 mg dnevno	22,5	1075,6	500 mg mjesečno	28	13,82
2	300 mg dnevno	22,0	552,4	500 mg mjesečno	28	10,73
3	300 mg dnevno	1,0	213,8	500 mg mjesečno	21	28,15

Koncentracije određene u uzorcima plazme pacijenata dobro se podudaraju s koncentracijama pronađenim u kliničkim studijama (150,151). U slučaju pacijentice 3, uočeno je da je koncentracija ALP u njezinoj plazmi najniža od svih triju pacijentica, iako dozu ALP uzela samo jedan sat prije uzorkovanja. To može upućivati na neadherenciju ili ultrabrzi metabolizam. Kako bi se dalje istražili slični slučajevi u kojima se čini da je koncentracija ALP niža od LLOQ ove metode, preporučuje se revalidacija sa širim kalibracijskim rasponom. Međutim, u ovoj studiji koja dokazuje koncept, koncentracije ALP uspješno su određene kod svih pacijentica, što potkrepljuje primjenjivost razvijene metode za TDM ovih lijekova.

4.5. Disperzivna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi za određivanje alpelisiba u ljudskoj plazmi metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute sa spektrometrijom masa

4.5.1. Dizajn hibridnog HEMA-MAA polimetakrilatnog sorbensa

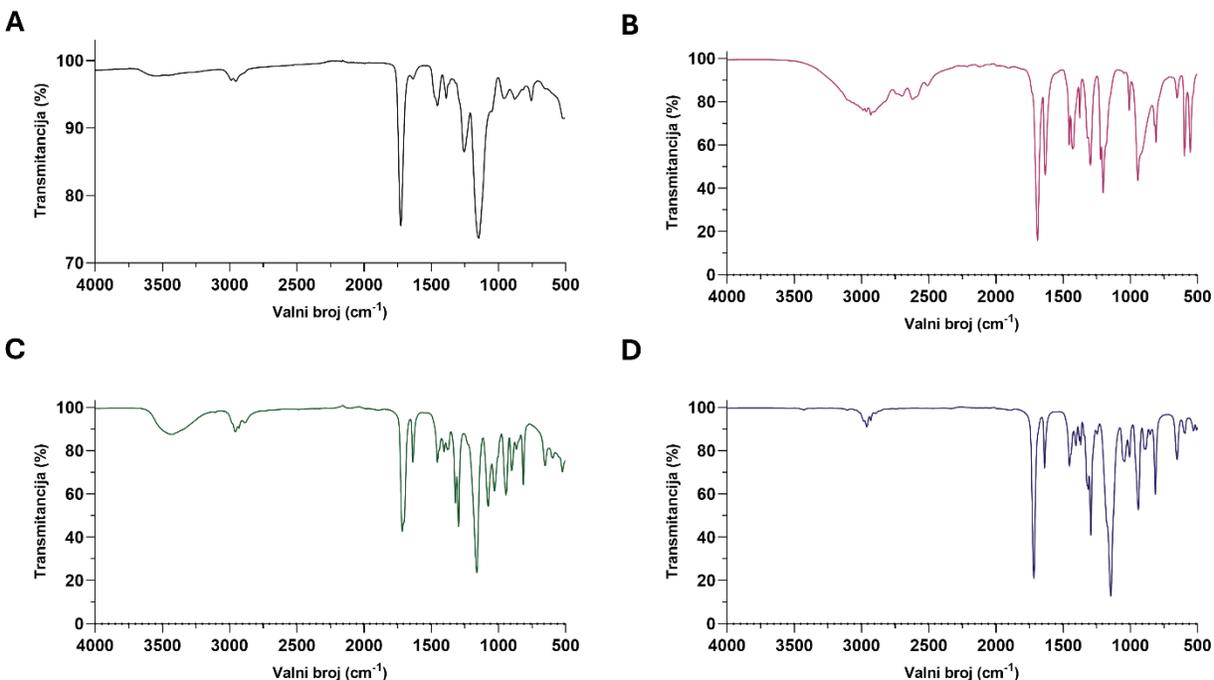
S ciljem selektivne ekstrakcije ALP iz ljudske plazme, u prvom koraku istraživanja sintetiziran je sorbens temeljen na molekularno utisnutom polimeru (engl. *molecularly imprinted polymer*, MIP). MIP-ovi se tradicionalno koriste za selektivno prepoznavanje ciljanih molekula zahvaljujući prisutnosti komplementarnih funkcionalnih džepova koji se formiraju tijekom sinteze u prisutnosti molekularnog predloška. Očekivalo se da će MIP omogućiti selektivnu adsorpciju ALP-a, smanjujući interferenciju drugih proteina i biomolekula u plazmi. Međutim, komparativna evaluacija afiniteta vezanja MIP-a u odnosu na odgovarajući neutisnuti polimer (engl. *non-imprinted polymer*, NIP) pokazala je zanemarive faktore utiska (engl. *imprinting factor*). To implicira da je prisutnost predloška tijekom sinteze imala minimalan učinak na selektivnost sorbensa. Ovaj neočekivani rezultat može se prvenstveno pripisati izraženoj nespecifičnoj adsorpciji koju je pokazao NIP sorbens. Naime, pokazalo se da je NIP u stanju učinkovito adsorbirati ALP čak i pri fiziološki očekivanim koncentracijama u plazmi. To ukazuje da su interakcije između polimera i ALP-a dovoljno snažne da omogućuju efektivno vezanje bez potrebe za molekularnim utiskom. S obzirom na veliku učinkovitost NIP sorbensa, sinteza MIP-a nije bila ekonomski ni kemijski opravdana. Ovaj rezultat naglašava važnost kritičkog vrednovanja koristi od molekularnog utiska u kontekstu bioloških matrica gdje prisutnost mnogih nespecifičnih interakcija može zasjeniti prednosti MIP-a.

Na temelju ovih rezultata, daljnja istraživanja bila su usmjerena na razvoj i optimizaciju polimetakrilatnog sorbensa bez molekularnog utiska, čiji dizajn omogućuje učinkovitu adsorpciju ALP-a u kompleksnim biološkim matricama. Odabir sastava monomera, umreživača (engl. *cross-linker*) i njihovih omjera temeljen je na mehanističkim principima koji upravljaju interakcijama polimera i analita, morfologijom polimerne mreže te performansama u vodenim biološkim matricama. Metakrilna kiselina (MAA) odabrana je kao glavni funkcionalni monomer zbog prisutnosti karboksilnih skupina sposobnih za stvaranje

usmjerenih vodikovih veza i elektrostatičkih interakcija s funkcionalnim skupinama ALP-a. Ove interakcije omogućuju snažno, ali reverzibilno vezanje analita, što je ključno za reproducibilnost i regeneraciju sorbensa. Karboksilne skupine MAA također doprinose pH-osjetljivim interakcijama, što omogućuje dodatnu kontrolu adsorpcije u fiziološkim uvjetima. Komonomer 2-hidroksietil-metakrilat (HEMA) uveden je u omjeru 1:4 (HEMA:MAA) kako bi se modulirala ukupna polarnost polimera, povećala hidrofilitnost i smanjile nespecifične hidrofobne interakcije koje su problematične u složenim uzorcima poput ljudske plazme. Hidroksilne skupine HEMA-e stvaraju hidratiziranu okolinu samog polimera, što poboljšava difuziju analita kroz matricu uzorka i omogućuje optimalnu dostupnost funkcionalnih veznih mjesta (152). Takav pristup minimizira fenomen “zarobljavanja” analita u unutrašnjosti mreže polimera, čime se povećava efikasnost adsorpcije i smanjuje varijabilnost između serija. Kao umreživač korišten je etilen-glikol-dimetakrilat (EGDMA) zahvaljujući svojoj bifunkcionalnoj prirodi koja omogućuje formiranje krute trodimenzijske polimerne mreže s velikom strukturnom stabilnošću i kemijskom otpornošću. Odabir omjera monomera i umreživača od 3:10 osigurava gusto umrežen polimer što stabilizira prostornu orijentaciju funkcionalnih skupina, ograničava prekomjerno bubrenje i formira mehanički robustan sorbens s reproducibilnim karakteristikama vezanja. Kombinacija MAA i HEMA unutar gusto umreženog polimera omogućuje optimalnu ravnotežu između hidrofilnih i hidrofobnih interakcija, kontrolirane polarne okoline i stabilnosti. Ovaj dizajn osigurava dovoljno snažno, ali reverzibilno vezanje ALP-a, smanjujući potrebu za selektivnim MIP dizajnom i pojednostavljujući sintezu. U konačnici, ovaj racionalni dizajn imao je za cilj postizanje optimalne ravnoteže između učinkovitosti nespecifičnog vezanja, stabilnosti polimerne mreže i kompatibilnosti s vodenim biološkim matricama, osiguravajući dovoljnu adsorpciju analita bez ugrožavanja strukturnog integriteta.

4.5.2. Strukturna karakterizacija sorbensa

Radi potvrde uspješne sinteze i kemijske strukture hibridnog HEMA-MAA polimetakrilatnog sorbensa, primijenjena je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR). FTIR spektar sintetiziranog sorbensa (Slika 70A) pokazao je karakteristične apsorpcijske vrpce koje odgovaraju umreženoj polimetakrilatnoj polimernoj mreži. Intenzivna apsorpcijska vrpca pri 1726 cm^{-1} pripisuje se vibracijama karbonilnih (C=O) skupina estera, koje potječu od funkcionalnih monomera (HEMA i MAA) te upotrijebljenog umreživača. Ova vrpca predstavlja jedan od ključnih dokaza uspješne ugradnje metakrilatnih jedinica u polimernu strukturu. Široka apsorpcijska vrpca u području oko 3550 cm^{-1} odgovara vibracijama hidroksilnih (O–H) skupina, što upućuje na prisutnost hidroksilnih skupina porijeklom iz HEMA monomera te eventualno karboksilnih skupina metakrilne kiseline (MAA). Prisutnost ovih polarnih skupina od posebne je važnosti jer doprinose hidrofilitnosti materijala i omogućuju ostvarivanje vodikovih veza s ciljnim analitom, čime se potencijalno povećava učinkovitost ekstrakcije. Apsorpcijske vrpce pri 2987 cm^{-1} i 2954 cm^{-1} pripisuju se asimetričnim i simetričnim vibracijama alifatskih C–H skupina, karakterističnih za metilenske i metilne fragmente polimernog lanca. Dodatno, vrpca pri 1148 cm^{-1} povezana je s vibracijama C–O i C–O–C veza esterskih skupina, što dodatno potvrđuje formiranje poliesterske mreže tipične za polimetakrilatne materijale. Izostanak karakteristične vrpce istezanja vinilne C=C veze u području $1630\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ potvrđuje potpunu ili gotovo potpunu konverziju dvostrukih veza tijekom polimerizacije, odnosno uspješnu radikalnu polimerizaciju metakrilatnih monomera i formiranje stabilne, umrežene polimerne strukture. Time je spektroskopski potvrđena kemijska stabilnost i strukturni integritet sintetiziranog sorbensa.



Slika 70. FTIR spektri **A)** sintetiziranog sorbensa, **B)** metakrilne kiseline, **C)** 2-hidroksietilmetakrilata i **D)** etilen-glikol-dimetakrilata

Hidrodinamička raspodjela veličine čestica polimetakrilatnog sorbensa određena je metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS). Rezultati DLS analize pokazali su unimodalnu raspodjelu veličine čestica s prosječnim hidrodinamičkim promjerom od $950,4 \pm 47,8$ nm te malim indeksom polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI) od $0,1276 \pm 0,1014$. Dobivena vrijednost PDI ukazuje na usku i homogenu raspodjelu veličine čestica, što je pokazatelj kontroliranog procesa sinteze i dobre reproduktivnosti pripreme materijala. Submikronska veličina čestica, u kombinaciji s niskom polidisperznošću, predstavlja značajnu prednost u primjeni disperzivne mikroekstrakcije u čvrstoj fazi (DSPME). Naime, takve čestice omogućuju formiranje stabilne suspenzije sorbensa unutar uzorka, ravnomjernu disperziju kroz cijeli volumen matrice te povećanje specifične površine dostupne za interakciju s analitima. Povećana međupovršina analit-sorbens rezultira poboljšanom kinetikom prijenosa tvari i većom učinkovitošću ekstrakcije. Osim toga, homogena veličina čestica doprinosi boljoj ponovljivosti analitičke metode, smanjujući varijabilnost povezanu s taloženjem ili agregacijom sorbensa. Sukladno

navedenim fizikalno-kemijskim svojstvima, može se očekivati da sintetizirani HEMA–MAA polimetakrilatni sorbens osigurava visoku učinkovitost ekstrakcije, dobru preciznost te pouzdanu primjenu u analitičkim postupcima temeljenim na DSPME pristupu.

4.5.3. Ispitivanje kinetike vezanja analita na sorbens

Kapacitet vezanja razvijenog polimetakrilatnog sorbensa ispitan je sustavnom inkubacijom 1,5 mg sorbensa s rastućim količinama ALP tijekom 24 sata na 25 °C, čime su osigurani uvjeti dostizanja adsorpcijske ravnoteže. Korištene količine ALP-a (5, 15,8, 50, 158,1 i 500 ng) odgovarale su koncentracijama u ljudskoj plazmi u rasponu od 50 do 5000 ng/mL, čime je eksperimentalni dizajn obuhvatio očekivane vrijednosti lijeka u plazmi. Nakon inkubacije, suspenzije su centrifugirane kako bi se sorbens odvojio od tekuće faze, a supernatanti su analizirani pomoću UHPLC-MS/MS metode. Količina vezanog ALP-a izračunata je kao razlika između početne (inkubirane) količine analita i preostale koncentracije određene u supernatantu. Ovakav pristup omogućuje preciznu kvantifikaciju adsorpcijskog kapaciteta bez potrebe za dodatnim desorpcijskim koracima. Rezultati su pokazali izrazito linearnu ovisnost između inkubirane količine ALP-a i količine vezane na sorbens, s koeficijentom korelacije $r = 0,9996$. Ova gotovo idealna linearnost upućuje na homogenu raspodjelu funkcionalnih veznih mjesta unutar polimerne mreže te na odsutnost ranog zasićenja sorbensa unutar ispitivanog koncentracijskog raspona. Posebno je značajno da je čak i pri najvišoj ispitivanoj razini, koja odgovara koncentraciji ALP-a u plazmi od 5000 ng/mL, udio vezanja iznosio 94,6 %. Ovaj rezultat jasno ukazuje na to da, iako sorbens inherentno posjeduje konačan kapacitet vezanja, taj kapacitet znatno premašuje koncentracije ALP-a koje se realno očekuju u uzorcima ljudske plazme. Time se potvrđuje da sorbens ima dostatan kapacitet za kvantitativnu ekstrakciju ALP-a bez rizika od zasićenja u rutinskim analitičkim primjenama.

Nakon utvrđivanja kapaciteta vezanja, detaljno je ispitana kinetika adsorpcije kako bi se razjasnila brzina vezanja i potencijalni mehanizam interakcije između ALP-a i sorbensa. U tu svrhu, 1,5 mg sorbensa inkubirano je s 50 ng ALP-a na 25 °C tijekom 0, 1, 2, 5, 10, 30, 60, 120 i 240 minuta. Važno je napomenuti da su najranije vremenske točke inherentno podložne

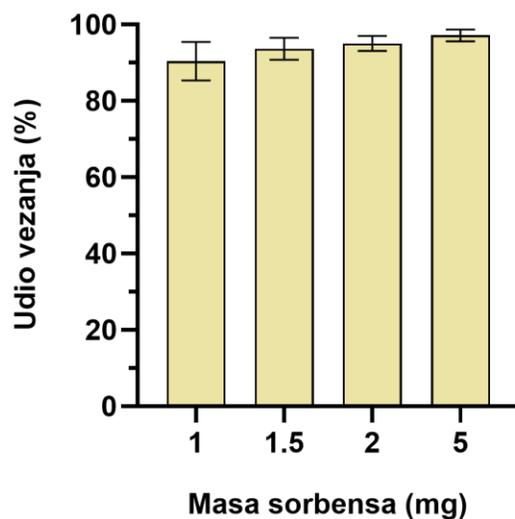
manjim pristranostima. Naime, prije uzorkovanja supernatanta nužan je korak centrifugiranja, tijekom kojeg sorbens ipak ostaje u ograničenom kontaktu s otopinom. Iako je tijekom centrifugiranja efektivna površina sorbensa značajno smanjena u odnosu na potpuno suspendirano stanje, određeni stupanj interakcije s analitom i dalje je moguć, što može blago utjecati na preciznost mjerenja u najkraćim vremenskim intervalima. Unatoč tim ograničenjima, dobiveni rezultati jasno su pokazali progresivno povećanje količine vezanog ALP-a s vremenom inkubacije. Adsorpcija je bila relativno brza u početnoj fazi, što se može pripisati dostupnosti velikog broja slobodnih veznih mjesta na površini sorbensa, dok se pri duljim vremenima inkubacije postupno približavala ravnotežnom stanju. Nakon 240 minuta inkubacije postignuto je 96,3 % vezanja ALP-a, što potvrđuje veliku učinkovitost sorbensa i njegovu sposobnost gotovo kvantitativne adsorpcije ciljanog analita.

Mehanizam adsorpcije analiziran je primjenom različitih kinetičkih modela na eksperimentalne podatke. Linearizacija podataka prema kinetičkom modelu pseudo-prvog reda provedena je prikazom ovisnosti prirodnog logaritma razlike ravnotežnog kapaciteta vezanja (q_e) i kapaciteta vezanja u vremenu t (q_t) o vremenu. Graf ovisnosti $\ln(q_e - q_t)$ o t , pokazao je linearnost isključivo u ranim fazama adsorpcije, dok su pri duljim vremenima inkubacije uočena značajna odstupanja. Ovakvo ponašanje sugerira da proces adsorpcije ne može biti adekvatno opisan jednostavnim modelom koji pretpostavlja da je brzina procesa proporcionalna broju nepopunjenih veznih mjesta. Nasuprot tome, izuzetno dobra linearna korelacija ($r = 1,000$) dobivena je primjenom Ho–McKayeovog modela adsorpcije pseudo-drugog reda, prikazom ovisnosti t/q_t o t (153). Ovaj model pretpostavlja da je brzina adsorpcije kontrolirana kemisorpcijom, odnosno da uključuje specifične interakcije između analita i funkcionalnih skupina na sorbensu, kao što su vodikove veze i elektrostatičke interakcije. Na temelju ovog modela, ravnotežni kapacitet vezanja (q_e) procijenjen je na 48,3 ng, što je u velikom skladu s eksperimentalno dobivenom vrijednošću od 48,2 ng nakon 240 minuta inkubacije. Takvo podudaranje dodatno potvrđuje prikladnost kinetičkog modela pseudo-drugog reda za opis adsorpcijskog ponašanja ovog sorbensa. Sveukupno, rezultati ispitivanja kapaciteta vezanja i kinetike adsorpcije jasno potvrđuju da polimetakrilatni sorbens posjeduje veliki kapacitet, brzu kinetiku vezanja i mehanizam adsorpcije temeljen

na specifičnim interakcijama. Ove karakteristike čine ga iznimno pogodnim za selektivnu i učinkovitu ekstrakciju ALP-a iz kompleksnih bioloških matrica, dodatno opravdavajući njegovu primjenu kao robusnu alternativu MIP sorbensima u bioanalitičkim metodama.

4.5.4. Optimizacija DSPME postupka pripreme uzorka

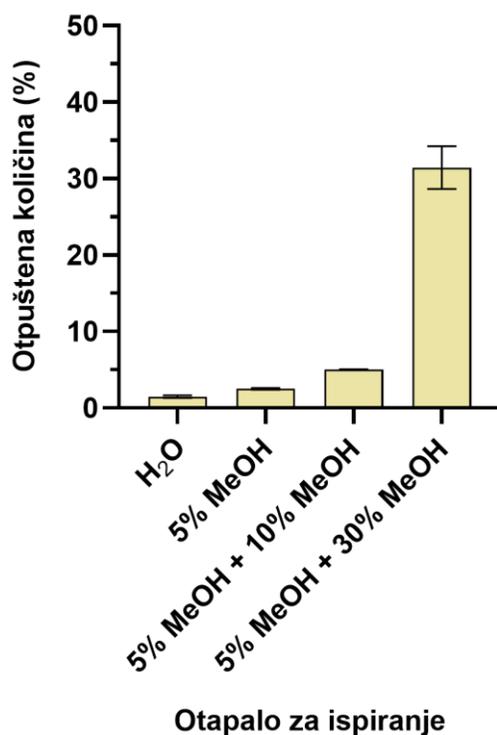
U prvom koraku optimizacije DSPME postupka ispitan je utjecaj mase polimetakrilatnog sorbensa na učinkovitost vezanja ALP. U tu svrhu inkubirano je 1,0, 1,5, 2,0 i 5,0 mg sorbensa s 50 ng ALP-a, pri čemu su svi ostali eksperimentalni uvjeti zadržani nepromijenjenima, kako je prethodno opisano. Kao što je i očekivano, najveća učinkovitost vezanja postignuta je primjenom 5 mg sorbensa (Slika 71), što se može pripisati većem broju dostupnih veznih mjesta i većoj ukupnoj površini sorbensa. Međutim, uporaba veće mase sorbensa rezultirala je i određenim praktičnim nedostacima, uključujući dulje vrijeme centrifugiranja i potrebu za intenzivnijom sonikacijom kako bi se postigla učinkovita disperzija i potpuno odvajanje sorbensa od tekuće faze. Takvi zahtjevi smanjuju robusnost i jednostavnost metode, osobito u kontekstu rutinske analize ili obrade većeg broja uzoraka. S obzirom na navedeno, za daljnje eksperimente odabrana je masa sorbensa od 2 mg, koja je pokazala tek neznatno nižu učinkovitost vezanja u usporedbi s 5 mg, ali je istodobno omogućila znatno jednostavnije rukovanje, kraće vrijeme obrade i bolju ponovljivost postupka. Ovaj kompromis između maksimalne adsorpcijske učinkovitosti i praktične izvedivosti predstavlja važan aspekt u razvoju analitičkih metoda, gdje se osim performansi mora uzeti u obzir i njihova primjenjivost u svakodnevnom laboratorijskom radu.



Slika 71. Utjecaj mase sorbensa u DSPME postupku na udio vezanja ALP nakon inkubacije s 50 ng ALP tijekom 30 minuta pri 25 °C. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

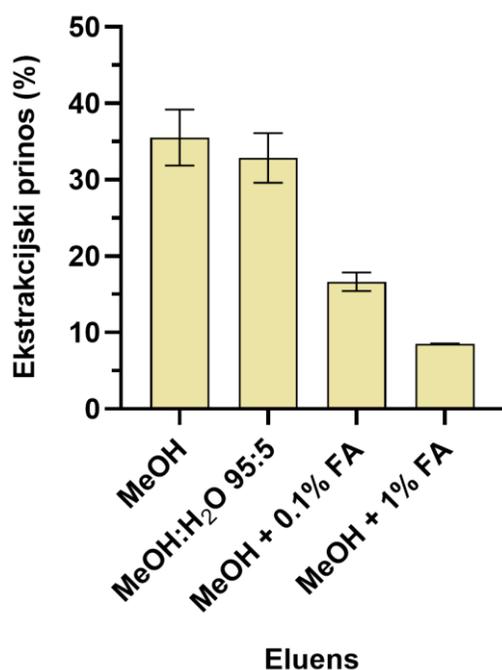
Nakon optimizacije mase sorbensa, istražen je utjecaj otapala za ispiranje na učinkovitost uklanjanja komponenti matrice uz minimalan gubitak analita. Sorbens s vezanim analitom ispran je s 500 μL ultračiste vode, 5 % MeOH ili sekvencijalno s 500 μL 5 % MeOH, nakon čega je uslijedilo ispiranje s 10 % ili 30 % MeOH. Primarni cilj koraka ispiranja bio je uklanjanje rezidualnih komponenti matrice bez značajnog ispiranja ALP-a sa sorbensa. Budući da su proteini plazme učinkovito uklonjeni tijekom prethodnog koraka taloženja proteina, ispiranje sorbensa bilo je prvenstveno usmjereno na smanjenje interferencija povezanih s fosfolipidima. Fosfolipidi su poznati kao jedan od glavnih izvora učinaka matrice u LC-MS/MS analizama, osobito zbog njihove sposobnosti supresije ili pojačanja ionizacije analita u ESI izvoru. Učinkovitost uklanjanja fosfolipida procijenjena je praćenjem karakterističnih MRM prijelaza povezanih s fosfokolinom u eluatu pomoću UHPLC-MS/MS. Odabrane su dva MRM prijelaza: m/z 524,4 \rightarrow 184,4, koji odgovara lizofosfatidilkolinu 18:0, te m/z 396,4 \rightarrow 184,4, koji odgovara generičkom fragmentu fosfokolina nastao iz fosfatidilkolina i lizofosfatidilkolina u pozitivnim ESI uvjetima. Ovi prijelazi korišteni su kao generički indikatori ukupnog fosfolipidnog opterećenja, a ne za identifikaciju pojedinačnih lipidnih vrsta. Očekivano,

dvostupanjski postupak ispiranja s 5 % MeOH, nakon čega je slijedilo ispiranje s 30 % MeOH, rezultirao je najučinkovitijim uklanjanjem fosfolipida (Slika 72). Međutim, ovaj pristup bio je praćen značajnim gubitkom ALP-a, koji je iznosio 31,4 %, što ukazuje da povećani udio organskog otapala narušava stabilnost interakcija između analita i sorbensa. Takav gubitak analita smatra se neprihvatljivim u kontekstu kvantitativne bioanalize. Nasuprot tome, ispiranje ultračistom vodom rezultiralo je zanemarivim gubitkom ALP-a od svega 1,5 %, dok je istodobno uklonjeno približno 50 % praćenog fosfolipidnog signala. Ovi rezultati ukazuju na to da je voda dovoljno učinkovita za uklanjanje slabije vezanih fosfolipidnih komponenti, dok istovremeno ne narušava više specifične interakcije odgovorne za zadržavanje ALP-a na sorbentu. Na temelju dobivenih rezultata, ultračista voda odabrana je kao optimalno otapalo za ispiranje u DSPME postupku, jer osigurava povoljnu ravnotežu između smanjenja matriksnih interferencija i očuvanja analita. Ovakav izbor dodatno potvrđuje kompatibilnost razvijenog sorbensa s vodenim sustavima te njegovu prikladnost za bioanalitičke primjene u kombinaciji s LC–MS/MS detekcijom.



Slika 72. Utjecaj otapala za ispiranje u DSPME postupku na otpuštenu količinu ALP iz sorbensa s vezanim analitom nakon inkubacije s 50 ng ALP tijekom 30 minuta pri 25 °C. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

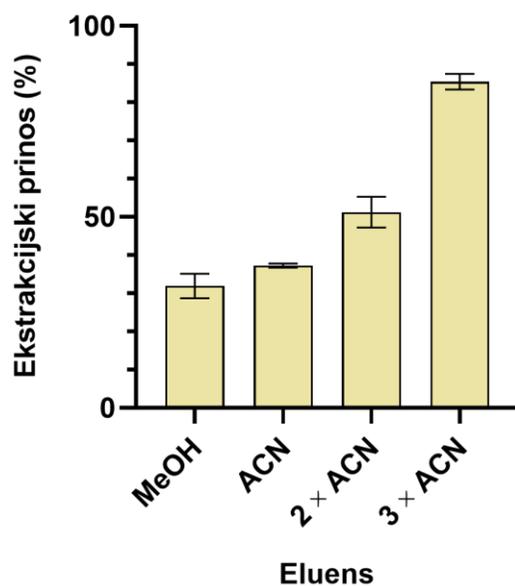
Zatim je istražen utjecaj različitih otapala za eluciju na ukupni ekstrakcijski prinos. U preliminarnim eksperimentima, kao eluensi ispitani su čisti MeOH te uz dodatak 5 % vode, 0,1 % mravlje kiseline ili 1 % mravlje kiseline (engl. *formic acid*, FA). Međutim, dobiveni su mali ekstrakcijski prinosi (Slika 73).



Slika 73. Utjecaj eluensa u DSPME postupku na ekstrakcijski prinos ALP nakon inkubacije s 50 ng ALP tijekom 30 minuta pri 25 °C. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

To se može pripisati sposobnosti MeOH da stabilizira vodikove veze i protonaciju ALP-a, što pojačava ion-ionske i ion-dipolne interakcije. Nakon toga, provedena je elucija jednokratko s MeOH ili ACN-om jednom, dvaput ili triput. Rezultati su pokazali da tri uzastopna eluiranja s 1 mL ACN-a daju veliki ekstrakcijski prinos (Slika 74). To je zato što ACN, kao polarno

aprotično otapalo, učinkovito narušava vodikove veze i ion-ionske interakcije ALP-a i metakrilnih ostataka.



Slika 74. Utjecaj eluensa u DSPME postupku na ekstrakcijski prinos ALP nakon inkubacije s 50 ng ALP tijekom 30 minuta pri 25 °C. ($N = 3$, trake pogrešaka predstavljaju standardnu devijaciju oko aritmetičke sredine).

Konačno, ukupni ekstrakcijski prinos ALP-a u optimiziranom DSPME postupku procijenjen je pri niskoj (200 ng/mL), srednjoj (500 ng/mL) i visokoj (1125 ng/mL) koncentracijskoj razini. Srednji ekstrakcijski prinos za ove razine koncentracije bilo je 81,6 %, 81,7 % i 87,7 % s odgovarajućim RSD vrijednostima od 3,6 %, 1,4 % i 3,8 %.

Nakon optimizacije DSPME postupka, budući da manje varijacije u uvjetima reakcije mogu utjecati na svojstva polimernih sorbenasa, procijenjena je ponovljivost sinteze sorbensa između šarži. Tri neovisno pripremljene sintetske šarže primijenjene su u optimiziranom DSPME postupku pri koncentraciji ALP-a od 500 ng/mL. Svaka šarža analizirana je u triplikatu te je dobivena vrijednost RSD-a između šarži od 3,5%. Ova mala varijabilnost ukazuje na to da je postupak sinteze vrlo ponovljiv i da su razlike između pojedinačnih šarži zanemarive. Također, obično se ispituje mogućnost recikliranja, odnosno ponovne upotrebe sorbensa

kako bi se smanjio ekonomski i ekološki utjecaj analitičkih metoda. Međutim, u ovom slučaju, trošak povezan s proizvodnjom šarže sorbensa dovoljne za 25 ekstrakcija iznosio je približno 6 eurocenti, što je znatno niže od troškova i potrošnje otapala potrebnih za opsežne postupke regeneracije i čišćenja sorbensa. Posljedično, ponovna upotreba sorbensa ne bi ponudila ekonomsku ili ekološku prednost. Stoga se ovaj sorbens na bazi polimetakrilata preporučuje za jednokratnu upotrebu.

4.5.5. Validacija metode

4.5.5.1. Učinak matrice

Učinak matrice (ME) odnosi se na promjenu intenziteta analitičkih signala, a koja proizlazi iz koeluiranja sastojaka matrice uzorka, te su posebno česti u analizi složenih bioloških matrica poput plazme. Stoga je sustavna evaluacija ME ključna kako bi se pokazala njegova konzistentnost i ponovljivost u različitim matricama. Ovaj zahtjev postaje posebno kritičan pri korištenju novih ili nedovoljno karakteriziranih sorbensa. U ovom ispitivanju, ME je procijenjen analizom uzoraka plazme dobivenih iz šest neovisnih izvora, koji uključuju i hemolizirane kao i vrlo lipemične plazme, sukladno ICH smjernicama (138,142). Za svaki izvor plazme, uzorci su pripremljeni u triplikatu i obogaćeni niskim i visokim koncentracijskim razinama analita nakon obrade uzorka. Zatim su tako dobivene koncentracije uspoređene sa standardnim otopinama pripremljenim u ekvivalentnim koncentracijama. ME je kvantificiran kao srednja vrijednost odstupanja od nominalne koncentracije, uz odgovarajuće RSD vrijednostima, izračunata pomoću jednadžbe (37). Rezultati su pokazali da prosječna supresija signala iznosi 47,5 %. Unatoč tome, supresija je bila reproducibilna između šest različitih matrica s izuzetno malom RSD vrijednošću od 4,7 %. Stoga, ME ne predstavlja analitički izazov za predloženi sorbens.

4.5.5.2. Linearnost metode

Linearnost metode ispitana je u kalibracijskom rasponu od 50-2000 ng/mL, koji je odabran na temelju koncentracija analita koje se obično opažaju u kliničkim istraživanjima. Kalibracijske krivulje konstruirane su korištenjem QC uzoraka obogaćenih na devet koncentracijskih razina linearnom regresijom koristeći težinski faktor $1/x^2$. U skladu sa ICH

smjernicama, točnost povratno izračunatih koncentracija ostala je unutar $\pm 15\%$ nominalnih vrijednosti ($\pm 20\%$ pri LLOQ) za najmanje 75% ispitanih kalibracijskih standarda, odnosno najmanje šest kalibracijskih točaka. Dobiveni koeficijenti korelacije kretali su se od 0,9969 do 0,9986 s RSD vrijednošću nagiba triju pravaca od 1,7 %, što pokazuje veliku linearnost u odabranom rasponu. Ipak, s obzirom na odsutnost IS-a, za sve analize korištene su svježe pripremljene kalibracijske krivulje.

4.5.5.3. Točnost i preciznost

Točnost i preciznost analitičke metode sustavno su procijenjene analizom QC uzoraka pripremljenih u triplikatu pri niskoj (200 ng/mL), srednjoj (500 ng/mL) i visokoj (1125 ng/mL) koncentracijskoj razini. Točnost metode kvantificirana je srednjim odstupanjem od nominalnih koncentracija, dok je preciznost izražena RSD vrijednostima dobivenim iz ponovljenih mjerenja. Na svim koncentracijskim razinama odstupanja su se nalazila unutar unaprijed definiranog kriterija prihvatljivosti od $\pm 15\%$, a vrijednosti RSD nisu prelazile 15 % (Tablica 31).

Tablica 31. Točnost i preciznost ispitane unutar dana ($N = 3$) i između različitih dana ($N = 6$)

Analit	γ (ng/mL)	Unutar dana ($n = 3$)		Između dana ($n = 6$)	
		Odstupanje (%)	RSD (%)	Odstupanje (%)	RSD (%)
ALP	200	-0,5	3,2	-3,4	4,9
	500	-1,0	2,6	1,1	3,3
	1125	-3,0	1,7	-3,5	3,0

4.5.6. Primjena metode

Predložena DSPME-UHPLC-MS/MS metoda primijenjena je za analizu uzoraka plazme dviju pacijentica (u dobi od 42 i 62 godine) koje su primale kombiniranu terapiju ALP-om i FUL-om. Pronađene koncentracije ALP-a kod pacijentice 1 i pacijentice 2 bile su 1006,8 odnosno 703,6 ng/mL. To je u skladu s očekivanim koncentracijama na temelju kliničkih studija. Time

je dokazano da je razvijeni polimetakrilatni sorbens uspješan u ekstrakciji ALP-a iz stvarnih uzoraka.

4.6. Ekološka i ekonomska evaluacija razvijenih analitičkih metoda i metoda pripreme uzoraka

Ovo doktorsko istraživanje uključuje razvoj dvije CE-DAD metode, jednu HPLC-DAD metodu, dvije MEKC-MS/MS metode i jednu UHPLC-MS/MS metodu. U svrhu analiza tim metodama, razvijene su različite metode pripreme uzoraka. Za analizu gotovih ljekovitih oblika priprema uzorka uključuje jednostavnu ekstrakciju organskim otapalom. S druge strane, za pripremu složenijih uzoraka kao što je ljudska plazma, razvijene su PPT-AqS-DLLME, PPT-SE-LLME i PPT-DSPME metode pripreme uzorka.

U svrhu procjene ekološke, ekonomske i analitičke pristupačnosti tih metoda, sve su navedene metode obrađene AGREEprep, AGREE i BAGI alatima (89,90,92,154). Na taj se način mogu istaknuti prednosti i nedostaci pojedinačnih analitičkih metoda ili metoda pripreme uzoraka te se olakšava odabir tih metoda ovisno o zahtjevima analitičkog problema.

4.6.1. Ekološka evaluacija razvijenih metoda pripreme uzoraka alatom AGREEprep

Sve metode pripreme uzoraka razvijene u ovom radu pogodne su za *on site* analizu, odnosno za provedbu analize u istoj ustanovi u kojoj je uzorak prikupljen.

Što se tiče toksičnih i opasnih otapala i reagensa, prilikom evaluacije u obzir je uzeto korištenje metanola za jednostavnu ekstrakciju, inkubaciju sa sorbensom kod DSPME metode te otapanje uzoraka, acetonitrila za taloženje proteina i eluciju sa sorbena kod DSPME metode, kloroforma i propan-2-ola kod AqS-DLLME metode te PFOA-e kod SE-LLME metode.

Niti jedna razvijena metoda pripreme uzoraka ne zasniva se na upotrebi održivih ili obnovljivih materijala i reagensa. Ipak, moguća je višekratna upotreba staklenog laboratorijskog posuđa kao i nastavaka za pipetiranje čistih otapala. Prilikom izračuna ukupne količine otpada u obzir je uzeta i masa nastavaka za pipete, plastičnih epruveta i PTFE filtera.

Prilikom izračuna obrata uzorka, uzeto je u obzir stvarno vrijeme koje je analitičaru potrebno za pripremu uzorka. Na taj se način s jedne strane uzima u obzir vrijeme rukovanja uzorcima, ali se s druge strane u obzir uzima činjenica da tijekom soniciranja, centrifugiranja, uparavanja ili inkubiranja analitičar može provoditi i druge postupke. S obzirom na navedeno, trajanje jednostavne ekstrakcije je oko 35 minuta, PPT-AqS-DLLME oko 2 sata, PPT-AqS-SE-LLME oko 2 sata te PPT-DSPME oko 2 sata i 45 minuta. Prilikom izračuna obrata uzorka za PPT-DSPME u obzir nije uzeto vrijeme potrebno za sintezu sorbensa, budući da se sorbens može pripremiti jednom za vrlo velik broj ekstrakcija te je time taj korak ekvivalentan nabavci kemikalija i materijala za ostale metode pripreme uzoraka. Treba naglasiti da iako je istovremeno moguće pripremiti samo 12 uzoraka zbog ograničenog broja mjesta na centrifugi, ukupni kapacitet uparivača je 48 uzoraka. Budući da korak centrifugiranja kod PPT i minijaturiziranih ekstrakcija traje samo 5 minuta, uz ukupno produljenje od 10 minuta može se analizirati dodatnih 12 uzoraka, odnosno uz pola sata pripreme više, moguće je analizirati 48 uzoraka.

Sve razvijene metode pripreme uzorka zahtijevaju manualnu obradu. Jednostavna ekstrakcija zahtijeva samo soniciranje, dok metode pripreme uzorka plazme zahtijevaju više koraka. Pritom se ističe taloženje proteina i uparavanje supernatanta u svim metodama, ekstrakcija dodatkom dispergera, odnosno surfaktanta uz miješanje vrhom pipete i vorteksiranje kao i ponovno uparavanje organskog sloja (PPT-AqS-DLLME i PPT-SE-LLME), inkubacija sorbensa, ispiranje i elucija (PPT-DSPME) i otapanje, odnosno razrjeđenje uzorka na analizu za sve metode.

Prilikom izračuna ukupne potrošnje energije za pojedinu metodu pripreme uzorka, u obzir je uzeta energetska potrošnja vakuumskog uparivača i inkubatora s obzirom na vrijeme rada i broj obrađivanih uzoraka. Ostala korištena sitna laboratorijska oprema predstavlja zanemariv utrošak energije.

Konačno, pregledom sigurnosno-tehničkih listova reagensa i otapala, identificirani su sljedeći rizici: opasnost za zdravlje (metanol i kloroform), velika zapaljivost (acetonitril, metanol i propan-2-ol), toksičnost (metanol i kloroform), općenita štetnost (acetonitril,

metanol i propan-2-ol), korozivnost (PFOA), toksičnost za vodeni okoliš (PFOA), perzistentnost (PFOA) i bioakumulacija (PFOA).

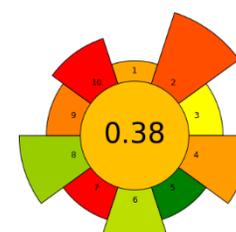
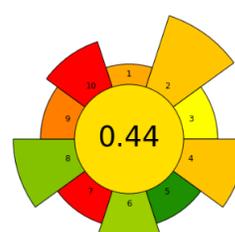
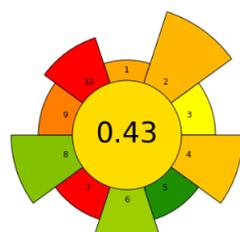
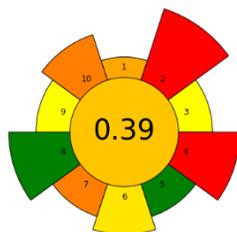
Ekološka evaluacija metoda pripreme uzoraka alatom AGREEprep prikazana je u Tablici 32.

Rezultati AGREEprep iznose 0,39 za jednostavnu ekstrakciju, 0,43 za PPT-AqS-DLLME, 0,44 za PPT-SE-LLME i 0,38 za PPT-DSPME. Glavni nedostatak jednostavne ekstrakcije je veliki volumen metanola koji se koristi za samu ekstrakciju te posljedično veća količina otpada. S druge strane, ključni nedostaci PPT-AqS-DLLME i PPT-SE-LLME priprema uzoraka je velik broj manualnih koraka u kojem se radi sa štetnim i opasnim tvarima. Ipak, u odnosu na jednostavnu ekstrakciju, zbog svoje minijaturizacije, ove metode generiraju manje otpada te su se stoga pokazale zelenijima. Konačno, PPT-DSPME metoda pokazala se najmanje zelenom ponajviše zbog nešto duljeg trajanja pripreme i elucije acetonitrilom. Ipak, unatoč tome, na ovaj se način izbjegava rad s kloroformom ili PFOA-om što treba uzeti u obzir kada se govori o sigurnosti samog analitičara.

Tablica 32. Ekološka evaluacija razvijenih metoda pripreme uzoraka alatom AGREEprep

Kriterij	Jednostavna ekstrakcija	PPT-AqS-DLLME	PPT-SE-LLME	PPT-DSPME
1 Lokacija pripreme uzorka	U istoj ustanovi	U istoj ustanovi	U istoj ustanovi	U istoj ustanovi
2 Volumen štetnih reagensa , mL	50	0,83	0,67	3,45
3 Upotreba obnovljivih reagensa	Ne, ali se neki koriste višekratno			
4 Količina otpada, g	51,5	4,6	4,5	7,3
5 Volumen uzorka, mL	0,02	0,15	0,15	0,1
6 Obrat uzorka, h ⁻¹	6,9	19,2	19,2	14,8
7 Broj koraka	2 ili manje	6+	6+	6+
8 Stupanj automatizacije	Manualno	Manualno	Manualno	Manualno
9 Utrošak energije, Wh/uzorak	10,0	27,3	27,3	32,0
10 Analitička tehnika	CE	CE-MS	CE-MS	LC-MS
10 Broj piktograma	3	4+	4+	4+

Rezultati



4.6.2. Ekonomska evaluacija razvijenih metoda pripreme uzoraka alatom BAGI

Sve razvijene metode pripreme uzoraka omogućuju kvantitativnu i potvrdnu analizu analita za koje su namijenjene.

Što se tiče složenosti analitičke tehnike, iako su postupci pripreme razvijeni za CE-DAD, HPLC-DAD, MEKC-MS/MS ili UHPLC-MS/MS tehniku, mogu se koristiti i za analizu različitim drugih tehnikama, imajući na umu instrumentalnu kompatibilnost te osjetljivost instrumenta. S obzirom na to, složenost analitičke tehnike manje je relevantan kriterij u procjeni zelenosti same metode pripreme uzorka pa je stoga za sve metode odabran isti odgovor.

Broj uzoraka koji se mogu istodobno obrađivati definiran je prema ograničavajućem koraku pojedine metode pripreme. Tako je za jednostavnu ekstrakciju organskim otapalom moguće istovremeno pripremiti 4 uzorka jer je to broj odmjernih tikvica koje stanu u ultrazvučnu kupelj. Kod PPT-AqS-DLLME, PPT-SE-LLME i PPT-DSPME metoda, usporedno se može pripremiti do 12 uzoraka, sukladno broju mjesta na Eppendorf MiniSpin centrifugi.

Prilikom izračuna obrata uzorka, uzeto je u obzir stvarno vrijeme koje je analitičaru potrebno za pripremu uzorka. Na taj se način s jedne strane uzima u obzir vrijeme rukovanja uzorcima, ali se s druge strane u obzir uzima činjenica da tijekom soniciranja, centrifugiranja, uparavanja ili inkubiranja analitičar može provoditi i druge postupke. S obzirom na navedeno, trajanje jednostavne ekstrakcije je oko 35 minuta, PPT-AqS-DLLME oko 2 sata, PPT-AqS-SE-LLME oko 2 sata te PPT-DSPME oko 2 sata i 45 minuta. Prilikom izračuna obrata uzorka za PPT-DSPME u obzir nije uzeto vrijeme potrebno za sintezu sorbensa, budući da se sorbens može pripremiti jednom za vrlo velik broj ekstrakcija te je time taj korak ekvivalentan nabavci kemikalija i materijala za ostale metode pripreme uzoraka.

Sve metode pripreme uzorka zahtijevaju jeftine i široko dostupne materijale i instrumente koji su ili već dostupni u većini laboratorija ili se lako nabavljaju.

Što se tiče kriterija ukoncentriravanja, jednostavna ekstrakcija ne zahtijeva korak uparavanja, dok preostale metode zahtijevaju barem jedan korak ukoncentriravanja.

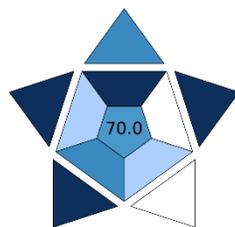
Ekonomska evaluacija metoda pripreme uzoraka alatom BAGI prikazana je u Tablici 33.

Rezultati BAGI iznose 70 za jednostavnu ekstrakciju, 67,5 za PPT-AqS-DLLME, 65 za PPT-SE-LLME i 65 za PPT-DSPME. Time su se sve metode pripreme pokazale ekonomski učinkovitima ($BAGI \geq 60$). Glavni nedostatak svih metoda je neautomatizirana priprema uzoraka te osrednji broj istovremeno pripremanih uzoraka. Nedostatak jednostavne ekstrakcije je neminijaturizirana priprema uzoraka, dok je nedostatak PPT-SE-LLME i PPT-DSPME manji broj analita koji se naknadno određuju. Ipak, taj se nedostatak može jednostavno riješiti budući da su se te metode pripreme uzoraka pokazale robusnima. Prednosti metoda su dostupnost opreme i reagensa, mali volumen uzorka i velik obrat uzoraka.

Tablica 33. Ekonomska evaluacija razvijenih metoda pripreme uzoraka alatom BAGI

	Kriterij	Jednostavna ekstrakcija	PPT-AqS-DLLME	PPT-SE-LLME	PPT-DSPME
1	Vrsta analize	Kvantitativna i potvrdna	Kvantitativna i potvrdna	Kvantitativna i potvrdna	Kvantitativna i potvrdna
2	Broj analita	3	6	2	1
3	Analitička tehnika	Jednostavna	Jednostavna	Jednostavna	Jednostavna
4	Broj istovremeno pripremanih uzoraka	2-12	2-12	2-12	2-12
5	Složenost pripreme uzorka	Jednostavno	Minijaturizirano	Minijaturizirano	Minijaturizirano
6	Obrat uzoraka, h ⁻¹	6,9	19,2	19,2	14,8
7	Dostupnost opreme i reagensa	Uobičajeni	Uobičajeni	Uobičajeni	Uobičajeni
8	Ukoncentriravanje	Nije potrebno	2 koraka	2 koraka	1 korak
9	Stupanj automatizacije	Manualno	Manualno	Manualno	Manualno
10	Količina uzorka, mL	0,02	0,15	0,15	0,10

Rezultati



4.6.3. Ekološka evaluacija razvijenih analitičkih metoda alatom AGREE

Kao i kod AGREEprep alata, sve analitičke metode razvijene u ovom radu pogodne su za *at site* analizu, odnosno za provedbu analize u istoj ustanovi u kojoj je uzorak prikupljen.

Kao volumen uzorka uziman je volumen injektiranja.

Broj pojediničanih koraka prilikom pripreme uzorka predmet je evaluacije AGREEprep alatom te je manje relevantan za AGREE alat. Naime, svaka je razvijena analitička metoda u ovom radu pogodna za analizu uzoraka pripremljenih na različite načine. Stoga je u samom alatu broj predanalitičkih koraka za svaku metodu postavljen na manje od tri.

Sve su analize razvijenim analitičkim metodama automatizirane te se pristupom računalu na daljinu čak mogu izvoditi i izvan samog laboratorija.

Što se tiče volumena otpada, u obzir je uzeta ukupna količina mobilne faze, elektroforetskog pufera i obložne tekućine koja se potroši tijekom analize. Prilikom izračuna obrata uzoraka, u obzir je uzeto trajanje pojedinačne analize, odnosno 4 i 3 minute za CE-DAD, 16 minuta za HPLC-DAD, 17 i 12 minuta za MEKC-MS/MS i 5 minuta za UHPLC-MS/MS metodu.

U AGREE upitniku su korištene dvije razine značajnosti pojedinih kriterija. Veća važnost pridana je svim parametrima koji se odnose na količinu uzorka, štetnih otapala i generiranog otpada, kao i potrošnju energije.

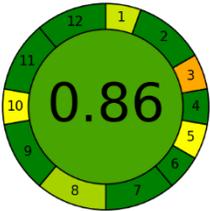
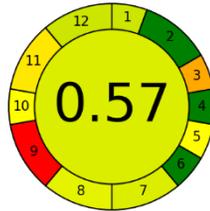
Analogno evaluaciji AGREEprep alatom, pregledom sigurnosno-tehničkih listova reagensa i otapala, identificirani su sljedeći rizici: opasnost za zdravlje (metanol), velika zapaljivost (acetonitril i metanol), toksičnost (metanol), općenita štetnost (acetonitril i metanol), korozivnost (PFOA i mravlja kiselina), toksičnost za vodeni okoliš (PFOA), perzistentnost (PFOA) i bioakumulacija (PFOA).

Ekološka evaluacija razvijenih CE-DAD, HPLC-DAD, MEKC-MS/MS i UHPLC-MS/MS metoda alatom AGREE prikazana je u Tablici 34. Prilikom evaluacije, težinski faktor 2 pripisan je kriterijima 2, 7, 8, 9, 11 i 12, dok je ostalim kriterijima pripisan težinski faktor 1

Rezultati AGREE iznose 0,86 za CE-DAD, 0,59 za HPLC-DAD, 0,64 za obje MEKC-MS/MS i 0,57 za UHPLC-MS/MS metode. Time su se sve metode pripreme pokazale ekološki prihvatljivima (AGREE \geq 0,50).

Glavni nedostaci svih metoda su lokacija uzorkovanja i lokacije instrumenta te samo djelomična upotreba obnovljivih reagensa. Kao najzelenija metoda pokazala se CE-DAD metoda zbog iznimno malih volumena uzorka, količine generiranog otpada, utroška energije te odsustva štetnih otapala. Nedostatci HPLC-DAD metode su ponajviše relativno veliki volumeni otpada i štetnih reagensa. Nedostatci MEKC-MS/MS i UHPLC-MS/MS metoda su dodatno i veći broj opasnih tvari s kojima se rukuje te veća energetska zahtjevnost zbog MS instrumenta. Ipak, unatoč manjem obratu uzoraka, MEKC-MS/MS metode pokazale su se zelenijima od UHPLC-MS/MS metode, ponajviše zbog zanemarive količine otpada i štetnih reagensa.

Tablica 34. Ekološka evaluacija razvijenih analitičkih metoda alatom AGREE

Kriterij	CE-DAD	HPLC-DAD	MEKC-MS/MS	MEKC-MS/MS	UHPLC-MS/MS
1 Lokacija uzorkovanja	U istoj ustanovi	U istoj ustanovi	U istoj ustanovi	U istoj ustanovi	U istoj ustanovi
2 Volumen uzorka, mL	0,050	0,020	0,025	0,015	0,010
3 Lokacija instrumenta	U istoj ustanovi	U istoj ustanovi	U istoj ustanovi	U istoj ustanovi	U istoj ustanovi
4 Broj koraka pripreme uzorka	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3
5 Stupanj automatizacije Minijaturizacija	Automatizirano Nije minijaturizirano	Automatizirano Nije minijaturizirano	Automatizirano Minijaturizirano	Automatizirano Minijaturizirano	Automatizirano Minijaturizirano
6 Derivatizacija	-	-	-	-	-
7 Volumen otpada, mL	0,012	16,0	0,172	0,050	2,5
8 Broj analita	3	1	6	2	1
9 Obrat uzoraka, h ⁻¹	6,7	3,8	3,5	5,0	12,0
10 Energetska zahtjevnost	15 Wh	LC	CE-MS	CE-MS	LC-MS
11 Upotreba obnovljivih reagensa	Djelomično	Djelomično	Djelomično	Djelomično	Djelomično
12 Volumen štetnih reagensa, mL	-	9,53	0,120	0,024	1,41
13 Broj opasnosti	-	1	4	4	2
Rezultati					

4.6.4. Ekonomska evaluacija razvijenih analitičkih metoda alatom BAGI

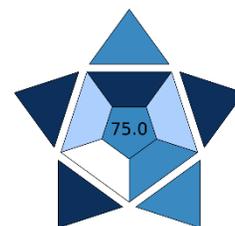
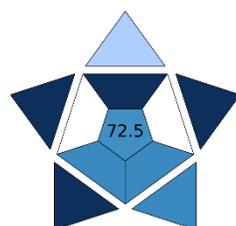
Za procjenu ekonomske učinkovitosti samih analitičkih metoda, korišten je BAGI alat analogno evaluaciji metoda priprema uzoraka te su rezultati prikazani u Tablici 35.

Rezultati BAGI iznose 77,5 za CE-DAD, 72,5 za HPLC-DAD te 75 za MEKC-MS/MS i UHPLC-MS/MS metode. Time su se sve metode pripreme pokazale ekonomski učinkovitima (BAGI ≥ 60). Ekonomski najprihvatljivija je CE-DAD metoda zbog svoje jednostavne izvedbe uz velik obrat uzoraka. Glavni nedostatak CE-DAD i HPLC-DAD metoda je neminijaturizirana priprema uzorka, dok je glavni nedostatak MEKC-MS/MS i UHPLC-MS/MS metoda zahtjev za sofisticiranom opremom koja nije široko dostupna u svim laboratorijima.

Tablica 35. Ekonomska evaluacija razvijenih analitičkih metoda alatom BAGI

Kriterij	CE-DAD	HPLC-DAD	MEKC-MS/MS	MEKC-MS/MS	UHPLC-MS/MS
1 Vrsta analize	Kvantitativna i potvrdna				
2 Broj analita	3	1	6	2	1
3 Analitička tehnika	Jednostavna	Jednostavna	Sofisticirana	Sofisticirana	Sofisticirana
4 Broj istovremeno pripremanih uzoraka	13-95	13-95	13-95	13-95	13-95
5 Složenost pripreme uzorka	Ekstrakcija	Ekstrakcija	Minijaturizirano	Minijaturizirano	Minijaturizirano
6 Obrat uzorka, h ⁻¹	6,7	3,8	3,5	5,0	12,0
7 Dostupnost opreme i reagensa	Uobičajeni	Uobičajeni	Uobičajeni	Uobičajeni	Uobičajeni
8 Ukoncentriravanje	Izravna analiza				
9 Stupanj automatizacije	Autosampler	Autosampler	Autosampler	Autosampler	Autosampler
10 Količina uzorka, mL	0,050	0,020	0,025	0,015	0,010

Rezultati



5. ZAKLJUČCI

Ova doktorska disertacija predstavlja sveobuhvatan, sustavan i inovativan analitički okvir za određivanje odabranih lijekova koji se koriste u liječenju HR+/HER2- raka dojke, uspješno integrirajući analitiku lijekova i bioanalitiku s principima zelene i održive analitičke kemije.

Glavni zaključci i znanstveni doprinosi ovog rada mogu se sažeti na sljedeći način:

- Razvijeni su i optimirani minijaturizirani, učinkoviti i ekološki prihvatljivi postupci pripreme uzorka ljudske plazme, uključujući PPT-DLLME, PPT-SE-LLME i PPT-DSPME. Ovi postupci pokazali su veliku učinkovitost ekstrakcije, robusnost i primjenjivost na složene biološke uzorke, uz istodobno smanjenu potrošnju uzorka, otapala i generiranje otpada.
- Dizajniran je, sintetiziran, karakteriziran i optimiziran novi hibridni polimetakrilatni sorbens za DSPME, što predstavlja izvorni znanstveni doprinos u području mikroekstrakcijskih tehnika. Sorbens je pokazao dobru reproducibilnost sinteze, povoljna adsorpcijska svojstva, velike prinose ekstrakcije te učinkovito uklanjanje fosfolipidnih interferencija, što je čest problem u bioanalizi plazme.
- Razvijeno je i validirano ukupno 6 novih analitičkih metoda – dvije CE-DAD, HPLC-DAD, dvije MEKC-MS/MS i UHPLC-MS/MS metode, koje su u potpunosti usklađene sa ICH Q2(R2) i ICH M10 smjernicama. Sve metode pokazale su veliku selektivnost, točnost, preciznost, linearnost i robusnost, čime je potvrđena njihova prikladnost za rutinsku primjenu.
- Značajno su unaprijeđene metode temeljene na kapilarnoj elektroforezi, osobito MEKC-MS/MS, čime su prevladana postojeća ograničenja vezana uz osjetljivost i kompatibilnost sa spektrometrijom masa. Primjena perfluoriranih surfaktanata i *sweeping* prekoncentracije omogućila je visoku osjetljivost uz injektiranje nanolitarskih volumena uzoraka, čime je potvrđen potencijal kapilarne elektroforeze kao ravnopravne alternative tekućinskoj kromatografiji.
- Uspješna primjena razvijenih metoda na stvarne farmaceutske oblike i uzorke plazme pacijentica potvrdila je njihovu praktičnu vrijednost. Dobivene koncentracije lijekova

bile su u skladu s očekivanim i literaturnim podacima, što jasno ukazuje na potencijal metoda kao temelja za uvođenje terapijskog praćenja lijeka u kliničku praksu.

- Ekološka i ekonomska procjena provedena alatima AGREE, AGREEprep i BAGI pokazala je da su svi razvijeni analitički postupci održivi i troškovno prihvatljivi. Posebno se kapilarna elektroforeza istaknula kao izrazito ekološki prihvatljiva tehnika u usporedbi s konvencionalnim kromatografskim metodama, bez kompromisa u analitičkoj učinkovitosti.

Ukupno gledano, ova doktorska disertacija donosi originalne znanstvene doprinose na metodološkoj i konceptualnoj razini, pružajući pouzdana, učinkovita i održiva analitička rješenja za analizu suvremenih antitumorskih lijekova. Posebna vrijednost rada ogleda se u uspješnoj primjeni i daljnjem razvoju MEKC-MS/MS tehnike, koja je u području bioanalitike lijekova još uvijek rijetko zastupljena u usporedbi s dominantnim kromatografskim pristupima. Time je jasno demonstriran njezin dosad nedovoljno iskorišten potencijal za osjetljivo i selektivno određivanje lijekova u složenim biološkim matricama. Razvijeni analitički postupci ne samo da ispunjavaju aktualne regulatorne zahtjeve, već otvaraju prostor za širu primjenu kapilarne elektroforeze u kombinaciji sa spektrometrijom masa u rutinskoj analitičkoj i kliničkoj praksi. Integracijom inovativnih postupaka pripreme uzorka, naprednih separacijskih tehnika i održivih analitičkih principa, ovaj rad predstavlja osnovu za daljnja istraživanja i buduću implementaciju terapijskog praćenja lijekova. Zaključno, rezultati ove disertacije potvrđuju da MEKC-MS/MS, iako još uvijek rijetko primjenjivana, može predstavljati konkurentnu, a u određenim aspektima i nadmoćnu alternativu tekućinskoj kromatografiji, osobito u kontekstu minijaturizacije, smanjene potrošnje resursa i povećane održivosti. Time se ovom disertacijom ne pridonosi samo rješavanju konkretnih analitičkih izazova u liječenju HR+/HER2- raka dojke, već se istodobno proširuju metodološki horizonti suvremene bioanalitičke kemije.

6. POPIS LITERATURE

1. Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H. Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*. 2022;14(10):2569. doi:10.3390/cancers14102569
2. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020;77(2):181–5. doi:10.1111/his.14091
3. Burstein HJ. Systemic Therapy for Estrogen Receptor–Positive, HER2-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(26):2557–70. doi:10.1056/NEJMra1307118
4. Gennari A, André F, Barrios CH, Cortés J, de Azambuja E, DeMichele A, et al. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2021;32(12):1475–95. doi:10.1016/j.annonc.2021.09.019
5. Shah AN, Metzger O, Bartlett CH, Liu Y, Huang X, Cristofanilli M. Hormone Receptor–Positive/Human Epidermal Growth Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer in Young Women: Emerging Data in the Era of Molecularly Targeted Agents. *Oncologist*. 2020;25(6):e900–8. doi:10.1634/theoncologist.2019-0729.
6. Akshata Desai KA. Triple Negative Breast Cancer – An Overview. *Hereditary Genetics*. 2013;001. doi:10.4172/2161-1041.S2-001
7. Karim AM, Eun Kwon J, Ali T, Jang J, Ullah I, Lee YG, et al. Triple-negative breast cancer: epidemiology, molecular mechanisms, and modern vaccine-based treatment strategies. *Biochem Pharmacol*. 2023;212:115545. doi:10.1016/j.bcp.2023.115545
8. Darida M, Rubovszky G, Kiss Z, Székely B, Madaras B, Horváth Z, et al. Improvement in breast cancer survival across molecular subtypes in Hungary between 2011 and 2020: a nationwide, retrospective study. *Front Oncol*. 2025;15. doi:10.3389/fonc.2025.1465511
9. Trapani D, Martins-Branco D, Curigliano G, Gennari A, Pentheroudakis G, Harbeck N. Updated treatment recommendations for systemic treatment: from the ESMO Metastatic Breast Cancer Living Guideline. *Annals of Oncology*. 2025;36(11):1414–8. doi:10.1016/j.annonc.2025.07.017
10. Chowaniec H, Ślubowska A, Mroczek M, Borowczyk M, Braszka M, Dworacki G, et al. New hopes for the breast cancer treatment: perspectives on the oncolytic virus therapy. *Front Immunol*. 2024 Mar 21;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1375433

11. Cejalvo JM, Falato C, Villanueva L, Tolosa P, González X, Pascal M, et al. Oncolytic viruses: A new immunotherapeutic approach for breast cancer treatment? *Cancer Treat Rev.* 2022;106:102392. doi:10.1016/j.ctrv.2022.102392
12. Forčić D, Mršić K, Perić-Balja M, Kurtović T, Ramić S, Silovski T, et al. An Unconventional Case Study of Neoadjuvant Oncolytic Virotherapy for Recurrent Breast Cancer. *Vaccines.* 2024;12(9):958. doi:10.3390/vaccines12090958
13. Lyman GH, Dale DC, Culakova E, Poniewierski MS, Wolff DA, Kuderer NM, et al. The impact of the granulocyte colony-stimulating factor on chemotherapy dose intensity and cancer survival: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Oncology.* 2013;24(10):2475–84. doi:10.1093/annonc/mdt226
14. Gascón P, Awada A, Karihtala P, Lorenzen S, Minichsdorfer C. Optimal use of granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis to improve survival in cancer patients receiving treatment. *Wien Klin Wochenschr.* 2024;136(11–12):362–8. doi:10.1007/s00508-023-02300-6
15. Hanker AB, Sudhan DR, Arteaga CL. Overcoming Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell.* 2020;37(4):496–513. doi:10.1016/j.ccell.2020.03.009
16. Turner NC, Oliveira M, Howell SJ, Dalenc F, Cortes J, Gomez Moreno HL, et al. Capivasertib in Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2023;388(22):2058–70. doi:10.1056/NEJMoa2214131
17. Harbeck N, Beckmann MW, Rody A, Schneeweiss A, Müller V, Fehm T, et al. HER2 Dimerization Inhibitor Pertuzumab - Mode of Action and Clinical Data in Breast Cancer. *Breast Care.* 2013;8(1):49–55. doi:10.1159/000346837
18. LoRusso PM, Weiss D, Guardino E, Girish S, Sliwkowski MX. Trastuzumab Emtansine: A Unique Antibody-Drug Conjugate in Development for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2011;17(20):6437–47. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0762
19. Modi S, Saura C, Yamashita T, Park YH, Kim SB, Tamura K, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(7):610–21. doi:10.1056/NEJMoa1914510
20. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from *BRCA* Mutation Carriers. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(2):123–34. doi:10.1056/NEJMoa0900212

21. Cortes J, Rugo HS, Cescon DW, Im SA, Yusof MM, Gallardo C, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2022;387(3):217–26. doi:10.1056/NEJMoa2202809
22. Latif F, Bint Abdul Jabbar H, Malik H, Sadaf H, Sarfraz A, Sarfraz Z, et al. Atezolizumab and pembrolizumab in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2022;22(2):229–35. doi:10.1080/14737140.2022.2023011
23. Im SA, Lu YS, Bardia A, Harbeck N, Colleoni M, Franke F, et al. Overall Survival with Ribociclib plus Endocrine Therapy in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2019;381(4):307–16. doi:10.1056/nejmoa1903765
24. Finn RS, Martin M, Rugo HS, Jones S, Im SA, Gelmon K, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2016;375(20):1925–36. doi:10.1056/nejmoa1607303
25. Johnston SRD, Harbeck N, Hegg R, Toi M, Martin M, Shao ZM, et al. Abemaciclib Combined With Endocrine Therapy for the Adjuvant Treatment of HR+, HER2–, Node-Positive, High-Risk, Early Breast Cancer (monarchE). *Journal of Clinical Oncology.* 2020;38(34):3987–98. doi:10.1200/JCO.20.02514
26. Zhang P, Zhang Q, Tong Z, Sun T, Li W, Ouyang Q, et al. Dalpiciclib plus letrozole or anastrozole versus placebo plus letrozole or anastrozole as first-line treatment in patients with hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer (DAWNA-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2023;24(6):646–57. doi:10.1016/S1470-2045(23)00172-9
27. Flaherty KT, LoRusso PM, DeMichele A, Abramson VG, Courtney R, Randolph SS, et al. Phase I, Dose-Escalation Trial of the Oral Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor PD 0332991, Administered Using a 21-Day Schedule in Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2012;18(2):568–76. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0509
28. Bandiera C, Locatelli I, Courlet P, Cardoso E, Zaman K, Stravodimou A, et al. Adherence to the CDK 4/6 Inhibitor Palbociclib and Omission of Dose Management Supported by Pharmacometric Modelling as Part of the OpTAT Study. *Cancers.* 2023;15(1):316. doi:10.3390/cancers15010316
29. André F, Ciruelos EM, Juric D, Loibl S, Campone M, Mayer IA, et al. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2–negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Annals of Oncology.* 2021;32(2):208–17. doi:10.1016/j.annonc.2020.11.011

30. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for *PIK3CA* - Mutated, Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2019;380(20):1929–40. doi:10.1056/NEJMoa1813904
31. Shen S, Chen Y, Carpio A, Chang C, Iyengar NM. Incidence, risk factors, and management of alpelisib-associated hyperglycemia in metastatic breast cancer. *Cancer.* 2023;129(24):3854–61. doi:10.1002/CNCR.34928
32. Cheung YMM, Cromwell GE, Tolaney SM, Min L, McDonnell ME. Factors leading to alpelisib discontinuation in patients with hormone receptor positive, human epidermal growth factor receptor-2 negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2022;192(2):303–11. doi:10.1007/S10549-021-06476-1
33. Hopkins BD, Pauli C, Xing D, Wang DG, Li X, Wu D, et al. Suppression of insulin feedback enhances the efficacy of PI3K inhibitors. *Nature.* 2018;560(7719):499–503. doi:10.1038/s41586-018-0343-4
34. Ziegengast JL, Elmes JB, Strassels SA, Patel JN, Moore DC. Alpelisib-Induced Diabetic Ketoacidosis: A Pharmacovigilance Analysis of the FDA Adverse Event Reporting System and Review of the Literature. *Clin Breast Cancer.* 2024;24(4):e204–9. doi:10.1016/J.CLBC.2024.01.004
35. McCormack P, Sapunar F. Pharmacokinetic Profile of the Fulvestrant Loading Dose Regimen in Postmenopausal Women with Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2008;8(4):347–51. doi:10.3816/CBC.2008.n.040
36. Borrie AE, Rose R V., Choi YH, Perera FE, Read N, Sexton T, et al. Letrozole concentration is associated with CYP2A6 variation but not with arthralgia in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2018;172(2):371–9. doi:10.1007/s10549-018-4910-z
37. Puzkiel A, Dalenc F, Tafzi N, Marquet P, Debled M, Jacot W, et al. Identification of non-adherence to adjuvant letrozole using a population pharmacokinetics approach in hormone receptor-positive breast cancer patients. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2024;199:106809. doi:10.1016/j.ejps.2024.106809
38. Desta Z, Kreutz Y, Nguyen AT, Li L, Skaar T, Kamdem LK, et al. Plasma Letrozole Concentrations in Postmenopausal Women With Breast Cancer Are Associated With CYP2A6 Genetic Variants, Body Mass Index, and Age. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90(5):693–700. doi:10.1038/clpt.2011.174
39. ChemAxon. www.chemicalize.com. Pristupljeno: 9. veljače 2026.

40. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017;7(1):42717. doi:10.1038/srep42717
41. Jorgenson JW, Lukacs KDeArman. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal Chem.* 1981;53(8):1298–302. doi:10.1021/ac00231a037
42. Knox JH. Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation. *Chromatographia.* 1988;26(1):329–37. doi:10.1007/BF02268176
43. Liu Jinping, Dolnik Vladislav, Hsieh YZung, Novotny Milos. Experimental evaluation of the separation efficiency in capillary electrophoresis using open tubular and gel-filled columns. *Anal Chem.* 1992;64(13):1328–36. doi:10.1021/ac00037a006
44. Hjertén S. Zone broadening in electrophoresis with special reference to high-performance electrophoresis in capillaries: An interplay between theory and practice. *Electrophoresis.* 1990;11(9):665–90. doi:10.1002/elps.1150110904
45. Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen ThPEM. Concentration distributions in free zone electrophoresis. *J Chromatogr A.* 1979;169:1–10. doi:10.1016/0021-9673(75)85028-X
46. Kuhn R, Hoffstetter-Kuhn S. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice.* 1. izdanje. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1993.
47. Vinther A, Sjøberg H. Mathematical model describing dispersion in free solution capillary electrophoresis under stacking conditions. *J Chromatogr A.* 1991;559(1–2):3–26. doi:10.1016/0021-9673(91)80055-L
48. Khaledi MG, Smith SC, Strasters JK. Micellar electrokinetic capillary chromatography of acidic solutes: migration behavior and optimization strategies. *Anal Chem.* 1991;63(17):1820–30. doi:10.1021/ac00017a029
49. Terabe Shigeru, Otsuka Koji, Ando Teiichi. Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Anal Chem.* 1985;57(4):834–41. doi:10.1021/ac00281a014
50. Burton DE, Sepaniak MJ, Maskarinec MP. Evaluation of the Use of Various Surfactants in Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *J Chromatogr Sci.* 1987;25(11):514–8. doi:10.1093/chromsci/25.11.514
51. Swedberg SA. Use of non-ionic and zwitterionic surfactants to enhance selectivity in high-performance capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 1990;503:449–52. doi:10.1016/S0021-9673(01)81525-9

52. Yu RB, Quirino JP. Bile Salts in Chiral Micellar Electrokinetic Chromatography: 2000–2020. *Molecules*. 2021;26(18):5531. doi:10.3390/molecules26185531
53. Profumo A, Profumo V, Vidali G. Micellar electrokinetic capillary chromatography of three natural vitamin A derivatives. *Electrophoresis*. 1996;17(10):1617–21. doi:10.1002/elps.1150171022
54. Herrero-Martínez JM, Simó-Alfonso EF, Mongay-Fernández C, Ramis-Ramos G. Determination of cationic surfactants by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with deoxycholate micelles in the presence of large organic solvent concentrations. *J Chromatogr A*. 2000;895(1–2):227–35. doi:10.1016/S0021-9673(00)00592-6
55. Rundlett KL, Armstrong DW. Mechanism of Signal Suppression by Anionic Surfactants in Capillary Electrophoresis–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 1996;68(19):3493–7. doi:10.1021/ac960472p
56. Ishihama Y, Katayama H, Asakawa N. Surfactants Usable for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Biochem*. 2000;287(1):45–54. doi:10.1006/abio.2000.4836
57. Petersson P, Jörntén-Karlsson M, Stålebro M. Direct coupling of micellar electrokinetic chromatography to mass spectrometry using a volatile buffer system based on perfluorooctanoic acid and ammonia. *Electrophoresis*. 2003;24(6):999–1007. doi:10.1002/elps.200390144
58. Wang C, Yan P, Xing H, Jin C, Xiao JX. Thermodynamics of Aggregation of Ammonium/Tetraalkylammonium Perfluorooctanoates: Effect of Counterions†. *J Chem Eng Data*. 2010;55(5):1994–9. doi:10.1021/JE900916E
59. Kancharla S, Canales E, Alexandridis P. Perfluorooctanoate in aqueous urea solutions: Micelle formation, structure, and microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22). doi:10.3390/ijms20225761
60. Ta HY, Perquis L, Balayssac S, Déjugnat C, Wodrinski A, Collin F, et al. Separation of unsaturated C18 fatty acids using perfluorinated-micellar electrokinetic chromatography: I. Optimization and separation process. *Electrophoresis*. 2023;44(3–4):431–41. doi:10.1002/elps.202200151
61. Van Biesen G, Bottaro CS. Ammonium perfluorooctanoate as a volatile surfactant for the analysis of *N*-methylcarbamates by MEKC-ESI-MS. *Electrophoresis*. 2006;27(22):4456–68. doi:10.1002/elps.200600076

62. Fischer J, Jandera P. Chromatographic behaviour in reversed-phase high-performance liquid chromatography with micellar and submicellar mobile phases: effects of the organic modifier. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1996;681(1):3–19. doi:10.1016/0378-4347(95)00538-2
63. Khaledi MG. Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective. *J Chromatogr A.* 1997;780(1–2):3–40. doi:10.1016/S0021-9673(97)00610-9
64. Quirino JP, Terabe S. Exceeding 5000-Fold Concentration of Dilute Analytes in Micellar Electrokinetic Chromatography. *Science* (1979). 1998;282(5388):465–8. doi:10.1126/science.282.5388.465
65. Quirino JP, Kim JB, Terabe S. Sweeping: concentration mechanism and applications to high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 2002;965(1–2):357–73. doi:10.1016/S0021-9673(01)01499-6
66. Quirino JP, Terabe S. On-Line Concentration of Neutral Analytes for Micellar Electrokinetic Chromatography. 3. Stacking with Reverse Migrating Micelles. *Anal Chem.* 1998;70(1):149–57. doi:10.1021/ac9706281
67. Simpson SL, Quirino JP, Terabe S. On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 2008;1184(1–2):504–41. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.001
68. Quirino JP, Terabe S. Sweeping of Analyte Zones in Electrokinetic Chromatography. *Anal Chem.* 1999;71(8):1638–44. doi:10.1021/ac9810866
69. Olivares JA, Nguyen NT, Yonker CR, Smith RD. On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis. *Anal Chem.* 1987;59(8):1230–2. doi:10.1021/ac00135a034
70. Smith RD, Olivares JA, Nguyen NT, Udseth HR. Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface. *Anal Chem.* 1988;60(5):436–41. doi:10.1021/ac00156a013
71. Smith RD, Barinaga CJ, Udseth HR. Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry. *Anal Chem.* 1988;60(18):1948–52. doi:10.1021/ac00169a022
72. Moini M. Simplifying CE–MS Operation. 2. Interfacing Low-Flow Separation Techniques to Mass Spectrometry Using a Porous Tip. *Anal Chem.* 2007;79(11):4241–6. doi:10.1021/ac0704560

73. Lee ED, Mück W, Henion JD, Covey TR. Liquid junction coupling for capillary zone electrophoresis/ion spray mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom.* 1989;18(9):844–50. doi:10.1002/bms.1200180932
74. Wachs T, Sheppard RL, Henion J. Design and applications of a self-aligning liquid junction-electrospray interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1996;685(2):335–42. doi:10.1016/S0378-4347(96)00176-4
75. Lee ED, Mück W, Henion JD, Covey TR. On-line capillary zone electrophoresis-ion spray tandem mass spectrometry for the determination of dynorphins. *J Chromatogr A.* 1988;458:313–21. doi:10.1016/S0021-9673(00)90575-2
76. Wojcik R, Dada OO, Sadilek M, Dovichi NJ. Simplified capillary electrophoresis nanospray sheath-flow interface for high efficiency and sensitive peptide analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2010;24(17):2554–60. doi:10.1002/rcm.4672
77. Sun L, Zhu G, Zhao Y, Yan X, Mou S, Dovichi NJ. Ultrasensitive and Fast Bottom-up Analysis of Femtogram Amounts of Complex Proteome Digests. *Angew Chem Int Ed.* 2013;52(51):13661–4. doi:10.1002/anie.201308139
78. Elshamy YS, Strein TG, Holland LA, Li C, DeBastiani A, Valentine SJ, et al. Nanoflow Sheath Voltage-Free Interfacing of Capillary Electrophoresis and Mass Spectrometry for the Detection of Small Molecules. *Anal Chem.* 2022;94(32):11329–36. doi:10.1021/acs.analchem.2c02074
79. Amenson-Lamar EA, Sun L, Zhang Z, Bohn PW, Dovichi NJ. Detection of 1 zmol injection of angiotensin using capillary zone electrophoresis coupled to a Q-Exactive HF mass spectrometer with an electrokinetically pumped sheath-flow electrospray interface. *Talanta.* 2019;204:70–3. doi:10.1016/j.talanta.2019.05.079
80. Mellors JS, Gorbounov V, Ramsey RS, Ramsey JM. Fully Integrated Glass Microfluidic Device for Performing High-Efficiency Capillary Electrophoresis and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2008;80(18):6881–7. doi:10.1021/ac800428w
81. Akashi S, Suzuki K, Arai A, Yamada N, Suzuki E, Hirayama K, et al. Top-down analysis of basic proteins by microchip capillary electrophoresis mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 2006;20(12):1932–8. doi:10.1002/rcm.2541
82. Takada Yasuaki, Sakairi Minoru, Koizumi Hideaki. Atmospheric Pressure Chemical Ionization Interface for Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 1995;67(8):1474–6. doi:10.1021/ac00104a027

83. Schappler J, Guillarme D, Prat J, Veuthey J, Rudaz S. Coupling CE with atmospheric pressure photoionization MS for pharmaceutical basic compounds: Optimization of operating parameters. *Electrophoresis*. 2007 Sep 27;28(17):3078–87. doi:10.1002/elps.200700012
84. Anastas PT. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. *Crit Rev Anal Chem*. 1999;29(3):167–75. doi:10.1080/10408349891199356
85. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013;50:78–84. doi:10.1016/j.trac.2013.04.010
86. Gałuszka A, Migaszewski ZM, Konieczka P, Namieśnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012;37:61–72. doi:10.1016/j.trac.2012.03.013
87. Płotka-Wasyłka J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*. 2018;181:204–9. doi:10.1016/j.talanta.2018.01.013
88. Płotka-Wasyłka J, Wojnowski W. Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. *Green Chemistry*. 2021;23(21):8657–65. doi:10.1039/D1GC02318G
89. Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski M. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Anal Chem*. 2020;92(14):10076–82. doi:10.1021/acs.analchem.0c01887
90. Wojnowski W, Tobiszewski M, Pena-Pereira F, Psillakis E. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2022;149:116553. doi:10.1016/j.trac.2022.116553
91. Nowak PM, Wietecha-Posłuszny R, Pawliszyn J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2021;138:116223. doi:10.1016/j.trac.2021.116223
92. Manousi N, Wojnowski W, Płotka-Wasyłka J, Samanidou V. Blue applicability grade index (BAGI) and software: a new tool for the evaluation of method practicality. *Green Chemistry*. 2023;25(19):7598–604. doi:10.1039/D3GC02347H
93. Chavan BB, Tiwari S, G. S, Nimbalkar RD, Garg P, R. S, et al. In vitro and in vivo metabolic investigation of the Palbociclib by UHPLC-Q-TOF/MS/MS and in silico toxicity studies of its metabolites. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;157:59–74. doi:10.1016/j.jpba.2018.05.008

94. Paul D, Surendran S, Chandrakala P, Satheeshkumar N. An assessment of the impact of green tea extract on palbociclib pharmacokinetics using a validated UHPLC–QTOF–MS method. *Biomedical Chromatography*. 2019;33(4). doi:10.1002/bmc.4469
95. Kala A, Patel YT, Davis A, Stewart CF. Development and validation of LC–MS/MS methods for the measurement of ribociclib, a CDK4/6 inhibitor, in mouse plasma and Ringer’s solution and its application to a cerebral microdialysis study. *Journal of Chromatography B*. 2017;1057:110–7. doi:10.1016/J.JCHROMB.2017.05.002
96. Jolibois J, Schmitt A, Royer B. A simple and fast LC-MS/MS method for the routine measurement of cabozantinib, olaparib, palbociclib, pazopanib, sorafenib, sunitinib and its main active metabolite in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2019;1132:121844. doi:10.1016/j.jchromb.2019.121844
97. Braal CL, Lam MH, Rienks T, van Tilborg CJ, Heuts W, Heijns JB, et al. Quantification of ribociclib in dried blood spots by LC–MS/MS: Method development and clinical validation. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;201:114118. doi:10.1016/J.JPBA.2021.114118
98. Bao X, Wu J, Sanai N, Li J. Determination of total and unbound ribociclib in human plasma and brain tumor tissues using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;166:197–204. doi:10.1016/j.jpba.2019.01.017
99. Martínez-Chávez A, Tibben MM, de Jong KAM, Rosing H, Schinkel AH, Beijnen JH. Simultaneous quantification of abemaciclib and its active metabolites in human and mouse plasma by UHPLC–MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;203:114225. doi:10.1016/j.jpba.2021.114225
100. Margaryan T, Elliott M, Sanai N, Tovmasyan A. Simultaneous determination of LY3214996, abemaciclib, and M2 and M20 metabolites in human plasma, cerebrospinal fluid, and brain tumor by LC-MS/MS. *J Pharm Anal*. 2022;12(4):601–9. doi:10.1016/j.jpha.2022.05.003
101. Habler K, Vogeser M, Teupser D. An UHPLC-MS/MS method for quantification of the CDK4/6 inhibitor abemaciclib in human serum. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab*. 2022;24:15–21. doi:10.1016/J.JMSACL.2022.02.001
102. Seo SW, Kim JM, Han DG, Geum D, Yun H, Yoon IS. A sensitive HPLC-FLD method for the quantification of alpelisib, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in rat plasma: Drug metabolism and pharmacokinetic evaluation in vitro and in vivo. *Journal of Chromatography B*. 2021;1163:122508. doi:10.1016/J.JCHROMB.2020.122508
103. Wang Q, Lan X, Zhao Z, Su X, Zhang Y, Zhou XY, et al. Characterization of Alpelisib in Rat Plasma by a Newly Developed UPLC-MS/MS Method: Application to a Drug-Drug Interaction Study. *Front Pharmacol*. 2021;12:743411. doi:10.3389/FPHAR.2021.743411

104. Lee S, Kim MS, Jeong JW, Chae J woo, Koo TS, Maeng HJ, et al. Bioanalysis of alpelisib using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and application to pharmacokinetic study. *J Anal Sci Technol*. 2022;13(1):1–13. doi:10.1186/S40543-022-00340-7
105. Bouali W, Erk N, Genc AA, AHMED HEH, Soylak M. A new and powerful electrochemical sensing platform based on MWCNTs@Fe₃O₄@CuAl₂O₄ for the determination of the anticancer agent Alpelisib in bulk and biological fluids. *Microchemical Journal*. 2023;195:109478. doi:10.1016/J.MICROC.2023.109478
106. Bouali W, Kurtay G, Ayşe Genç A, Erk N. Comprehensive analysis of Alpelisib detection: Uniting molecular docking, dynamics, and precision electrochemistry at the PEDOT:PSS-carbon paste interface. *Microchemical Journal*. 2024;204:111014. doi:10.1016/J.MICROC.2024.111014
107. Bouali W, Erk N, Sert B, Harputlu E. Evaluating the simultaneous electrochemical determination of antineoplastic drugs using LaNiO₃/g-C₃N₄@RGH nanocomposite material. *Talanta*. 2024;278:126486. doi:10.1016/J.TALANTA.2024.126486
108. Bock MJH, Bara I, LeDonne N, Martz A, Dyroff M. Validated assay for the quantification of anastrozole in human plasma by capillary gas chromatography-⁶³Ni electron capture detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;700(1–2):131–8. doi:10.1016/S0378-4347(97)00129-1
109. Mendes GD, Hamamoto D, Ilha J, Pereira A dos S, De Nucci G. Anastrozole quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to photospray tandem mass spectrometry applied to pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*. 2007;850(1–2):553–9. doi:10.1016/j.jchromb.2006.11.044
110. Mareck U, Geyer H, Guddat S, Haenelt N, Koch A, Kohler M, et al. Identification of the aromatase inhibitors anastrozole and exemestane in human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006;20(12):1954–62. doi:10.1002/rcm.2545
111. Shao R, Yu L, Lou H, Ruan Z, Jiang B, Chen J. Development and validation of a rapid LC-MS/MS method to quantify letrozole in human plasma and its application to therapeutic drug monitoring. *Biomedical Chromatography*. 2016;30(4):632–7. doi:10.1002/bmc.3607
112. Rodríguez J, Castañeda G, Muñoz L. Rapid determination of letrozole, citalopram and their metabolites by high performance liquid chromatography-fluorescence detection in urine: Method validation and application to real samples. *Journal of Chromatography B*. 2013;913–914:12–8. doi:10.1016/j.jchromb.2012.11.015

113. Taheri H, Jin Y, Ahmed E, Hu P, Li Y, Sparreboom A, et al. Quantification of the aromatase inhibitor letrozole and its carbinol metabolite in mouse plasma by UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2024;1238:124106. doi:10.1016/j.jchromb.2024.124106
114. Balaram VM, Parmar D, Teja BB, Rathnam S, Rao JV, Dasandi B. Sensitive and rapid high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for estimation of fulvestrant in rabbit plasma. *Biomedical Chromatography*. 2010;24(8):863–7. doi:10.1002/bmc.1378
115. Robertson JFR, Erikstein B, Osborne KC, Phippen J, Come SE, Parker LM, et al. Pharmacokinetic Profile of Intramuscular Fulvestrant in Advanced Breast Cancer. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(8):529–38. doi:10.2165/00003088-200443080-00003
116. Gumustas M, Sengel-Turk CT, Hascicek C, Ozkan SA. Optimization of a validated stability-indicating RP-LC method for the determination of fulvestrant from polymeric based nanoparticle systems, drugs and biological samples. *Biomedical Chromatography*. 2014;28(10):1409–17. doi:10.1002/bmc.3183
117. Liu Z, Gu G, Xia H, Liu Q, Pang Z, Jiang X, et al. Determination of Fulvestrant in Rat Plasma by LC–MS–MS: Application to a Pharmacokinetic Study. *Chromatographia*. 2011;74(3–4):227–34. doi:10.1007/s10337-011-2071-x
118. Posocco B, Buzzo M, Poetto AS, Orleni M, Gagno S, Zanchetta M, et al. Simultaneous quantification of palbociclib, ribociclib and letrozole in human plasma by a new LC-MS/MS method for clinical application. *PLoS One*. 2020;15(2). doi:10.1371/journal.pone.0228822
119. Poetto AS, Posocco B, Gagno S, Orleni M, Zanchetta M, Iacuzzi V, et al. A new dried blood spot LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of palbociclib, ribociclib, and letrozole in patients with cancer. *Journal of Chromatography B*. 2021;1185:122985. doi:10.1016/J.JCHROMB.2021.122985
120. Locatelli M, Tinari N, Grassadonia A, Tartaglia A, Macerola D, Piccolantonio S, et al. FPSE-HPLC-DAD method for the quantification of anticancer drugs in human whole blood, plasma, and urine. *Journal of Chromatography B*. 2018;1095:204–13. doi:10.1016/j.jchromb.2018.07.042
121. Beer B, Schubert B, Oberguggenberger A, Meraner V, Hubalek M, Oberacher H. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of tamoxifen, anastrozole, and letrozole in human plasma and its application to a clinical study. *Anal Bioanal Chem*. 2010;398(4):1791–800. doi:10.1007/S00216-010-4075-Z

122. Bertelsen BE, Viste K, Helland T, Hagland M, Sjøiland H, Geisler J, et al. Simultaneous Quantification of Aromatase Inhibitors and Estrogens in Postmenopausal Breast Cancer Patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(5):1368–74. doi:10.1210/clinem/dgab923
123. van Nuland M, Venekamp N, de Vries N, de Jong KAM, Rosing H, Beijnen JH. Development and validation of an UPLC-MS/MS method for the therapeutic drug monitoring of oral anti-hormonal drugs in oncology. *Journal of Chromatography B.* 2019;1106–1107:26–34. doi:10.1016/j.jchromb.2019.01.001
124. Mansour B, Ngo C, Schlemmer D, Robidou P, Blondel J, Marin C, et al. Simultaneous quantification of four hormone therapy drugs by LC-MS/MS: Clinical applications in breast cancer patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2024;242:116032. doi:10.1016/j.jpba.2024.116032
125. Al-Shehri M, Hefnawy M, Abuelizz H, Alzamil A, Mohammed M, Alsaif N, et al. Development and validation of an UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of palbociclib, letrozole and its metabolite carbinol in rat plasma and pharmacokinetic study application. *Arabian Journal of Chemistry.* 2020;13(2):4024–34. doi:10.1016/J.ARABJC.2019.05.005
126. Soledad Poetto A, Posocco B, Zanchetta M, Gagno S, Orleni M, Canil G, et al. “A new LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of abemaciclib, its main active metabolites M2 and M20, and letrozole for therapeutic drug monitoring.” *Journal of Chromatography B.* 2022;1207:123403. doi:10.1016/J.JCHROMB.2022.123403
127. Dhakne P, Sahu AK, Sharma MK, Sengupta P. Simultaneous quantification of abemaciclib and letrozole in rat plasma: method development, validation and pharmacokinetic application. *Biomedical Chromatography.* 2020;34(6). doi:10.1002/bmc.4825
128. Martínez-Chávez A, Rosing H, Hillebrand M, Tibben M, Schinkel AH, Beijnen JH. Development and validation of a bioanalytical method for the quantification of the CDK4/6 inhibitors abemaciclib, palbociclib, and ribociclib in human and mouse matrices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2019;411(20):5331–45. doi:10.1007/s00216-019-01932-w
129. Burke SM, Kamal M, Goey AKL. Development and Validation of a Quantitative LC-MS/MS Method for CDK4/6 Inhibitors Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib, and Abemaciclib-M2 in Human Plasma. *Ther Drug Monit.* 2023;45(3):327–36. doi:10.1097/FTD.0000000000001063
130. Habler K, Kalla AS, Rychlik M, Vogeser M, Teupser D. Therapeutic drug monitoring in breast cancer therapy – LC-MS/MS method for quantification of the CDK4/6 inhibitors abemaciclib, palbociclib, ribociclib, and major metabolites abemaciclib M20 and M2 in human serum. *J Pharm Biomed Anal.* 2023;225:115211. doi:10.1016/j.jpba.2022.115211

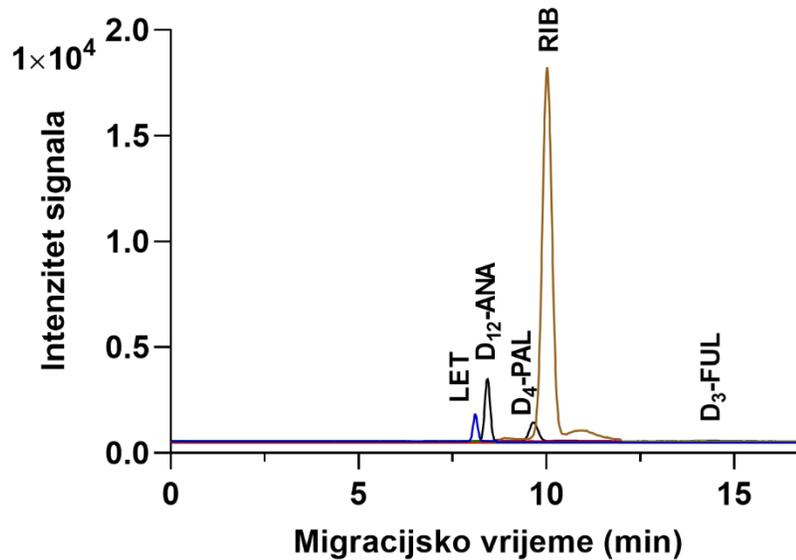
131. Leenhardt F, Gracia M, Perrin C, Muracciole-Bich C, Marion B, Roques C, et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the quantification of CDK4/6 inhibitors in human plasma in a clinical context of drug-drug interaction. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;188:113438. doi:10.1016/j.jpba.2020.113438
132. Calucică DM, Manda CV, Găman AM, Răileanu Ștefan, Stanca L, Popescu MDE, et al. Development of a SPE-LC-MS Method for the Quantitation of Palbociclib and Abemaciclib in Human Plasma. *Molecules.* 2022;27(23):8604. doi:10.3390/molecules27238604
133. Posocco B, Zanchetta M, Orleni M, Gagno S, Montico M, Peruzzi E, et al. Therapeutic Monitoring of Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib, M2, M20, and Letrozole in Human Plasma: A Novel LC-MS/MS Method. *Ther Drug Monit.* 2024;46(4):485–93. doi:10.1097/FTD.0000000000001174
134. Sato Y, Shigeta K, Hirasawa T, Sato T, Ogura J, Maekawa M, et al. Establishment of an analytical method for simultaneous quantitation of CDK4/6 inhibitors, aromatase inhibitors, and an estrogen receptor antagonist in human plasma using LC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2021;1173. doi:10.1016/j.jchromb.2021.122655 PubMed PMID: 33831689.
135. Turković L, Koraj N, Mlinarić Z, Silovski T, Crnković S, Sertić M. Optimisation of dispersive liquid-liquid microextraction for plasma sample preparation in bioanalysis of CDK4/6 inhibitors in therapeutic combinations for breast cancer treatment. *Heliyon.* 2023;9(8). doi:10.1016/j.heliyon.2023.e18880
136. Turković L, Bočkor L, Ekpenyong O, Silovski T, Lovrić M, Crnković S, et al. Development and Validation of a Novel LC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Abemaciclib, Palbociclib, Ribociclib, Anastrozole, Letrozole, and Fulvestrant in Plasma Samples: A Prerequisite for Personalized Breast Cancer Treatment. *Pharmaceuticals.* 2022;15(5):614. doi:10.3390/ph15050614
137. Turković L, Mutavdžić Pavlović D, Mlinarić Z, Skenderović A, Silovski T, Sertić M. Optimisation of Solid-Phase Extraction and LC-MS/MS Analysis of Six Breast Cancer Drugs in Patient Plasma Samples. *Pharmaceuticals.* 2023;16(10):1445. doi:10.3390/ph16101445
138. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2(R2) guideline on validation of analytical procedures. 2022.
139. Moreno-González D, Jáč P, Švec F, Nováková L. Determination of Sudan dyes in chili products by micellar electrokinetic chromatography-MS/MS using a volatile surfactant. *Food Chem.* 2020;310:125963. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2019.125963

140. Turković L, Koraj N, Mlinarić Z, Silovski T, Crnković S, Sertić M. Optimisation of dispersive liquid-liquid microextraction for plasma sample preparation in bioanalysis of CDK4/6 inhibitors in therapeutic combinations for breast cancer treatment. *Heliyon*. 2023;9(8). doi:10.1016/j.heliyon.2023.e18880
141. Turković L, Bočkor L, Ekpenyong O, Silovski T, Lovrić M, Crnković S, et al. Development and Validation of a Novel LC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Abemaciclib, Palbociclib, Ribociclib, Anastrozole, Letrozole, and Fulvestrant in Plasma Samples: A Prerequisite for Personalized Breast Cancer Treatment. *Pharmaceuticals*. 2022;15(5):614. doi:10.3390/ph15050614
142. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. 2022.
143. Braal CL, Jongbloed EM, Wilting SM, Mathijssen RHJ, Koolen SLW, Jager A. Inhibiting CDK4/6 in Breast Cancer with Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib: Similarities and Differences. *Drugs*. 2021;81(3):317–31. doi:10.1007/S40265-020-01461-2
144. Beer B, Schubert B, Oberguggenberger A, Meraner V, Hubalek M, Oberacher H. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of tamoxifen, anastrozole, and letrozole in human plasma and its application to a clinical study. *Anal Bioanal Chem*. 2010;398(4):1791–800. doi:10.1007/S00216-010-4075-Z
145. McCormack P, Sapunar F. Pharmacokinetic Profile of the Fulvestrant Loading Dose Regimen in Postmenopausal Women with Hormone Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2008;8(4):347–51. doi:10.3816/CBC.2008.N.040
146. Hubalek M, Oberguggenberger A, Beer B, Meraner V, Sztankay M, Oberacher H, et al. Does Obesity Interfere With Anastrozole Treatment? Positive Association Between Body Mass Index and Anastrozole Plasma Levels. *Clin Breast Cancer*. 2014;14(4):291–6. doi:10.1016/J.CLBC.2013.12.008
147. Fujiwara Y, Tamura K, Kondo S, Tanabe Y, Iwasa S, Shimomura A, et al. Phase 1 study of abemaciclib, an inhibitor of CDK 4 and 6, as a single agent for Japanese patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78(2):281–8. doi:10.1007/S00280-016-3085-8
148. Tamura K, Mukai H, Naito Y, Yonemori K, Kodaira M, Tanabe Y, et al. Phase I study of palbociclib, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in Japanese patients. *Cancer Sci*. 2016;107(6):755–63. doi:10.1111/CAS.12932

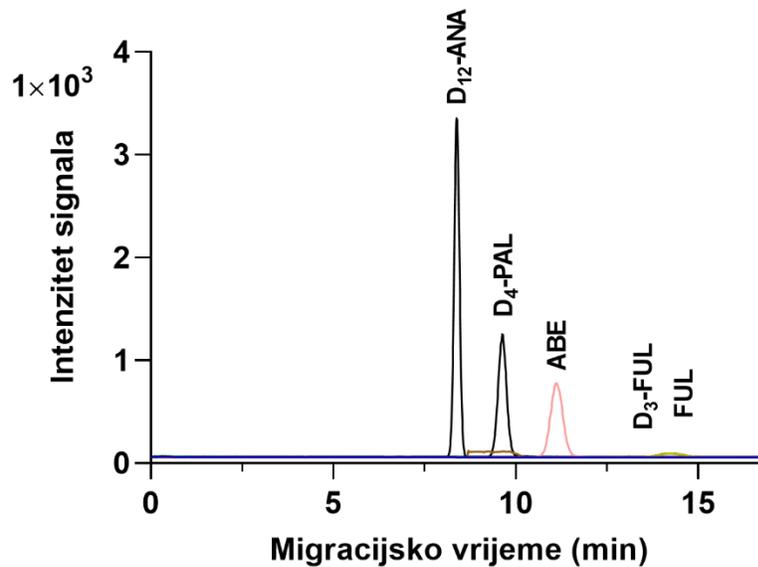
149. Infante JR, Cassier PA, Gerecitano JF, Witteveen PO, Chugh R, Ribrag V, et al. A phase I study of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor ribociclib (LEE011) in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(23):5696–705. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1248
150. Juric D, Rodon J, Tabernero J, Janku F, Burris HA, Schellens JHM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase α -selective inhibition with alpelisib (BYL719) in PIK3CA-altered solid tumors: Results from the first-in-human study. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(13):1291–9. doi:10.1200/JCO.2017.72.7107
151. Pritchard KI, Rolski J, Papai Z, Mauriac L, Cardoso F, Chang J, et al. Results of a phase II study comparing three dosing regimens of fulvestrant in postmenopausal women with advanced breast cancer (FINDER2). *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123(2):453–61. doi:10.1007/S10549-010-1022-9
152. Dirion B, Cobb Z, Schillinger E, Andersson LI, Sellergren B. Water-Compatible Molecularly Imprinted Polymers Obtained via High-Throughput Synthesis and Experimental Design. *J Am Chem Soc*. 2003;125(49):15101–9. doi:10.1021/ja0355473
153. Ho YS, McKay G. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*. 1999;34(5):451–65. doi:10.1016/S0032-9592(98)00112-5
154. Pena-Pereira F, Tobiszewski M, Wojnowski W, Psillakis E. A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. *Advances in Sample Preparation*. 2022;3:100025. doi:10.1016/j.sampre.2022.100025

7. PRILOZI

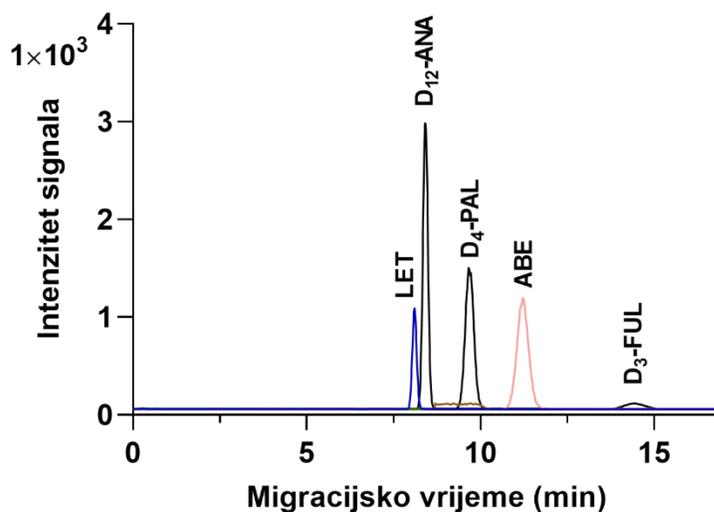
7.1. Maseni elektroferogrami uzoraka plazme pacijentica



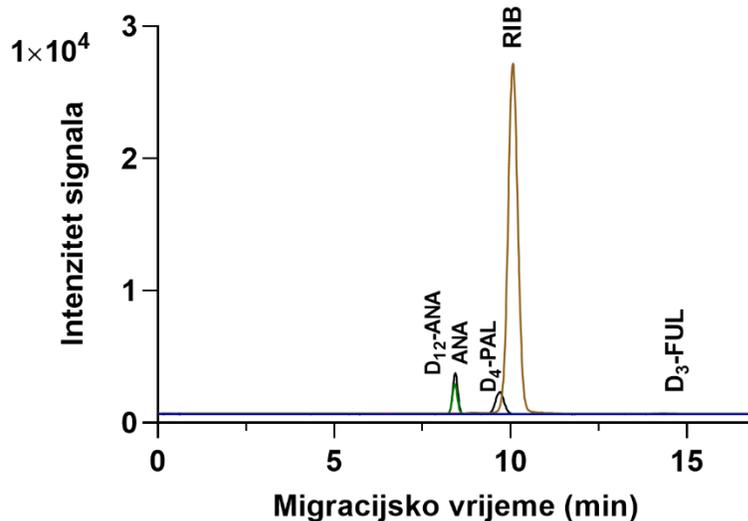
Prilog S1. Maseni elektroferogram uzorka plazme pacijentice 1 koja je na terapiji letrozolom (LET) i ribociklibom (RIB).



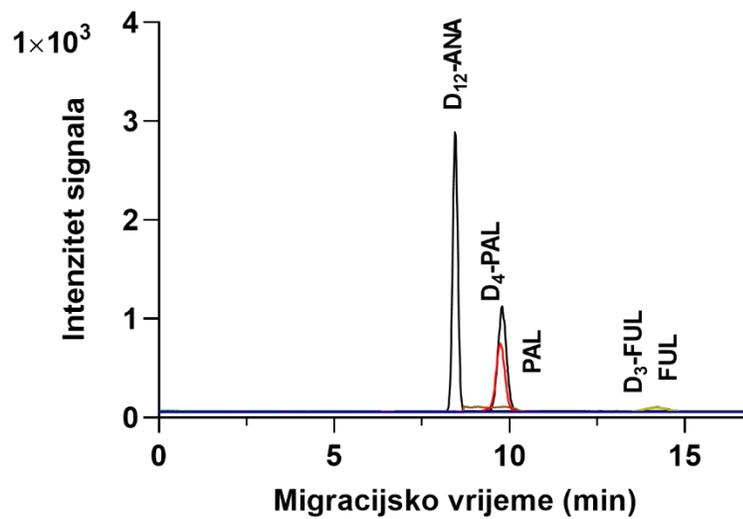
Prilog S2. Maseni elektroferogram uzorka plazme pacijentice 2 koja je na terapiji X i Y.



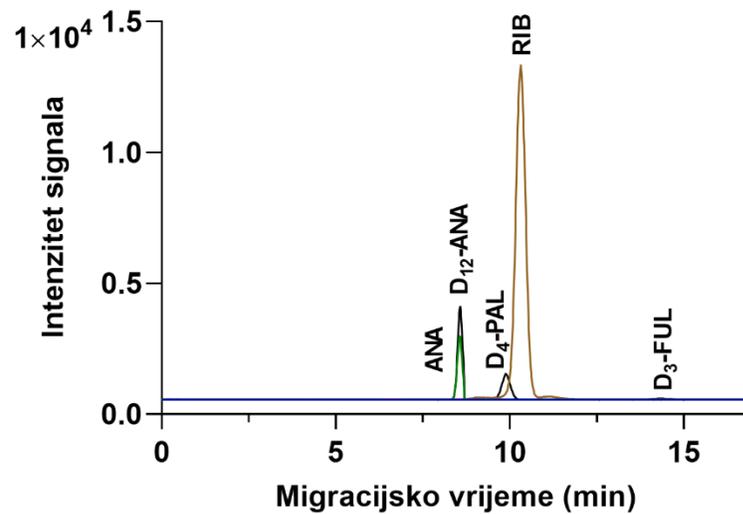
Prilog S3. Maseni elektroferogram uzorka plazme pacijentice 3 koja je na terapiji letrozolom (LET) i abemaciclibom (ABE).



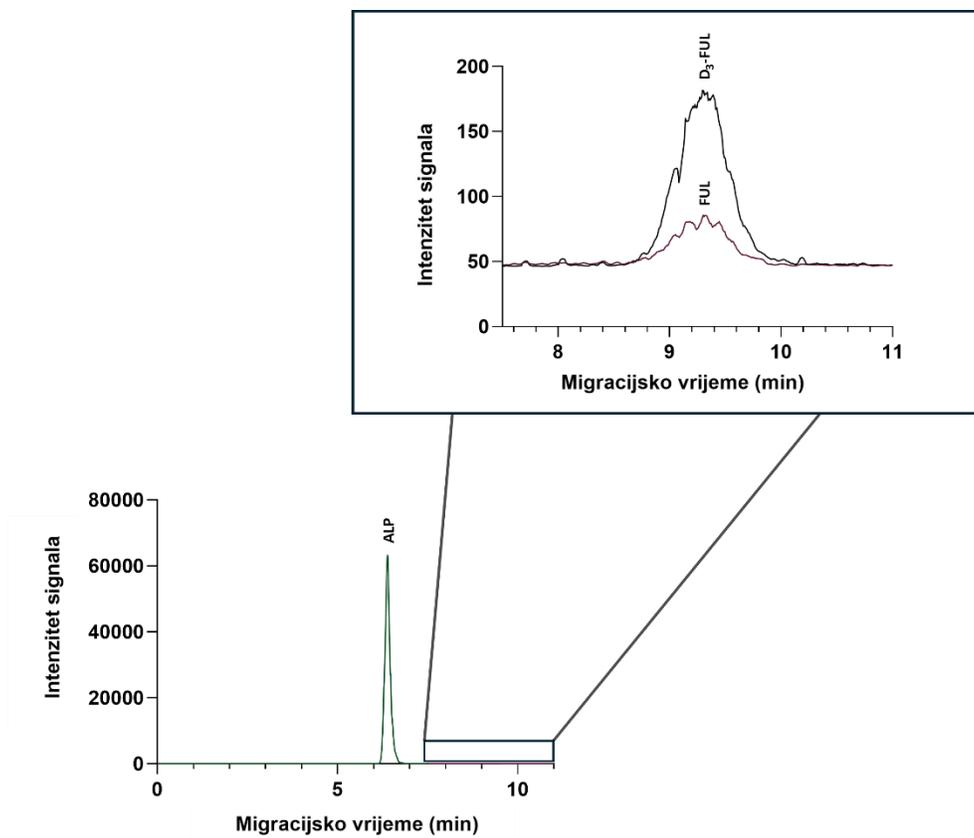
Prilog S4. Maseni elektroferogram uzorka plazme pacijentice 4 koja je na terapiji anastrozolom (ANA) i ribociclibom (RIB).



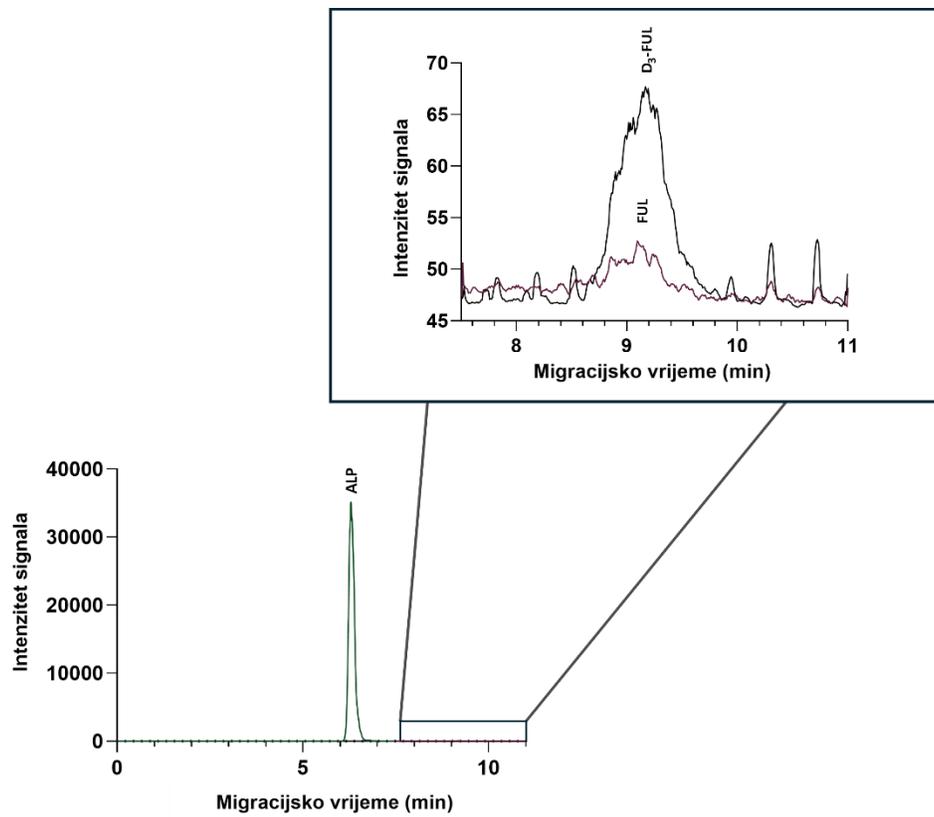
Prilog S5. Maseni elektroferogram uzorka plazme pacijentice 5 koja je na terapiji palbociklibom (PAL) i fulvestrantom (FUL).



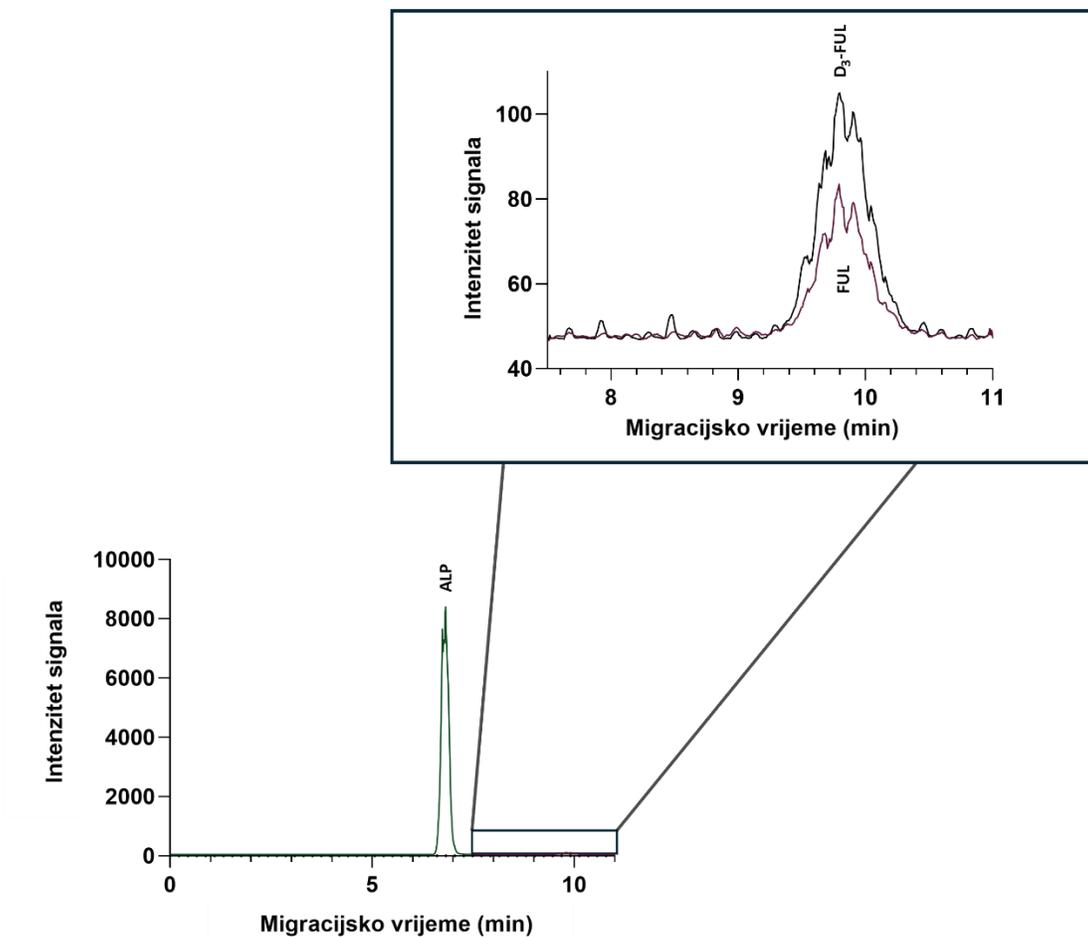
Prilog S6. Maseni elektroferogram uzorka plazme pacijentice 6 koja je na terapiji anastrozolom (ANA) i ribociklibom (RIB).



Prilog S7. Maseni elektroferogram uzorka plazme pacijentice 1 koja je na terapiji alpelisibom (ALP) i fulvestrantom (FUL).



Prilog S8. Maseni elektroferogram uzorka plazme pacijentice 1 koja je na terapiji alpelisibom (ALP) i fulvestrantom (FUL).



Prilog S9. Maseni elektroferogram uzorka plazme pacijentice 1 koja je na terapiji alpelisibom (ALP) i fulvestrantom (FUL).

7.2. Znanstveni radovi

1. **Zvonimir Mlinarić**, Lu Turković, Biljana Nigović, Miranda Sertić. Surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of apelisib and fulvestrant in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2025).
2. **Zvonimir Mlinarić**, Lu Turković, Ivor Babić, Tajana Silovski, Nina Kočevar Glavač, Miranda Sertić. Development, cross-validation and greenness assessment of capillary electrophoresis method for determination of ALP in pharmaceutical dosage forms – an alternative to liquid chromatography. *RSC Advances*, 14 (2024), 45; 32876-32882.
3. **Zvonimir Mlinarić**, Lu Turković, Miranda Sertić. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by sweeping micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry for determination of six breast cancer drugs in human plasma. *Journal of Chromatography A*, 1718 (2024), 464698, 10
4. **Zvonimir Mlinarić**, Lu Turković, Iva Begović, Biljana Nigović, Miranda Sertić. Rapid capillary electrophoresis method for simultaneous determination of abemaciclib, ribociclib, and palbociclib in pharmaceutical dosage forms: a green approach. *Molecules*, 27 (2022), 21, 7603, 13.

Article

Rapid Capillary Electrophoresis Method for Simultaneous Determination of Abemaciclib, Ribociclib, and Palbociclib in Pharmaceutical Dosage Forms: A Green Approach

Zvonimir Mlinarić , Lu Turković , Iva Begović, Biljana Nigović  and Miranda Sertić * 

Department of Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

* Correspondence: msertic@pharma.hr; Tel.: +385-1-6394-473

Abstract: Advances in the treatment of HR+/HER2- breast cancer phenotype have been made with the introduction of abemaciclib, ribociclib, and palbociclib, inhibitors of cyclin D dependent kinases 4 and 6 (CDK4/6). Here, a novel, fast, cheap, and green CE method for the simultaneous determination of these three CDK4/6 inhibitors in less than 4 min is proposed for the first time. Separation was achieved by capillary zone electrophoresis in an acidic medium, in accordance with the structures of the analytes and their pKa values. The optimal pH of the running buffer was found to be 2.9. The optimal method conditions were 27.5 kV separation voltage, 30 °C, 5 s injection time under 50 mbar pressure, and 50 mM phosphate background buffer with benzimidazole as an internal standard. The developed method was validated with respect to robustness, selectivity, accuracy, precision, linearity, and limits of detection. The method was shown to be linear in the range of 10 to 100 µg mL⁻¹ with correlation coefficients higher than 0.9981. A greenness assessment of the proposed method was performed, and the method was shown to be green. The validated method was successfully applied to pharmaceutical dosage forms of all CDK4/6 inhibitors.

Keywords: CDK4/6 inhibitors; abemaciclib; ribociclib; palbociclib; breast cancer; green chemistry; capillary electrophoresis



Citation: Mlinarić, Z.; Turković, L.; Begović, I.; Nigović, B.; Sertić, M. Rapid Capillary Electrophoresis Method for Simultaneous Determination of Abemaciclib, Ribociclib, and Palbociclib in Pharmaceutical Dosage Forms: A Green Approach. *Molecules* **2022**, *27*, 7603. <https://doi.org/10.3390/molecules27217603>

Academic Editor: Giovanni D'Orazio

Received: 7 October 2022

Accepted: 2 November 2022

Published: 6 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Breast cancer is the most common cancer in the world, with 2.3 million new cases diagnosed in 2020 [1]. This type of cancer is of major public health interest and reducing its burden on healthcare systems worldwide is of high importance. Over 70 % of breast cancers are hormone-receptor-positive (HR+) and human-epidermal-growth-factor-receptor-2-negative (HER2-) [2]. Today, the standard therapy for locally advanced or metastatic HR+/HER2- breast cancer is a combination of cyclin-D-dependent kinase 4 and 6 (CDK4/6) inhibitors with endocrine therapy because of better overall and progression-free survival [3–5]. Abemaciclib (ABE), ribociclib (RIB), and palbociclib (PAL) are CDK4/6 inhibitors that work by targeting overactive CDK4/6 in cancer cells and stopping their cell cycle, thereby slowing proliferation [6]. Their structures are shown in Figure 1. Analytical methods for these drugs are still scarce.

Capillary electrophoresis (CE) is a cost-efficient separation technique often considered an alternative to more widely used liquid chromatography. It offers greener, cheaper, and simpler analyses since it requires significantly smaller sample volumes and reagent consumption, and produces less waste than alternative techniques [7,8].

Furthermore, it offers great resolution and short analysis times with the potential to analyse a wide range of analytes, from small neutral and ionic molecules to large biomolecules such as proteins or nucleic acids [9].

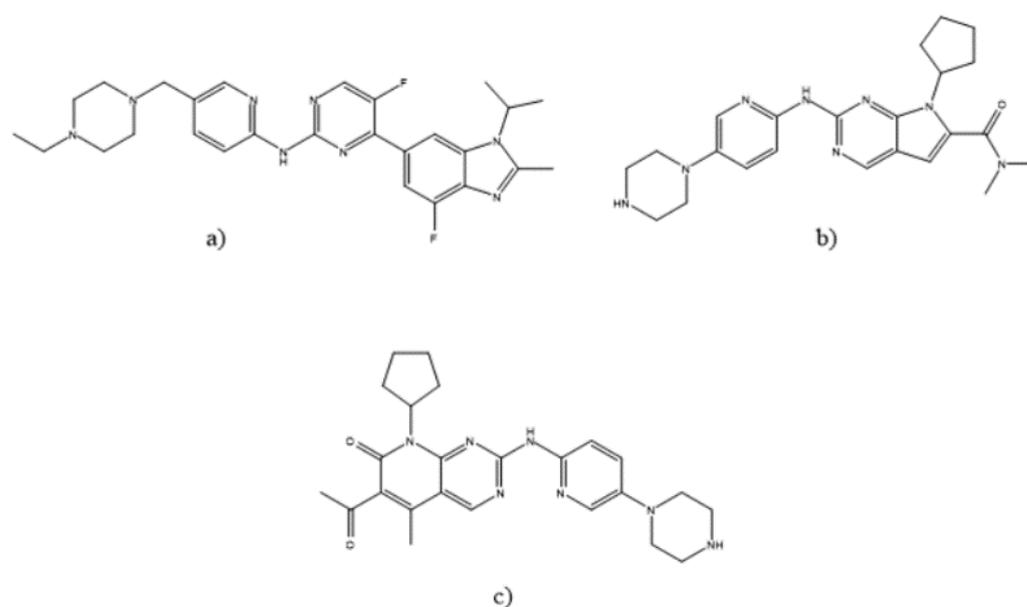


Figure 1. Molecular structures of (a) abemaciclib, (b) ribociclib and (c) palbociclib.

Green chemistry is often defined as an approach to the synthesis, processing, analysis, and use of chemicals that reduce hazards to the environment and people [10]. Due to global warming, green chemistry is no longer just a new industry trend or a popular topic but rather an unavoidable perspective in every aspect of science. Furthermore, a greener approach to potentially routine analytical methods makes them cheaper, and thus more sustainable in the long term. Capillary electrophoresis has been shown to be a great tool for achieving these goals [11–14].

At the moment, there are no methods reported for simultaneous determination of ABE, RIB, and PAL, nor the individual CDK4/6 inhibitors in pharmaceutical dosage forms. There is one published method for the determination of palbociclib [15]. However, this method is an RP-HPLC method applied only to standard solutions and not to pharmaceutical formulations. Currently, only a few methods are reported for the simultaneous determination of CDK4/6 inhibitors in biological samples [16–18]. Based on a literature search, there are no published CE methods for the analysis of CDK4/6 inhibitors at all. Furthermore, there are no official methods or monographs for ABE, RIB, or PAL in the European Pharmacopoeia or in the United States Pharmacopoeia [19,20]. Because of the absence of monographs for these drugs in pharmacopoeias and scarce literature on this topic, the development of an analytical method for the separation and determination of CDK4/6 inhibitors in pharmaceutical dosage forms is highly required in order to control their safety, quality and efficacy. Thus, the aim of this research is to introduce a novel, fast, cheap, and green CE method for the simultaneous determination of ABE, RIB, and PAL in their pharmaceutical dosage forms.

The goal is to develop a universal method for the analysis of any CDK4/6 inhibitor without the need for the development of a separate method for each particular drug.

2. Results and Discussion

2.1. Method Development

2.1.1. Effect of pH of the Running Buffer

The goal of method development was to achieve adequate separation of three CDK4/6 inhibitors and internal standard, achieving good peak shape and symmetry, while at the same time having the shortest possible analysis according to the principles of green chemistry.

Even though CDK4/6 inhibitors will never be used in combination in therapy, the goal was to develop a universal method for all of them to simplify the routine analysis of these

drugs. The structures of ABE, RIB, and PAL suggest that the optimal technique for their separation would be capillary zone electrophoresis (CZE) in an acidic medium. CZE is the simplest mode of capillary electrophoresis in which the separation among analytes occurs based on their different velocities. The velocity is defined as a product of electrophoretic mobility and the applied electric field. Based on their structures, the analytes will be positively charged in a pH range from 0 to nearly 10, migrating before the electroosmotic flow (EOF), resulting in short analysis times.

This was confirmed by evaluating the net charge of molecules in dependence on pH using Chemicalize software (Figure S1, Supplementary Material) [21]. Since ABE, RIB, and PAL are similar in size, to achieve separation between them, the pH of the running buffer for optimal separation should be that with the largest differences in net charges of the analytes at the acidic pH. This is also supported by consideration of the calculated pKa values of CDK4/6 inhibitors. Even though these molecules have many possible protonation sites in their structures, only some of them are relevant at the acidic pH. Therefore, the pKa values relevant for ABE are 1.83, 4.33, and 7.94, for RIB are 2.98, 4.31, and 8.86, and for PAL are 3.46 and 8.86. Preliminary experiments confirmed that the optimal pH should be between 2.5 and 3, since it provided good peak shapes and symmetries as well as separation. To find the optimal pH of the running buffer, a series of experiments were performed where pH was changed in the range from 2.5 to 3.0 while other separation parameters were kept constant (50 mM phosphate buffer, the temperature of 30 °C, applied voltage of 27.5 kV). With an increasing pH of the running buffer, migration times and resolutions generally increased with pH (Figure S2). Experiments with pH 2.9 and 3.0 showed similar resolutions, but pH 2.9 was chosen to be the optimal pH of the running buffer due to the fact that better peak shapes and symmetries were observed as well as slightly better resolution between ABE and RIB and RIB and PAL (Figure 2A).

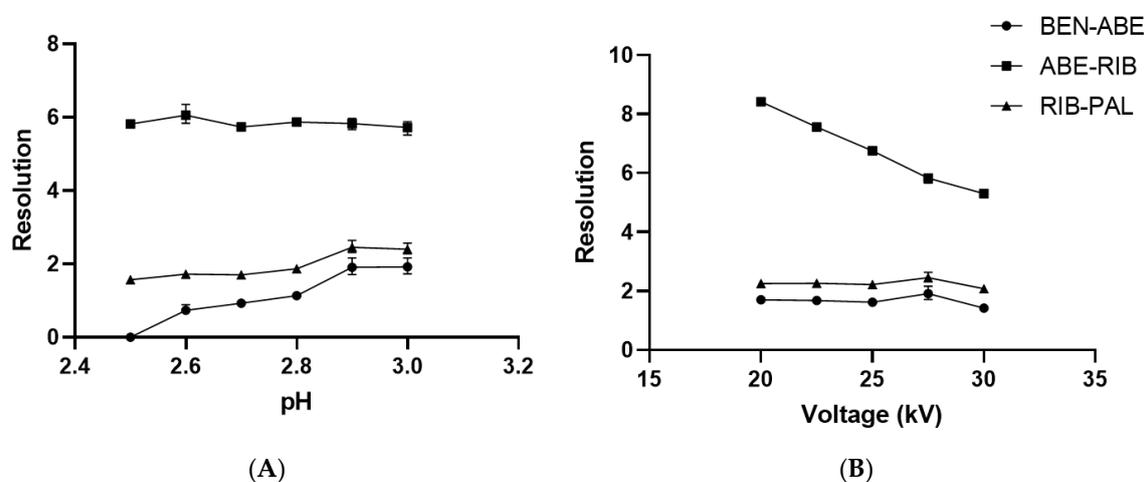


Figure 2. (A) Effect of pH of the running buffer on the resolutions of ABE, RIB, and PAL. (B) Effect of the applied voltage on the resolution of ABE, RIB, and PAL.

2.1.2. Effect of Applied Voltage and Capillary Temperature

To find the optimal voltage for the shortest separation time and the best resolution of analytes, a range of 20 to 30 kV of the applied voltage was investigated. Based on the performed experiments, increased voltage, shorter migration times and better peak shapes were observed. The analysis at 20 kV lasted 5.46 min while the analysis at 30 kV lasted only 3.15 min (Figure S3).

However, the effect on the resolution between closely migrating peaks suggested that the 27.5 kV voltage was better since the resolution was higher than 1.91 (Figure 2B), compared to the 30 kV applied voltage, which resulted in lower resolution between BEN and ABE ($R = 1.42$). Furthermore, at higher voltages, Joule heating in the capillary became significant and could negatively affect separation, migration times, or capillary stability.

Therefore, an applied voltage of 27.5 kV was chosen as optimal because it offers the optimal separation as well as good peak shapes and symmetries with negligibly longer analysis compared to the applied voltage of 30 kV.

The effect of capillary temperature on separation and migration times was investigated at 25, 30, and 35 °C under the optimal conditions previously stated. Temperature changes the running buffer viscosity and therefore increases EOF speed, but can decrease the resolution. A capillary temperature of 30 °C was chosen as optimal since it showed the best resolution ($R > 1.91$) among closely migrating peaks (ABE-RIB, RIB-PAL), with negligibly longer migration times compared to 35 °C: 3.65 min instead of 3.27 min (Figures S4 and S5).

2.1.3. Choosing the Internal Standard

In capillary electrophoresis, especially for quantitative analysis, it is customary to use internal standards to improve the performance of the method. One of the most critical aspects to achieving the required method performance is the injection precision, i.e., the sample volume size, since nL volumes are injected into the system using hydrodynamic or electrokinetic sample introduction techniques. There is no loop injector for such small volumes, as in HPLC for example.

During the initial stage of method development, different molecules (diazepam, oxazepam, quinine, imidazole, benzocaine, 4-aminobenzoic acid, and benzimidazole) were tested, and benzimidazole was chosen based on its structure, pKa value, electrophoretic behaviour, and resolution from the analytes. It gave a narrow peak, migrating closely to the analytes of interest, showed similar UV absorbance, and was well resolved from the closely eluting peak of ABE.

The addition of BEN as the internal standard (IS) to the sample solution remarkably improved the precision of the injection volumes and peak areas in repeated measurements.

Each CDK4/6 inhibitor, as well as the internal standard, exhibited different absorption maxima (Figure S6). Therefore, to ensure that the sensitivity was good enough for the detection of all analytes simultaneously, the wavelength of 270 nm was chosen as optimal. Detection was performed in an extended light path capillary with a bubble cell at the detection point. This tripled the method's sensitivity for all analytes. The electropherogram obtained in the separation of analytes under optimal conditions is presented in Figure 3. All analytes were separated in a short analysis with only 4 min of run time.

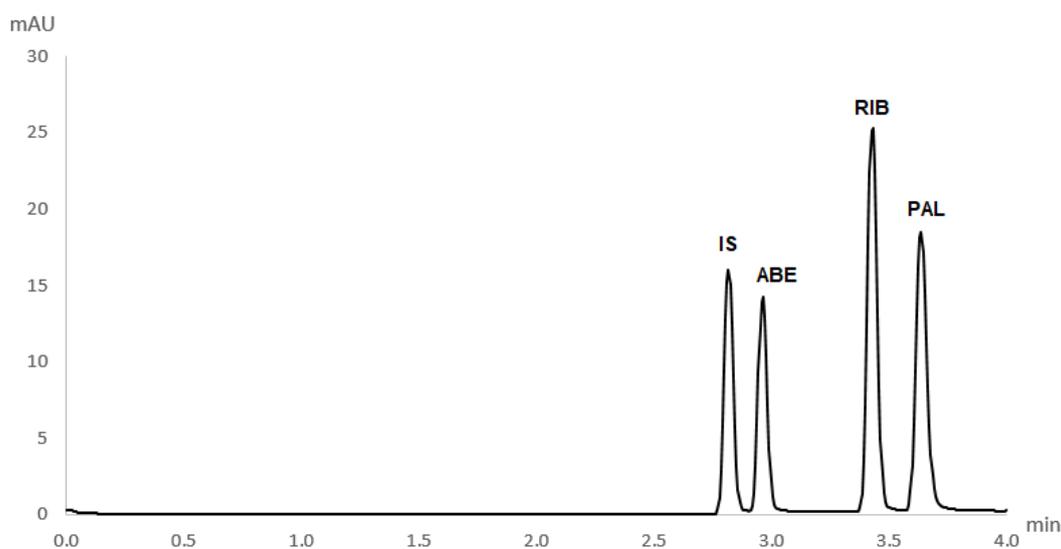


Figure 3. Electropherogram of standard solutions of CDK4/6 inhibitors under optimal conditions (50 mM phosphate buffer, pH 2.9, 27.5 kV, $\lambda = 270$ nm, 30 °C, injection time 5 s, pressure 50 mbar) (ABE = abemaciclib, RIB = ribociclib, PAL = palbociclib and IS = internal standard).

2.2. Method Validation

The developed CZE method for simultaneous analysis of three CDK4/6 inhibitors was validated under optimal conditions (50 mM phosphate buffer, pH 2.9, an applied voltage of 27.5 kV, a temperature of 30 °C, and injection in hydrodynamic mode of 5 s and 50 mbar), according to the ICH guidelines [22]. The selectivity of the method was determined by the assessment of peak purity by using OpenLab CDS ChemStation Edition software of standard solutions of ABE, RIB, and PAL. The purity match factor was between 999.1 and 999.8, which indicates that UV spectra from 190 to 400 nm of different parts of peaks were identical. Additionally, the method was tested on commercial drug pharmaceutical products, and peak purity factors for ABE, RIB, and PAL in their dosage forms were between 998.4 and 999.1, demonstrating that they were not co-migrating mutually nor with the excipients. Furthermore, electropherograms from standard solutions and pharmaceutical dosage forms were compared and no interferences from excipients were observed. Thus, the proposed method is selective and suitable for application to pharmaceutical dosage forms.

The linearity of the detector response was studied simultaneously by plotting ratios of corrected peak areas of each analyte and internal standard with five concentrations in the range of 10.0 to 100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The calibration curves were calculated by using $1/x^2$ weighted linear regression. LOD and LOQ were calculated as concentrations where the signal-to-noise ratios of analytes were 3:1 and 10:1, respectively. The regression and correlation data as well as detection and quantitation limits are given in Table 1.

Table 1. Method validation parameters.

	ABE		RIB		PAL	
Concentration range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	10.0–100		10.0–100		10.0–100	
Regression equation	$y = 0.01832x + 0.01282$		$y = 0.03615x - 0.01534$		$y = 0.02844x - 0.01491$	
r	0.9981		0.9984		0.9991	
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.25		0.08		0.11	
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.83		0.26		0.36	
Intra-day precision ($n = 6$)	Migration time	RSD	Migration time	RSD	Migration time	RSD
	3.05 min	0.65	3.50 min	0.27	3.70 min	0.53
	Peak area ^a	RSD	Peak area	RSD	Peak area	RSD
	0.92	0.94	1.74	1.05	1.52	0.33
Inter-day precision ($n = 9$)	Migration time	RSD	Migration time	RSD	Migration time	RSD
	3.01 min	1.17	3.46	0.87	3.66	0.67
	Peak area	RSD	Peak area	RSD	Peak area	RSD
	0.90	3.95	1.69	2.88	1.39	1.63

^a Ratio of peak areas of CDK4/6 inhibitor and internal standard.

Repeatability and intermediate precision were assessed to determine the method's precision. Intra-day precision was determined by six sequential injections of three separate standard solutions containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of ABE, RIB, PAL, and internal standard.

Inter-day precision was performed on three consecutive days with freshly prepared BGE and standard solutions. The corrected peak areas (ratio of peak area of the analyte and of the internal standard) and the migration times of the analytes were determined, and the results are shown in Table 1. Low relative standard deviation (RSD) values indicate that the proposed method is reliable and suitable for application to real samples.

The robustness was determined by studying the influence of variation of key method parameters using a one-variable-at-a-time approach. Effects of small changes in buffer pH (2.9 ± 0.1), capillary temperature (30 ± 5 °C), and applied voltage (27.5 ± 2.5 kV) were evaluated by observing the change of relative migration times and peak areas of analytes as these parameters are varied. The results of the robustness for these parameters were

expressed as RSD which was calculated as a standard deviation of the corrected migration time and corrected peak area for all peaks of interest. The changes in relative migration times and relative peak areas were small indicating that the robustness of the method was good.

The accuracy of the method was determined by comparing measured and known concentration values of the standard drug solutions. The recovery was found to be in a range from 99.9 to 104.3%, showing that the accuracy of the proposed method was good.

2.3. Application

The novel and validated method for the simultaneous determination of ABE, RIB, and PAL was applied to pharmaceutical dosage forms of these drugs (Verzenios 100 mg tablets, Kisqali 200 mg tablets, and Ibrance 125 mg capsules). Obtained electropherograms are shown in Figure 4. No interferences of excipients with the analytes' peaks were observed.

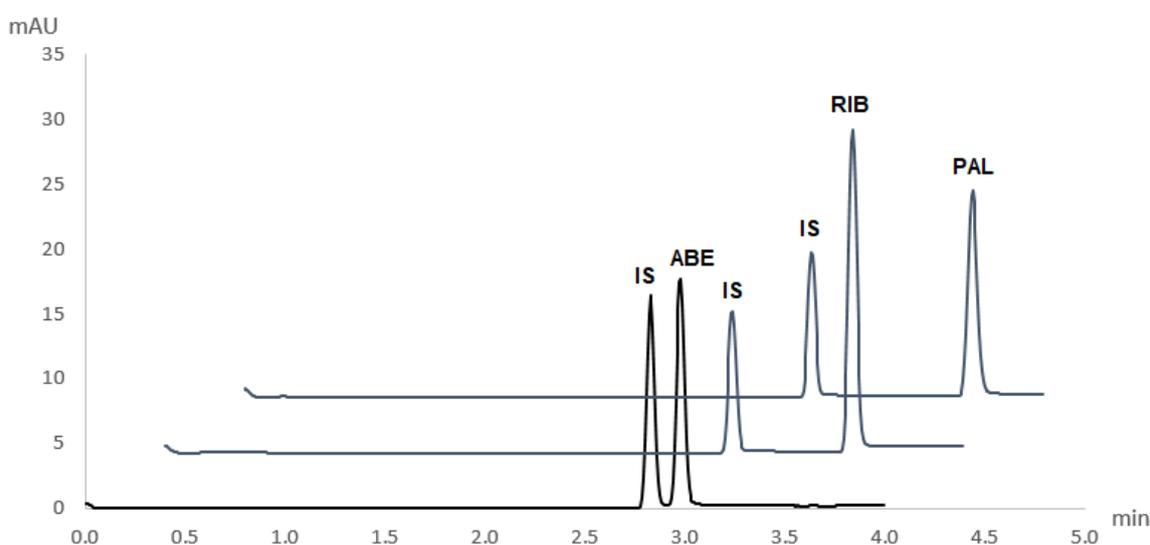


Figure 4. Electropherograms of ABE, RIB, and PAL pharmaceutical dosage forms under optimal conditions (50 mM phosphate buffer, pH 2.9, 27.5 kV, $\lambda = 270$ nm, 30 °C, injection time 5 s, pressure 50 mbar) (ABE = abemaciclib, RIB = ribociclib, PAL = palbociclib and IS = internal standard).

Quantitative determination was performed by comparing the peak area of a particular CDK4/6 inhibitor in its respective pharmaceutical dosage form and its corresponding peak area in a standard solution of a known concentration. Recoveries from real sample matrices were in agreement with labelled content, with mean recoveries being $99.7 \pm 3.0\%$, $101.7 \pm 2.7\%$, and $99.1 \pm 2.6\%$ for ABE, RIB, and PAL, respectively.

Therefore, the proposed method can be used for the quantitative determination of the pharmaceutical dosage forms of these drugs.

Our proposed method is the first CE method for any CDK4/6 inhibitors as well as the first CE method for the simultaneous determination of ABE, RIB, and PAL. So far, there have been only a few methods reported for simultaneous determination of ABE, RIB, and PAL [16–18], but these are LC methods that include longer analyses and more organic solvents, making them less environmentally friendly. Although our method has lower sensitivity than LC-MS methods, this does not present any drawbacks for the determination of these drugs in pharmaceutical dosage forms. Another advantage of our method is cheaper, more applicable instrumentation compared to the expensive mass detectors. Furthermore, there are no official monographs for any of the CDK4/6 inhibitors in any pharmacopoeia; therefore, we propose our method as a fast, cheap, and green solution for the determination of these drugs in quality control for both industry and regulatory agencies.

2.4. Greenness of the Method

There are several guidelines for assessing the greenness of a particular method. A common method used for this is the National Environmental Methods Index (NEMI) developed by U.S. governmental agencies, such as the U.S. Environmental Protection Agency (EPA). NEMI considers several criteria as to whether a method uses PBT (persistent, bioaccumulative, and toxic) or hazardous chemicals as defined and listed on EPA's toxic release inventory (TRI), whether the method uses corrosive chemicals (pH during analysis less than 2 or greater than 12) and whether the method produces more than 50 g of waste per analysis [23]. Our proposed method does not use any chemicals listed as PBT or hazardous on TRI, pH during analysis was 2.9, and waste produced per analysis was in μL . Therefore, according to NEMI's criteria, our proposed method is perfectly green (Figure 5A).

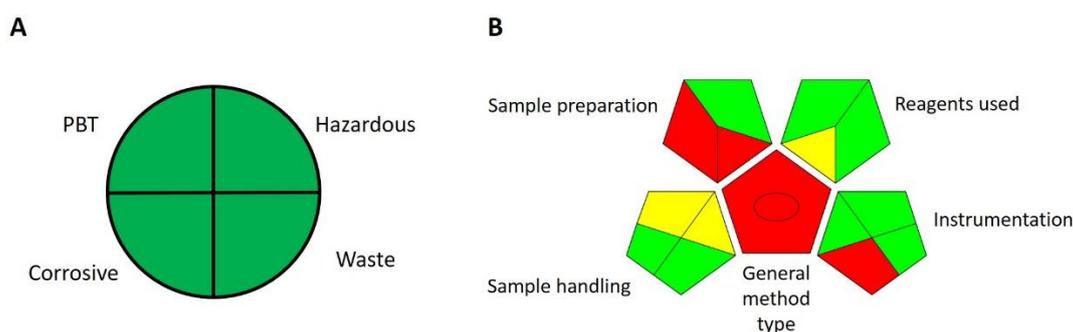


Figure 5. (A) National Environmental Methods Index's greenness profile symbol for the proposed method. (B) Evaluation of greenness of our proposed method using the Green Analytical Procedure Index tool.

There is another greenness assessment method called the analytical eco-scale system which uses the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) data to determine penalty points for steps, instruments, and chemicals that deviate from the ideally green analytical method [24]. The maximum score is 100 points, with a score greater than 50 representing an acceptable green analysis and a score greater than 75 representing an excellent green analysis. Our proposed method has 20 penalty points (Table 2) for using small amounts of acetonitrile, methanol, formic acid, and sodium hydroxide, while producing minimal waste. Therefore, our method has an analytical eco-scale score of 80, which means that it is an excellent green method.

Table 2. Analytical eco-scale system greenness assessment of our proposed method.

Reagents/Instruments	Number of Pictograms ^a	Hazard ^b	Penalty Points ^c
Acetonitrile	2	2	4
Methanol	3	2	6
Formic acid	2	2	4
1 M NaOH	1	2	2
Waste	≤ 1 mL (g), no treatment		4
Technique	≤ 0.1 kWh per sample consumption		-
Occupational hazard	Analytical process hermetization		-
Total penalty points			20
Analytical eco-scale total score			80

^a Number of pictograms on the reagent packaging. ^b Hazard factor according to the GHS guidelines. ^c Penalty points are the product of the number of pictograms and hazards in case of reagents or a fixed number for a particular criteria.

Finally, there is the Green Analytical Procedure Index (GAPI), which is a tool used for the greenness assessment of analytical procedures [25]. The GAPI tool uses a pictogram composed of pentagons to determine the greenness of each step in an analytical procedure

on a colour scale from red to green. It evaluates different steps such as sample preparation and analysis, reagents and solvents, and instrumentation. Health and environmental hazards, energy expenditure, waste generation and treatment are also considered. Therefore, the GAPI tool evaluates the entire analytical procedure. Since it uses a visual representation of the greenness of each step, it can be used for fast comparison of the greenness of different analytical procedures—the greener the pictogram, the greener the method—and to spotlight weak points in a method. GAPI evaluation of our proposed method shows that it is a very green method, the only weakness being the requirement for macro-scale extraction with non-green solvents (Figure 5B).

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

Standards of ABE, RIB, and PAL were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). Benzimidazole (BEN) was purchased from Sigma-Aldrich (Burlington, MA, USA). Tablets of ABE (Verzenios) and RIB (Kisqali), as well as capsules of PAL (Ibrance), which are clinically available, were used. Running buffers were prepared from 50 mM sodium phosphate solution with pH = 2.5 and 1 M sodium hydroxide solution, both purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). LC-grade acetonitrile and methanol were purchased from VWR International (Radnor, PA, USA). Formic acid was purchased from Kemika (Zagreb, Croatia). Ultra-pure water used for the preparation of all solutions and running buffers was obtained using a Milli-Q system.

3.2. Instrumentation

CE experiments were performed on Agilent High-Performance Capillary Electrophoresis 7100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a diode array detector. For controlling the CE system, data acquisition, and data analysis the OpenLab CDS ChemStation Edition software was used. Separations were performed on uncoated fused-silica capillaries with a 50 μm internal diameter, a total length of 48.5 cm (effective length to detector 40 cm), and an extended light path of 150 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Before the first use, new capillaries were conditioned by rinsing with 1 M NaOH for 30 min, water for 10 min, 1 M HCl for 30 min, water for 10 min, 10 % phosphoric acid for 10 min, water for 10 min, and finally equilibrated with running buffer for 30 min. Daily conditioning was performed by rinsing with 10% phosphoric acid for 10 min, water for 10 min, and equilibration with running buffer for 20 min. Before each run, the capillary was equilibrated with a running buffer for 5 min and the capillary tip was dipped in a water vial for clean-up of both the capillary tip and the electrode before injection to achieve better reproducibility. At the end of each day, the capillary was flushed with water for 20 min and stored in water until the next usage. Running buffers were replaced every five runs.

3.3. CE Conditions

The optimal buffer was found to be 50 mM sodium phosphate buffer with pH 2.9, adjusted by the addition of 1 M sodium hydroxide solution. Before injection, all solutions were filtered through the 0.2 μm PTFE syringe filters (VWR International, Radnor, PA, USA). Samples were injected in the hydrodynamic mode for 5 s under the pressure of 50 mbar. Separations were carried out at the applied voltage of 27.5 kV and the temperature inside the capillary cartridge was maintained at 30 °C. Detection was performed at the wavelength of 270 nm.

3.4. Standard Solutions

Stock solutions of BEN, ABE and RIB were prepared by dissolving the appropriate amount of the substance in methanol to a concentration of 1 mg mL⁻¹, while the stock solution of PAL was prepared by dissolving the appropriate amount of substance in a mixture of acetonitrile–water (50:50, *v/v*) with 0.1% formic acid to the final concentration of

0.25 mg mL⁻¹. All stock solutions were stored in a refrigerator at 4 °C and were freshly used. In these conditions, stock solutions were found to be stable for at least 2 months.

Working standard solutions were prepared immediately before injection by dilution of the appropriate volumes of stock solutions of BEN, ABE, RIB, and PAL with acetonitrile, methanol, and water to obtain a methanol–water–acetonitrile (50:40:10, *v/v/v*) solution of BEN, ABE, RIB, and PAL of a required concentration. For optimization of the method, a solution containing 50 µg mL⁻¹ of BEN, ABE, RIB, and PAL was used.

3.5. Tablet Solutions

Ten tablets and capsules of ABE, RIB, and PAL dosage forms were weighed and crushed in a mortar with a pestle until a fine powder was obtained. Then, in the case of ABE and RIB, an accurately weighed quantity of powder and BEN to yield a concentration of 1 mg mL⁻¹ was transferred into a 50 mL calibrated flask, and 20 mL of methanol was added. In the case of PAL, an accurately weighed quantity of powder and BEN to yield a concentration of 0.25 mg mL⁻¹ was transferred into a 50 mL calibrated flask, and 10 mL of water and 10 mL of acetonitrile were added. Sample solutions were then sonicated for 30 min at room temperature and filled up to the mark with methanol for ABE and RIB, and water, acetonitrile, and formic acid in the case of PAL, to reach a solution of acetonitrile–water (50:50, *v/v*) with 0.1% formic acid. Finally, solutions were filtered through 0.2 µm PTFE syringe filters (VWR, Radnor, PA, USA). Sample solutions were then analysed in the same way as standard solutions.

4. Conclusions

A novel, fast, cheap, and green CE method for the simultaneous determination of three CDK4/6 inhibitors in their pharmaceutical dosage forms in less than 4 min is proposed. This is the first method ever reported to be suitable for the analysis of abemaciclib, ribociclib, and palbociclib in their dosage forms. Therefore, due to the lack of official monographs in pharmacopoeias and the literature, we propose this method as an assay for the determination of these drugs in their dosage forms for industry and regulatory agencies to ensure quality, efficacy, and safety. The evaluation of the greenness of the method showed that our method is green, which ensures cheaper and safer routine use and reduces the negative impact on the environment.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules27217603/s1>, Figure S1: Calculated pKa values of CDK4/6 inhibitors; Figure S2: Effect of pH of the running buffer on the relative migration times of ABE, RIB, and PAL; Figure S3: Effect of applied voltage on the migration times of ABE, RIB, and PAL; Figure S4: Effect of capillary temperature on the migration times of ABE, RIB, and PAL; Figure S5: Effect of capillary temperature on the resolutions of BEN, ABE, RIB, and PAL, Figure S6: UV spectra of BEN, ABE, RIB and PAL.

Author Contributions: Conceptualization, M.S. and Z.M.; methodology, M.S., Z.M., I.B. and L.T.; validation, M.S., L.T. and B.N.; formal analysis, Z.M. and I.B.; investigation, Z.M. and L.T.; resources, M.S.; data curation, Z.M.; writing—original draft preparation, Z.M.; writing—review and editing, M.S., L.T. and B.N.; visualization, Z.M.; supervision, M.S. and B.N.; project administration, M.S.; funding acquisition, M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Croatian Science Foundation, grant numbers HRZZ-UIP-2019-04-8461 and DOK-2021-02-4595.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article and supplementary material.

Acknowledgments: The authors sincerely thank Tajana Silovski from the University Hospital Centre Zagreb for her valuable inputs.

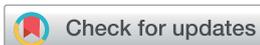
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds ABE, RIB and PAL are available from the authors.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin* **2021**, *71*, 209–249. [CrossRef] [PubMed]
2. Shah, A.N.; Metzger, O.; Bartlett, C.H.; Liu, Y.; Huang, X.; Cristofanilli, M. Hormone Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer in Young Women: Emerging Data in the Era of Molecularly Targeted Agents. *Oncologist* **2020**, *25*, e900–e908. [CrossRef] [PubMed]
3. Johnston, S.R.D.; Harbeck, N.; Hegg, R.; Toi, M.; Martin, M.; Shao, Z.M.; Zhang, Q.Y.; Martinez Rodriguez, J.L.; Campone, M.; Hamilton, E.; et al. Abemaciclib Combined With Endocrine Therapy for the Adjuvant Treatment of HR+, HER2-, Node-Positive, High-Risk, Early Breast Cancer (MonarchE). *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 3987–3998. [CrossRef] [PubMed]
4. Im, S.-A.; Lu, Y.-S.; Bardia, A.; Harbeck, N.; Colleoni, M.; Franke, F.; Chow, L.; Sohn, J.; Lee, K.-S.; Campos-Gomez, S.; et al. Overall Survival with Ribociclib plus Endocrine Therapy in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 307–316. [CrossRef] [PubMed]
5. Finn, R.S.; Martin, M.; Rugo, H.S.; Jones, S.; Im, S.-A.; Gelmon, K.; Harbeck, N.; Lipatov, O.N.; Walshe, J.M.; Moulder, S.; et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1925–1936. [CrossRef] [PubMed]
6. Braal, C.L.; Jongbloed, E.M.; Wilting, S.M.; Mathijssen, R.H.J.; Koolen, S.L.W.; Jager, A. Inhibiting CDK4/6 in Breast Cancer with Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib: Similarities and Differences. *Drugs* **2021**, *81*, 317–331. [CrossRef] [PubMed]
7. Wuethrich, A.; Quirino, J.P. Capillary Electrophoresis as a Green Alternative Separation Technique. In *The Application of Green Solvents in Separation Processes*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 517–532. ISBN 9780128054437.
8. Deeb, S.; Wätzig, H.; El-Hady, D.A.; Albishri, H.M.; de Griend, C.S.v.; Scriba, G.K.E. Recent Advances in Capillary Electrophoretic Migration Techniques for Pharmaceutical Analysis. *Electrophoresis* **2014**, *35*, 170–189. [CrossRef] [PubMed]
9. Altria, K.D.; Marsh, A.; Sängler-van de Griend, C. Capillary Electrophoresis for the Analysis of Small-Molecule Pharmaceuticals. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2263–2282. [CrossRef] [PubMed]
10. Anastas, P.T. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1999**, *29*, 167–175. [CrossRef]
11. Al-Attas, A.; Nasr, J.J.; El-Enany, N.; Belal, F. A Green Capillary Zone Electrophoresis Method for the Simultaneous Determination of Piperacillin, Tazobactam and Cefepime in Pharmaceutical Formulations and Human Plasma. *Biomed. Chromatogr.* **2015**, *29*, 1811–1818. [CrossRef] [PubMed]
12. Tong, T.T.V.; Cao, T.T.; Tran, N.H.; van Le, T.K.; Le, D.C. Green, Cost-Effective Simultaneous Assay of Chloramphenicol, Methylparaben, and Propylparaben in Eye-Drops by Capillary Zone Electrophoresis. *J. Anal. Methods Chem.* **2021**, *2021*, 5575701. [CrossRef] [PubMed]
13. Pedroso, T.M.; van Schepdael, A.; Salgado, H.R.N. Application of the Principles of Green Chemistry for the Development of a New and Sensitive Method for Analysis of Ertapenem Sodium by Capillary Electrophoresis. *Int J. Anal. Chem.* **2019**, *2019*, 1456313. [CrossRef] [PubMed]
14. Ranasinghe, M.; Quirino, J.P. Can we replace liquid chromatography with the greener capillary electrophoresis? *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2021**, *31*, 100515. [CrossRef]
15. Dange, Y.; Bhinge, S.; Salunkhe, V. Optimization and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Palbociclib and Letrozole. *Toxicol Mech Methods* **2018**, *28*, 187–194. [CrossRef] [PubMed]
16. Sato, Y.; Shigeta, K.; Hirasawa, T.; Sato, T.; Ogura, J.; Maekawa, M.; Ebata, A.; Hamanaka, Y.; Tada, H.; Ishida, T.; et al. Establishment of an Analytical Method for Simultaneous Quantitation of CDK4/6 Inhibitors, Aromatase Inhibitors, and an Estrogen Receptor Antagonist in Human Plasma Using LC-ESI-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2021**, *1173*, 122655. [CrossRef] [PubMed]
17. Turković, L.; Bočkor, L.; Ekpenyong, O.; Silovski, T.; Lovrić, M.; Crnković, S.; Nigović, B.; Sertić, M. Development and Validation of a Novel LC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Abemaciclib, Palbociclib, Ribociclib, Anastrozole, Letrozole, and Fulvestrant in Plasma Samples: A Prerequisite for Personalized Breast Cancer Treatment. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 614. [CrossRef] [PubMed]
18. Martínez-Chávez, A.; Rosing, H.; Hillebrand, M.; Tibben, M.; Schinkel, A.H.; Beijnen, J.H. Development and validation of a bioanalytical method for the quantification of the CDK4/6 inhibitors abemaciclib, palbociclib, and ribociclib in human and mouse matrices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 5331–5345. [CrossRef] [PubMed]
19. Council of Europe. *European Pharmacopoeia*, 10th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2022.
20. United States Pharmacopoeial Convention. *United States Pharmacopoeia—National Formulary 2022*; United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, MD, USA, 2022.
21. ChemAxon, Chemicalize. Available online: www.chemicalize.com (accessed on 25 January 2022).

22. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Step 5. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2005. Available online: www.ich.org/page/quality-guidelines (accessed on 28 May 2022).
23. Keith, L.H.; Gron, L.U.; Young, J.L. Green Analytical Methodologies. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2695–2708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gałuszka, A.; Migaszewski, Z.M.; Konieczka, P.; Namieśnik, J. Analytical Eco-Scale for Assessing the Greenness of Analytical Procedures. *TrAC-Trends Anal. Chem.* **2012**, *37*, 61–72. [[CrossRef](#)]
25. Płotka-Wasyłka, J. A New Tool for the Evaluation of the Analytical Procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta* **2018**, *181*, 204–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]


 Cite this: *RSC Adv.*, 2024, 14, 32876

Development, cross-validation and greenness assessment of capillary electrophoresis method for determination of ALP in pharmaceutical dosage forms – an alternative to liquid chromatography†

 Zvonimir Mlinarić,^a Lu Turković,^a Ivor Babić,^a Tajana Silovski,^{b,c} Nina Kočevar Glavač^d and Miranda Sertić^a

Breast cancer treatment has made tremendous progress in recent years and new therapies are emerging continuously. Alpelisib (ALP) is a novel phosphoinositide-3-kinase (PI3K) inhibitor recently approved for human receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative, PIK3CA-mutated metastatic breast cancer in combination with fulvestrant. ALP has been the subject of only a limited number of preclinical *in vitro* and *in vivo* studies using different chromatographic techniques. However, no research has been published on analyzing ALP using capillary electrophoresis (CE). The absence of pharmacopoeial monographs for ALP in both the European and United States Pharmacopoeias highlights the urgent need to develop a reliable analytical method for its quality control in both industry and regulatory authorities. In this work, we have developed a first-ever CE method for the determination of ALP in pharmaceutical dosage forms in just 1.4 minutes. This was achieved with a 25 mM borate buffer at pH 9.3, 30 kV separation voltage and 30 °C capillary temperature. The proposed method was validated according to the ICH guidelines regarding selectivity, linearity ($r = 0.9988$), precision ($RSD < 5.9\%$), accuracy (bias $< 3.0\%$) and robustness ($RSD < 3.2\%$). It was applied to the pharmaceutical dosage form of ALP and was shown to be suitable for the reliable determination of ALP. Furthermore, to demonstrate the applicability of the CE as an alternative technique to more commonly used HPLC in the analysis of drugs, cross-validation of CE and HPLC methods was performed. Bland–Altman analysis showed that the average difference in determined concentrations between CE and HPLC over a range of 10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was $0.87 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p = 0.6390$, $N = 19$) meaning that there is no difference in the performance of CE and HPLC in the determination of ALP in pharmaceutical dosage forms. The environmental impact of both methods was assessed using AGREE software and scores for CE and HPLC were calculated to be 0.74 and 0.51, respectively. Because of equally reliable analytical performance and greener analysis, CE should be considered as an alternative technique to HPLC in the analysis of ALP pharmaceutical dosage forms.

 Received 6th August 2024
 Accepted 10th October 2024

DOI: 10.1039/d4ra05715e

rsc.li/rsc-advances

Introduction

According to the World Health Organization (WHO), around 2.3 million cases of breast cancer are diagnosed each year, and around 685 thousand patients die from it worldwide.¹ This makes breast cancer the leading cause of cancer deaths in women in the

world. The expected global burden of cancer by 2040 is 28.4 million cases which represents a 47% rise from 2020.¹ Typical breast cancer treatment combines surgery, radiation, and systemic treatment; the latter encompasses endocrine therapy, chemotherapy, and targeted therapy including immunotherapy.² Breast cancer medication has made tremendous progress in recent decades, and new medicines continue to enter the market. Alpelisib (ALP) is a novel targeted breast cancer drug which inhibits phosphoinositide 3-kinase (PI3K). It was first approved by the FDA in 2019, in combination with fulvestrant, for the treatment of hormone receptor-positive (HR+), human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2-), PIK3CA-mutated, advanced or metastatic breast cancer, and has been available in the EU since EMA's marketing authorization in 2020.³

The development of new drugs is intrinsically linked to the development of analytical methods for the determination of

^aUniversity of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Analysis, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia. E-mail: miranda.sertic@pharma.unizg.hr

^bUniversity Hospital Centre Zagreb, Department of Oncology Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

^cUniversity of Zagreb School of Medicine, Šalata 2, 10000 Zagreb, Croatia

^dUniversity of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Biology, Aškerčeva cesta 7, 1000, Ljubljana, Slovenia

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d4ra05715e>



pharmacokinetic properties and quality control. ALP has been the subject of only a limited number of preclinical *in vitro* and *in vivo* studies using different chromatographic techniques; high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) for the study of ALP metabolism and pharmacokinetics in rats,⁴ and ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the determination of ALP in mice and human plasma.^{5,6} There is one stability-indicating method employing liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS/MS) for structural characterization of the forced degradation products of ALP.⁷ Few electrochemical methods for the analysis of ALP in biological fluids and tablets were reported, but it was not specified which exact formulation was analysed.^{8–10} However, no research has been published on the analysis of ALP by capillary electrophoresis (CE). The fact that no pharmacopoeial monographs for ALP are available in either the European or the United States Pharmacopoeia,^{11,12} shows the urgent need for the development of a reliable analytical method for the quality control of ALP.

CE has been recognized as an alternative or complementary analytical tool with specific advantages over chromatographic techniques.¹³ Of these, a considerable advantage is the suitability of the application to a wide range of analytes, from organic and inorganic, charged and neutral, water-soluble and insoluble, polar and nonpolar, small-sized and polymeric, to aromatic and aliphatic molecules. In addition, CE requires small sample and solvent volumes and enables faster analysis times.^{14,15}

Along with a need to develop reliable, efficient, and cost-effective methods, sustainability is gaining increased attention as a growing element in green analytical chemistry. Indeed, CE has been proven to meet the criteria of a sustainable and eco-friendly analytical solution due to its significant advantages, both at a level of environmental compatibility and analytical performance.^{16,17}

Based on the background mentioned above, ALP as an active pharmaceutical ingredient is an attractive candidate for the development of a CE analytical method for use in pharmacological research and pharmaceutical quality control. As this area has not been investigated so far, our work aimed to develop and validate a new CE method that will allow the quantitative determination of ALP in finished pharmaceutical products, as well as compare the proposed method to an HPLC method – a complementary analytical technique and a golden standard in the pharmaceutical industry. Additional focus will be given to the evaluation of method greenness according to selected guidelines.

The ultimate goal of our work is to support the development of the analytical determination of ALP by industry and regulatory authorities, by providing a reliable and sustainable CE method that enables the quantitative determination of ALP in finished pharmaceutical products.

Experimental

Instrumentation

CE experiments were carried out on High-Performance Capillary Electrophoresis G1600A (Agilent Technologies, Santa Clara,

CA, USA) with diode array detection. Data were collected and analyzed using ^{3D}CE/MSD ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). An uncoated fused-silica capillary with a 50 μm internal diameter, total length of 37 cm, and effective length of 28.5 cm was used (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

For the HPLC analysis, an Agilent 1100 system equipped with a diode array detector was used (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Data were collected and analyzed using ChemStation for LC 3D systems (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Microsoft Office 365 Excel (Redmond, WA, USA) and GraphPad Prism 8 (Boston, MA, USA) were used for data analysis and visualisation.

Chemicals

HPLC-grade methanol (MeOH) was purchased from Carlo Erba (Milan, Italy). Sodium dodecyl sulfate (SDS) was obtained from MilliporeSigma (Burlington, MA, USA), 1 M sodium hydroxide solution and 50 mM sodium tetraborate buffer solution pH 9.3 for CE were purchased from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Ultrapure water, used throughout this work, was purified using a Merck Millipore Milli-Q IQ 7015 system (Burlington, MA, USA). The standard of ALP (purity > 98%) was obtained from MedChemExpress (Princeton, NJ, USA). The chemical structure of ALP is shown in Fig. S1.† 4-Aminobenzoic acid (internal standard, IS) was from Fluka (Buchs, Switzerland). Piqray 50 and 200 mg film-coated tablets were obtained from Novartis (Basel, Switzerland).

Experimental conditions

Standard solutions. Standard solutions of ALP and IS were prepared at 0.5 mg mL⁻¹ in MeOH and stored at +4 °C. The stock solutions were stable for at least two months. Working solutions for the analyses were prepared in 50% MeOH at 5, 10, 40, 50, 60, 75, and 100 μg mL⁻¹ concentration levels.

Sample preparation of ALP tablets. The amount of ALP tablet powder containing 2.5 mg ALP was weighed in a 10 mL volumetric flask. Afterwards, IS (2.5 mg) and MeOH (7 mL) were added, and the mixture was vortex-mixed for 5 min, followed by

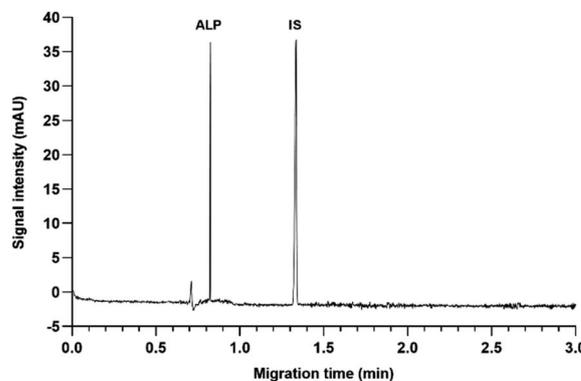
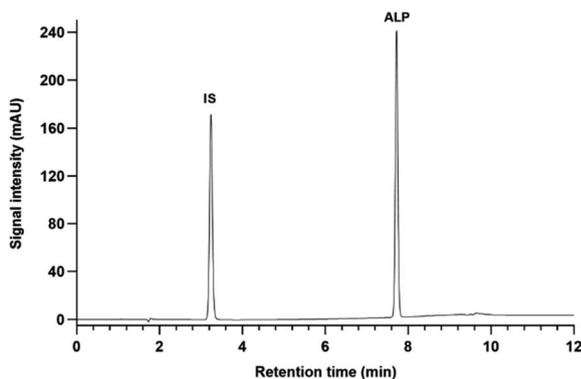


Fig. 1 CZE electropherogram of ALP and IS standard solutions at 50 μg mL⁻¹, 25 mM borate at pH 9.3, 30 kV, 30 °C.



Table 1 Gradient table for the developed HPLC method

Time (min)	Mobile phase B%
0	30
7	100
10	100
10.5	30
16	30

Fig. 2 Chromatogram of ALP and IS standard solutions at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, detection at 315 nm.

ultrasonication for 30 min. The volume was filled up to the mark and the aliquots of the solution were centrifuged for 3 min at 10 000 rpm. The obtained supernatants were diluted five-fold into 50% MeOH for the analysis.

CE conditions. Before the first use, a new capillary was conditioned with methanol for 10 min, followed by 1 M NaOH for 10 min, water for 10 min, and the running buffer for 20 min. Daily conditioning was done by flushing with 0.1 M NaOH for 10 min, water for 10 min, and the running buffer for 10 min. At the end of the working day, the capillary was washed with water for 20 minutes and stored in water vials until the next usage. Running buffers were changed after every 10 runs. All liquids were filtered through a $0.2 \mu\text{m}$ PES filter before use. Method run time was set at 3 min, with 3 min preconditioning with the running buffer, and 2 min postconditioning with 0.1 M NaOH. Samples were injected for 6 seconds under 50 mbar pressure. The optimal running buffer composition was 25 mM sodium borate buffer pH 9.3. The analyses were performed at 30 kV capillary voltage and $30 \text{ }^\circ\text{C}$ cassette temperature. The analyte and the IS were detected at 216 nm. A representative electropherogram of ALP and IS at the optimal conditions is shown in Fig. 1.

HPLC conditions. A Gemini C18 column, dimensions $150 \times 4.6 \text{ mm}$, particle size $5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Torrance, CA, USA), thermostated at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ was used for separation. The mobile phase consisted of ultrapure water with 0.1% formic acid (mobile phase A) and methanol containing 0.1% formic acid (mobile phase B) in gradient elution at 1 mL min^{-1} flow rate. The total runtime was 16 min. The gradient composition is depicted in Table 1. The analyte and IS were detected at 315 nm wavelength. A representative chromatogram of ALP and IS is shown in Fig. 2.

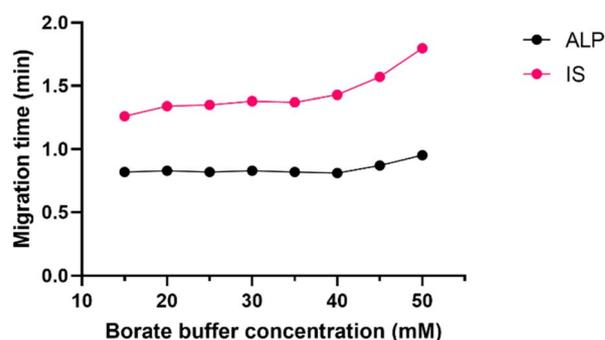
Results and discussion

CE method development

The first step of every CE method development is the choice of the CE mode, and the pH of the running buffer. Since ALP is a basic molecule, capillary zone electrophoresis (CZE) in basic pH was the technique of choice to ensure high electrophoretic mobility of ALP. This would also secure strong electroosmotic flow due to highly deprotonated silanol groups on the inner capillary wall. The preliminary results demonstrated that the routinely used borate buffer of pH 9.3 enabled fast analysis of ALP in CZE mode.

Borate buffer concentration was investigated in the range of 15 to 50 mM. This is a pivotal step in developing the CZE method since the buffer concentration directly influences the electroosmotic flow (EOF) and the reproducibility of the separation system. Higher buffer concentration decreases EOF and prolongs the analysis. It may also generate a high electric current within the capillary causing Joule heating. On the other hand, if the buffer concentration is too low, the sample might adsorb to the capillary surface. Finally, if the buffer and the sample conductivity differ, the analyte peak shape distorts. At all tested buffer concentrations, the peak shape and symmetry were adequate, and as seen in Fig. 3 the migration time did not change much until the concentration of 45 mM was investigated. To avoid the aforementioned analyte adsorption and Joule heating, the 25 mM borate buffer was chosen for the subsequent experiments.

Although ALP analysis is already possible using CZE, since this is the first report of a capillary electrophoretic determination of this drug, the influence of background electrolyte (BGE) additions was also investigated. The addition of SDS, as the most commonly used surfactant, was tested in the concentrations 20–30 mM. Since this changes the CE mode to micellar electrokinetic chromatography (MEKC), the observed increase in the ALP migration times and total analysis time is not surprising. However, the total analysis time was not too long (Fig. S2[†]), and such BGE could also be used for the analysis of ALP in the presence of other neutral analytes. It is worth mentioning that the migration order of ALP and the IS is reversed in MEKC.

Fig. 3 Effect of borate buffer concentration (15–50 mM) on ALP and IS migration times, pH 9.3, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 kV.

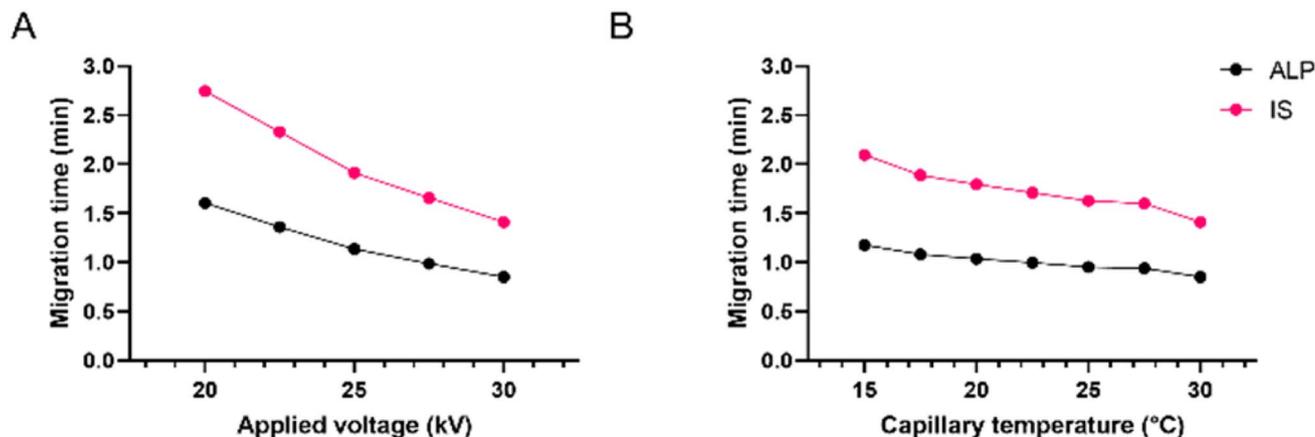


Fig. 4 Effect of (A) applied voltage and (B) capillary temperature on ALP and IS migration times; 25 mM borate at pH 9.3.

A similar effect of the increase of migration times was observed with the addition of the organic solvent to the borate buffer. Namely, the addition of the organic solvent changes the electrolyte viscosity of the BGE. Its effects to the EOF are complex, they may alter the selectivity of the method and have to be determined experimentally. The addition of 10% methanol did not result in an improved peak shape, had no influence on the selectivity of the method, and had little influence on the resolution between ALP and IS (Fig. S3†). Moreover, it slightly prolonged the analysis time. Since the aim was to keep the method as eco-friendly as possible and no improvements were noticed by the addition of surfactants or organic solvent to the BGE, only 25 mM borate buffer pH 9.3 was used as optimal BGE composition.

Finally, for fine-tuning, the influences of capillary temperature and separation voltage on the analysis time, peak shape, and resolution were investigated. The separation voltage was tested in the range of 15 to 30 kV. This parameter, directly influencing the strength of the electric field, showed the strongest effect on the migration times (Fig. 4A). As expected, the fastest analysis was obtained at 30 kV. Before it was chosen as optimal, the influence on the peak area, resolution, and current was also investigated. Although the increase of separation voltage decreases peak area, the method's sensitivity remained satisfactory in the entire range. The resolution between ALP and the IS remained extremely high due to very narrow peaks and short migration times. Finally, the applied 30 kV voltage resulted in a current of around 110 μA , posing little risk of Joule heating.

Capillary temperature was investigated in the range of 15 to 30 °C. In Fig. 4B it can be observed that the migration times increased by decreasing the capillary temperature. This is in accordance with the known influence of temperature on the viscosity of the BGE, which affects both the EOF and the electrophoretic mobility of the analyte. Since the peak shape and the resolution were satisfactory in the entire tested range, the preference was given to 30 °C since the analysis time was the shortest, the peaks were narrow and symmetrical, and the resolution was excellent. Due to low buffer concentration in the BGE, even at higher voltages, the current within the capillary was not high with little risk of Joule heating.

CE method validation

The newly developed CE method was validated according to the ICH Q2(R2) guidelines in terms of selectivity, linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy, and robustness.¹⁸ The peak area of ALP was corrected with the IS.

The linearity of the proposed method was evaluated in the range 10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ with the obtained correlation coefficient of 0.9988.

Selectivity was assessed as peak purity from 200 to 400 nm. The obtained scores ranged from 998.9 to 1000.0, demonstrating that ALP and IS were not co-migrating mutually nor with any other compounds.

The precision of the method was expressed as repeatability and intermediate precision. Repeatability was assessed by 6 measurements on 3 concentration levels within a single day,

Table 2 Accuracy ($N = 3$) and precision results – repeatability ($N = 6$ samples per concentration level in one day) and intermediate precision ($N = 9$ samples per concentration level in 3 days)

ALP concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Accuracy	Repeatability		Intermediate precision	
	Bias (%)	Migration time RSD (%)	IS-corrected peak area RSD (%)	Migration time RSD (%)	IS-corrected peak area RSD (%)
40	3.0	0.08	1.25	1.73	4.96
50	0.9	0.17	0.67	1.00	3.93
60	2.3	0.29	1.10	0.31	5.87



while intermediate precision was evaluated by 3 measurements on 3 concentration levels for 3 days, totalling 9 measurements per concentration level. The accuracy of the method was expressed as the bias of measured concentrations from the nominal values at 3 concentration levels. Results are shown in Table 2.

Traditionally, the robustness is a weak point of the CE technique since it is usually less robust than the HPLC technique. Therefore, robustness of the developed CE method was assessed by slightly varying the BGE concentrations, capillary temperature and separation voltage and it was expressed as the bias of the IS-corrected peak area and the RSD of the migration times (Table 3).

Since all validation parameters were in acceptable ranges, the developed method is successfully validated for the intended use.

Analysis of ALP tablets

The developed and validated CE method was applied to the pharmaceutical dosage form of ALP (Piqray 50 mg film-coated tablets) to determine its content. Found concentrations of ALP were in agreement with the labelled content, and the mean recovery of ALP was $98.7 \pm 1.2\%$.

Next, both CE and HPLC methods were applied to another pharmaceutical dosage form of ALP (Piqray 200 mg film-coated tablets) to test whether there were any differences in their applicability to the analysis of ALP in real samples (Fig. S4–S5†). No interferences of excipients with the analyte's peak were observed. Both methods detected similar concentrations of ALP in the same sample with relative concentrations (CE to HPLC) ranging from 99.7 to 102.1%.

HPLC method validation, cross-validation

To further demonstrate the applicability of the proposed method in the pharmaceutical industry or regulatory setting, cross-validation between the CE and HPLC as a golden standard was conducted in terms of precision, accuracy, and linearity. The results are presented in Tables 4 and 5. The precision and accuracy of both methods were acceptable due to low RSD and bias values, respectively. Furthermore, the validation

Table 3 Robustness results ($N = 6$ samples per condition (3 positive, 3 negative))

Parameter	Migration time RSD (%)	IS-corrected peak area RSD (%)
BGE concentration (25 ± 1 mM)	0.70	1.53
Capillary temperature (30 ± 1 °C)	1.11	1.51
Applied voltage (30–1 kV)	4.26	3.19

Table 4 Precision and accuracy of the CE and HPLC method

ALP concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE		HPLC	
	RSD (%)	Bias (%)	RSD (%)	Bias (%)
40	0.4	−2.6	0.2	−4.6
50	0.9	5.5	0.3	−0.1
60	2.9	−1.6	0.4	1.4

Table 5 Summary of key cross-validation results for the CE and LC methods

Validation parameter	CE	HPLC
Linear range	10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	10–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Weighting factor	$1/x^2$	$1/x^2$
Slope	0.00414	0.0253
Intercept	0.0001096	−0.0281
Correlation coefficient	0.9988	0.9988
Detection limit ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.67	0.06
Quantitation limit ^b ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5.00	0.20

^a Calculated as the concentration of the analyte at which the signal-to-noise ratio is 3 : 1. ^b Calculated as the concentration of the analyte at which the signal-to-noise ratio is 10 : 1.

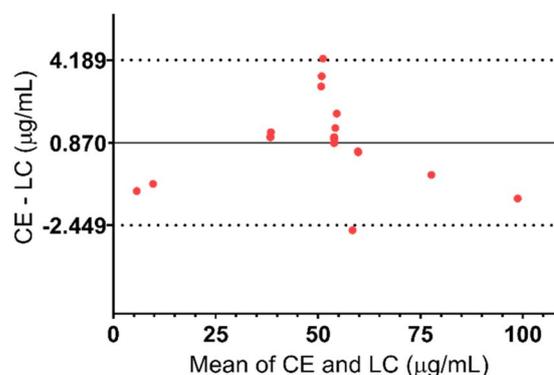


Fig. 5 Bland–Altman plot of the results obtained with both methods (difference of measured concentrations with CE and LC methods vs. average value of both methods). Bias (the average of the differences) = 0.870; 95% confidence interval = -2.449 – 4.189 $\mu\text{g mL}^{-1}$ p -value (paired t -test): 0.6390, $N = 19$.

parameters of CE and HPLC were comparable meaning that both methods could be applied for the intended purpose.

The same samples including calibration standards ($N = 7$), quality controls ($N = 6$), and ALP dosage form extracts ($N = 6$) were analysed simultaneously using both methods and the results were compared using a Bland–Altman plot, as shown in Fig. 5. Differences between the results for all the samples were less than variation during the validation of the methods. Additionally, the 95% confidence interval is narrow which further emphasizes small differences in CE and HPLC methods. Therefore, it can be concluded that both methods are valid for the determination of ALP in its dosage form.

Greenness assessment

The environmental impact of both methods was assessed using AGREE software.¹⁹ Custom weights were attributed to sample preparation-related parameters (weight 1 – equal conditions in both cases) and technique-related parameters (weight 2). Exact inputs for CE and HPLC methods for all AGREE criteria are given in ESI Table S1.† Detailed calculation of AGREE scores is given in ESI Table S2.† The calculated AGREE scores are presented in Fig. 6.



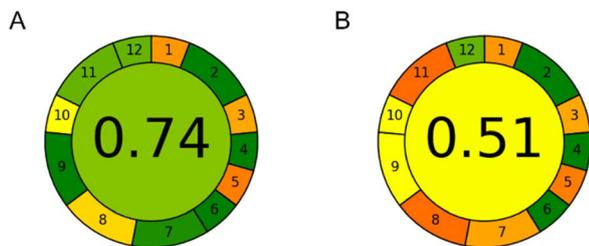


Fig. 6 AGREE assessment results: (A) CE method and (B) HPLC method.

It can be seen that the CE method achieved an AGREE score of 0.74 compared to an AGREE score of 0.51 in the HPLC method. Thus, the CE method is significantly more environmentally friendly. The main observed advantages of the CE method over the HPLC method were in the amount of waste per analysis (0.15 mL of the background electrolyte as opposed to 16 mL of the mobile phase), sample throughput (7 samples per hour instead of 3), energy consumption (0.015 kW h at most), and reduced use of toxic reagents (0.01 mL of MeOH present in the sample, instead of 9.5 mL in the HPLC mobile phase for the duration of each analytical run). Both methods require an equally small sample amount – only 20 μ L. However, CE injects only a few nanolitres of the sample and can therefore inject the same sample many times if needed. As it can be seen, CE has weak points in criteria 1, 3 and 5. This is due to the external sampling and sample preparation which is not miniaturized as well as the at-line position of the instrument. Besides this, the HPLC method has additional weak points in criteria 8, 9 and 11 due to the relatively higher amounts of waste generated and toxic chemicals utilized while also having lower sample throughput.

Conclusion

In this work, novel CE and HPLC methods for the determination of ALP in pharmaceutical dosage forms were developed, validated according to ICH guidelines and applied to real pharmaceutical samples. In addition, methods were cross-validated, and it was shown that there is no significant difference in the analytical performances of both methods. The greenness assessment was done on both methods showing that the CE method is significantly greener concerning waste production, sample throughput and energy consumption. It is worth noting that this is the first-ever CE method for the analysis of ALP in any sample matrix and as such is a valuable contribution to the analysis of ALP in general. In the end, due to equally reliable analytical performance and greener analysis, CE should be considered as an alternative technique to HPLC in the analysis of ALP pharmaceutical dosage forms.

Data availability

The data supporting this article have been included as part of the ESI.†

Author contributions

Zvonimir Mlinarić: conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, data curation, validation, visualization, writing – original draft. Lu Turković: conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, data curation, validation, visualization, writing – reviewing and editing. Ivor Babić: methodology, investigation, data curation. Tajana Silovski: validation, writing – reviewing and editing, resources. Nina Kočevar Glavač: validation, writing – reviewing and editing. Miranda Sertić: conceptualization, methodology, validation, writing – reviewing and editing, resources, supervision, project administration, funding acquisition.

Conflicts of interest

T. S. received speaker honoraria from Eli Lilly, Pfizer and Novartis and conference reimbursement from Novartis and Pfizer; is a consultant of Novartis and Pfizer and is a co-investigator in Novartis clinical study. Other authors declare no conflict of interest related to this study. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Acknowledgements

This work has been funded by the Croatian Science Foundation through projects UIP-2019-04-8461 and DOK-2021-02-4595, and the European Regional Development Fund through project Farminova, KK.01.1.1.02.0021.

References

- H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. Bray, *Ca-Cancer J. Clin.*, 2021, **71**, 209–249.
- A. G. Waks and E. P. Winer, *JAMA*, 2019, **321**, 288–300.
- A. Markham, *Drugs*, 2019, **79**, 1249–1253.
- S. W. Seo, J. M. Kim, D. G. Han, D. Geum, H. Yun and I. S. Yoon, *J. Chromatogr. B*, 2021, **1163**, 122508.
- Q. Wang, X. Lan, Z. Zhao, X. Su, Y. Zhang, X. Y. Zhou and R. A. Xu, *Front. Pharmacol*, 2021, **12**, 743411.
- S. Lee, M. S. Kim, J. W. Jeong, J. woo Chae, T. S. Koo, H. J. Maeng, S. J. Chung, K. R. Lee and Y. J. Chae, *J. Anal. Sci. Technol.*, 2022, **13**, 1–13.
- V. Ghanghav, A. Chawathe, S. K. Chauthe and N. Sharma, *Biomed. Chromatogr.*, 2024, **38**, e5813.
- W. Bouali, N. Erk, A. A. Genc, H. E. H. Ahmed and M. Soylak, *Microchem. J.*, 2023, **195**, 109478.
- W. Bouali, G. Kurtay, A. Ayşe Genç and N. Erk, *Microchem. J.*, 2024, **204**, 111014.
- W. Bouali, N. Erk, B. Sert and E. Harputlu, *Talanta*, 2024, **278**, 126486.
- United States Pharmacopoeia, *USP-NF Issue 1*, Rockville, MD, USA, 2024.
- European Pharmacopoeia 11th Edition*, Council of Europe, Strasbourg, France, 2024.



- 13 A. Wuethrich and J. P. Quirino, in *The Application of Green Solvents in Separation Processes*, Elsevier, 2017, pp. 517–532.
- 14 J. Sastre Toraño, R. Ramautar and G. de Jong, *J. Chromatogr. B*, 2019, **1118–1119**, 116–136.
- 15 S. El Deeb, H. Wätzig, D. A. El-Hady, H. M. Albishri, C. S. van de Griend and G. K. E. Scriba, *Electrophoresis*, 2014, **35**, 170–189.
- 16 M. Ranasinghe and J. P. Quirino, *Curr. Opin. Green Sustainable Chem.*, 2021, **31**, 100515.
- 17 Z. Mlinarić, L. Turković, I. Begović, B. Nigović and M. Sertić, *Molecules*, 2022, **27**, 7603.
- 18 ICH Q2(R2), *Validation of Analytical Procedures*, ICH Secretariat, Geneva, Switzerland, 2023.
- 19 F. Pena-Pereira, W. Wojnowski and M. Tobiszewski, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 10076–10082.



Supplementary information

Development, cross-validation and greenness assessment of capillary electrophoresis and liquid chromatography methods for determination of alpelisib in pharmaceutical dosage forms

Zvonimir Mlinarić^a, Lu Turković^a, Ivor Babić^a, Tajana Silovski^{b,c}, Nina Kočevar Glavač^d,
Miranda Sertić^a

^a University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Analysis, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

^b University Hospital Centre Zagreb, Department of Oncology, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

^c University of Zagreb School of Medicine, Šalata 2, 10000 Zagreb, Croatia

^d University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Biology, Aškerčeva cesta 7, 1000, Ljubljana, Slovenia

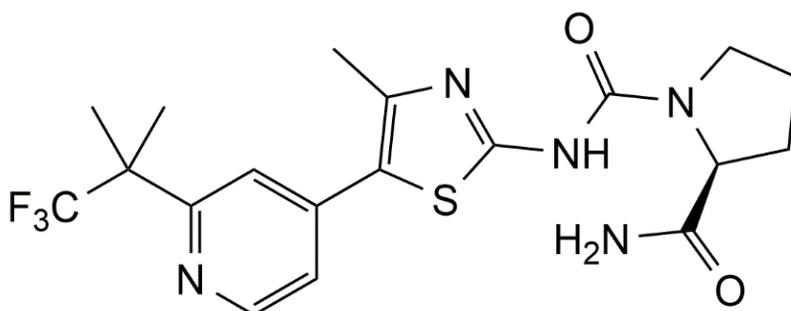


Figure S1. Chemical structure of alpelisib. Drawn by ChemDraw Professional 15.0 (PerkinElmer, Shelton, CT, USA)

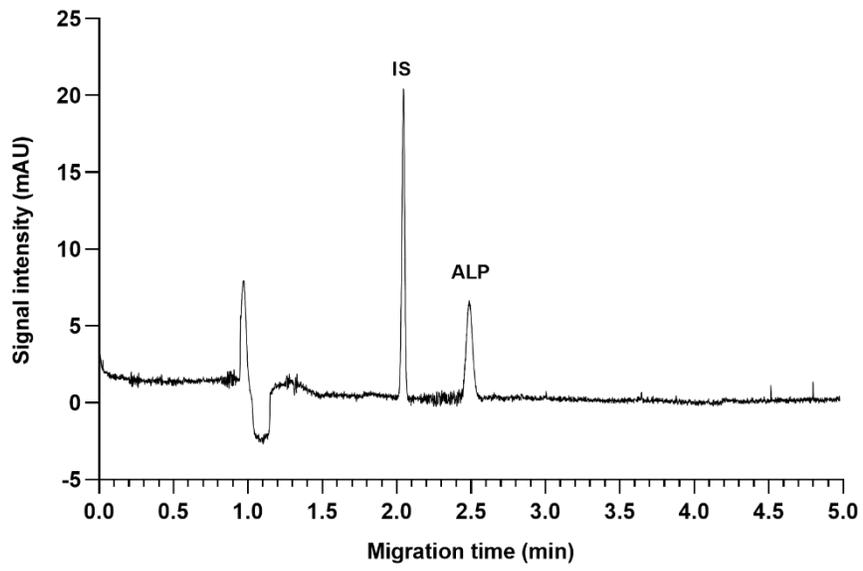


Figure S2. MEKC electropherogram of ALP and IS, 25 mM borate at pH 9.3, 20 mM SDS, 30 kV, 30 °C

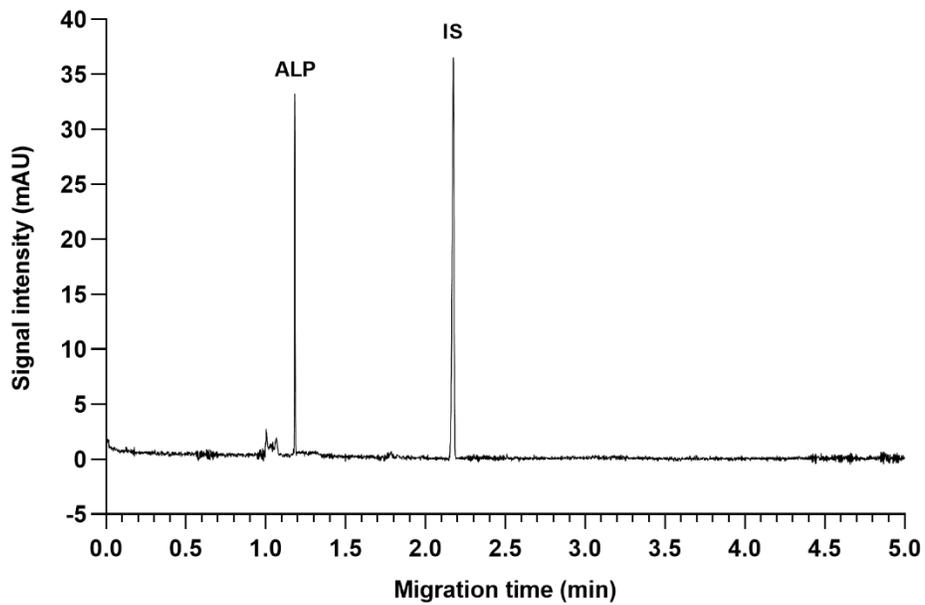
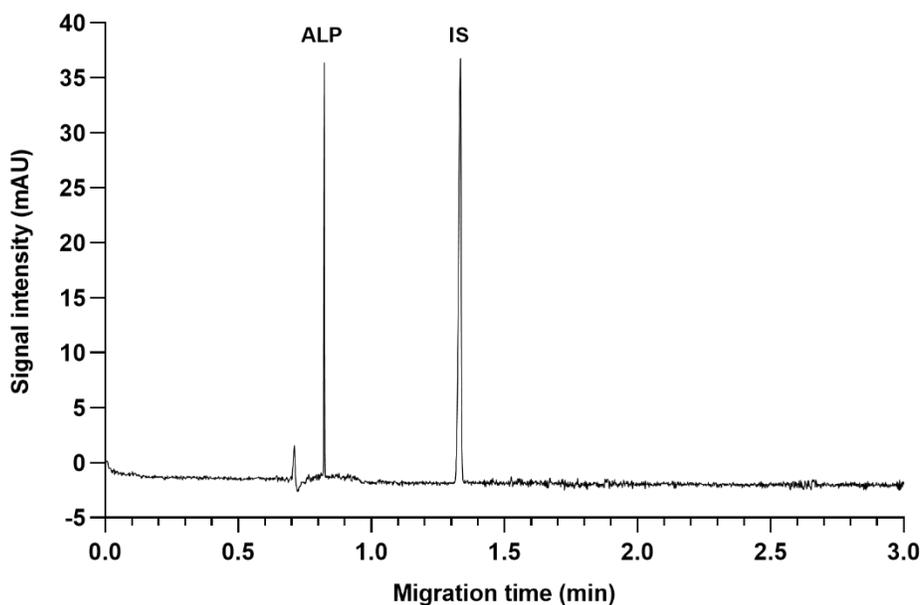


Figure S3. Electropherogram of ALP and IS, 25 mM borate at pH 9.3, 10% MeOH, 30 mM borate, 30 °C, 30 kV

Table S1. Principles of green analytical chemistry used to calculate AGREE score for CE and LC methods

Principle	Weight	CE	LC
Sampling	1	External sample preparation (reduced steps)	External sample preparation (reduced steps)
Amount of sample (g or mL)	2	0.02	0.02
Positioning of analytical device	1	at-line	at-line
Major steps	1	3 or fewer	3 or fewer
Automation; sample preparation	1	semi-automatic, not miniaturized	semi-automatic, not miniaturized
Derivatization	1	no	no
Amount of waste (g or mL)	2	0.15	16
Number of analytes, samples per hour	2	1, 7	1, 3
Energy	2	0,015 kWh	LC
Bio-based reagents	1	Some are bio-based	Some are bio-based
Use of toxic reagents	2	Yes, 0.01 mL	Yes, 9.5 mL
Threats	1	Highly flammable	Highly flammable

**Figure S4.** Electropherogram of ALP pharmaceutical dosage form with added IS at 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 mM borate at pH 9.3, 30 kV, 30 $^{\circ}\text{C}$

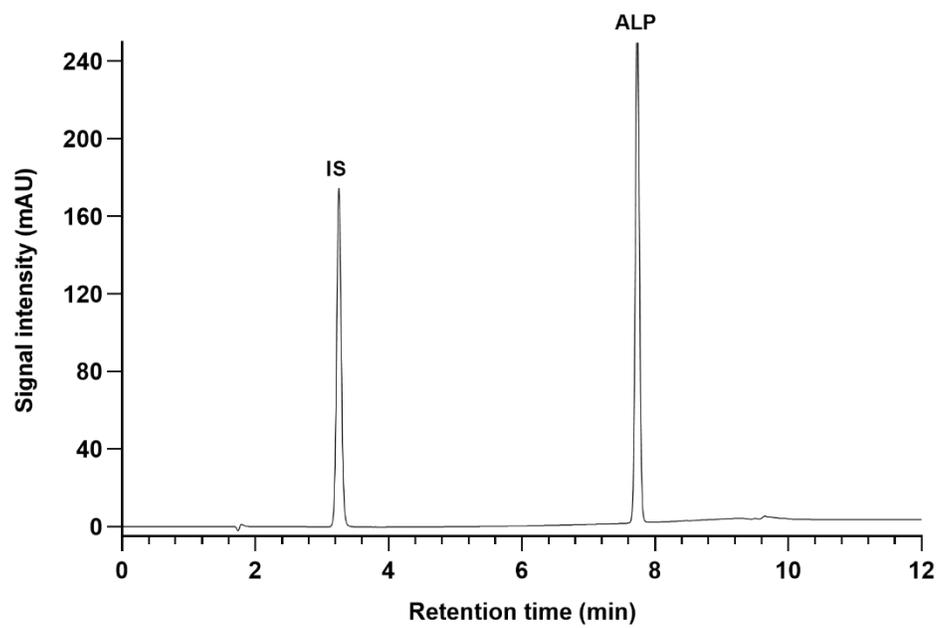


Figure S5. Chromatogram of ALP pharmaceutical dosage form with added IS at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, detection at 315 nm



Dispersive liquid-liquid microextraction followed by sweeping micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry for determination of six breast cancer drugs in human plasma

Zvonimir Mlinarić, Lu Turković, Miranda Sertić*

University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Analysis, 10000 Zagreb, Croatia

ARTICLE INFO

Keywords:

Micellar electrokinetic chromatography
Mass spectrometry
Dispersive liquid-liquid microextraction
Breast cancer
CDK4/6 inhibitors
Therapeutic drug monitoring

ABSTRACT

Herein, we have developed a novel method of aqueous-sample dispersive liquid-liquid microextraction (AqS-DLLME) followed by sweeping micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry (MEKC-MS/MS) for simultaneous determination of breast cancer drugs letrozole, anastrozole, palbociclib, ribociclib, abemaciclib, and fulvestrant in human plasma. Coupling of MEKC to MS was possible due to the use of ammonium perfluorooctanoate (APFO) as a volatile surfactant. The MEKC and MS conditions were optimized to achieve a fast, sensitive, selective, and green analysis enabling full separation of the analytes within 16 min. Electrophoretic buffer was 125 mM APFO at apparent pH 10.5 in 32 % MeOH, while sheath liquid was 70 % MeOH with 0.2 % formic acid, delivered at 10 μ L/min. Excellent extraction recoveries from plasma ranging from 89.4 to 104.9 % were obtained with a combination of protein precipitation and DLLME. The developed method was validated according to the ICH guidelines. Remarkable selectivity, accuracy (bias < 6.7 %), precision (RSD < 15.8 %), and stability (bias < 10.4 %) with insignificant matrix effect (RSD < 14.0 %) and no carry-over were obtained over a wide range of concentrations. Linearity with inter-day slope RSD lower than 8.7 % was demonstrated. With this method, very low concentrations could be detected after the injection of only 68.7 nL of the sample. The method was applied to plasma samples from six women currently receiving breast cancer treatment. Determined concentrations of the drugs of interest agreed with concentrations found in clinical studies, thus proving the suitability of the developed method for therapeutic drug monitoring as a superior alternative to published LC-MS methods.

1. Introduction

Breast cancer, as the most common cancer in the world, is a significant burden for healthcare systems worldwide [1]. Most breast cancers are hormone receptor-positive (HR+) and human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2-) [2]. At the moment, first-line therapy for locally advanced or metastatic HR+/HER2- breast cancer is a combination of cyclin-D dependent kinase 4 and 6 (CDK4/6) inhibitors and endocrine therapy due to better clinical outcomes [3–5]. Registered CDK4/6 inhibitors are palbociclib (PAL), ribociclib (RIB), and abemaciclib (ABE), which are used in combination with letrozole (LET), anastrozole (ANA) or fulvestrant (FUL).

Even though their introduction into breast cancer therapy significantly improved clinical outcomes, treatment involving CDK4/6 inhibitors is still challenging due to the exhibition of a wide range of

adverse effects. The most common serious adverse effects of these drugs are neutropenia, leukopenia, QTc prolongation, and hepatotoxicity, which can lead to dose reduction/interruption, drug cycle delay or permanent discontinuation, and subsequent therapy failure [6].

This can be overcome by therapeutic drug monitoring (TDM), as TDM-guided dosing is useful in improving clinical outcomes and reducing adverse effects for many anticancer drugs. Optimal drug candidate for TDM has a narrow therapeutic window, high interindividual, and low intraindividual pharmacokinetic variability, adherence problems, and unpredictable dose-exposure relationship [7,8]. Therefore, CDK4/6 inhibitors are good candidates for TDM. However, a prerequisite for TDM development is a validated, sensitive, and selective analytical method capable of detecting very low drug concentrations in complex biological samples in routine analysis [9].

To this moment, several LC-MS methods have been reported for the

* Corresponding author at: University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Analysis, 10000 Zagreb, Croatia.
E-mail address: miranda.sertic@pharma.unizg.hr (M. Sertić).

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464698>

Received 28 September 2023; Received in revised form 24 January 2024; Accepted 29 January 2024

Available online 3 February 2024

0021-9673/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

determination of individual CDK4/6 inhibitors [10–15], a combination of PAL, RIB, and LET [16,17], CDK4/6 inhibitors with hormone therapy, as well as ABE or LET metabolites [18–22], ANA and LET [23], or all three CDK4/6 inhibitors [20,24,25]. There is also one electrochemical method for ABE [26]. Interestingly, methods for the determination of ANA and FUL, both of which are present in the lowest concentrations in patient plasma, are rarely reported. Also, some of these methods are developed on rat or mouse plasma and are thus not applicable to TDM. Only three LC-MS methods have been reported capable of detecting all six drugs in human plasma [27–29]. However, the method published by Sato et al. exhibits a significant, unresolved carry-over effect and was also not applied to real samples of all analytes of interest. Work published by Turković et al. includes an LC-MS method suitable for TDM, but it uses a Q-TOF detector which is less common in clinical practice. One recent work included an LC-MS method suitable for human plasma, but it exhibited problems with FUL having either low extraction recovery or strong ion suppression and signal instability [29].

Furthermore, most existing methods used only simple protein precipitation (PPT) while some methods employed SPE [10,12,14,15,23,29]. PPT is not a selective technique, which might pose an issue with more complex plasma matrices, while on the other hand, SPE requires costly, single-use sorbent cartridges. Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) is an increasingly used sample preparation technique with high extraction efficacy and selectivity, extremely low solvent consumption, short extraction times, and environmental friendliness [30]. It is based on a ternary solvent system composed of a sample, an extraction solvent, and a disperser solvent which increases the surface area at which the extraction occurs. Recently, we have published different DLLME modes for the six drugs investigated, but these modes have not yet been applied in any other analytical method [31].

On the other hand, capillary electrophoresis (CE) is rarely used for TDM despite the notable advantages over LC such as higher separation efficacy, cheaper and greener analysis due to the lower solvent usage, waste generation, and sample consumption [32,33]. A common drawback of the CE technique is its lower sensitivity, which can be overcome by coupling with mass spectrometry (MS). Only a few studies reported the employment of DLLME together with CE-MS and online pre-concentration techniques for various samples to yield superior analytical performance, simplicity, economic and environmental perspectives [34–38].

With this in mind, the aim of this work was to develop a fast, green, selective, and sensitive method for the determination of LET, ANA, PAL, RIB, ABE, and FUL in human plasma by sweeping MEKC-MS/MS. In addition, a highly efficient combination of PPT and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) with CE-MS is suggested.

To the best of our knowledge, this is the first CE-MS and MEKC method for the determination of any of the six drugs of interest, and also the first CE method for the analysis of these drugs in biological samples. This work also presents a rare instance of MEKC-MS/MS method development involving an Agilent Jet Stream electrospray ionization source, further contributing to the literature on this topic.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

LC-MS grade methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), isopropanol (i-PrOH), and ethanol (EtOH) were purchased from Carlo Erba Reagents (Milano, Italy). Chloroform (CLF) was obtained from Honeywell Research Chemicals (Wabash, IN, USA). Tetrahydrofuran (THF) was purchased from MilliporeSigma (Burlington, MA, USA). Formic acid for MS was obtained from Carlo Erba Reagents (Milano, Italy). Ammonium hydroxide (25 %) was purchased from Alkaloid (Skopje, North Macedonia). Pentadecafluorooctanoic acid (PFOA) was purchased from Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA). Ultrapure water

(conductivity 0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$) used in this work was purified by a Merck Millipore Milli-Q IQ 7015 system (Darmstadt, Germany). Standards of PAL, RIB, ABE, d_{12} -ANA, d_4 -PAL, and d_3 -FUL (purity > 98 %) were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). The standards of ANA and LET (purity > 98 %) were purchased from Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan), while the standard of FUL (purity > 97 %) was purchased from MilliporeSigma (Burlington, MA, USA). Structures of the analytes and isotopically labelled internal standards are shown in Supplementary Figure S1.

2.2. Standard solutions

Stock solutions of LET, ANA, RIB, ABE, and FUL were prepared in MeOH at 0.5 mg/mL, while the stock solution of PAL was prepared in water with 0.1 % formic acid at 0.5 mg/mL. Stock solutions of d_{12} -ANA, d_4 -PAL, and d_3 -FUL were prepared in MeOH at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. All stock solutions were stored at 4 °C and were freshly used. In these conditions, stock solutions were found to be stable for at least 2 months.

Working standard solutions were prepared immediately before injection by dilution of the appropriate volumes of stock solutions of LET, ANA, PAL, RIB, ABE, and FUL with MeOH and water to obtain a MeOH-water (32:68, v/v) mixture of all the analytes of a required concentration. Solutions of all the analytes of interest at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were used for the optimization of the MEKC and MS parameters, respectively.

Running buffer was prepared by dissolving PFOA in a mixture of MeOH and water, followed by titration with 5 M NH_4OH to yield ammonium perfluorooctanoate (APFO) at apparent pH 10.50 with the final composition of 32:68 (v/v) MeOH-water.

2.3. Instrumentation

MEKC-MS/MS experiments were performed on a Capillary Electrophoresis 7100 system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled to a 6470 triple quadrupole mass spectrometer with Agilent Jet Stream electrospray ionization (AJS-ESI) source (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Sheath liquid was delivered to the sprayer using an Agilent 1260 infinity II series isocratic pump equipped with a 1:100 flow splitter (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For data acquisition and analysis, MassHunter workstation software version 10.1 was used (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Microsoft Office 365 Excel (Redmond, WA, USA) and GraphPad Prism 8 (Boston, MA, USA) were used for data analysis and visualization.

2.4. MEKC conditions

Before the first use, new capillaries were conditioned by rinsing with 1 M NaOH for 30 min, water for 30 min, and running buffer for 30 min. Daily conditioning was performed by rinsing with 5 M NH_4OH for 5 min, water for 5 min, and equilibration with a running buffer for 20 min. Between runs, the capillary was equilibrated with a running buffer for 5 min and the capillary tip was briefly inserted into a water vial before injection to achieve better reproducibility. At the end of each day, the capillary was flushed with water for 20 min and stored in water until the next usage. Running buffers were replaced every three runs.

Separations were performed on an uncoated fused-silica capillary with a 50 μm internal diameter, and a total length of 75 cm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The separation voltage was 25 kV, and the capillary temperature was 30 °C. Samples were hydrodynamically injected for 60 s at 50 mbar. During the analysis, an additional hydrodynamic pressure of 70 mbar was applied.

2.5. MS conditions

The mass spectrometer operated in positive ESI mode with multiple reaction monitoring (MRM). The selected transitions, corresponding

optimized collision energies, and optimized fragmentor voltages are shown in Supplementary Table S1, while the exemplary MS spectra for all analytes are given in Supplementary Figures S2–10. AJS parameters were sheath gas temperature 250 °C, sheath gas flow 5 L/min, and nozzle voltage 2000 V. The sheath liquid was composed of 70 % MeOH in water with 0.2 % formic acid and delivered to the sprayer at a rate of 10 µL/min. ESI parameters were as follows: gas temperature 350 °C, gas flow 9 L/min, nebulizer pressure 12 psi, and capillary voltage 2500 V. To prevent capillary current instability, nebulizer pressure was programmed to 1 psi during the injection phase.

2.6. Plasma collection and preparation

Venous blood from healthy volunteers (drug-free) and from patients (treated with breast cancer drugs of interest) was collected in tubes with K₂-EDTA anticoagulant. Plasma, collected after centrifugation at 1500 g for 10 min, was stored at –18 °C. Before any experiments, plasma was thawed at room temperature for 20 min. Informed consent was collected from all donors. The research was approved by the Ethics Committee of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (approval number 251–62–03–19–30) and by the Ethics Committee of University Hospital Centre Zagreb (approval number 02/21-JG).

2.7. Sample preparation

Spiked plasma samples were prepared by the addition of working standard solutions of the analytes to drug-free plasma in the volume ratio plasma:standard = 9:1. In 150 µL of spiked plasma samples or patient plasma samples, 10 µL of stock solution containing d₁₂-ANA, d₄-PAL, and d₃-FUL was added. Then, 590 µL of ACN was added for PPT to occur. The samples were vortexed for 10 s and centrifuged at 4300 g for 5 min. After that, 700 µL of clear supernatant was collected and evaporated to dryness using Eppendorf Concentrator Plus (Hamburg, Germany). Dry residues after PPT were dissolved in 100 µL of water. DLLME was performed by adding 50 µL of i-PrOH and 100 µL of CLF, vigorously mixing with a pipette tip ten times, and vortexing for 10 s. After 5 min of centrifugation at 4300 g the whole bottom layer was collected and evaporated to dryness. Before the analysis, the dry residue was dissolved in 25 µL of MeOH-water (32:68, v/v).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the MEKC conditions

While not all analytes are completely neutral at the basic pH, there is also no single pH value where all six analytes have different enough electrophoretic mobilities required to conduct capillary zone electrophoresis. Therefore, MEKC was a technique of choice to separate the analytes. Separation in MEKC is achievable due to the analytes' different partitioning between the pseudo-stationary phase of negatively charged APFO micelles and the bulk running buffer.

Since all six drugs are poorly soluble in water, an organic solvent needs to be added to the background electrolyte (BGE) to prevent precipitation inside the capillary. Our previous experience shows that MeOH is a good solvent for these analytes [27]. Therefore, the starting composition of BGE was 30:70 (v/v) MeOH-APFO in water solution. Parameters optimized for MEKC separation were pH of the BGE, APFO concentration, the qualitative and quantitative composition of the organic modifier added to the BGE, additional hydrodynamic pressure during the analysis, injection time, capillary temperature, and separation voltage. Optimal parameters were selected based on the resolution between analytes and the total analysis time.

3.1.1. Optimization of the pH of the BGE

Firstly, the effect of pH was investigated in the range of 9.00 to 10.50. In the case of completely neutral analytes in MEKC, pH should not

show a significant effect because it does not affect partitioning between the pseudo-stationary phase and the bulk solution. However, in our case, ABE, PAL, RIB, and FUL are not completely uncharged in the investigated pH range, and therefore pH affects their partitioning coefficients as well as their inherent electrophoretic mobilities. This explains why the resolutions and analysis time changed significantly with the increasing pH. The best results were obtained at pH values of 10.25 and 10.50 (Supplementary Figure S11). Because of ambiguous results for resolutions between different analytes, the lowest resolution (between RIB and ABE) was chosen as the decisive factor. Since the resolution between RIB and ABE was slightly better at pH 10.50, that condition was chosen as the optimal. Also, migration times were shorter at pH 10.50, further supporting the decision. Further increase in pH might improve the separation even more, but this was avoided because pH 10.50 is already on the upper limit of ammonia buffer capacity and a further increase of pH might decrease the stability of the BGE pH, worsening the reproducibility.

3.1.2. Optimization of the APFO concentration

The effect of the APFO concentration was investigated in the range of 75 to 150 mM. The critical micellar concentration (CMC) of APFO is around 25 mM in water [39,40]. On the other hand, preliminary experiments showed that even an APFO concentration of 50 mM is not enough for complete micelle formation in a MeOH-water mixture. The reason might be that organic modifiers added to the BGE, especially in greater amounts needed for sufficient solubility of the analytes, interfere with micelle formation, and effectively increase the CMC. The optimal results in terms of resolutions were obtained when the APFO concentration was 125 mM (Supplementary Figure S12). Further increase of APFO concentration yielded capillary currents higher than 50 µA - the upper recommended limit for most CE-MS systems.

3.1.3. Optimization of the composition of the BGE and the hydrodynamic injection

The quantitative composition of the BGE was tested with MeOH as the organic modifier in the range of 20 to 40 %. Optimal resolutions were achieved when BGE was 32:68 (v/v) MeOH-APFO in water solution (Supplementary Figure S13). Experiments with 40 % MeOH showed deteriorated resolutions, possibly due to interferences with the micelle formation as explained above. Addition of different organic modifiers - ACN, EtOH, i-PrOH, and THF to MeOH was tested. The overall quantitative composition of the organic phase in the BGE was kept at 32%, while varying the volume ratios of the additional solvent to MeOH. A comigration of the analytes was observed when solvents other than MeOH were used, especially ACN and THF.

Furthermore, additional hydrodynamic pressure during the analysis was investigated in the 0 to 100 mbar range. Experiments showed that an increase in hydrodynamic pressure up to 70 mbar yielded shorter analysis times without compromising the separation. Thus, an additional pressure of 70 mbar was applied in each analysis.

3.1.4. Optimization of the capillary temperature and the separation voltage

Capillary temperature and separation voltage were studied in the ranges of 20 to 30 °C and 20 to 25 kV, respectively. The capillary temperature was not tested above 30 °C to avoid a temperature gradient along the capillary due to the fact that in the CE-MS system, a part of the capillary is outside the CE instrument, and thus is not completely in a temperature-regulated environment. Separation voltages above 25 kV yielded capillary currents above the recommended 50 µA and were thus not considered. Both capillary temperature and voltage showed only minor effects on the resolution and migration times. Therefore, 30 °C and 25 kV were selected for further experiments to prevent Joule's heating and long analysis time (Supplementary Figures S14–15).

3.1.5. Optimization of the sweeping on-line sample preconcentration

Further improvements in the separation and sensitivity of the

method can be achieved with on-line sample preconcentration techniques. Sweeping is one of these techniques, often used in MEKC, where neutral and hydrophobic analytes are concentrated. It is based on the accumulation of the analytes in a narrow zone when the micelles from the BGE migrate towards the sample zone, which is similar in composition to the BGE but does not contain micelles. This way, a larger sample volume can be injected to gain sensitivity without a loss of separation efficacy, as opposed to a classical hydrodynamic injection, where the sample solvent is of the exact same composition as the BGE. Therefore, in this study, the samples were dissolved in 32:68 (v/v) MeOH-water without APFO. Sweeping was optimized by investigating injection time in the 15 to 80 s range at a 50 mbar hydrodynamic pressure. The sensitivity of the method increased with injection time until 60 s. Further increase in injection time resulted in worse separation. Therefore, 60 s injection at 50 mbar was chosen as optimal. According to the Hagen-Poiseuille equation, this corresponds to the injection volume of 68.7 nL (approximately 1.2 % of capillary volume). To quantify the gain in sensitivity with sweeping compared to the classical hydrodynamic injection, sensitivity enhancement factors based on peak heights (SEF_{height}) were calculated using the following equation [41]:

$$SEF_{\text{height}} = \frac{\frac{\text{peak height under sweeping injection}}{\text{analyte concentration in sweeping injection}}}{\frac{\text{peak height under hydrodynamic injection}}{\text{analyte concentration in hydrodynamic injection}}}$$

When comparing sweeping (60 s at 50 mbar) and classical hydrodynamic injection (5 s at 50 mbar), SEF_{height} values of 252, 207, 10.3, 173, 117, and 209 were obtained for LET, ANA, PAL, RIB, ABE, and FUL, respectively. These values represent remarkable sensitivity enhancement crucial for the detection of extremely low drug concentrations. This proves that sweeping is a good strategy to increase the sensitivity of MEKC methods without the loss of separation efficacy even for closely migrating analytes.

3.2. Optimisation of the MS/MS conditions

MS/MS conditions were optimized using MRM in the positive ESI mode. Protonated molecular ion $[M + H]^+$ was the most abundant parent ion for each analyte. For each analyte's parent ion, two product ion transitions were selected. The most intense transition was used as the quantifier ion (Q), and the other transition, as specific as possible for the given analyte, was used as a qualifier ion (I). Time segments with different monitored transitions were set for different analytes. The dwell time for each analyte was set to achieve a cycle time of 500 ms in each segment, thus ensuring enough data points per peak. Fragmentor voltages for each analyte as well as collision energies and collision cell accelerator voltages for each transition were optimized through the direct infusion of each analyte without the CE to obtain the maximal MS response.

The ion source parameters were optimized with the developed MEKC-MS/MS method, since some ion source parameters can also affect separation, while the electrophoretic conditions can affect analyte ionization in the source. Usually, classical ESI parameters like the drying gas flow rate and temperature, capillary voltage, and nebulizer pressure are optimized. In this case, since AJS-ESI was used, additional parameters like the sheath gas flow rate, temperature, and nozzle voltage were also optimized. Moreover, the sheath liquid qualitative and quantitative organic composition, the concentration of formic acid in the sheath liquid as well as the sheath liquid flow rate were optimized. Optimal parameters were selected based on the signal intensities of the analytes.

3.2.1. Optimization of the AJS-ESI parameters

AJS-ESI uses superheated nitrogen gas to confine the nebulizer spray which improves ion desolvation, thus enhancing sensitivity compared to the regular ESI source. This feature is mostly used in LC-MS systems, where higher flow rates are used, than in MEKC-MS/MS systems. Therefore, literature on AJS-ESI coupled with MEKC is scarce, with only

one work reporting a detailed optimization of the MEKC-AJS-ESI-MS/MS parameters [41]. This paper has reported that AJS-ESI parameters affected sensitivity significantly more than classical ESI parameters. Therefore, first, the sheath gas temperature was investigated in the range of 75 to 250 °C while keeping the sheath gas flow and nozzle voltage at 5 L/min and 2000 V. The sheath gas temperature of 75 °C yielded poor reproducibility of the signals. The optimal sensitivities for all analytes were obtained at 250 °C except for LET, whose optimal sensitivity was observed at 150 °C (Supplementary Figure S16). Nevertheless, the sensitivity of LET was acceptable at 250 °C. Therefore, experiments were continued with a sheath gas temperature set to 250 °C. This is contrary to previous findings that low sheath gas temperature favors ionization. While it is true that lower sheath gas temperature decreases the thermal confinement zone of superheated nitrogen, which might act as the electric insulator for the ions, it is worth noting that the thermal confinement zone depends on the sheath gas flow rate too. Next, the sheath gas flow rate was studied in the 3 to 11 L/min range. The best sensitivity for all the analytes was obtained at the sheath gas flow rate of 5 L/min (Supplementary Figure S17). Thus, in our case, a relatively higher sheath gas temperature of 250 °C and a lower sheath gas flow rate of 5 L/min proved to be optimal. This suggests that the insulating effect of the thermal confinement zone depends on all AJS-ESI parameters, as well as the ion charge and ion abundance. Therefore, different approaches in the optimization of AJS-ESI parameters in MEKC-MS/MS systems should be investigated on a case-by-case basis. Finally, nozzle voltage was tested in the range of 0 to 2000 V. An increase of the nozzle voltage to 2000 V enhanced the sensitivity for a full order of magnitude (Fig. 1). This dramatic improvement might be explained by the effect of the additional voltage applied to the tip of the capillary in overcoming the previously mentioned electric insulation effect of the superheated nitrogen. It is worth noting that the nozzle voltage is especially helpful in MEKC-MS since neutral compounds, mostly analyzed with this technique, have lower ionization rates anyway. Our study confirms previously reported results [41] that ion drying is not critical at low flow rates such as 1–15 $\mu\text{L}/\text{min}$ mostly used in CE-MS and that high nozzle voltage in combination with either low sheath gas flow rate or low sheath gas temperature benefits CE-MS systems the most.

3.2.2. Optimization of the sheath liquid

Since the flow rate in the CE capillary is insufficient for the formation of a stable spray for most ion sources, the co-axial sheath liquid interface was used in this study. Sheath liquid helps in the formation of a stable spray, but as a trade-off, it dilutes the analytes coming from the CE system. Therefore, the composition of the sheath liquid, as well as its flow rate, was investigated to achieve optimal sensitivity. The qualitative composition of the sheath liquid was optimized by mixing ACN, MeOH, EtOH, or *i*-PrOH with water and formic acid in a ratio of 50/49.9/0.1 (v/v/v). MeOH and *i*-PrOH showed similar signal intensities, with MeOH being slightly better (Supplementary Figure S18). EtOH and ACN caused lower signal intensities, with the LET signal being attenuated when ACN was used. Therefore, MeOH was chosen as the optimal organic solvent. Then, the quantitative composition of the sheath liquid was tested with 50–80 % MeOH in water with 0.1 % formic acid. Signal intensities increased with increasing MeOH composition until 80 %, when the baseline significantly deteriorated (Supplementary Figure S19). Thus, 70 % MeOH in water was considered in further experiments. Next, the ratio of formic acid in 70 % MeOH was investigated in the range from 0 to 0.5 %. Sheath liquid with no formic acid showed good sensitivity, but low reproducibility. Besides that, the effect of different formic acid concentrations in the sheath liquid on signal intensities was not significant. Nevertheless, sheath liquid with 0.2 % formic acid yielded somewhat better sensitivity (Supplementary Figure S20). Finally, the sheath liquid flow rate was tested in the 2–12 $\mu\text{L}/\text{min}$ range. Optimal sensitivity was obtained when sheath liquid was delivered to the nebulizer at the rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Supplementary Figure S21).

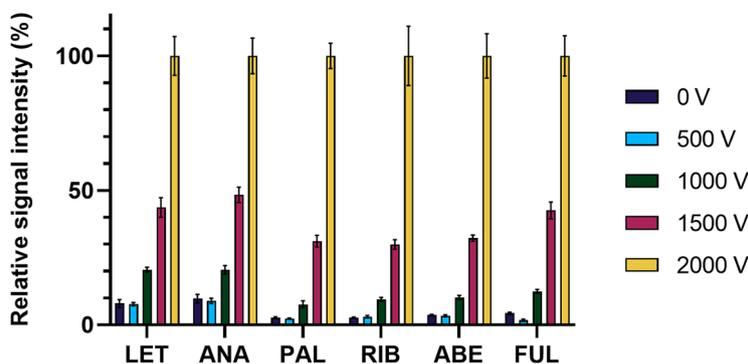


Fig. 1. Effect of nozzle voltage on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$).

In the end, classical ESI parameters were tested as follows: drying gas temperature 200–350 °C, drying gas flow rate 5–11 L/min, nebulizer pressure 6–14 psi, and capillary voltage 2000–4000 V (Supplementary Figures S22–25). Optimal ESI parameters are described in Section 2.5. The mass electropherogram of the analytes under the optimized MEKC-MS/MS conditions is shown in Fig. 2.

3.3. Sample preparation

Since human plasma contains a wide range of different compounds, some of which can significantly complicate the analysis due to extensive matrix effects or instrument incompatibility, extensive sample preparation is often needed. Proteins are plasma components that disable analysis on most instruments due to their precipitation in organic solvents. Therefore, PPT is usually performed beforehand. In previous studies on the analytes of interest, PPT was performed using ACN, MeOH, ACN-MeOH mixture, acetone, 70 % perchloric acid, or 4 M ammonium sulfate [27,28,31]. ACN and acetone resulted in good precipitation of proteins with high recoveries of the analytes. However, the sample treated with acetone showed greater foaming, resulting in difficult sample handling. Also, volume ratios of the PPT agent to plasma 4:1 and 10:1 were tested, and 4:1 was shown to be better in the case of acetonitrile. In this work, PPT was carried out by the addition of 600 μ L ACN in 150 μ L of plasma. After vortexing and centrifugation, 700 μ L of the supernatant was collected, evaporated to dryness, and dissolved in 32:68 (v/v) MeOH-water. Samples prepared this way were successfully analyzed by the developed method, but the reproducibility of the responses as well as the electric current stability were not satisfactory. This may be due to leftover complex plasma matrix components adhering to

the walls of the capillary over the analytical run, as well as causing inconsistent matrix effects. Evidently, an additional sample purification step was needed. In our previous work, we developed three DLLME modes for the analysis of the six drugs of interest in plasma samples [31]. The best overall recoveries were achieved using “aqueous-sample DLLME” (AqS-DLLME), a method that required very low volumes of sample and hazardous solvents as well as no additional costly equipment, therefore it was tested for this application as well, following PPT and solvent evaporation. In the original work, AqS-DLLME was performed by dissolution of the dry residue after PPT in 100 μ L of water. Then, the extraction mixture composed of 50 μ L i-PrOH and 100 μ L CLF was added, and the mixture was vigorously stirred. After centrifugation, the whole bottom layer was collected, evaporated to dryness, and the dry residue was dissolved in 40 μ L of 65 % v/v MeOH before the analysis. Other organic solvents were also tested as dispersers and extractants, but CLF and i-PrOH resulted in the best recoveries (84.63 – 96.61 %) and greenness of the method. Therefore, in this work, a DLLME mixture of 50 μ L i-PrOH and 100 μ L CLF was also used. Before the analysis, the dry residue after DLLME was dissolved in 25 μ L of MeOH-water (32:68, v/v). This way, because 150 μ L of plasma had been used in PPT, a pre-concentration of the analytes by a factor of 6 was obtained. Relatively low amounts of sample solvent can be used because the CE instrument injects only nanoliters of the sample, ensuring that enough sample will be left in the vial even if multiple injections of the same sample are needed. A detailed overview of the full sample preparation procedure is shown in Fig. 3.

Analyses were performed at low, medium, and high concentration levels in triplicates, and mean recoveries are reported in Table 1. The obtained recoveries and relative standard deviations (RSDs) were excellent, showing that PPT followed by AqS-DLLME is the optimal sample preparation in our case.

3.4. Method validation

The developed method was fully validated according to the ICH and EMA guidelines on bioanalytical method validation with respect to selectivity, specificity, matrix effect, linearity and calibration range, accuracy and precision, carry-over, and stability [42]. Quality control (QC) samples used in accuracy and precision experiments were prepared at four concentration levels: lower limit of quantification (LLOQ), low, medium, and high QC. Matrix effect and stability were tested on low and high concentration levels.

The use of internal standards (IS) is recommended by all guidelines on bioanalytical methods and their absence must be justified. Deuterated compounds as internal standards can greatly improve the analytical performance of the method, but on the other hand, are usually highly priced and as such not available to everyone. To reduce the economic burden of the method and to increase its greenness, an approach with fewer internal standards was investigated. Due to the structural similarity and the fact that the analytes migrate closely, which in turn

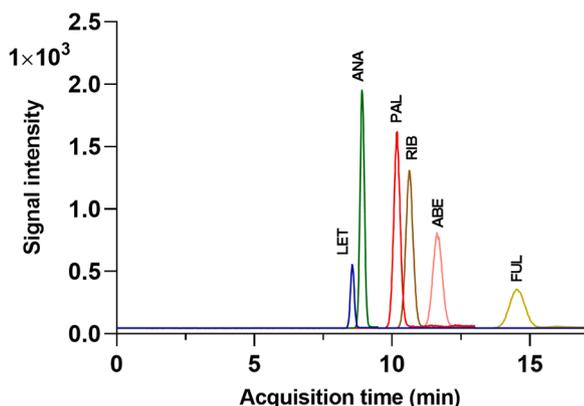


Fig. 2. The mass electropherogram of the six analytes under optimized MEKC-MS/MS conditions (2.5 μ g/mL LET, ANA, PAL, and RIB, 5 μ g/mL ABE, and FUL. Electrophoretic conditions: 125 mM APFO at pH of 10.5 in 32 % MeOH, 25 kV, 30 °C, 70 mbar pressure. Sheath liquid: 70 % MeOH with 0.2 % formic acid at 10 μ L/min).

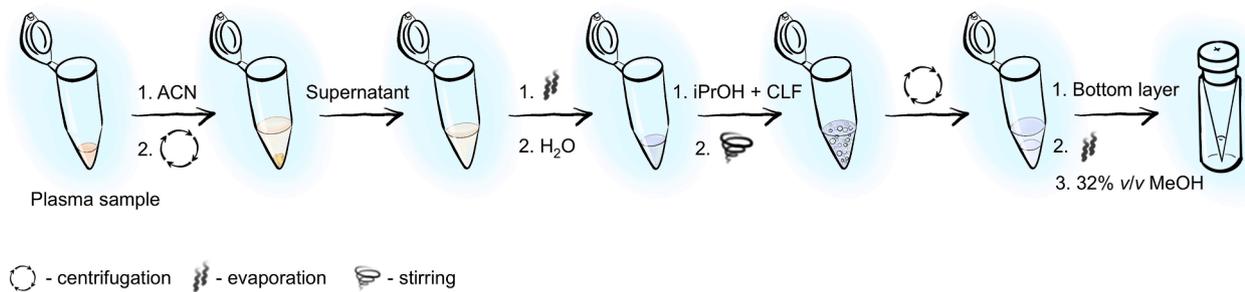


Fig. 3. A detailed overview of the full sample preparation procedure involving PPT followed by the AqS-DLLME.

Table 1

Mean recoveries and corresponding RSD values after PPT-DLLME sample preparation ($n = 3$ per concentration level).

Analyte	Concentration (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Analyte	Concentration (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
LET	75	99.0	13.0	RIB	1250	97.9	7.4
	112.5	95.1	4.3		1875	96.3	7.4
	300	94.3	8.6		5000	89.4	1.1
ANA	50	100.4	0.9	ABE	125	97.7	17.3
	75	95.9	0.5		187.5	104.5	11.0
	200	97.9	0.2		500	104.9	2.2
PAL	75	100.1	2.3	FUL	25	101.7	2.5
	112.5	95.0	2.0		37.5	99.3	2.2
	300	99.6	1.0		100	98.6	3.3

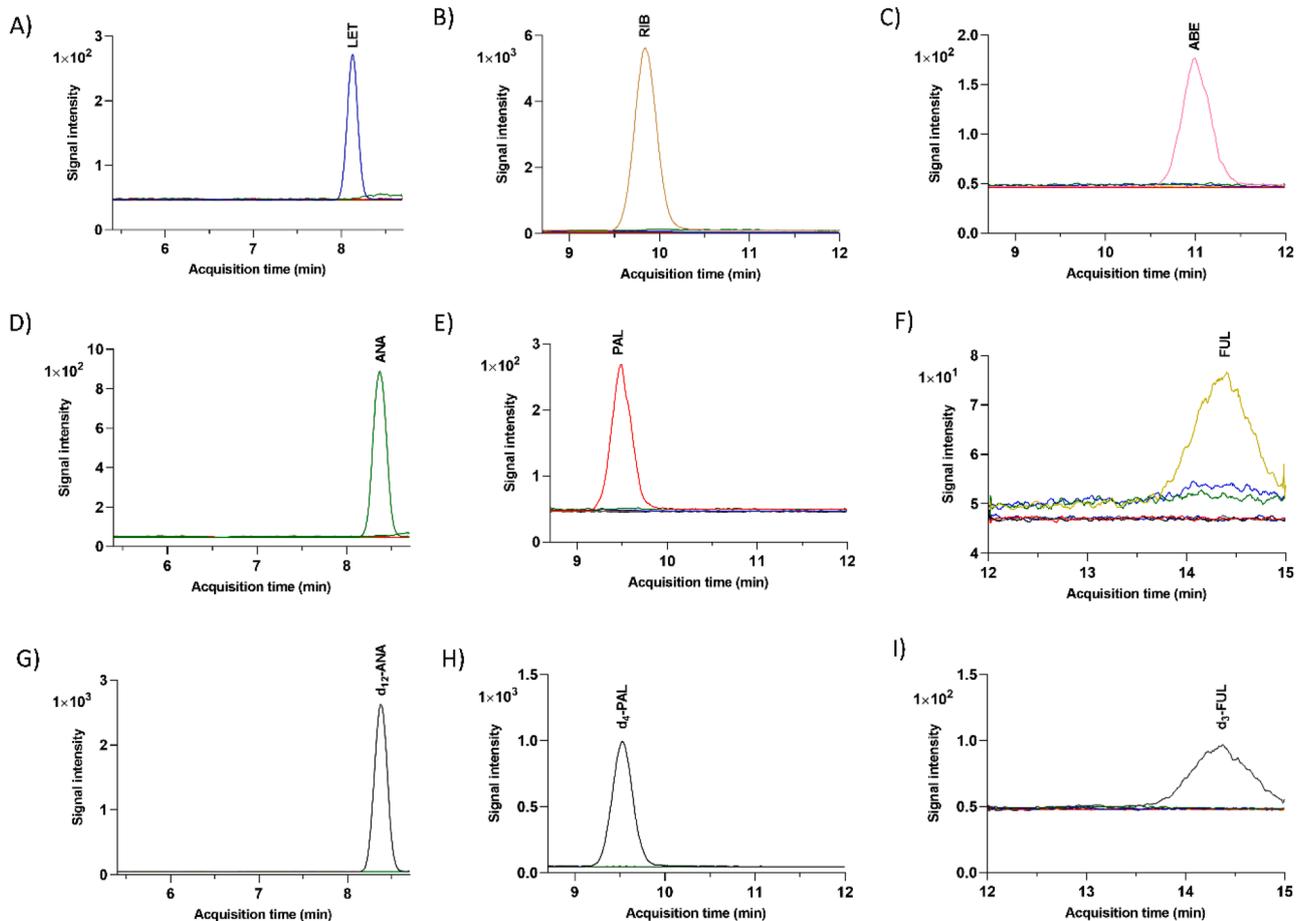


Fig. 4. Overlaid extracted ion chromatograms (EIC) of each analyte at the LLOQ concentration level and six blank plasmas at the quantifier m/z transitions. A) LET, B) RIB, C) ABE, D) ANA, E) PAL, F) FUL, G) d_{12} -ANA, H) d_4 -PAL, I) d_3 -FUL.

Table 2
Calibration curves and linear regression parameters for all analytes.

Analyte	Intra-day ¹			Inter-day ²			
	Slope	RSD (%)	Intercept	Slope	RSD (%)	Intercept	R
LET	0.002183	2.7	0.021475	0.002542	7.1	-0.019160	0.9802–0.9984
ANA	0.013070	2.5	0.031543	0.015383	5.5	0.016949	0.9945–0.9997
PAL	0.006415	2.3	0.005510	0.007257	3.4	0.003132	0.9941–0.9994
RIB	0.008335	7.5	-0.147830	0.009393	5.8	1.127633	0.9890–0.9984
ABE	0.003744	8.9	-0.019960	0.004096	8.7	0.014977	0.9922–0.9989
FUL	0.031343	1.8	0.094573	0.045093	2.4	0.10633	0.9966–0.9991

$N = 6 - 9$ calibration points per each curve. ¹ Intra-day was calculated from three calibration curves on the same day. ² Inter-day was calculated from six calibration curves in four days.

ensures a similar matrix effect, some internal standards can be used for the correction of noncorresponding analytes. In this work, d_{12} -ANA was used for LET and ANA, d_4 -PAL was used for PAL, RIB, and ABE, and d_3 -FUL was used for FUL. From the accuracy and precision evaluation (Table 4), it can be seen that ANA, PAL, and FUL showed somewhat better general accuracy and precision due to the presence of the corresponding deuterated counterparts. Nevertheless, the accuracy and precision of LET, RIB, and ABE were also satisfactory.

3.4.1. Selectivity, specificity, and carry-over

The selectivity of the method was determined by using plasma from six different sources, including highly lipemic and hemolyzed plasma. The signal intensities of any interfering compounds at the migration times of the analytes were not greater than 20 % of the analyte at the LLOQ level and 5 % of the internal standard intensities (Fig. 4). Since there are no metabolites or degradation products with the same molecular masses as the analytes, the method is also highly specific, because of the MRM mode. MRM transitions with corresponding fragmentor voltages and collision energies are given in Supplementary Table S1. Finally, signal intensities in a blank sample following the injection of the highest calibration standard were not greater than 20 % of the analyte and 5 % of the internal standard intensities at the LLOQ level, which means there is no significant carry-over.

3.4.2. Linearity and calibration range

The linearity of the method was tested over a calibration range of 30–300 ng/ml for LET, 20–200 ng/ml for ANA, 30–300 ng/ml for PAL, 500–5000 ng/ml for RIB, 50–500 ng/ml for ABE, and 10–100 ng/ml for FUL. The calibration ranges were set according to drug concentrations found in clinical studies, i.e. concentrations realistically expected in patient plasma samples. It should be pointed out that concentrations well below the LLOQ values of all the analytes could still be detected with our method since signal-to-noise ratios at the LLOQ levels were very high, as can be seen in Fig. 4. The calibration results are shown in Table 2. The calibration curves were constructed using linear regression with $1/x^2$ weighting and IS correction. The accuracy of the back-calculated concentrations was within 15 % (20 % for LLOQ) of the nominal concentrations for at least 75 % and a minimum of six calibration samples. Despite the relatively low inter-day RSD values of the slopes of the calibration curves, fresh calibration curves were prepared

Table 3
Mean matrix effects and corresponding RSD values for different plasma sources ($n = 3$ per concentration level and plasma source).

Analyte	Concentration (ng/mL)	ME (%)	RSD (%)	Analyte	Concentration (ng/mL)	ME (%)	RSD (%)
LET	75	-17.3	14.0	RIB	1250	20.3	10.6
	300	-1.4	11.9		5000	3.4	12.7
ANA	50	1.3	2.0	ABE	125	52.0	9.1
	200	0.0	3.2		500	1.2	8.2
PAL	75	0.4	2.2	FUL	25	11.8	1.6
	300	-0.9	3.1		100	-0.4	1.6

daily.

3.4.3. Accuracy and precision

Accuracy and precision were evaluated using QC samples prepared in quintuplicate at four concentration levels. The mean accuracy was expressed as the bias from the nominal concentration and the mean precision was expressed as RSD between measurements. Analytical biases were within ± 15 % and RSD values between measurements were less than 15 % (20 % for LLOQ). Results are given in Table 4.

3.4.4. Matrix effect

The matrix effect (ME) was evaluated using plasma from six different sources, including highly lipemic and hemolyzed. Each plasma was prepared in triplicate, spiked at the low and high concentration levels after the extraction, and compared with standard solutions at the same concentration levels. The matrix effect was expressed as mean accuracy bias (using the ratio of IS-corrected concentrations of the analyte in the sample matrix and the standard solution) according to the following equation:

$$ME (\%) = \left(\frac{\text{Found concentration of the analyte in sample matrix}}{\text{Found concentration of the analyte in standard solution}} - 1 \right) \cdot 100\%$$

Also, RSD values between different matrices were calculated. The matrix effects are shown in Table 3. The matrix effects were classified as negligible (absolute value of ME less than 10 %), soft (absolute value of ME between 10 and 20 %) medium (absolute value of ME between 20 and 50 %) and strong (absolute value of ME greater than 50 %) [41]. A more pronounced matrix effects for LET (soft), FUL (soft), RIB (medium), and ABE (strong) were observed at the low concentration level, but it was reproducible between different plasmas and thus does not represent an analytical problem. No significant matrix effects were observed at the high concentration level.

3.4.5. Stability

In the preliminary studies, stock solutions were found to be stable at $+4$ °C for at least 2 months. The stability of the analytes in the matrix must be presented as stability during the analytical run, freeze-thaw stability, long-term stability, and bench-top stability. However, in our previous work, we have demonstrated freeze-thaw (3 cycles thawing from -18 °C for 30 min), long-term (2 weeks at -18 °C), and bench-top

Table 4
Intra-day ($n = 5$) and inter-day ($n = 15$) accuracy and precision.

Analyte	Concentration (ng/mL)	Intra-day ($n = 5$)		Inter-day ($n = 15$)	
		Bias (%)	RSD (%)	Bias (%)	RSD (%)
LET	30	20.1	3.9	4.1	15.8
	75	9.3	12.4	0.7	11.4
	112.5	-8.6	3.6	-5.2	9.9
	300	8.7	9.2	0.9	9.6
ANA	20	6.6	6.3	2.7	8.3
	50	-1.6	4.1	-4.5	6.7
	75	-4.4	5.0	-5.1	3.7
	200	1.8	4.4	-1.2	6.7
PAL	30	-0.6	4.4	-1.7	6.5
	75	-2.9	3.6	-5.8	6.0
	112.5	-7.6	5.7	-6.7	4.1
	300	-0.9	4.5	-1.5	5.6
RIB	500	-3.1	11.1	0.8	15.1
	1250	0.2	12.6	5.1	10.9
	1875	-7.9	5.3	1.1	10.6
	5000	0.0	8.1	3.0	8.9
ABE	50	10.0	8.2	2.2	8.7
	125	9.0	11.8	0.0	12.1
	187.5	2.1	11.8	-5.7	11.1
	500	-3.5	9.2	-3.0	9.6
FUL	10	2.9	4.5	-2.2	9.7
	25	-4.7	4.4	-5.0	5.8
	37.5	-6.6	5.6	-5.1	4.8
	100	-7.1	4.5	-5.3	6.1

(2 h at 25 °C) stabilities for the same set of analytes and in the same matrix [27]. Therefore, only stability during the analytical run was investigated in this work since the CE instrument's autosampler does not cool the samples. For this, QC samples were prepared in triplicate at low and high concentration levels, placed on an autosampler at 25 °C, and analyzed at the zero time-point and after 10 h. The mean differences in found concentrations from the nominal concentration after 10 h and RSD values were all less than 15% at both concentration levels, proving the analytes' stability on the CE's autosampler (Table 5).

3.5. Application

The fully validated MEKC-MS/MS method was applied to the plasma samples of six women (ages 39 to 75, median 56.5 years) currently receiving treatment with a combination of CDK4/6 inhibitor (PAL, RIB,

or ABE) and endocrine therapy (LET, ANA, or FUL). Samples were analyzed against a freshly prepared calibration curve and the results are shown in Table 6, while mass electropherograms are presented in Supplementary Figures S26–31.

LET, ANA, and ABE are orally administered continuously – LET and ANA as single daily doses, and ABE twice a day. PAL and RIB are administered daily for 21 days following a week off treatment to improve tolerability. FUL is administered once a month as an intramuscular injection [43].

All six analytes were successfully determined in patients' plasma within the method's calibration range. The determined concentrations are in accordance with concentrations found in clinical studies [23, 44–48]. This demonstrates the suitability of the developed method for TDM.

Table 5
Sample stability results ($n = 3$ per concentration).

Analyte	Concentration (ng/mL)	Bias (%)	RSD (%)	Analyte	Concentration (ng/mL)	Bias (%)	RSD (%)
LET	75	-0.6	12.6	RIB	1250	-5.6	10.4
	300	-1.7	5.7		5000	-3.4	8.6
ANA	50	2.9	2.5	ABE	125	10.4	4.9
	200	-1.6	6.7		500	3.8	9.6
PAL	75	-3.9	2.2	FUL	25	5.9	7.3
	300	0.8	1.9		100	-0.8	6.2

Table 6
Determined drug concentrations in patient plasma samples.

Patient	CDK4/6 inhibitor (dose)	Determined concentration (ng/mL)	Endocrine agent (dose)	Determined concentration (ng/mL)
1	RIB (600 mg daily)	1323.69	LET (2.5 mg daily)	173.76
2	ABE (150 mg twice a day)	257.54	FUL (500 mg monthly)	16.64
3	ABE (150 mg twice a day)	304.94	LET (2.5 mg daily)	143.43
4	RIB (600 mg daily)	1209.75	ANA (1 mg daily)	45.72
5	PAL (125 mg daily)	92.06	FUL (500 mg monthly)	14.56
6	RIB (600 mg daily)	1000.38	ANA (1 mg daily)	43.05

4. Conclusion

In this work, a novel sweeping MEKC-MS/MS method for the determination of six breast cancer drugs was developed and validated. Excellent recoveries were obtained with a combination of PPT and AqS-DLLME. The developed method was applied to real patient plasma samples and all analytes were successfully determined, proving its suitability for TDM.

The method is compared with previously published methods (Supplementary Table S2). This is the first DLLME-CE-MS and MEKC method for the determination of any of the six drugs of interest and also the first CE method for the analysis of these drugs in biological samples. Also, this work presents further investigation of AJS-ESI source compatibility with MEKC-MS systems, which are seldom combined due to the complexity of the interface and rarely reported in the literature. Furthermore, it is the greenest method since it uses only 170 µL of solvent per analysis and injects only 68.7 nL of the sample. Therefore, due to numerous advantages, we propose this method for the development of TDM of these drugs as a superior alternative to previously reported LC-MS methods.

CRedit authorship contribution statement

Zvonimir Mlinarić: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Lu Turković:** Methodology, Validation, Writing – review & editing, Visualization. **Miranda Sertić:** Conceptualization, Methodology, Validation, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Miranda Sertić reports financial support was provided by Croatian Science Foundation. Miranda Sertić reports equipment, drugs, or supplies was provided by European Regional Development Fund.

Data availability

Data will be made available on request.

Funding

This work was supported by the Croatian Science Foundation (Grant numbers UIP-2019-04-8461 and DOK-2021-02-4995); European Regional Development Fund FarmInova (Grant number KK.01.1.1.02.0021).

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Biljana Nigović, PhD, for her valuable advice, manuscript revisions, and emotional support during CE-MS method development. We are sincerely grateful to Tajana Silovski, MD, PhD, for providing patient plasma samples used in this study.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.chroma.2024.464698](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464698).

References

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality

- Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209–249, <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [2] A.N. Shah, O. Metzger, C.H. Bartlett, Y. Liu, X. Huang, M. Cristofanilli, Hormone Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer in Young Women: emerging Data in the Era of Molecularly Targeted Agents, *Oncologist.* 25 (2020) e900–e908, <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0729>.
- [3] S.CHROMA464698-A. Im, Y.CHROMA464698-S. Lu, A. Bardia, N. Harbeck, M. Colleoni, F. Franke, L. Chow, J. Sohn, K.CHROMA464698-S. Lee, S. Campos-Gomez, R. Villanueva-Vazquez, K.CHROMA464698-H. Jung, A. Chakravarty, G. Hughes, I. Gounaris, K. Rodriguez-Lorenc, T. Taran, S. Hurvitz, D. Tripathy, Overall Survival with Ribociclib plus Endocrine Therapy in Breast Cancer, *N. Engl. J. Med.* 381 (2019) 307–316, <https://doi.org/10.1056/nejmoa1903765>.
- [4] R.S. Finn, M. Martin, H.S. Rugo, S. Jones, S.CHROMA464698-A. Im, K. Gelmon, N. Harbeck, O.N. Lipatov, J.M. Walshe, S. Moulder, E. Gauthier, D.R. Lu, S. Randolph, V. Diéras, D.J. Slamon, Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer, *N. Engl. J. Med.* 375 (2016) 1925–1936, <https://doi.org/10.1056/nejmoa1607303>.
- [5] S.R.D. Johnston, N. Harbeck, R. Hegg, M. Toi, M. Martin, Z.M. Shao, Q.Y. Zhang, J. L. Martinez Rodriguez, M. Campone, E. Hamilton, J. Sohn, V. Guarneri, M. Okada, F. Boyle, P. Neven, J. Cortés, J. Huober, A. Wardley, S.M. Tolaney, I. Cicin, I. C. Smith, M. Frenzel, D. Headley, R. Wei, B. San Antonio, M. Hulstijn, J. Cox, J. O'Shaughnessy, P. Rastogi, Abemaciclib Combined With Endocrine Therapy for the Adjuvant Treatment of HR+, HER2-, Node-Positive, High-Risk, Early Breast Cancer (monarchE), *J. Clin. Oncol.* 38 (2020) 3987–3998, <https://doi.org/10.1200/JCO.20.02514>.
- [6] M. Thill, M. Schmidt, Management of adverse events during cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6) inhibitor-based treatment in breast cancer, *Ther. Adv. Med. Oncol.* (2018) 10, <https://doi.org/10.1177/1758835918793326>.
- [7] A. Mueller-Schoell, S.L. Groenland, O. Scherf-Clavel, M. van Dyk, W. Huisinga, R. Michelet, U. Jaehde, N. Steeghs, A.D.R. Huitema, C. Kloft, Therapeutic drug monitoring of oral targeted antineoplastic drugs, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 77 (2021) 441–464, <https://doi.org/10.1007/s00228-020-03014-8>.
- [8] N. Widmer, C. Bardin, E. Chatelut, A. Paci, J. Beijnen, D. Levéque, G. Veal, A. Astier, Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two – Targeted therapies, *Eur. J. Cancer.* 50 (2014) 2020–2036, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.04.015>.
- [9] Z. Fang, H. Zhang, J. Guo, J. Guo, Overview of therapeutic drug monitoring and clinical practice, *Talanta* 266 (2024), <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124996>.
- [10] K. Habler, M. Vogeser, D. Teupser, An UHPLC-MS/MS method for quantification of the CDK4/6 inhibitor abemaciclib in human serum, *J. Mass Spectrom. Adv. Clin.* 24 (2022) 15–21, <https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2022.02.001>.
- [11] C.L. Braal, M.H. Lam, T. Rienks, C.J. van Tilborg, W. Heuts, J.B. Heijns, M.E.M. M. Bos, R.H.J. Mathijssen, P. de Bruijn, S.L.W. Koolen, Quantification of ribociclib in dried blood spots by LC-MS/MS: method development and clinical validation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 201 (2021) 114118, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114118>.
- [12] A. Kala, Y.T. Patel, A. Davis, C.F. Stewart, Development and validation of LC-MS/MS methods for the measurement of ribociclib, a CDK4/6 inhibitor, in mouse plasma and Ringer's solution and its application to a cerebral microdialysis study, *J. Chromatogr. B* 1057 (2017) 110–117, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.05.002>.
- [13] B. Llopis, P. Robidou, N. Tissot, B. Pinna, P. Gougis, F.C. Aubart, L. Campedel, B. Abbar, D.R. Weil, M. Uzunov, J. Gligorov, J.E. Salem, C. Funck-Brentano, N. Zahr, Development and clinical validation of a simple and fast UPLC-ESI-MS/MS method for simultaneous quantification of nine kinase inhibitors and two antiandrogen drugs in human plasma: interest for their therapeutic drug monitoring, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 197 (2021) 113968, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113968>.
- [14] B.B. Chavan, S. Tiwari, G. Shankar, R.D. Nimbalkar, P. Garg, R. Srinivas, M.V.N. K. Talluri, In vitro and in vivo metabolic investigation of the Palbociclib by UHPLC-Q-TOF/MS/MS and in silico toxicity studies of its metabolites, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 157 (2018) 59–74, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.05.008>.
- [15] F. Leenhardt, M. Gracia, C. Perrin, C. Muracciole-Bich, B. Marion, C. Roques, M. Alexandre, N. Firmin, S. Pouderoux, L. Mbatshi, C. Gongora, W. Jacot, A. Evrard, Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the quantification of CDK4/6 inhibitors in human plasma in a clinical context of drug-drug interaction, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 188 (2020) 113438, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113438>.
- [16] A.S. Poetto, B. Posocco, S. Gagno, M. Orleni, M. Zanchetta, V. Iacuzzi, G. Canil, M. Buzzo, M. Montico, M. Guardascione, D. Basile, G. Pelizzari, M. Alberti, L. Gerrata, F. Puglisi, G. Toffoli, A new dried blood spot LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of palbociclib, ribociclib, and letrozole in patients with cancer, *J. Chromatogr. B* 1185 (2021) 122985, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122985>.
- [17] B. Posocco, M. Buzzo, A.S. Poetto, M. Orleni, S. Gagno, M. Zanchetta, V. Iacuzzi, M. Guardascione, F. Puglisi, D. Basile, G. Pelizzari, E. Marangon, G. Toffoli, Simultaneous quantification of palbociclib, ribociclib and letrozole in human plasma by a new LC-MS/MS method for clinical application, *PLoS One* 15 (2020), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228822>.
- [18] A.Soledad Poetto, B. Posocco, M. Zanchetta, S. Gagno, M. Orleni, G. Canil, M. Alberti, F. Puglisi, G. Toffoli, A new LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of abemaciclib, its main active metabolites M2 and M20, and letrozole for therapeutic drug monitoring, *J. Chromatogr. B* 1207 (2022) 123403, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123403>.

- [19] M. Al-Shehri, M. Hefnawy, H. Abuelizz, A. Alzamil, M. Mohammed, N. Alsaif, A. Almezhia, H. Alkahtani, M. Abounassif, Development and validation of an UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of palbociclib, letrozole and its metabolite carbinol in rat plasma and pharmacokinetic study application, *Arab. J. Chem.* 13 (2020) 4024–4034, <https://doi.org/10.1016/j.ARABJC.2019.05.005>.
- [20] S.M. Burke, M. Kamal, A.K.L. Goey, Development and Validation of a Quantitative LC-MS/MS Method for CDK4/6 Inhibitors Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib, and Abemaciclib-M2 in Human Plasma, *Ther. Drug. Monit.* 45 (2023) 327–336. doi:10.1097/FTD.0000000000001063.
- [21] T. Margaryan, M. Elliott, N. Sanai, A. Tovmasyan, Simultaneous determination of LY3214996, abemaciclib, and M2 and M20 metabolites in human plasma, cerebrospinal fluid, and brain tumor by LC-MS/MS, *J. Pharm. Anal.* 12 (2022) 601–609, <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2022.05.003>.
- [22] A. Martínez-Chávez, M.M. Tibben, K.A.M. de Jong, H. Rosing, A.H. Schinkel, J. H. Beijnen, Simultaneous quantification of abemaciclib and its active metabolites in human and mouse plasma by UHPLC-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 203 (2021) 114225, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114225>.
- [23] B. Beer, B. Schubert, A. Oberguggenberger, V. Meraner, M. Hubalek, H. Oberacher, Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of tamoxifen, anastrozole, and letrozole in human plasma and its application to a clinical study, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1791–1800, <https://doi.org/10.1007/S00216-010-4075-Z/FIGURES/3>.
- [24] A. Martínez-Chávez, H. Rosing, M. Hillebrand, M. Tibben, A.H. Schinkel, J. H. Beijnen, Development and validation of a bioanalytical method for the quantification of the CDK4/6 inhibitors abemaciclib, palbociclib, and ribociclib in human and mouse matrices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 5331–5345, <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01932-w>.
- [25] J.M. Janssen, N. de Vries, N. Venekamp, H. Rosing, A.D.R. Huitema, J.H. Beijnen, Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for nine oral anticancer drugs in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 174 (2019) 561–566, <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2019.06.034>.
- [26] Z. Lei, M. Alwan, H.T.A. Alamir, H.H.C. Alkaaby, S.S. Farhan, S.A. Awadh, U. S. Altamari, H.F.A. Al-Baghdady, A.A. Kadhim, M.T. Qasim, A.H. Adhab, A. Nekuei, Detection of abemaciclib, an anti-breast cancer agent, using a new electrochemical DNA biosensor, *Front. Chem.* 10 (2022) 980162, <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.980162/BIBTEX>.
- [27] L. Turković, L. Bočkor, O. Ekpenyong, T. Silovski, M. Lovrić, S. Crnković, B. Nigović, M. Sertić, Development and Validation of a Novel LC-MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Abemaciclib, Palbociclib, Ribociclib, Anastrozole, Letrozole, and Fulvestrant in Plasma Samples: a Prerequisite for Personalized Breast Cancer Treatment, *Pharmaceuticals* 15 (2022) 614, <https://doi.org/10.3390/ph15050614>.
- [28] Y. Sato, K. Shigeta, T. Hirasawa, T. Sato, J. Ogura, M. Maekawa, A. Ebata, Y. Hamanaka, H. Tada, T. Ishida, M. Kikuchi, N. Mano, Establishment of an analytical method for simultaneous quantitation of CDK4/6 inhibitors, aromatase inhibitors, and an estrogen receptor antagonist in human plasma using LC-ESI-MS/MS, *J. Chromatogr. B* (2021) 1173, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122655>.
- [29] L. Turković, D. Mutavdžić Pavlović, Z. Mlinarić, A. Skenderović, T. Silovski, M. Sertić, Optimisation of Solid-Phase Extraction and LC-MS/MS Analysis of Six Breast Cancer Drugs in Patient Plasma Samples, *Pharmaceuticals* 16 (2023) 1445, <https://doi.org/10.3390/PH16101445/S1>.
- [30] A. Kamal El-Deen, H. Elmansi, F. Belal, G. Magdy, Recent advances in dispersion strategies for dispersive liquid-liquid microextraction from green chemistry perspectives, *Microchem. J.* 191 (2023) 108807, <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2023.108807>.
- [31] L. Turković, N. Koraj, Z. Mlinarić, T. Silovski, S. Crnković, M. Sertić, Optimisation of dispersive liquid-liquid microextraction for plasma sample preparation in bioanalysis of CDK4/6 inhibitors in therapeutic combinations for breast cancer treatment, *Heliyon*. 9 (2023). doi:10.1016/j.heliyon.2023.e18880.
- [32] M. Ranasinghe, J.P. Quirino, Can we replace liquid chromatography with the greener capillary electrophoresis? *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 31 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100515>.
- [33] Z. Mlinarić, L. Turković, I. Begović, B. Nigović, M. Sertić, Rapid Capillary Electrophoresis Method for Simultaneous Determination of Abemaciclib, Ribociclib, and Palbociclib in Pharmaceutical Dosage Forms: a Green Approach, *Molecules*. 27 (2022), <https://doi.org/10.3390/molecules27217603>.
- [34] C. Tejada-Casado, D. Moreno-González, F.J. Lara, A.M. García-Campana, M. del Olmo-Iruela, Determination of benzimidazoles in meat samples by capillary zone electrophoresis tandem mass spectrometry following dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1247 (2012) 212–219, <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2017.02.023>.
- [35] D. Moreno-González, L. Gámiz-Gracia, J.M. Bosque-Sendra, A.M. García-Campana, Dispersive liquid-liquid microextraction using a low density extraction solvent for the determination of 17N-methylcarbamates by micellar electrokinetic chromatography-electrospray-mass spectrometry employing a volatile surfactant, *J. Chromatogr. A* 1247 (2012) 26–34, <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2012.05.048>.
- [36] I. Kohler, J. Schappler, T. Sierro, S. Rudaz, Dispersive liquid-liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry for urine analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 73 (2013) 82–89, <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2012.03.036>.
- [37] G. D'Orazio, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, S. Fanali, M.Á. Rodríguez-Delgado, Estrogenic compounds determination in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction and micellar electrokinetic chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1344 (2014) 109–121, <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2014.04.005>.
- [38] J. Domínguez-Álvarez, Capillary electrophoresis coupled to electrospray mass spectrometry for the determination of organic and inorganic arsenic compounds in water samples, *Talanta* 212 (2020) 120803, <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.120803>.
- [39] C. Wang, P. Yan, H. Xing, C. Jin, J.CHROMA464698-X. Xiao, Thermodynamics of Aggregation of Ammonium/Tetraalkylammonium Perfluorooctanoates: effect of Counterions†, *J. Chem. Eng. Data*. 55 (2010) 1994–1999, <https://doi.org/10.1021/JE900916E>.
- [40] S. Kancharla, E. Canales, P. Alexandridis, Perfluorooctanoate in aqueous urea solutions: micelle formation, structure, and microenvironment, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019), <https://doi.org/10.3390/ijms20225761>.
- [41] D. Moreno-González, P. Jác, F. Švec, L. Nováková, Determination of Sudan dyes in chili products by micellar electrokinetic chromatography-MS/MS using a volatile surfactant, *Food Chem.* 310 (2020) 125963, <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125963>.
- [42] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH harmonised guideline Bioanalytical Method Validation M10, (2019). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf. (Accessed 17 January 2024).
- [43] C.L. Braal, E.M. Jongbloed, S.M. Wilting, R.H.J. Mathijssen, S.L.W. Koolen, A. Jager, Inhibiting CDK4/6 in Breast Cancer with Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib: similarities and Differences, *Drugs* 81 (2021) 317–331, <https://doi.org/10.1007/S40265-020-01461-2/TABLES/3>.
- [44] P. McCormack, F. Sapunar, Pharmacokinetic Profile of the Fulvestrant Loading Dose Regimen in Postmenopausal Women with Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer, *Clin. Breast Cancer* 8 (2008) 347–351, <https://doi.org/10.3816/CBC.2008.N.040>.
- [45] M. Hubalek, A. Oberguggenberger, B. Beer, V. Meraner, M. Sztankay, H. Oberacher, B. Schubert, L. Wildt, B. Seeber, J. Giesinger, G. Kemmler, B. Holzner, B. Sperner-Unterwiesing, Does Obesity Interfere With Anastrozole Treatment? Positive Association Between Body Mass Index and Anastrozole Plasma Levels, *Clin. Breast Cancer* 14 (2014) 291–296, <https://doi.org/10.1016/J.CLBC.2013.12.008>.
- [46] Y. Fujiwara, K. Tamura, S. Kondo, Y. Tanabe, S. Iwasa, A. Shimomura, S. Kitano, K. Ogasawara, P.K. Turner, J. Mori, H. Asou, E.M. Chan, N. Yamamoto, Phase I study of abemaciclib, an inhibitor of CDK 4 and 6, as a single agent for Japanese patients with advanced cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 78 (2016) 281–288, <https://doi.org/10.1007/S00280-016-3085-8/FIGURES/3>.
- [47] K. Tamura, H. Mukai, Y. Naito, K. Yonemori, M. Kodaira, Y. Tanabe, N. Yamamoto, S. Osera, M. Sasaki, Y. Mori, S. Hashigaki, T. Nagasawa, Y. Umeyama, T. Yoshino, Phase I study of palbociclib, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in Japanese patients, *Cancer Sci.* 107 (2016) 755–763, <https://doi.org/10.1111/CAS.12932>.
- [48] J.R. Infante, P.A. Cassier, J.F. Gerecitano, P.O. Witteveen, R. Chugh, V. Ribrag, A. Chakraborty, A. Matano, J.R. Dobson, A.S. Crystal, S. Parasarman, G.I. Shapiro, A phase I study of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor ribociclib (LEE011) in patients with advanced solid tumors and lymphomas, *Clin. Cancer Res.* 22 (2016) 5696–5705, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1248/274394/AM/A-PHASE-I-STUDY-OF-THE-CYCLIN-DEPENDENT-KINASE-4-6>.

**Dispersive liquid-liquid microextraction followed by
sweeping micellar electrokinetic chromatography-tandem
mass spectrometry for determination of six breast cancer
drugs in human plasma**

Zvonimir Mlinarić¹, Lu Turković¹, Miranda Sertić^{1*}

¹University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical
Analysis, 10000 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: Prof. Dr. Miranda Sertić, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and
Biochemistry, Department of Pharmaceutical Analysis, 10000 Zagreb, Croatia. E-mail:
miranda.sertic@pharma.unizg.hr. Tel: + 385 1 6394 473

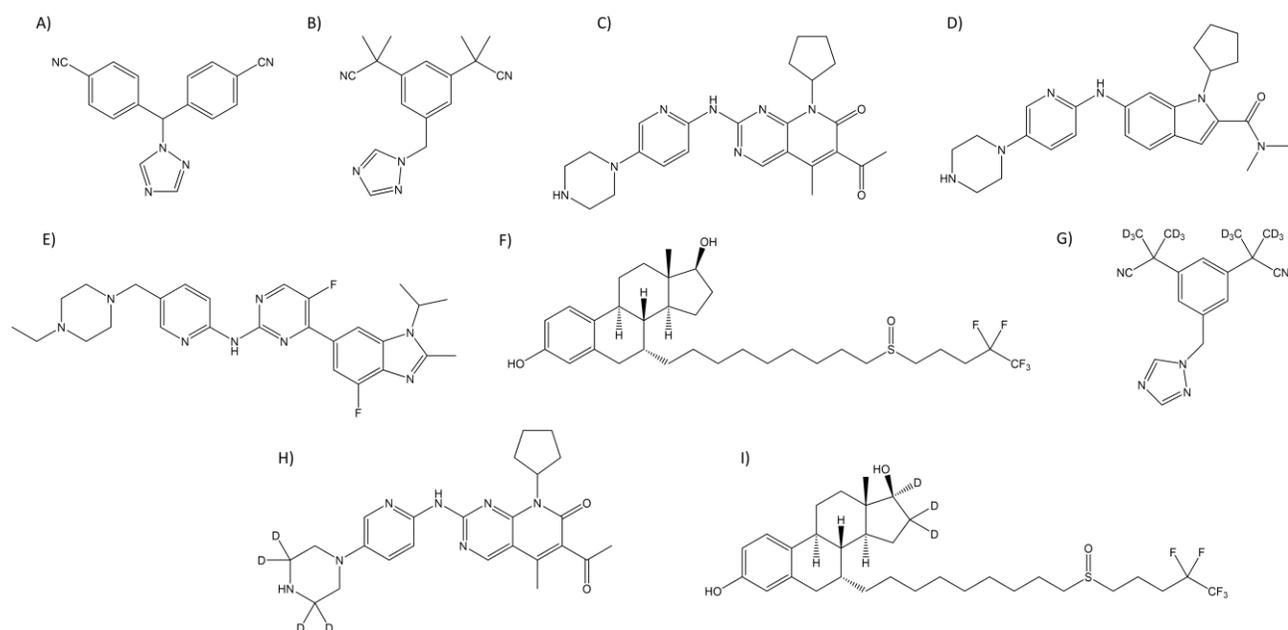


Figure S1. Structures of the analytes: **A)** letrozole, **B)** anastrozole, **C)** palbociclib, **D)** ribociclib, **E)** abemaciclib, **F)** fulvestrant, **G)** d₁₂-anastrozole **H)** d₄-palbociclib, and **I)** d₃-fulvestrant

Table S1. Selected quantifier and qualifier transitions and corresponding optimized collision energies and fragmentor voltages of the analytes

Analyte	Fragmentor voltage (V)	Quantifier ion		Qualifier ion	
		Transition (m/z)	Collision energy (eV)	Transition (m/z)	Collision energy (eV)
LET	90	286.0 → 217.0	9	286.0 → 190.0	37
ANA	140	294.1 → 225.1	25	294.1 → 210.0	41
PAL	185	448.2 → 380.0	33	448.2 → 319.5	49
RIB	195	435.2 → 322.4	37	435.2 → 251.9	51
ABE	140	507.2 → 393.0	21	507.2 → 176.8	105
FUL	145	607.4 → 589.5	17	607.4 → 467.2	25
d ₁₂ -ANA	100	306.2 → 237.3	24	306.2 → 219.1	40
d ₄ -PAL	161	452.2 → 384.0	33	452.2 → 366.0	44
d ₃ -FUL	125	610.3 → 592.0	16	610.3 → 468.4	25

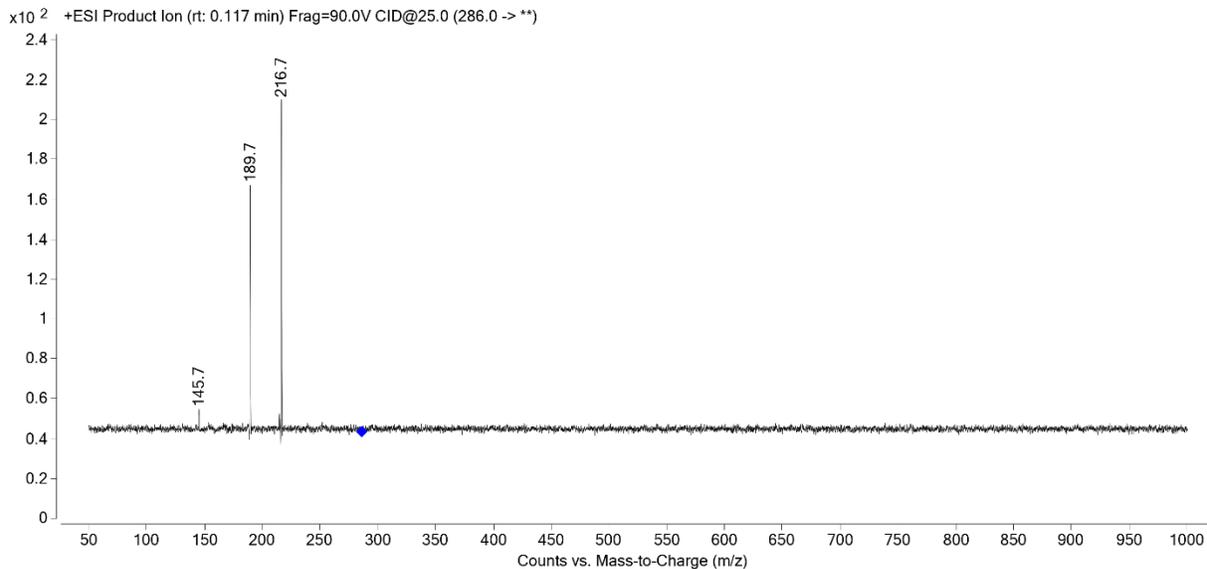


Figure S2. Exemplary MS spectrum of LET (precursor ion m/z 286.0, collision energy 25 eV, fragmentor voltage 90 V)

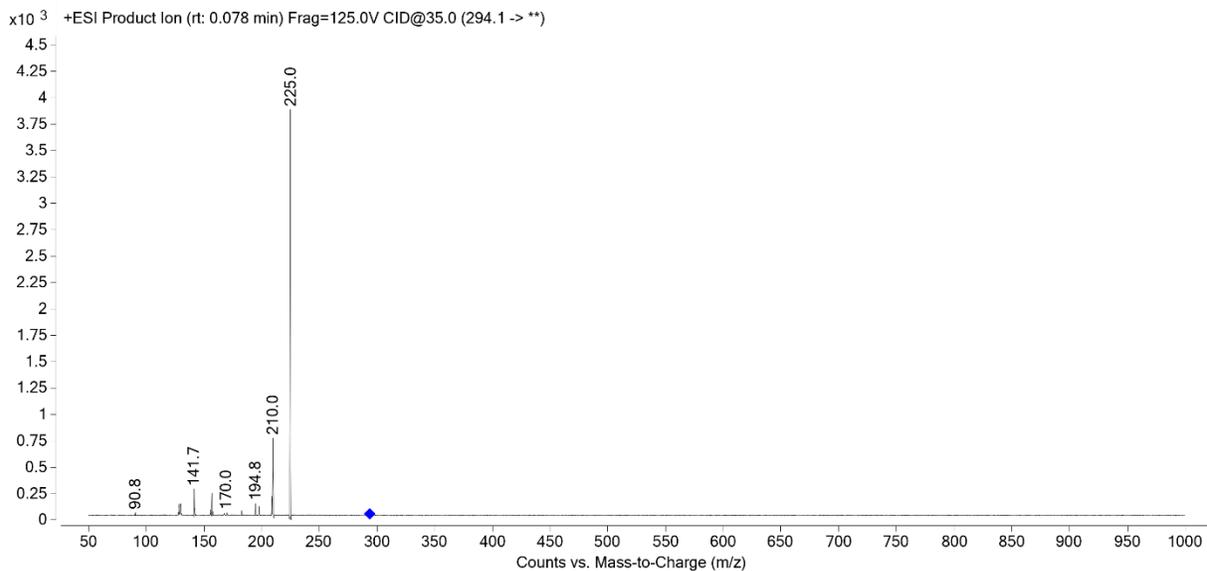


Figure S3. Exemplary MS spectrum of ANA (precursor ion m/z 294.1, collision energy 35 eV, fragmentor voltage 125 V)

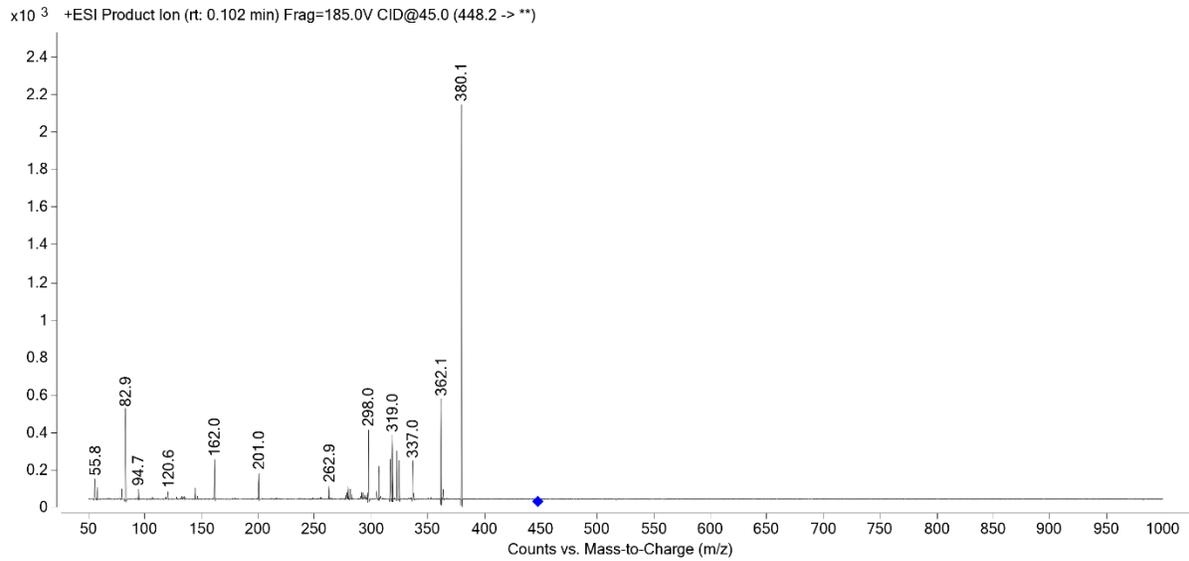


Figure S4. Exemplary MS spectrum of PAL (precursor ion m/z 448.2, collision energy 45 eV, fragmentor voltage 185 V)

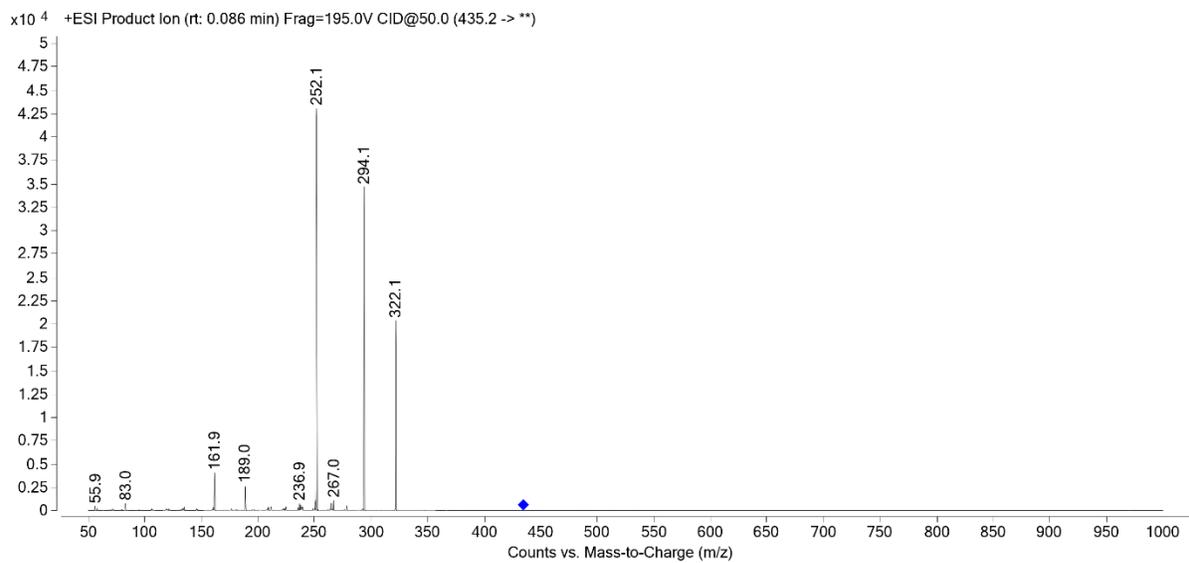


Figure S5. Exemplary MS spectrum of RIB (precursor ion m/z 435.2, collision energy 50 eV, fragmentor voltage 195 V)

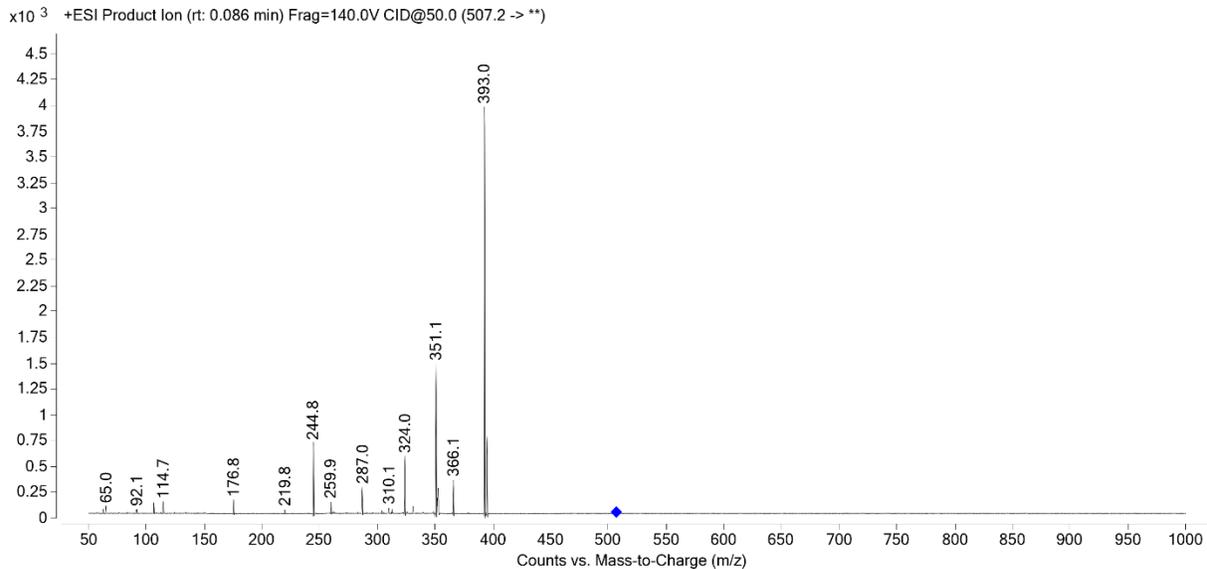


Figure S6. Exemplary MS spectrum of ABE (precursor ion m/z 507.2, collision energy 50 eV, fragmentor voltage 140 V)

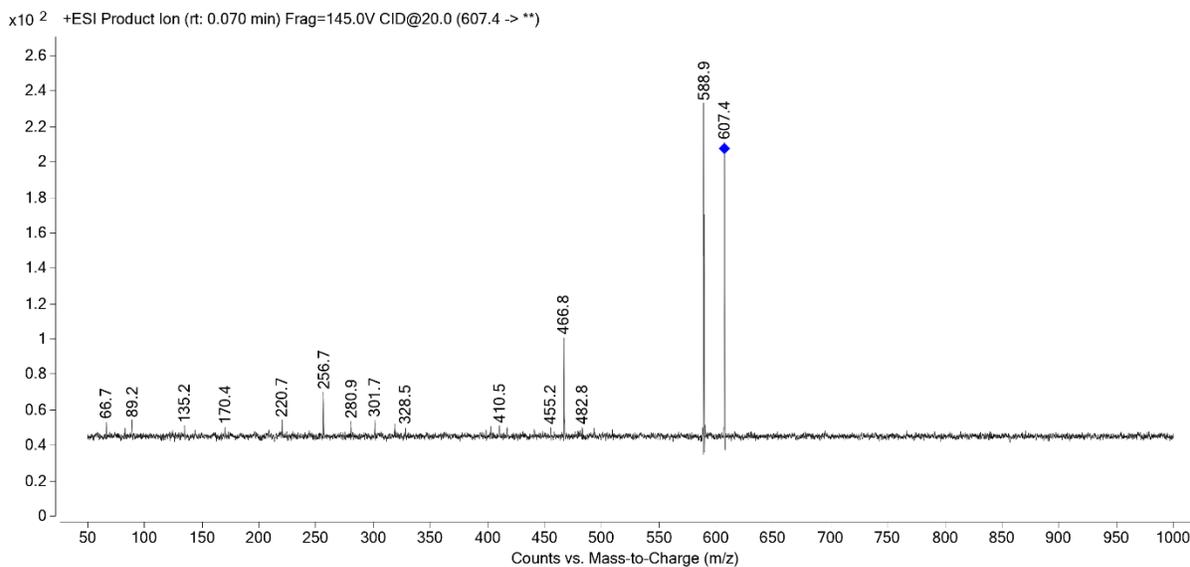


Figure S7. Exemplary MS spectrum of FUL (precursor ion m/z 607.4, collision energy 20 eV, fragmentor voltage 145 V)

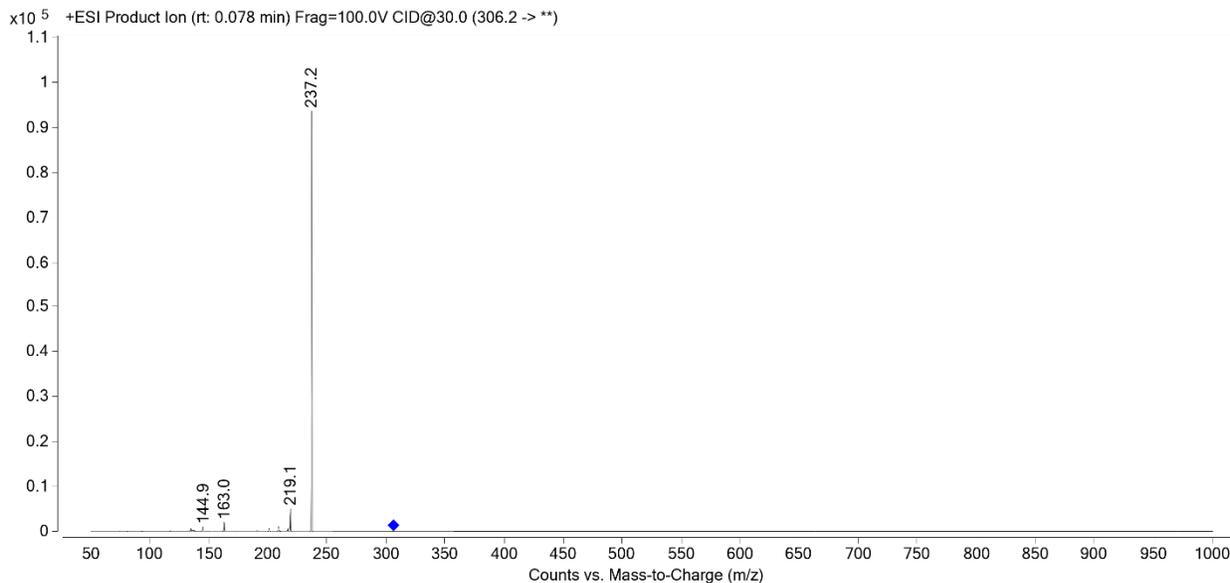


Figure S8. Exemplary MS spectrum of d₁₂-ANA (precursor ion m/z 306.2, collision energy 30 eV, fragmentor voltage 100 V)

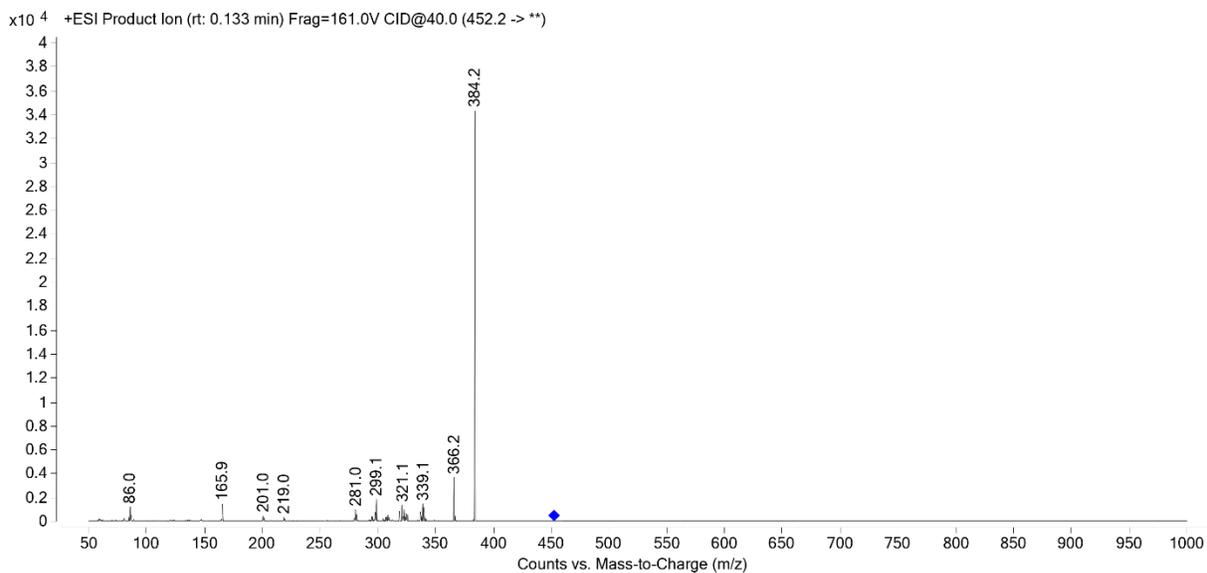


Figure S9. Exemplary MS spectrum of d₄-PAL (precursor ion m/z 452.2, collision energy 40 eV, fragmentor voltage 161 V)

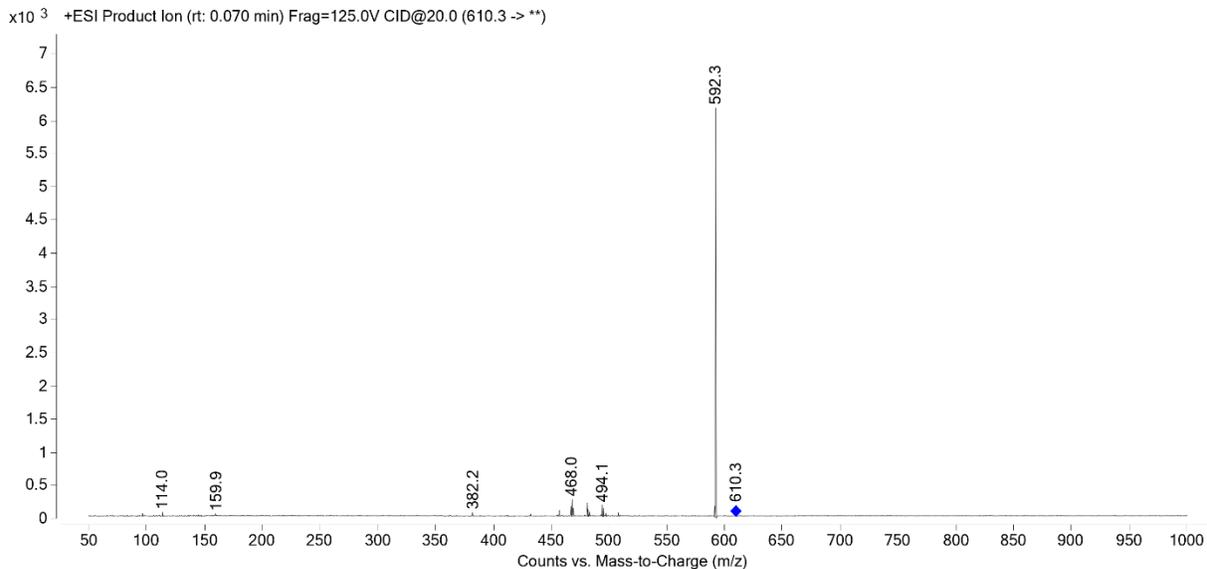


Figure S10. Exemplary MS spectrum of d₃-FUL (precursor ion *m/z* 610.3, collision energy 20 eV, fragmentor voltage 125 V)

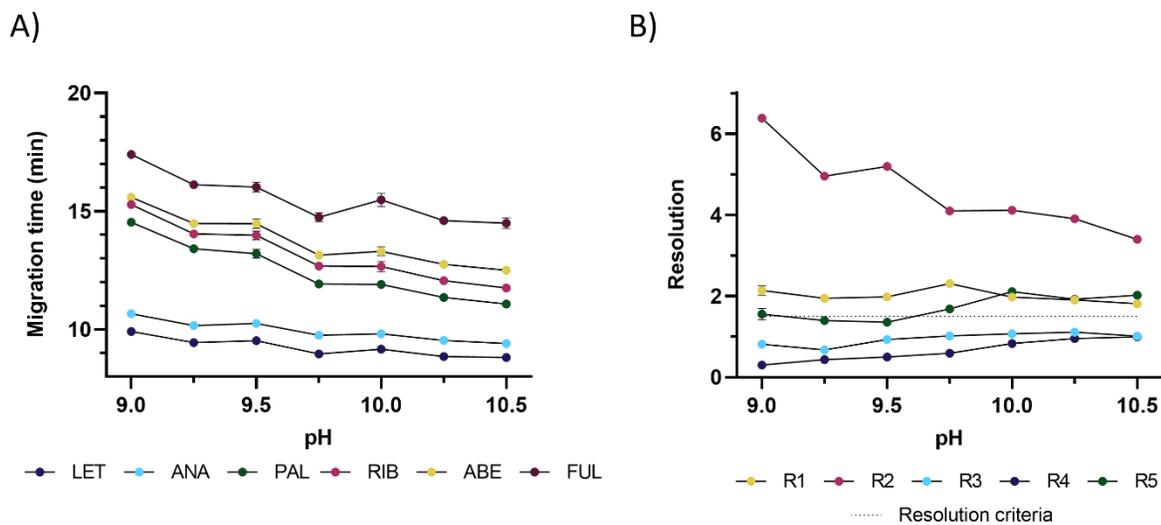


Figure S11. Effect of pH of the BGE on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

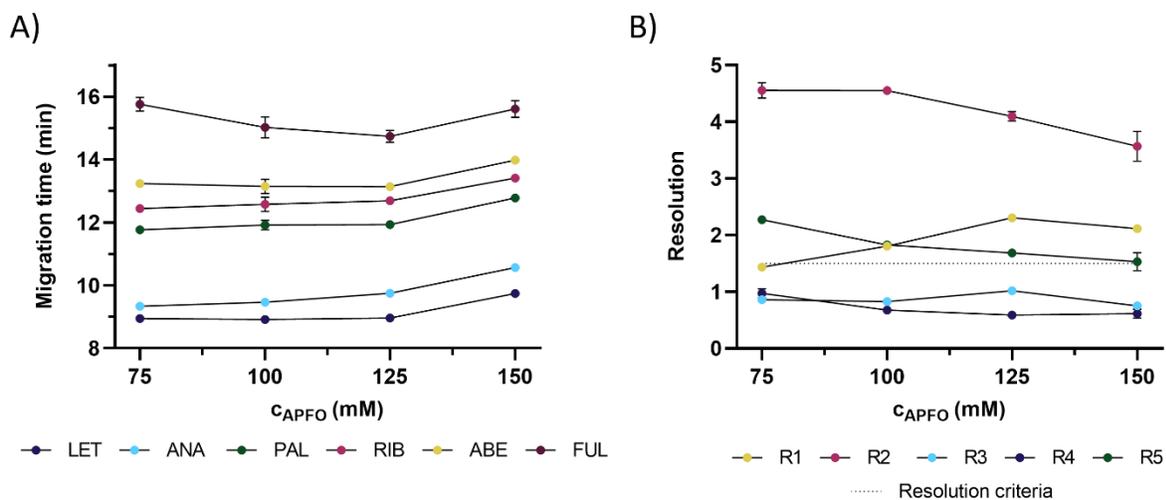


Figure S12. Effect of APFO concentration in the BGE on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

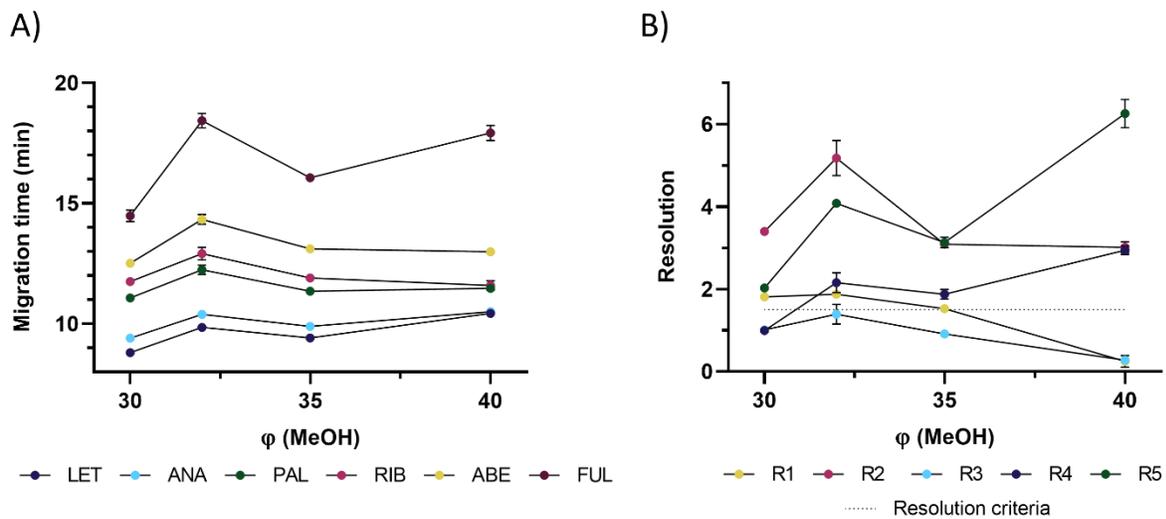


Figure S13. Effect of MeOH volumetric ratio in the BGE on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

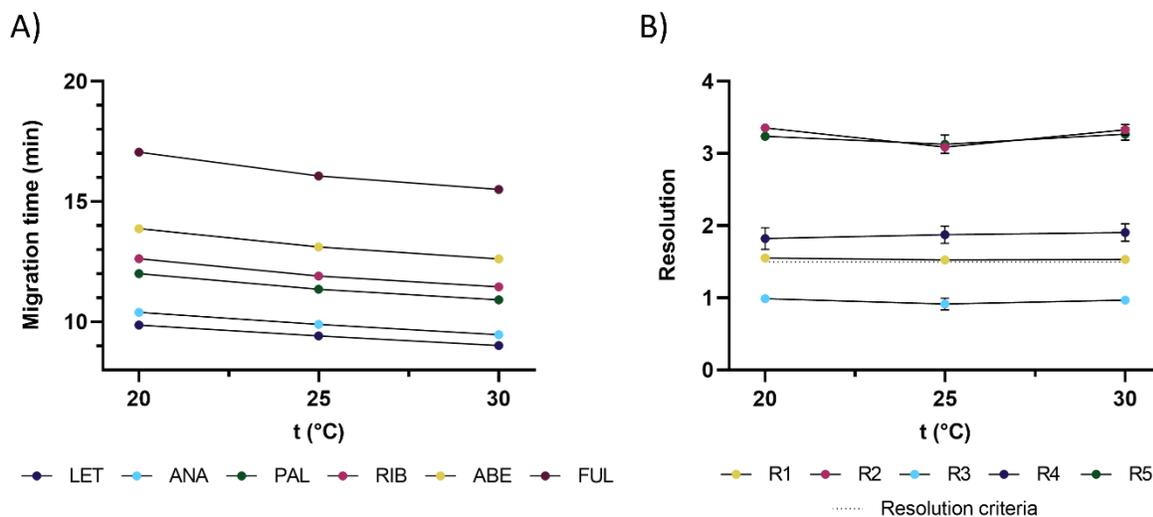


Figure S14. Effect of capillary temperature on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

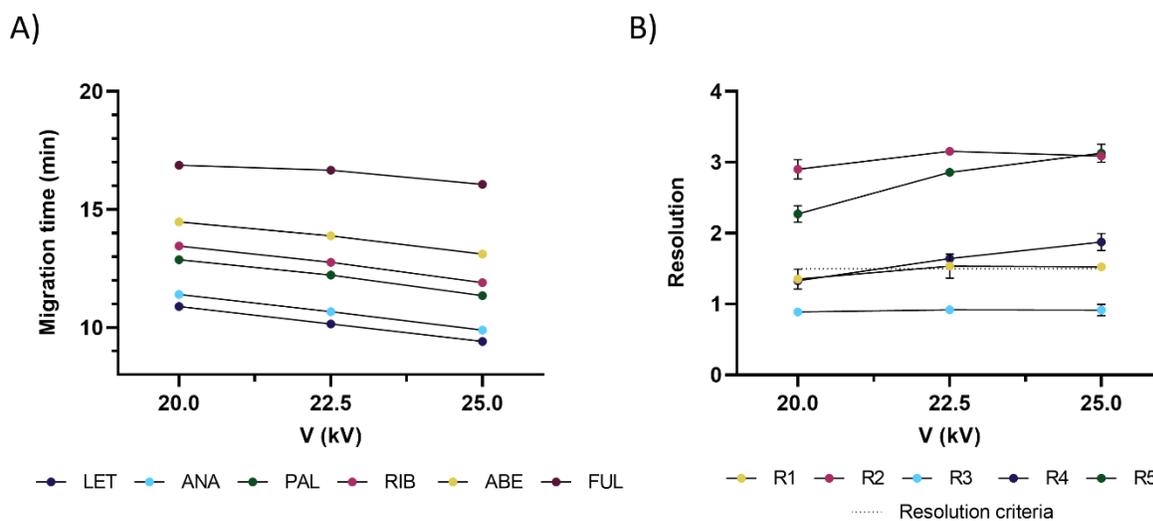


Figure S15. Effect of separation voltage on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

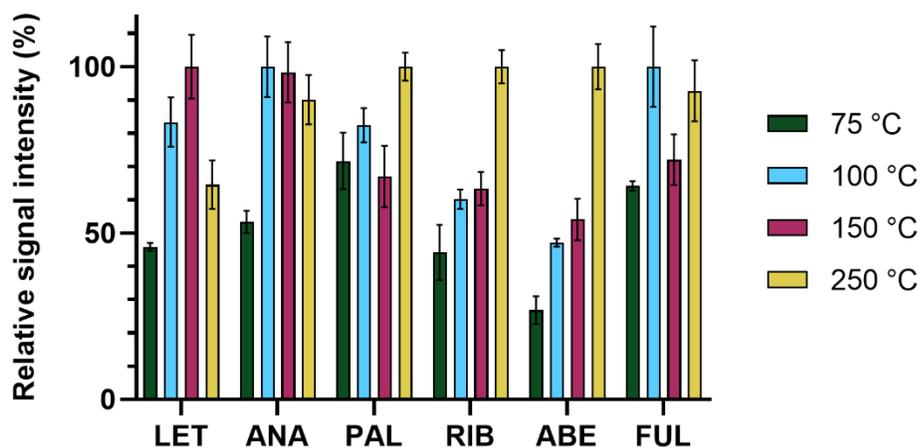


Figure S16. Effect of sheath gas temperature on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

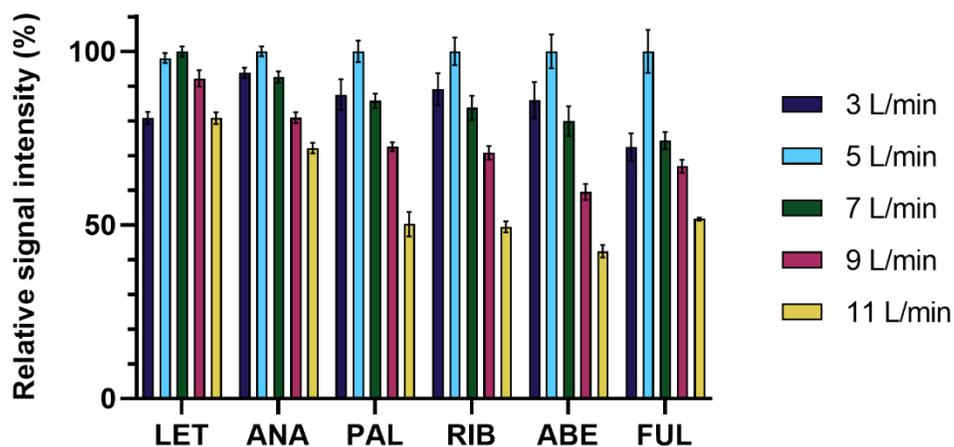


Figure S17. Effect of sheath gas flow rate on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

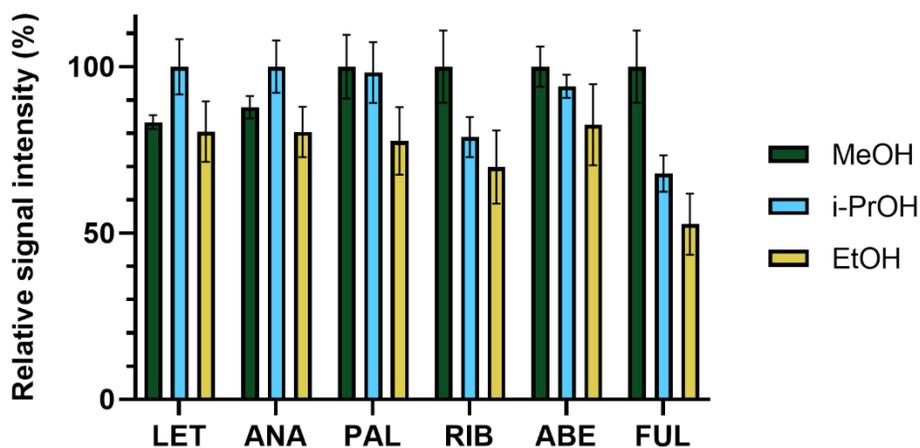


Figure S18. Effect of organic solvent type in the sheath liquid on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

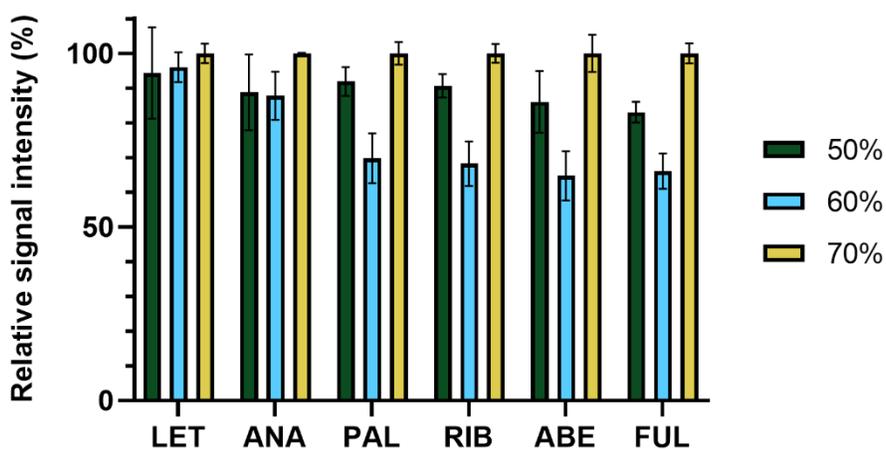


Figure S19. Effect of methanol content in the sheath liquid on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

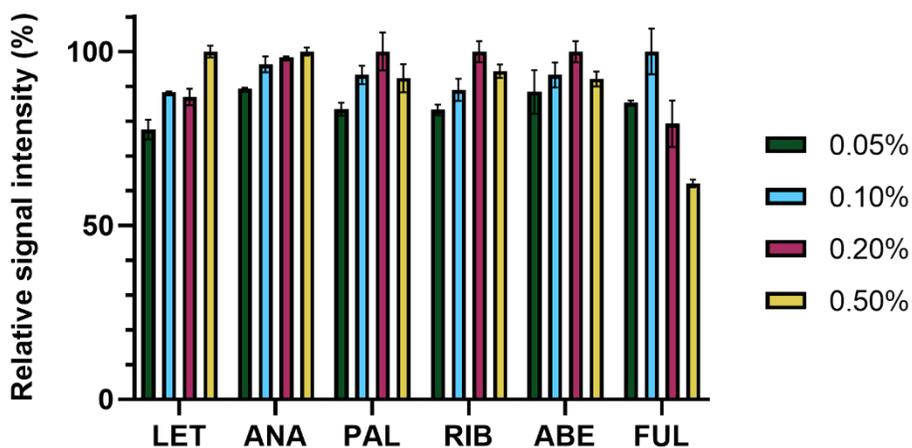


Figure S20. Effect of formic acid concentration in the sheath liquid on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

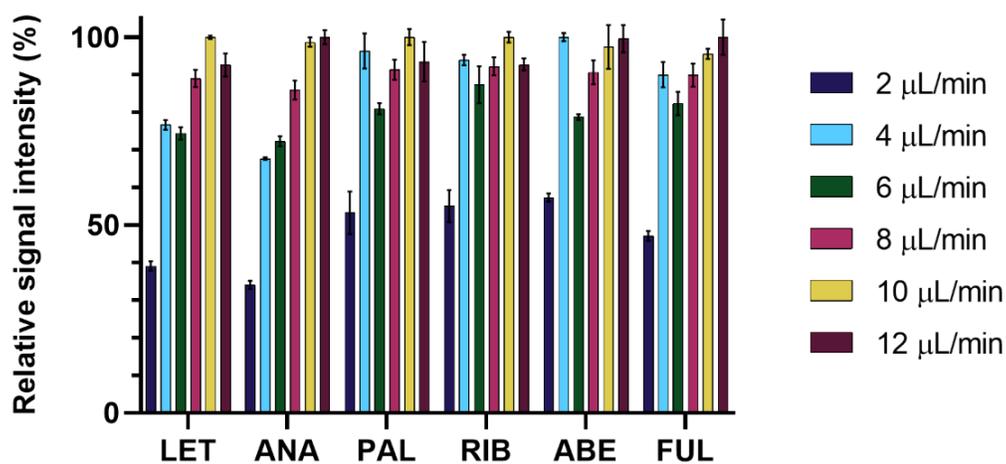


Figure S21. Effect of sheath liquid flow rate on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

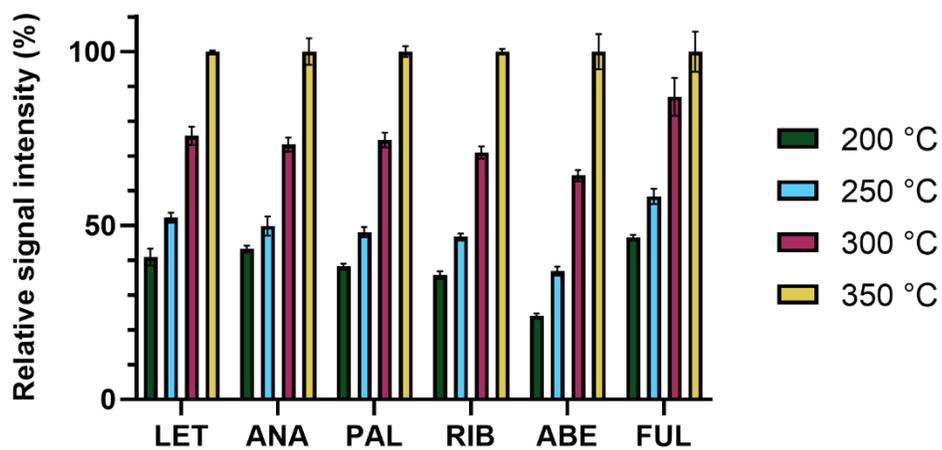


Figure S22. Effect of gas temperature on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

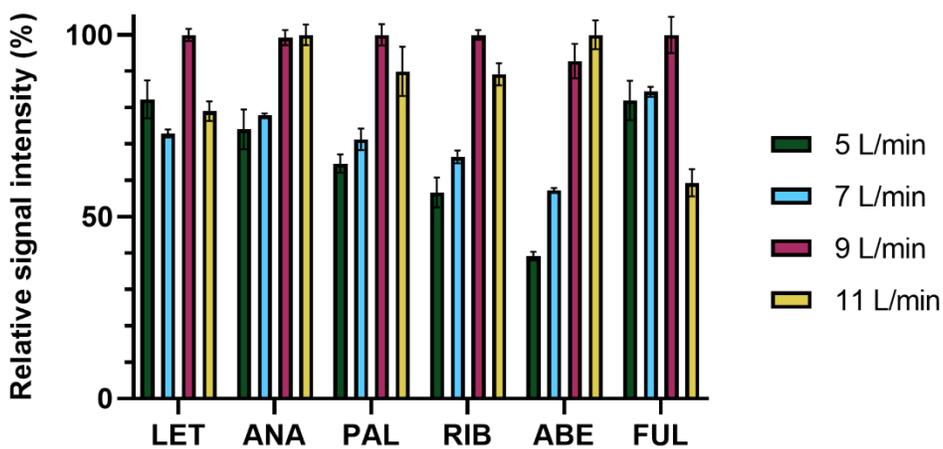


Figure S23. Effect of gas flow rate on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

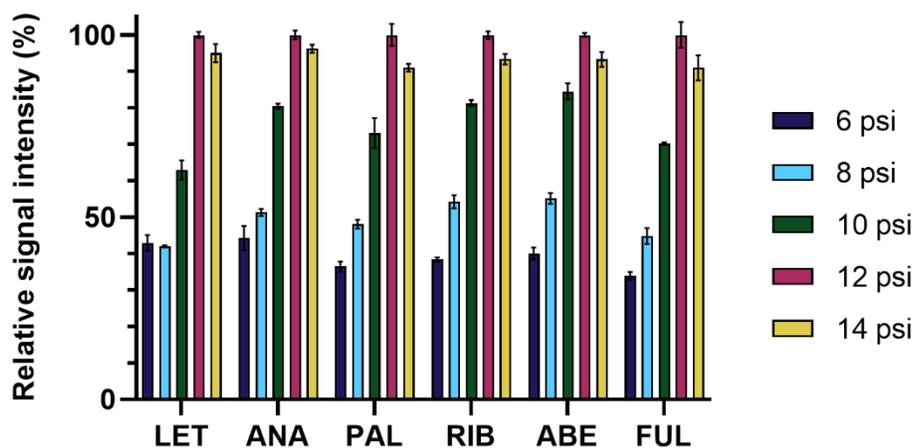


Figure S24. Effect of nebulizer pressure on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

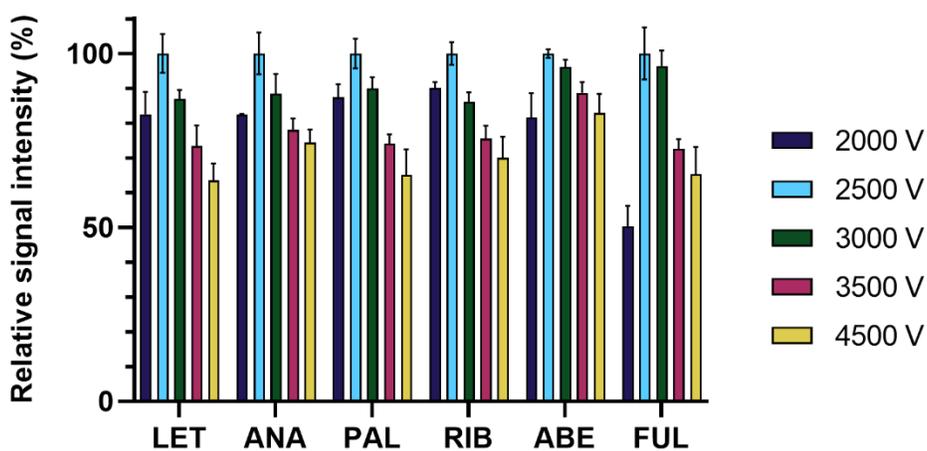


Figure S25. Effect of capillary voltage on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

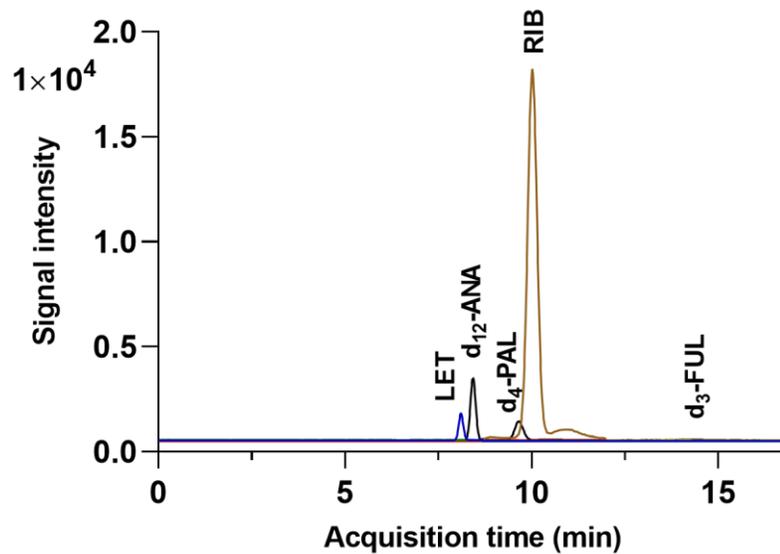


Figure S26. Mass electropherogram of a plasma sample from patient 1 treated with LET and RIB

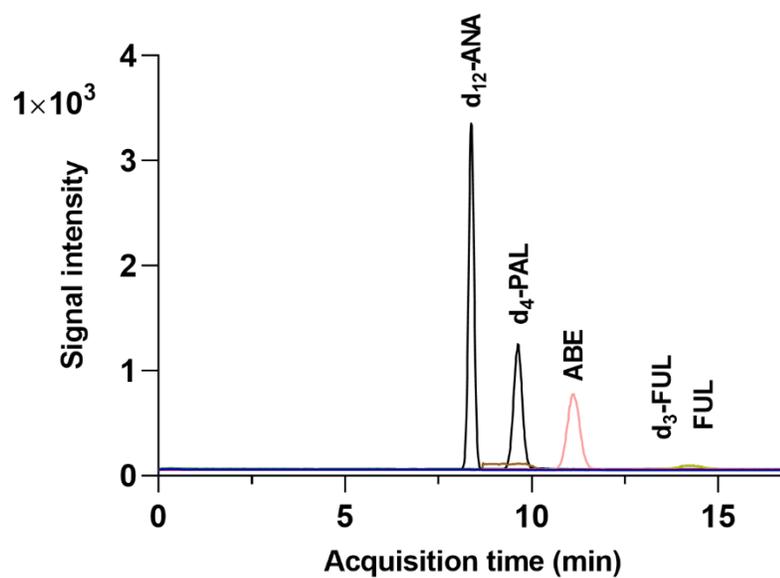


Figure S27. Mass electropherogram of a plasma sample from patient 2 treated with ABE and FUL

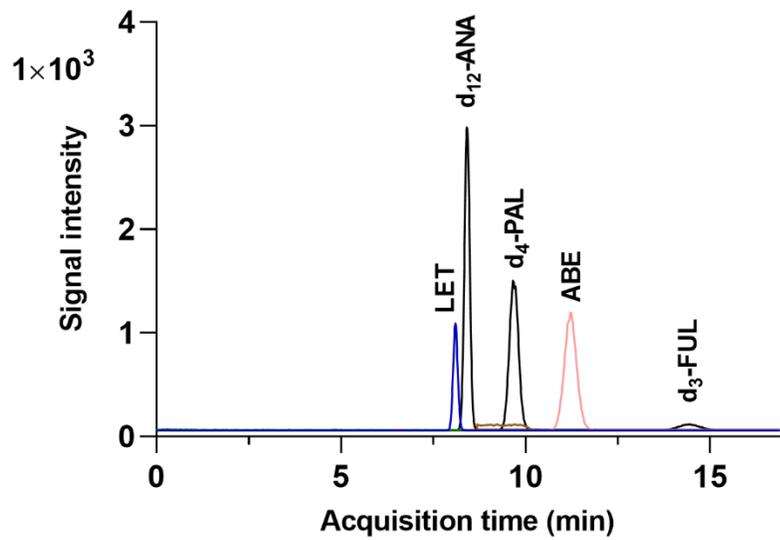


Figure S28. Mass electropherogram of a plasma sample from patient 3 treated with LET and ABE

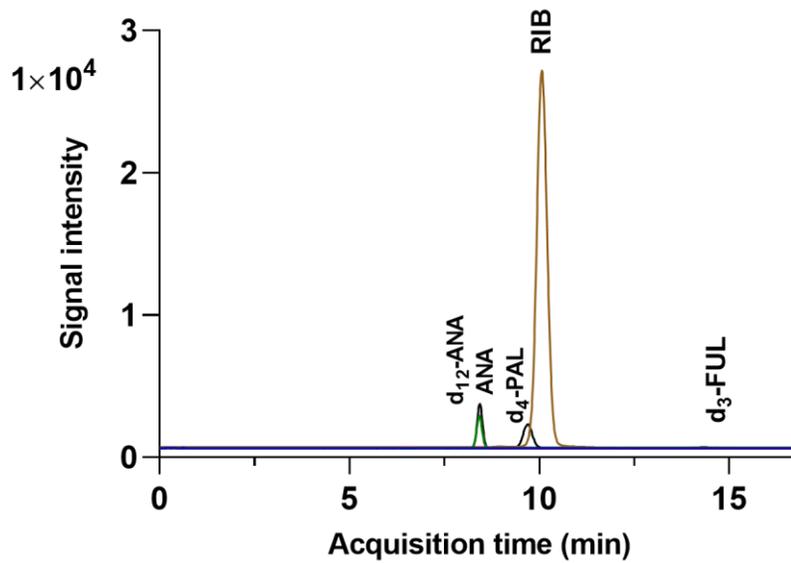


Figure S29. Mass electropherogram of a plasma sample from patient 4 treated with ANA and RIB

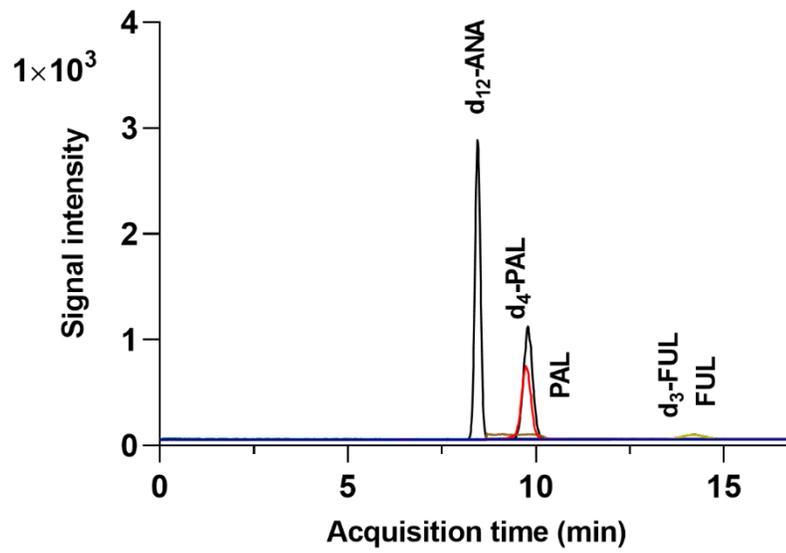


Figure S30. Mass electropherogram of a plasma sample from patient 5 treated with PAL and FUL

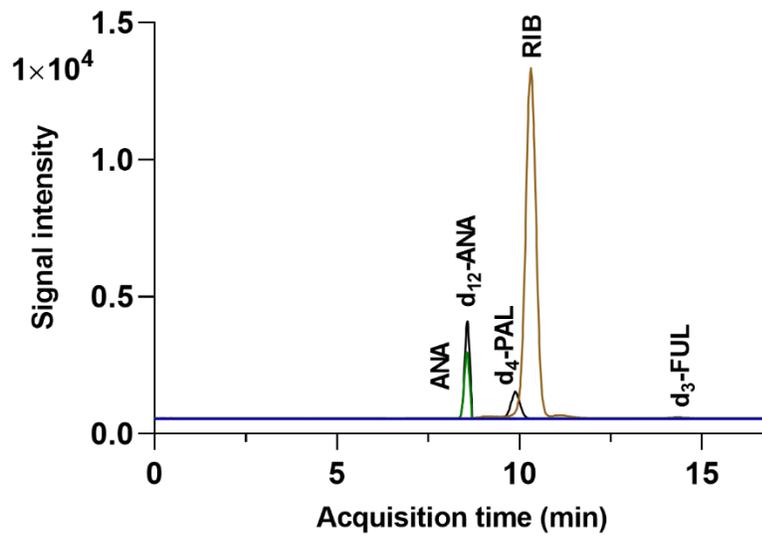


Figure S31. Mass electropherogram of a plasma sample from patient 6 treated with ANA and RIB

Table S2. Comparison of the developed MEKC-MS/MS method with previously reported methods

Reference	Analytes	Analytical Technique	Sample Preparation Technique	Mean extraction recovery	Solvent usage per analysis	Injection volume	Applied to patient samples for all analytes
Martinez-Chávez et al., 2019.	PAL, RIB, ABE	LC-MS/MS	PPT: ACN	61.6-78.5%	2.8 mL	10 µL	No
Al-Shehri et al., 2020	PAL, LET, carbinol	LC-MS/MS	PPT: ACN	94.1-99.0%	0.9 mL	5 µL	No
Posocco et al., 2020.	LET, PAL, RIB	LC-MS/MS	PPT: MeOH	≥ 92.3%	1.35 mL	N/A	Yes
Leenhardt et al., 2021.	PAL, RIB	LC-MS/MS	SPE: Oasis HLB (30 mg/1 mL)	N/A	11 mL	10 µL	No
Martinez-Chávez et al., 2021.	ABE, ABE-M2, ABE-M18, ABE-M20	LC-MS/MS	PPT: ACN	90.3-105.8%	2.8 mL	5 µL	Yes
Sato et al., 2021.	LET, ANA, PAL, RIB, ABE, FUL	LC-MS/MS	PPT: ACN:MeOH 9:1	N/A	2.25 mL	5 µL	No
Habler et al., 2022.	PAL, RIB, ABE, ABE-M2, ABE-M20	LC-MS/MS	PPT: ACN, online SPE	89.4-116%	6.3 mL	3 µL	No
Margaryan et al., 2022.	ABE, ABE-M2, ABE-M20, LY3214996	LC-MS/MS	PPT: MeOH	86.0-99.1%	1.9 mL	2 µL	Yes
Turković et al., 2022.	LET, ANA, PAL, RIB, ABE, FUL	LC-MS/MS	PPT: ACN	> 85%	8.52 mL	5 µL	Yes
Poetto et al., 2022.	LET, ABE, ABE-M2, ABE-M20	LC-MS/MS	PPT: ACN	95.8-105.7%	N/A	N/A	Yes
Turković et al., 2023.	LET, ANA, PAL, RIB, ABE, FUL	LC-DAD-FLD	PPT: ACN, DLLME	81.7-95.6%	15 mL	10 µL	Yes
Turković et al., 2023.	LET, ANA, PAL, RIB, ABE, FUL	LC-MS/MS	SPE: Sep-Pak Vac C8 (200 mg/3 mL)	92.3-105.5%	15.6 mL	10 µL	Yes
This work	LET, ANA, PAL, RIB, ABE, FUL	MEKC-MS/MS	PPT: ACN, DLLME	89.4-104.9%	170 µL	68.7 nL	Yes



Surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of alpelisib and fulvestrant in human plasma

Zvonimir Mlinarić¹ · Lu Turković¹ · Biljana Nigović¹ · Miranda Sertić¹

Received: 15 August 2025 / Revised: 3 November 2025 / Accepted: 5 November 2025
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2025

Abstract

A novel bioanalytical method combining surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction (SE-LLME) with sweeping micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry (MEKC-MS/MS) was developed and validated for therapeutic drug monitoring (TDM) of alpelisib (ALP) and fulvestrant (FUL) in human plasma. This method addresses the need for sensitive, selective quantification in patients with PIK3CA-mutated, HR+/HER2– breast cancer. Sample preparation involved protein precipitation followed by SE-LLME using pentadecafluorooctanoic acid (PFOA) and chloroform, yielding recoveries greater than 88.4% for ALP and 78.7% for FUL. Optimised MEKC conditions were 50 mM ammonium pentadecafluorooctanoate at pH 9.75 with 25% methanol, 30 kV separation voltage, 30 °C capillary temperature, and 100 mbar additional pressure during the analysis. Sweeping preconcentration significantly enhanced sensitivity—109-fold for ALP and 11.2-fold for FUL. The method was validated per ICH guidelines, demonstrating excellent linearity ($r \geq 0.9963$) across the calibration ranges (200–2000 ng/mL for ALP, 10–100 ng/mL for FUL), accuracy (mean biases –10.3% to 7.5%), and precision (RSD < 12.6%). Despite notable matrix effects for ALP, consistency across six different plasma sources (RSD ≤ 12.7%) ensured reliability. Analytes were stable under benchtop, autosampler, freeze-thaw, and long-term conditions (bias ≤ 11.1%). No carry-over was detected, and dilution integrity was confirmed (bias ≤ 2.7%). Application to patient samples validated the method's clinical relevance, with measured concentrations aligning with the expected ones. This is the first capillary electrophoresis method for ALP in biological matrices and the only method for simultaneous TDM of ALP and FUL, offering a robust, cost-effective, and eco-friendly alternative to traditional chromatographic approaches.

Keywords Capillary electrophoresis · Mass spectrometry · Surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction · Personalised treatment · Bioanalytical method · Breast cancer

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in the world [1], while the most prevalent phenotype is hormone receptor-positive (HR+) and human epidermal growth factor receptor 2-negative (HER2–) breast cancer [2]. Currently, the standard first-line treatment for metastatic or locally advanced HR+/HER2– breast cancer comprises a combination of a

cyclin-D dependent kinase 4 and 6 (CDK4/6) inhibitor, such as palbociclib, ribociclib, or abemaciclib, with anti-hormonal therapy, including agents such as letrozole, anastrozole, or fulvestrant.

However, in some cases, certain genetic mutations in breast cancer can also be viable drug targets. One such case is a mutated PIK3CA gene, which encodes the p110 α catalytic subunit of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). At the moment, PI3K inhibitor alpelisib (ALP) is indicated in combination with fulvestrant (FUL) for the treatment of PIK3CA-mutated HR+/HER2– breast cancer [3].

Although the introduction of ALP led to a significant improvement in the clinical outcomes of this specific breast cancer subtype, there are still challenges with its use [4].

✉ Miranda Sertić
miranda.sertic@pharma.unizg.hr

¹ Department of Pharmaceutical Analysis, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Namely, clinical studies of ALP showed that hyperglycaemia is a very common adverse effect of ALP, with as much as 80% of patients experiencing it in some populations [5]. This induced hyperglycaemia is the most common reason for dose reduction, and after disease progression, the second most common reason for ALP discontinuation, often in the first 30 days of treatment [6]. It has also been suggested that PI3K inhibitor-induced hyperglycaemia can potentially stimulate sufficient insulin release to reactivate PI3K signalling via activation of other isoforms, which can result in treatment resistance [7]. There were even recorded fatal cases of hyperglycaemic ketoacidosis or hyperosmolar hyperglycaemic syndrome after the administration of ALP [8]. Considering all, there is an unmet need to address these problems, and therapeutic drug monitoring (TDM) of ALP in breast cancer patients is a promising solution. A prerequisite for TDM is a selective and sensitive bioanalytical method which is validated and suitable for routine analysis in clinical settings [9].

To date, several studies have reported methods for analysing ALP. These include high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD) for the evaluation of ALP metabolism in rats [10], and ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for its quantification in mice and human blood plasma [11, 12]. Additionally, a single stability-indicating method utilising liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS/MS) has been reported for the structural elucidation of ALP degradation products under forced degradation conditions [13]. A few electrochemical methods have also been described for the analysis of ALP in biological matrices and tablet formulations [14–16]. There is only one study reporting the use of a capillary electrophoresis (CE) with a diode array detector (DAD) method for determining ALP in pharmaceutical dosage forms [17]. However, to the best of our knowledge, there is no single analytical method for the quantification of ALP in real patient samples suitable for TDM. On the other hand, there are only a few bioanalytical methods reported for the analysis of FUL [18–22]. However, there are no published methods for the simultaneous analysis of ALP and FUL.

Conversely, CE is seldom utilised in TDM, despite its considerable advantages over LC, such as enhanced separation efficiency, greater cost-effectiveness, and improved environmental sustainability, owing to its minimal consumption of organic solvents, reduced waste generation, and lower sample volume requirements [23]. A commonly cited limitation of CE is its relatively lower sensitivity. However, this drawback can be effectively addressed by coupling CE with MS.

Another limitation of CE lies in its susceptibility to interferences arising from complex sample matrices, which may

lead to capillary blockage or disruption of a stable electroosmotic flow (EOF). Nevertheless, this challenge can be effectively overcome through appropriate and efficient sample preparation. For plasma samples, protein precipitation (PPT) is commonly employed to remove proteins. However, this approach often lacks sufficient cleanup efficiency, necessitating additional preparatory steps to achieve reproducible results and mitigate significant matrix effects. While various sample preparation strategies are available, many require expensive consumables or involve substantial solvent consumption. In contrast, liquid-liquid microextraction techniques offer rapid, cost-effective alternatives. Among these, dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) has recently gained prominence as a highly effective method. It employs a ternary solvent system comprising the analyte, an extractant, and a disperser, synergistically enhancing extraction efficiency by markedly increasing the interfacial surface area between the immiscible phases.

However, DLLME demands careful and often complex optimisation of solvent composition and ratios [22]. As an alternative, the interfacial surface area between the sample and extraction solvent can be increased by incorporating a surfactant, in a technique known as surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction (SE-LLME). It has been shown that SE-LLME offers several advantages in analytical sample preparation. The inclusion of surfactants improves the extraction efficiency by increasing the solubility of target analytes in the extraction phase and enhancing mass transfer across the phase boundary. This leads to higher enrichment factors and improved sensitivity, especially for compounds with low partition coefficients in conventional LLME systems. Additionally, SE-LLME often requires minimal solvent volumes, aligning with green chemistry principles, and can be easily integrated with various analytical techniques [24–31]. Since micellar electrokinetic chromatography (MEKC) is already utilising a surfactant for the pseudo-stationary phase, SE-LLME is a promising sample preparation technique for such cases. Despite the clear advantages of employing SE-LLME as a sample preparation technique for MEKC-MS methodologies, only one study in the existing literature has reported the use of this combination [24].

Taking this into account, this work aimed to develop and fully validate a selective and sensitive PPT-SE-LLME sample preparation workflow followed by a sweeping MEKC-MS/MS method suitable for the TDM of ALP and FUL.

As far as we are aware, this work represents the first MEKC and CE-MS method for the determination of ALP or a combination of ALP and FUL. Moreover, this represents the first CE method developed for the analysis of ALP in biological matrices. To date, it also remains the only bioanalytical approach suitable for the TDM of ALP when co-administered with FUL. Finally, herein it was demonstrated

that the combination of PPT with SE-LLME is suitable for sample preparation for complex plasma samples prior to the analysis with MEKC-MS/MS.

Experimental

Materials and chemicals

MS-grade solvents, including ethanol (EtOH), methanol (MeOH), propan-2-ol (i-PrOH), acetonitrile (ACN), and formic acid (FA) were obtained from Carlo Erba Reagents (Milano, Italy). Chloroform (CLF), on the other hand, was sourced from Honeywell Research Chemicals (Wabash, IN, USA). Pentadecafluorooctanoic acid (PFOA) was acquired from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), while 25% NH₄OH was supplied by Alkaloid (Skopje, North Macedonia). Ultrapure water, with a conductivity of 0.055 µS/cm, was produced using a Milli-Q IQ 7015 purification system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

The analytical standards employed included ALP (purity > 98%) procured from MedChemExpress (Princeton, NJ, USA), FUL (purity > 97%) from MilliporeSigma (Burlington, MA, USA), and deuterium labelled FUL (D₃-FUL) (purity > 98%) from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). The molecular structures of the analytes, along with those of the isotopically labelled internal standard (IS), are presented in Supplementary Figure S1.

Instrumentation

MEKC-MS/MS analyses were conducted using an Agilent 7100 Capillary Electrophoresis system hyphenated to a 6470 triple quadrupole mass spectrometer, integrated with an Agilent Jet Stream electrospray ionization (AJS-ESI) source (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The introduction of the sheath liquid into the electrospray interface was facilitated through an Agilent 1260 Infinity II series isocratic pump, operating in conjunction with a 1:100 flow-splitting configuration. Data acquisition and processing were carried out using MassHunter Workstation software, version 10.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For statistical analysis and data visualisation, GraphPad Prism 8 (Boston, MA, USA) and Microsoft Excel from Office 365 (Redmond, WA, USA) were employed.

Standard solutions

Primary stock solutions of ALP and FUL were individually prepared in MeOH at concentrations of 0.5 mg/mL, whereas the IS, D₃-FUL, was dissolved in MeOH to yield a stock concentration of 100 µg/mL. All prepared solutions were stored at 4 °C and remained chemically stable under

these refrigerated conditions for a minimal duration of three months. Working standard solutions were freshly prepared prior to the injection by diluting appropriate volumes of ALP and FUL stock solutions with water and MeOH to yield a MeOH-water mixture (25:75, v/v) containing all the analytes at the desired concentrations. For the MEKC method development, a solution containing 1 µg/mL ALP and FUL was used, while for the MS method development, a solution containing 100 ng/mL ALP and 500 ng/mL FUL was used.

The running buffer was prepared by dissolving PFOA in a MeOH-water mixture, followed by titration with 25% NH₄OH to form ammonium pentadecafluorooctanoate (APFO) at a concentration of 50 mM, adjusted to an apparent pH of 9.75. The final solvent composition of the buffer was a MeOH-water mixture (25:75, v/v).

MEKC experiments

Prior to initial analytical application, capillary conditioning was executed through a systematic sequence of rinsing steps: an alkaline pretreatment with 1 M NaOH for 30 min, followed by a 30-min wash with ultrapure water, and subsequently a 30-min equilibration phase using the running buffer. Routine daily preparation encompassed sequential flushing with 5 M NH₄OH for 5 min, ultrapure water for an equivalent duration, and a final 20-min rinse with the running buffer to ensure optimal separation conditions. Between consecutive analytical injections, a brief reconditioning step comprising a 2-min flush with 5 M ammonium hydroxide, followed by a 3-min wash using the running buffer, was employed. After each working day, capillaries were subjected to a 20-min rinse with ultrapure water and were then stored submerged in water to preserve capillary integrity and prevent blockages. To uphold analytical reproducibility and system performance, the running buffer was systematically replaced following every third injection sequence. The optimal MEKC parameters were a running buffer composed of 50 mM APFO at pH 9.75 in 25% MeOH, a capillary temperature of 30 °C, a separation voltage of 30 kV, 100 mbar additional hydrodynamic pressure during the analysis and hydrodynamic injection at 50 mbar for 60 s.

MS experiments

The MS was operated in positive ESI mode, employing multiple reaction monitoring (MRM) for selective and sensitive detection of target analytes. The specific MRM transitions, along with their respective optimised fragmentor voltages and collision energy parameters, are presented in Supplementary Table S1. The AJS ion source was configured with a sheath gas temperature of 250 °C, a sheath gas flow rate of 5 L/min, and a nozzle voltage set at 2000 V. The sheath liquid, consisting of a 50:50 (v/v) MeOH-water mixture containing

0.1% FA, was introduced to the sprayer at a flow rate of 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Additional ESI source parameters included a nebuliser pressure of 10 psi, a drying gas temperature of 300 $^{\circ}\text{C}$, a drying gas flow rate of 9 L/min, and a capillary voltage of 2500 V. To mitigate instability in capillary current associated with the introduction of air bubbles during sample injection, the nebuliser pressure was temporarily reduced to 1 psi during the sample injection.

Sample collection

Informed consent was obtained from all blood donors following applicable ethical and regulatory standards. Venous blood samples were collected in K_2 -EDTA anticoagulant tubes from patients undergoing treatment with the drugs of interest, as well as from healthy volunteers serving as drug-free controls. Following centrifugation at 1500 g for 10 min, plasma was isolated and stored at -18°C for short-term preservation and at -80°C for long-term storage. Prior to analysis, the plasma was thawed at ambient temperature for 20 min.

Plasma sample preparation

Spiking of plasma samples was performed by diluting drug-free plasma with working standard solutions of the analytes at a 14:1 (v/v) ratio. Subsequently, 10 μL of a D_3 -FUL stock solution was added to 150 μL of spiked or patient plasma samples. PPT was then performed by adding 590 μL of ACN. The samples were vortexed for 10 s and centrifuged at 4300 g for 5 min. A volume of 720 μL of the resulting clear supernatant was collected and subsequently evaporated to dryness. The dry residues were reconstituted in 150 μL of water. Afterwards, SE-LLME was conducted by adding 20 μL of 50 mM PFOA in MeOH-water (25:75, v/v) and 50 μL of CLF, followed by vigorous mixing using a pipette tip (15 cycles). Following centrifugation at 4300 g for 5 min, 45 μL of the bottom phase was collected and evaporated to dryness. Before analysis, the dry residue was reconstituted in 15 μL of MeOH-water (25:75, v/v).

Results and discussion

Optimisation of the MEKC parameters

ALP is positively charged below pH 4 and negatively charged above pH 6 (Supplementary Figure S2A). However, since FUL is fully charged only above pH 12, outside the ammonia buffer range, capillary zone electrophoresis (CZE) was unsuitable (Supplementary Figure S2B). Although CZE could theoretically operate under acidic or basic pH, with FUL migrating solely due to the EOF, and ALP by both

the EOF and its inherent electrophoretic mobility, neutral plasma components would co-migrate with FUL, producing a strong and unreproducible matrix effect. Accordingly, MEKC was the choice in this study.

Given the poor aqueous solubility of ALP and FUL, MeOH, which was also used in their stock solutions, was incorporated into the BGE as the starting organic additive. Additionally, APFO was chosen as the MS-compatible surfactant, with the initial BGE composition consisting of a 30:70 (v/v) mixture of MeOH and an aqueous solution of APFO.

During the method development, key MEKC parameters were systematically optimised, with optimal conditions chosen based on analyte resolution, total analysis time and overall peak shapes and symmetries.

Optimisation of the running buffer pH

The impact of pH was studied in the range of 9 to 10, within the ammonia buffer range. As FUL remained uncharged across this range, pH variations primarily affected ALP and EOF. Increasing pH enhanced the EOF, which shortens the analysis. Since the resolution between ALP and FUL was sufficient at all pH values, it was not a decisive factor. The optimal pH, providing the shortest analysis, was 9.75 (Supplementary Figure S3).

Optimisation of the APFO concentration

The APFO concentration was varied between 50 and 100 mM. Although its critical micellar concentration (CMC) in water is approximately 25 mM [32, 33], organic solvents in the BGE can interfere with micelle formation and effectively increase the CMC [21]. The shortest analysis was obtained with 50 mM APFO, yielding a resolution of 3.23, adequate for the baseline separation (Supplementary Figure S4). This composition produced an average capillary current of 24 μA , well below the 50 μA limit recommended for the majority of CE-MS systems.

Optimisation of the running buffer composition and the additional hydrodynamic pressure

The impact of MeOH content in the BGE was evaluated within a range of 20 to 35% (v/v). Although 20% MeOH produced the shortest analysis, instability due to occasional capillary current drops, possibly from FUL precipitation, rendered it unsuitable. Accordingly, the BGE containing 25% MeOH as the next best condition was chosen as optimal (Supplementary Figure S5). To evaluate qualitative effects, MeOH was partially substituted with ACN, EtOH, or *i*-PrOH (20:5:75, $v/v/v$, MeOH-organic solvent-APFO in water). EtOH or *i*-PrOH prolonged the analysis significantly,

while ACN showed comparable results with MeOH alone. Overall, MeOH as the sole organic modifier showed the best results regarding analysis time and resolution (Supplementary Figure S6).

The applied hydrodynamic pressure during analysis was systematically varied within the range of 0 to 100 mbar. Because increasing pressure to 100 mbar significantly reduced analysis time without impairing separation efficiency, this pressure was applied in all subsequent analyses (Supplementary Figure S7).

Optimisation of the separation voltage and capillary temperature

With low capillary current under optimal BGE conditions, the separation voltage was tested up to 30 kV. On the other hand, since a portion of the capillary extends beyond the temperature-controlled environment of the CE-MS setup, the temperature was kept below 30 °C to avoid thermal gradients. Therefore, separation voltage and capillary temperature were investigated in the ranges of 20 to 30 kV and 20 to 30 °C, respectively. As expected, higher voltage and temperature slightly improved resolution and reduced analysis time. Therefore, 30 °C and 30 kV were selected to balance efficient separation with system stability, thereby minimising excessive Joule heating while avoiding unnecessarily extended analysis times (Supplementary Figures S8–S9).

Optimisation of the sweeping online sample preconcentration

A CE technique is inherently less sensitive than complementary analytical techniques, which can be addressed by online preconcentration strategies such as sweeping, widely applied in MEKC. In this study, sweeping was performed by dissolving the analytes in a 25:75 (v/v) MeOH-water mixture without APFO. Injection time was tested between 15 and 60 s at 50 mbar, with sensitivity increasing proportionally and reaching optimal performance at 60 s. Based on the Hagen-Poiseuille equation, this corresponds to an injection volume of roughly 74 nL, which represents about 5.4% of the total capillary volume. Sensitivity enhancement factors based on peak height (SEF_{height}) were calculated according to the following equation [34]:

$$SEF_{\text{height}} = \frac{\frac{\text{peak height under sweeping injection}}{\text{analyte concentration in sweeping injection}}}{\frac{\text{peak height under hydrodynamic injection}}{\text{analyte concentration in hydrodynamic injection}}}$$

Comparing sweeping (60 s at 50 mbar) with conventional hydrodynamic injection of a sample dissolved in the BGE (5 s at 50 mbar), yielded SEF_{height} values of 109 for ALP and 11.2 for FUL. These results demonstrate a substantial

increase in sensitivity, confirming sweeping as an effective strategy for enhancing MEKC detection of trace drug concentrations in human plasma without compromising separation efficiency.

Optimisation of the MS parameters

MS parameters were optimised using MRM in the positive ESI mode. For all analytes, the $[M+H]^+$ ion was selected as the precursor, along with the quantifier and the qualifier transitions. Time-segmented acquisition was employed, and dwell times were adjusted to maintain an overall cycle time of approximately 500 ms. Fragmentor voltages, collision energies, and collision cell accelerator voltages were optimised via direct infusion. Because ionisation conditions can influence separation and vice versa, ESI parameters were evaluated under MEKC conditions. Standard ESI and AJS-ESI-specific parameters, as well as sheath liquid, were optimised to maximise analyte signal intensity.

Optimisation of the Agilent Jet Stream ESI parameters

The AJS-ESI source enhances desolvation via thermally focused superheated nitrogen. Although widely used in LC-MS, its optimisation for MEKC-MS has been scarcely reported [21, 34]. Thus, AJS-ESI parameters were systematically investigated.

Sheath gas temperature was varied within the range of 100 to 250 °C, at fixed nozzle voltage (2000 V) and sheath gas flow (5 L/min). Sensitivity increased with temperature, with optimal responses for ALP and FUL observed at 200 °C and 250 °C, respectively (Supplementary Figure S10). As FUL occurs at lower plasma concentrations and exhibits a weaker detector response, 250 °C was selected for further experiments.

The sheath gas flow rate was investigated within the range of 5 to 11 L/min, yielding maximal sensitivity for both analytes at 5 L/min (Supplementary Figure S11), consistent with previous findings that AJS performance depends on temperature, flow and analyte properties [21]. Consequently, the optimisation of AJS-ESI parameters within the MEKC methods must be conducted on a case-by-case basis to accommodate the specific analytical demands and physicochemical properties of the target analytes inherent to each method.

Nozzle voltage was then evaluated over the range of 0 to 2000 V, and increasing it to 2000 V enhanced sensitivity seven- to tenfold (Supplementary Figure S12), likely by overcoming the insulating effects of the superheated nitrogen gas. This improvement was more pronounced for more lipophilic FUL, supporting reports that at CE-MS flow rates (1–15 $\mu\text{L}/\text{min}$), ion desolvation is not a limiting factor, and higher nozzle voltages, combined with reduced

sheath gas flow or temperature, can substantially improve sensitivity [21, 34].

Optimisation of the sheath liquid

In this study, a coaxial sheath liquid interface was used for CE-MS coupling to enable stable electrospray formation at the low native CE flow rate. Although the sheath liquid stabilises the spray, it also dilutes the analyte and reduces sensitivity. Therefore, its composition and flow rate were optimised.

To determine the optimal organic solvent, various organic solvents (MeOH, EtOH, ACN, and *i*-PrOH) were mixed with water and FA in a fixed ratio of 50/49.9/0.1 (*v/v/v*). For ALP, EtOH gave marginally higher sensitivity than MeOH and *i*-PrOH, while for FUL, MeOH yielded the highest signal (Supplementary Figure S13). In contrast, ACN significantly suppressed signal intensity for both analytes. Accordingly, MeOH was selected as the optimal organic modifier.

Subsequent optimisation of MeOH content between 50 and 70% (*v/v*) in water containing 0.1% FA gave maximal responses for both analytes at 50% MeOH (Supplementary Figure S14). The concentration of FA in the 50% MeOH mixture was then varied from 0% to 0.2%, with 0.1% providing the greatest signal enhancement for both analytes (Supplementary Figure S15). Thus, the optimised sheath liquid composition was MeOH/water/FA in a 50/49.9/0.1 (*v/v/v*) ratio.

Sheath liquid flow rates between 3 and 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ were evaluated, with 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ yielding the highest signals due to reduced dilution (Supplementary Figure S16).

Finally, conventional ESI parameters, including nebuliser pressure (8–12 psi), drying gas temperature (250–350 $^{\circ}\text{C}$), drying gas flow rate (7–11 L/min), and capillary voltage (2000–3000 V) were further optimised (Supplementary Figures S17–S20), with final settings listed in “MS experiments”. The mass electropherogram of ALP and FUL obtained under the fully optimised MEKC-MS/MS conditions is presented in Supplementary Figure S21.

Optimisation of plasma sample preparation

Due to the complexity of blood plasma, extensive pretreatment is required before instrumental analysis. In this work, PPT was initially performed as described in section “Plasma sample preparation” to remove the proteins and prevent precipitation in organic solvents. However, consistent with previous observations [21], PPT alone occasionally caused electric current instabilities and irreproducible matrix effects in CE-MS, likely due to concentrated residual plasma components. Thus, an additional sample preparation step was needed.

In this study, for SE-LLME, CLF was used as an extraction solvent for its high density and broad solubilising capacity. PFOA, already employed as the running buffer surfactant, was also used in SE-LLME to prevent the ion-suppressing effect of any other residual surfactant. Its concentration is critical for the efficient extraction of the analytes. Namely, if its concentration is too low, emulsification will not occur, and analytes might not be extracted into CLF. On the other hand, if the PFOA concentration is too high, especially if it is above CMC, micelles would form and solubilise analytes in the water layer. As the final PFOA concentration in the extraction mixture depends on the volumes of all solvents, the extraction conditions were carefully optimised. Seven extraction conditions were tested (Supplementary Table 2), with each extraction carried out as described in section “Plasma sample preparation”, where the amount of the bottom layer collected for evaporation was always 90% of the total volume. The extraction recoveries were calculated by comparing analyte concentrations in pre-extraction spiked plasma samples and post-extraction spiked plasma. The obtained extraction recoveries in different SE-LLME experiments are given in Fig. 1. It can be seen that the optimal extraction condition for the maximal recoveries of ALP and FUL is 150 μL H₂O, 20 μL 50 mM PFOA and 50 μL CLF. This corresponds to the final PFOA concentration of 4.55 mM.

To assess the analyte recovery across different concentration levels, analyses were performed at the optimal conditions in triplicate at low, medium, and high concentrations.

Fig. 1 Bar chart showing recoveries of alpelisib (ALP) and fulvestrant (FUL) across seven SE-LLME conditions (mean \pm SD, $n = 3$). The optimal conditions are 150 μL H₂O, 20 μL 50 mM PFOA, and 50 μL chloroform which corresponds to a PFOA concentration of 4.55 mM

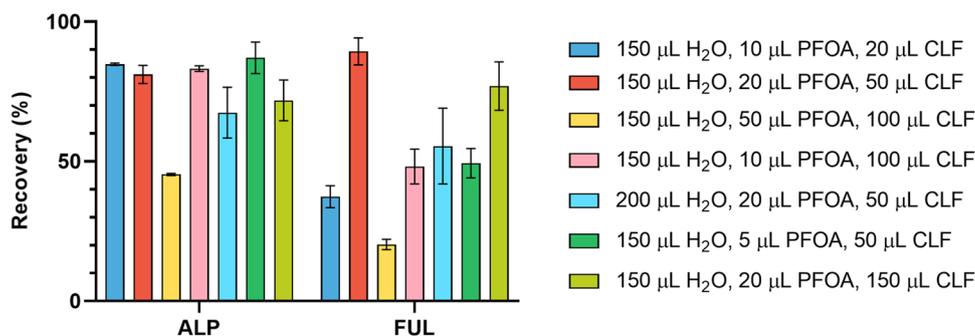


Table 1 Mean recoveries and their associated relative standard deviation (RSD) values following sample preparation by PPT-SE-LLME ($n = 3$ for each concentration level)

Analyte	Concentration (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Analyte	Concentration (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
ALP	500	94.2	6.9	FUL	25	78.7	5.8
	750	88.4	15.0		37.5	81.2	1.0
	1500	97.3	6.3		75	101.5	5.7

The mean extraction recovery values are given in Table 1. The empirically obtained recoveries and corresponding reproducibility were excellent, thereby substantiating that PPT followed by SE-LLME constitutes a robust and efficient sample preparation workflow for the present study.

The integration of PPT-SE-LLME with sweeping yielded impressive total concentration factors of 941 for ALP and 96.4 for FUL, demonstrating the high efficiency of the combined enrichment strategy. This straightforward approach significantly enhances sensitivity, making it well suited for MEKC-MS/MS analysis of plasma samples containing very low concentrations of analytes of interest [35, 36].

Method validation

The developed analytical method was comprehensively validated in accordance with the guidelines established by the ICH and EMA for bioanalytical method validation [37]. The validation encompassed assessment of specificity, selectivity, linearity and calibration range, matrix effects, accuracy and precision, stability, carry-over, and dilution integrity. Quality control (QC) samples were prepared at four concentration levels spanning the calibration range for the study of accuracy and precision: lower limit of quantification (LLOQ), low, medium, and high. For the investigation of stability and matrix effects, QC samples were prepared at low and high concentration levels.

The guidelines recommend the use of internal standards (IS), and their absence must be justified. Usually, isotopically labelled (mostly deuterated) analytes are used as an internal standard since they are expected to have almost the same migration time, matrix effect and detector response as the corresponding unlabelled analyte. Therefore, in this work, D_3 -FUL was used as an IS for FUL. On the other hand, currently, there is no isotopically labelled ALP commercially available. Therefore, preliminary experiments were carried out to test whether palbociclib (PAL) can be used as an IS for ALP. This sounded promising due to the similar molecular masses of ALP and PAL (441.5 Da and 447.5 Da, respectively) and similar migration times in the developed method (PAL migrated less than a minute after ALP). However, it has been shown that accuracy and precision were not satisfactory in this case. Therefore, the validation proceeded without an IS for ALP. This is justified by the satisfactory accuracy and precision of the method as presented later.

Specificity and selectivity

Owing to the utilisation of the MRM mode, which enables targeted analysis, and the absence of known metabolites or degradation products of ALP and FUL sharing identical m/z ratios, the method is regarded as highly specific.

The method's selectivity was evaluated by analysing plasma samples obtained from six distinct sources, including both hemolyzed and highly lipemic specimens. No interfering signals exceeding 20% of the analyte response at the lower limit of quantification (LLOQ) or 5% of the internal standard response were observed at the migration times of the analytes (Fig. 2).

Linearity and calibration range

The linearity of the method was assessed over calibration ranges of 200–2000 ng/mL for ALP and 10–100 ng/mL for FUL, selected based on analyte concentrations typically observed in clinical studies [35, 36]. Preliminarily, lower LLOQ concentrations were tested for ALP, but accuracy and precision, as well as linearity, were not satisfactory due to the absence of IS. Nevertheless, LLOQ of 200 ng/mL is sufficient for most patients according to the literature data. Calibration curves were generated using linear regression with a $1/x^2$ weighting factor, incorporating IS correction for FUL. Following ICH guidelines, the accuracy of the back-calculated concentrations was within $\pm 15\%$ of the nominal values ($\pm 20\%$ for the LLOQ) for at least 75% of the calibration standards, including a minimum of six samples. Correlation coefficients (r) ranged from 0.9963 to 0.9986 for ALP and from 0.9972 to 0.9997 for FUL across all constructed calibration curves. Nevertheless, due to the absence of IS for ALP, fresh calibration curves were prepared for each analytical run.

Matrix effect

Matrix effect (ME) is the phenomenon of suppressed or enhanced signal intensities due to the presence of interferences from the sample matrix and is often present when complex samples like plasma are analysed. Therefore, it is mandatory to evaluate ME to show that it is reproducible between different matrices. In this study, ME was assessed by analysing plasma from six distinct sources, including hemolyzed and

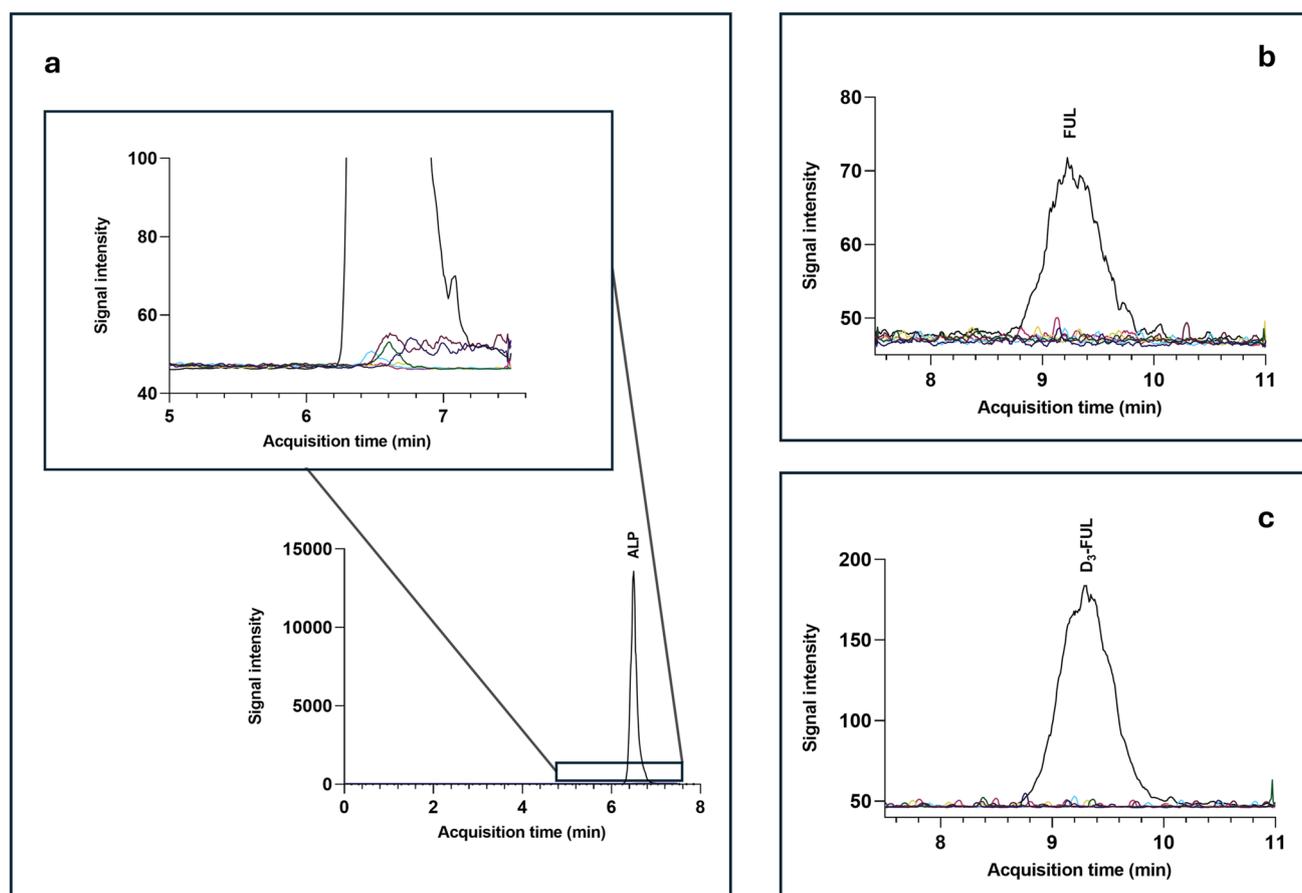


Fig. 2 Results of selectivity demonstrated by the overlaid extracted ion chromatograms (EIC) of **a** alpelisib (ALP), **b** fulvestrant (FUL), and **c** D₃-fulvestrant (D₃-FUL) at their respective LLOQ concentration level and six blank plasma samples at their quantifier *m/z* transitions

highly lipemic plasma. For each plasma source, triplicates were prepared by spiking at both low and high concentration levels following sample processing. These were then compared against standard solutions prepared at equivalent concentrations. ME was quantified as the mean accuracy bias across matrices, accompanied by the corresponding RSD values, as calculated using the following equation:

$$\text{ME}(\%) = \left(\frac{\text{Signal intensity of the analyte in sample matrix}}{\text{Signal intensity of the analyte in standard solution}} - 1 \right) \cdot 100\%$$

The obtained MEs are given in Table 2. It can be seen that there is a noticeable ion suppression of ALP in plasma matrices at both low and high levels. However, absolute ME is less important than the relative ME between different plasma sources [38]. Namely, the relatively high

absolute ME for ALP does not present an analytical problem since the reproducibility was satisfactory between different plasma matrices. MEs for FUL and D₃-FUL were comparable, and thus, the overall ME for FUL after the IS correction was negligible.

Accuracy and precision

The accuracy and precision of the method were assessed using QC samples prepared in quintuplicate at four distinct concentration levels, as outlined previously. Accuracy was determined by calculating the mean bias relative to the nominal concentrations, while precision was expressed as the RSD among replicates. All measured biases fell within the acceptable range of $\pm 15\%$, and RSD values consistently

Table 2 Mean ME and RSD values for six distinct plasma sources ($n = 3$ per concentration level and plasma source)

Analyte	Concentration (ng/mL)	ME (%)	RSD (%)	Analyte	Concentration (ng/mL)	ME (%)	RSD (%)
ALP	500	-45.3	11.6	FUL	25	0.4	8.1
	1500	-20.6	14.6		75	-1.8	7.5

remained below 15%. A comprehensive summary of these results is provided in Table 3.

Stability

During the optimisation of the method, it was found that the stock solutions are stable at +4 °C for a minimum duration of three months. However, according to the guidelines, the analytes' stability in the sample matrix must be demonstrated under the various conditions—stability during the analytical run, bench-top stability, freeze-thaw stability and long-term stability. All stability studies were performed by preparing QC samples in triplicate at low and high concentration levels, exposing the samples to certain conditions, analysing them, and then expressing a mean bias from the freshly prepared samples and corresponding RSD values. For the stability during the analytical run, QC samples were left on the CE autosampler at 25 °C for 10 h. Next, for the bench-top stability, QC samples were placed on a working bench for 2 h at 25 °C. Then, for the freeze-thaw stability, QC samples underwent 3 cycles of thawing from −18 °C to 25 °C for 30 min. The time between each thawing cycle was at least 12 h. Finally, long-term stability was assessed by leaving QC samples at −18 °C for 2 weeks. The mean biases

in found concentrations from nominal concentration were all less than 15% at both concentration levels, demonstrating the analytes' stability in various conditions (Table 4).

Dilution integrity and carry-over

Dilution integrity assessment is required when there is an expectation that the analyte in the real sample might be present in concentrations higher than the upper limit of quantification (ULOQ) of the calibration range. Since ALP in some cases can be present in human plasma at concentrations above 2000 ng/mL, dilution integrity was investigated as well. Its goal is to demonstrate that the dilution does not affect the method's accuracy and precision. For this, QC samples were prepared in quintuplicate at a concentration of 2.5 times higher than the ULOQ (5000 ng/mL and 250 ng/mL for ALP and FUL, respectively). Then, these samples were diluted with blank plasma 5 times for the concentrations to fall into the middle of the calibration range. The mean biases from the nominal concentrations were −1.5% and 2.7%, and RSD values were 7.9% and 5.1%, for ALP and FUL, respectively (Supplementary Table 3). These values demonstrate the suitable dilution integrity of the method.

To evaluate potential carry-over, blank plasma samples were injected directly after the highest concentration standard in the calibration series. No interfering peaks corresponding to ALP or FUL were observed at their respective migration times in the blank runs (Supplementary Figure S22). The signal responses in these post-injection blanks were below 20% of the LLOQ for the analytes and below 5% for the IS, confirming the absence of carry-over and ensuring method reliability in routine clinical analysis.

Application to real patient samples

The fully validated SE-LLME sweeping MEKC-MS/MS method was implemented for the analysis of plasma samples obtained from three female patients (aged 42, 62 and 69), undergoing combination therapy with ALP and FUL. The

Table 3 Results of intra-day ($n = 5$) and inter-day ($n = 15$) accuracy and precision assessment

Analyte	Concentration (ng/mL)	Intra-day ($n = 5$)		Inter-day ($n = 15$)	
		Bias (%)	RSD (%)	Bias (%)	RSD (%)
ALP	200	−4.5	11.6	−10.3	12.6
	500	−5.0	5.9	−3.0	11.1
	750	9.0	11.9	7.5	11.8
	1500	−5.6	9.7	0.8	10.8
FUL	10	−8.4	2.0	−6.4	7.4
	25	−3.6	1.4	−4.1	8.6
	37.5	2.9	4.7	−2.9	10.3
	75	−1.8	10.2	−5.9	8.3

Table 4 Analytes' stability results ($n = 3$ per concentration and condition)

Analyte	Concentration (ng/mL)		Analytical run stability	Bench-top stability	Freeze-thaw stability	Long-term stability
ALP	500	Bias (%)	6.0	4.1	−9.8	−0.4
		RSD (%)	7.1	5.1	4.5	4.4
	1500	Bias (%)	11.1	−2.0	−4.0	−9.5
		RSD (%)	4.7	3.3	3.6	8.7
FUL	25	Bias (%)	4.3	2.6	3.7	1.4
		RSD (%)	3.8	3.2	2.8	0.1
	75	Bias (%)	−6.6	−10.3	2.2	−5.5
		RSD (%)	3.8	2.0	2.2	0.5

Table 5 Found drug concentrations in patient plasma samples

Patient	ALP dosage	Sampling time after ALP administration (hours)	Determined concentration (ng/mL)	FUL dosage	Sampling time after FUL administration (days)	Determined concentration (ng/mL)
1	300 mg daily	22.5	1075.6	500 mg monthly	28	13.82
2	300 mg daily	22.0	552.4	500 mg monthly	28	10.73
3	300 mg daily	1.0	213.8	500 mg monthly	21	28.15

plasma samples were analysed against a freshly prepared calibration curve. The determined plasma concentrations of ALP and FUL, together with the corresponding dosage regimens, are summarised in Table 5, whereas mass electropherograms are provided in Supplementary Figures S23–S25.

The found concentrations in patient plasma samples align well with the concentrations found in the clinical studies [35, 36]. In the case of patient 3, it can be seen that the plasma concentration is the lowest of all three patients, even though patient 3 has taken the ALP dose just 1 h before sampling. This might be a case of lack of adherence or ultra-fast metabolism. To further investigate similar cases where the concentration of ALP seems to be lower than the LLOQ of this method, revalidation with a broader calibration range is advised. However, in this proof-of-concept study, ALP concentrations were successfully determined in all patients, which substantiates the applicability of the developed method for TDM of target drugs.

Additionally, a critical comparison with previously published methods is given in Supplementary Table 4, showing the advantages of this work compared to previously published methods. It is also worth noting that this is the only method at all for the simultaneous determination of ALP and FUL, regardless of the technique.

Conclusions

In this work, a novel and fully validated sweeping MEKC-MS/MS method was developed for the simultaneous determination of ALP and FUL in human plasma, addressing a critical unmet need in therapeutic drug monitoring for patients with PIK3CA-mutated HR+/HER2– breast cancer. The method combines protein precipitation with surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction (PPT-SE-LLME), followed by sweeping online preconcentration during the MEKC-MS/MS analysis. This integrated approach provided high extraction efficiency, minimal matrix interference, and significant improvements in sensitivity, achieving total concentration factors of 941 for ALP and 96.4 for FUL. Full validation in accordance with ICH and EMA guidelines confirmed excellent linearity, accuracy, precision,

stability, and absence of carry-over or dilution-related bias. Application to patient samples demonstrated the method's practical clinical relevance, with measured concentrations within the method's calibration range and consistent with clinical expectations. As the first CE method for ALP quantification in biological matrices and the only available method for concurrent monitoring of ALP and FUL, this strategy offers a compelling, sustainable, and cost-efficient alternative to traditional chromatographic platforms, supporting broader adoption of CE-MS in routine bioanalysis.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00216-025-06233-z>.

Acknowledgements We want to thank Tajana Silovski for providing patient plasma samples used in this study. Also, we would like to thank all the personnel involved in the sample collection and storage. Zvonimir Mlinarić is grateful to Kristian Morić-Španić for fruitful lab discussions about this work.

Author contribution Zvonimir Mlinarić: conceptualisation, methodology, formal analysis, investigation, data curation, writing—original draft, writing—review and editing, visualisation. Lu Turković: methodology, validation, writing—review and editing, visualisation. Biljana Nigović: conceptualisation, writing—review and editing, supervision. Miranda Sertić: conceptualisation, resources, writing—review and editing, supervision, project administration, funding acquisition.

Funding This work was supported by the Croatian Science Foundation (Grant Numbers UIP-2019-04-8461 and DOK-2021-02-4995) and the European Regional Development Fund Farminova (Grant Number KK.01.1.1.02.0021).

Data availability Data will be made available upon request.

Declarations

Institutional review board statement The study was conducted in accordance with the ethical principles outlined in the Declaration of Helsinki and received approval from the Ethics Committee of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy (Approval No. 251-62-03-19-30; date of approval: April 23, 2019), as well as from the Ethics Committee of the University Hospital Centre Zagreb (Approval No. 02/21-JG; date of approval: August 20, 2019). Written informed consent was obtained from all participants before their inclusion in the study.

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Shah AN, Metzger O, Bartlett CH, Liu Y, Huang X, Cristofanilli M. Hormone Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer in Young Women: Emerging Data in the Era of Molecularly Targeted Agents. *Oncologist.* 2020;25:e900–8. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0729>.
- Markham A. Alpelisib: first global approval. *Drugs.* 2019;79:1249–53. <https://doi.org/10.1007/S40265-019-01161-6>.
- André F, Ciruelos EM, Juric D, Loibl S, Campone M, Mayer IA, Rubovszky G, Yamashita T, Kaufman B, Lu YS, Inoue K, Pápai Z, Takahashi M, Ghaznawi F, Mills D, Kaper M, Miller M, Conte PF, Iwata H, Rugo HS. Alpelisib plus fulvestrant for *PIK3CA*-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Ann Oncol.* 2021;32:208–17. <https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2020.11.011>.
- Shen S, Chen Y, Carpio A, Chang C, Iyengar NM. Incidence, risk factors, and management of alpelisib-associated hyperglycemia in metastatic breast cancer. *Cancer.* 2023;129:3854–61. <https://doi.org/10.1002/CNCR.34928>.
- Cheung YMM, Cromwell GE, Tolaney SM, Min L, McDonnell ME. Factors leading to alpelisib discontinuation in patients with hormone receptor positive, human epidermal growth factor receptor-2 negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2022;192:303–11. <https://doi.org/10.1007/S10549-021-06476-1>.
- Hopkins BD, Pauli C, Xing D, Wang DG, Li X, Wu D, Amadiume SC, Goncalves MD, Hodakoski C, Lundquist MR, Bareja R, Ma Y, Harris EM, Sboner A, Beltran H, Rubin MA, Mukherjee S, Cantley LC. Suppression of insulin feedback enhances the efficacy of PI3K inhibitors. *Nature.* 2018;560:499–503. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0343-4>.
- Ziegengeist JL, Elmes JB, Strassels SA, Patel JN, Moore DC. Alpelisib-induced diabetic ketoacidosis: a pharmacovigilance analysis of the FDA adverse event reporting system and review of the literature. *Clin Breast Cancer.* 2024;24:e204–9. <https://doi.org/10.1016/J.CLBC.2024.01.004>.
- Fang Z, Zhang H, Guo J, Guo J. Overview of therapeutic drug monitoring and clinical practice. *Talanta.* 2024;266: 124996. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124996>.
- Seo SW, Kim JM, Han DG, Geum D, Yun H, Yoon IS. A sensitive HPLC-FLD method for the quantification of alpelisib, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in rat plasma: drug metabolism and pharmacokinetic evaluation *in vitro* and *in vivo*. *J Chromatogr B.* 2021;1163: 122508. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2020.122508>.
- Wang Q, Lan X, Zhao Z, Su X, Zhang Y, Zhou XY, Xu RA. Characterization of alpelisib in rat plasma by a newly developed UPLC-MS/MS method: application to a drug-drug interaction study. *Front Pharmacol.* 2021;12: 743411. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.743411>.
- Lee S, Kim MS, Jeong JW, Chae J woo, Koo TS, Maeng HJ, Chung SJ, Lee KR, Chae YJ. Bioanalysis of alpelisib using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and application to pharmacokinetic study. *J Anal Sci Technol.* 2022;13:1–13. <https://doi.org/10.1186/S40543-022-00340-7>.
- Ghanghav V, Chawathe A, Chauthe SK, Sharma N. Development of stability-indicating assay method and liquid chromatography–quadrupole-time-of-flight mass spectrometry-based structural characterization of the forced degradation products of alpelisib. *Biomed Chromatogr.* 2024;38:e5813. <https://doi.org/10.1002/BMC.5813>.
- Bouali W, Erk N, Sert B, Harputlu E. Evaluating the simultaneous electrochemical determination of antineoplastic drugs using LaNiO₃/g-C₃N₄@RGH nanocomposite material. *Talanta.* 2024;278:126486. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2024.126486>.
- Bouali W, Kurtay G, Ayşe Genç A, Erk N. Comprehensive analysis of Alpelisib detection: uniting molecular docking, dynamics, and precision electrochemistry at the PEDOT:PSS-carbon paste interface. *Microchem J.* 2024;204: 111014. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2024.111014>.
- Bouali W, Erk N, Genc AA, Ahmed HEH, Soylak M. A new and powerful electrochemical sensing platform based on MWCNTs@Fe₃O₄@CuAl₂O₄ for the determination of the anticancer agent Alpelisib in bulk and biological fluids. *Microchem J.* 2023;195: 109478. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2023.109478>.
- Mlinarić Z, Turković L, Babić I, Silovski T, Kočevič Glavac N, Sertić M. Development, cross-validation and greenness assessment of capillary electrophoresis method for determination of ALP in pharmaceutical dosage forms – an alternative to liquid chromatography. *RSC Adv.* 2024;14:32876–82. <https://doi.org/10.1039/D4RA05715E>.
- Turković L, Bočkor L, Ekpenyong O, Silovski T, Lovrić M, Crnković S, Nigović B, Sertić M. Development and validation of a novel LC-MS/MS method for the simultaneous determination of abemaciclib, palbociclib, ribociclib, anastrozole, letrozole, and fulvestrant in plasma samples: a prerequisite for personalized breast cancer treatment. *Pharmaceuticals.* 2022;15: 614. <https://doi.org/10.3390/ph15050614>.
- Sato Y, Shigeta K, Hirasawa T, Sato T, Ogura J, Maekawa M, Ebata A, Hamanaka Y, Tada H, Ishida T, Kikuchi M, Mano N. Establishment of an analytical method for simultaneous quantitation of CDK4/6 inhibitors, aromatase inhibitors, and an estrogen receptor antagonist in human plasma using LC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B.* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122655>.
- Turković L, Mutavdžić Pavlović D, Mlinarić Z, Skenderović A, Silovski T, Sertić M. Optimisation of solid-phase extraction and LC-MS/MS analysis of six breast cancer drugs in patient plasma samples. *Pharmaceuticals.* 2023;16: 1445. <https://doi.org/10.3390/PH16101445>.
- Mlinarić Z, Turković L, Sertić M. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by sweeping micellar electrokinetic chromatography–tandem mass spectrometry for determination of six breast cancer drugs in human plasma. *J Chromatogr A.* 2024;1718: 464698. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464698>.
- Turković L, Koraj N, Mlinarić Z, Silovski T, Crnković S, Sertić. Optimisation of dispersive liquid-liquid microextraction for plasma sample preparation in bioanalysis of CDK4/6 inhibitors in therapeutic combinations for breast cancer treatment. *Heliyon.* 2023;9(8):e18880. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18880>.
- Ranasinghe M, Quirino JP. Can we replace liquid chromatography with the greener capillary electrophoresis? *Curr Opin Green Sustain Chem.* 2021;3:100515. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100515>.
- Moreno-González D, Huertas-Pérez JF, García-Campaña AM, Gámiz-Gracia L. Vortex-assisted surfactant-enhanced emulsification liquid–liquid microextraction for the determination of carbamates in juices by micellar electrokinetic chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2015;139:174–80. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2015.02.057>.
- Wu Q, Chang Q, Wu C, Rao H, Zeng X, Wang C, Wang Z. Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification

- microextraction for the determination of carbamate pesticides in water samples by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2010;1217:1773–8. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.01.060>.
26. Vichapong J, Burakham R, Srijaranai S. Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid–liquid microextraction with solidification of floating organic droplet combined with HPLC for the determination of neonicotinoid pesticides. *Talanta*. 2013;117:221–8. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2013.08.034>.
 27. Moradi M, Yamini Y, Esrafil A, Seidi S. Application of surfactant assisted dispersive liquid–liquid microextraction for sample preparation of chlorophenols in water samples. *Talanta*. 2010;82:1864–9. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2010.08.002>.
 28. Yang ZH, Le LuY, Liu Y, Wu T, Zhou ZQ, Liu DH. Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid–liquid microextraction. *J Chromatogr A*. 2011;1218:7071–7. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.08.029>.
 29. Moradi M, Yamini Y, Baheri T. Analysis of abuse drugs in urine using surfactant-assisted dispersive liquid–liquid microextraction. *J Sep Sci*. 2011;34:1722–9. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201100132>.
 30. Zhang Y, Lee HK. Low-density solvent-based vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for the fast determination of phthalate esters in bottled water. *J Chromatogr A*. 2013;1274:28–35. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2012.12.017>.
 31. Li RH, Liu DH, Yang ZH, Zhou ZQ, Wang P. Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction for the determination of triazine herbicides in water samples by microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*. 2012;33:2176–83. <https://doi.org/10.1002/ELPS.201200104>.
 32. Wang C, Yan P, Xing H, Jin C, Xiao J-X. Thermodynamics of aggregation of ammonium/tetraalkylammonium perfluorooctanoates: effect of counterions[†]. *J Chem Eng Data*. 2010;55:1994–9. <https://doi.org/10.1021/JE900916E>.
 33. Kancharla S, Canales E, Alexandridis P. Perfluorooctanoate in aqueous urea solutions: micelle formation, structure, and microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20225761>.
 34. Moreno-González D, Jáč P, Švec F, Nováková L. Determination of Sudan dyes in chili products by micellar electrokinetic chromatography-MS/MS using a volatile surfactant. *Food Chem*. 2019;310:125963. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125963>.
 35. Juric D, Rodon J, Tabernero J, Janku F, Burris HA, Schellens JHM, Middleton MR, Berlin J, Schuler M, Marta GM, Rugo HS, Ruth SB, Huang A, Bootle D, Demanse D, Blumenstein L, Coughlin C, Quadt C, Baselga J. Phosphatidylinositol 3-kinase a–selective inhibition with alpelisib (BYL719) in PIK3CA-altered solid tumors: results from the first-in-human study. *J Clin Oncol*. 2018;36:1291–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.7107>.
 36. Pritchard KI, Rolski J, Papai Z, Mauriac L, Cardoso F, Chang J, Panasci L, Ianuli C, Kahan Z, Fukase K, Lindemann JPO, MacPherson MP, Neven P. Results of a phase II study comparing three dosing regimens of fulvestrant in postmenopausal women with advanced breast cancer (FINDER2). *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123:453–61. <https://doi.org/10.1007/S10549-010-1022-9>.
 37. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH harmonised guideline Bioanalytical Method Validation M10. 2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf. Accessed 08 Aug 2025.
 38. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. *Anal Chem*. 2003;75(13):3019–30. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of alpelisib and fulvestrant in human plasma

Zvonimir Mlinarić ^a, Lu Turković ^a, Biljana Nigović ^a, Miranda Sertić ^a

^a University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Analysis, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Corresponding author:

Prof. Dr. Miranda Sertić

University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Analysis, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

e-mail: miranda.sertic@pharma.unizg.hr

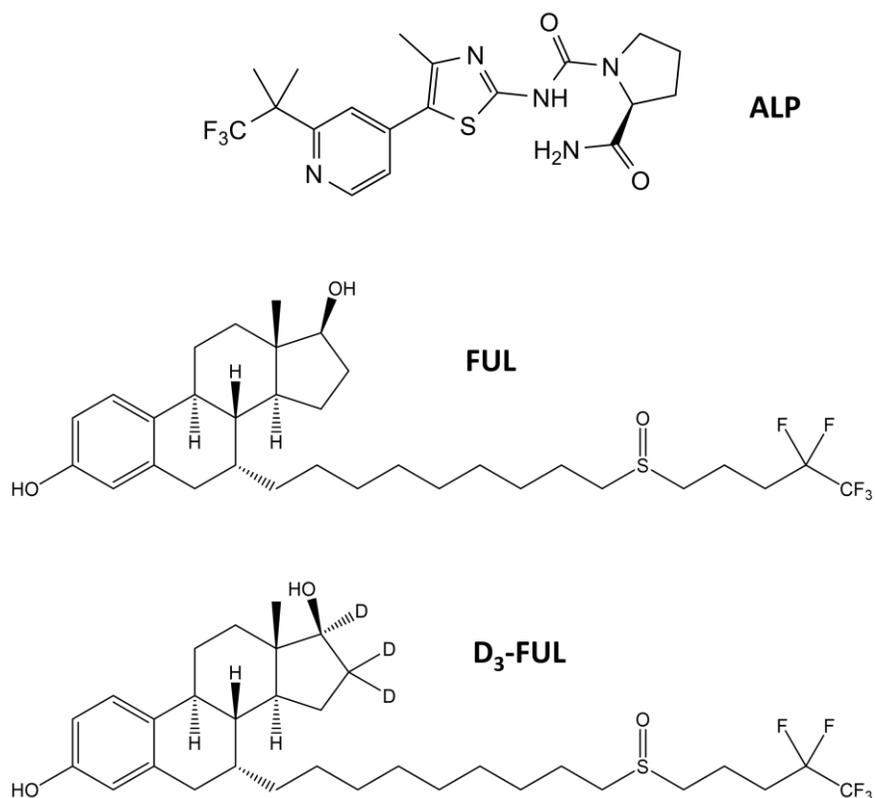


Figure S1. Molecular structures of alpelisib (ALP), fulvestrant (FUL), and deuterated fulvestrant (D₃-FUL)

Table S1. Selected quantifier and qualifier transitions of the analytes and corresponding optimised collision energies and fragmentor voltages.

Analyte	Fragmentor voltage (V)	Quantifier ion		Qualifier ion	
		Transition (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)	Transition (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)
ALP	140	442.2 → 328.1	25	442.2 → 288.1	50
FUL	145	607.4 → 589.5	17	607.4 → 467.2	25
D ₃ -FUL	125	610.3 → 592.0	16	610.3 → 468.4	25

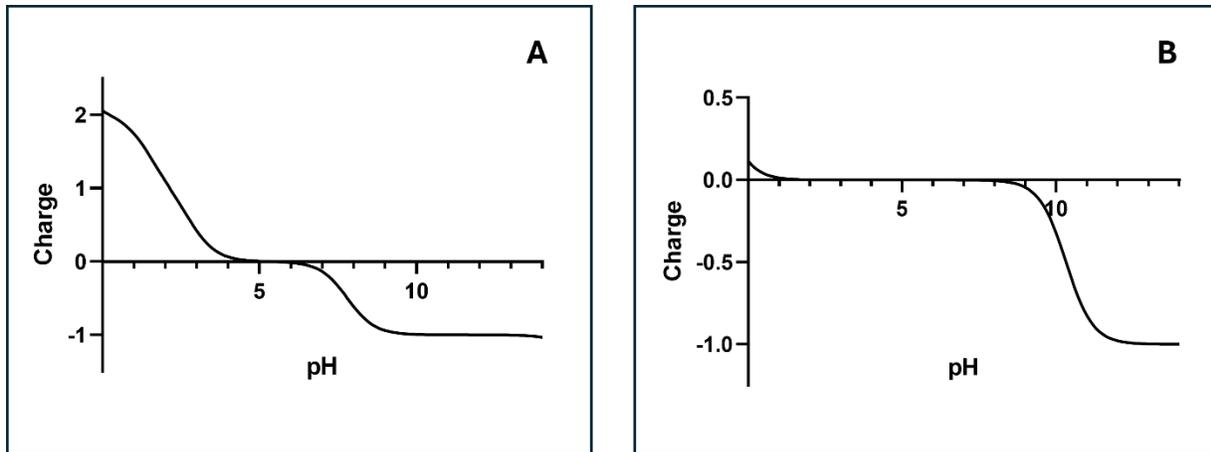


Figure S2. Charges of **A)** alpelisib and **B)** fulvestrant in the pH range 0–14 predicted using Chemicalize software (ChemAxon).

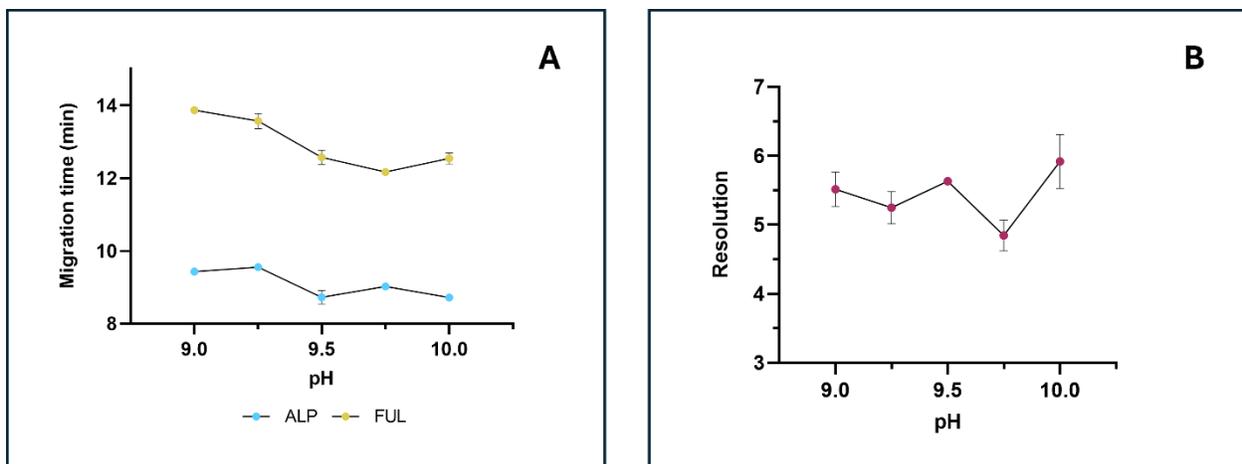


Figure S3. Effect of pH of the BGE on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

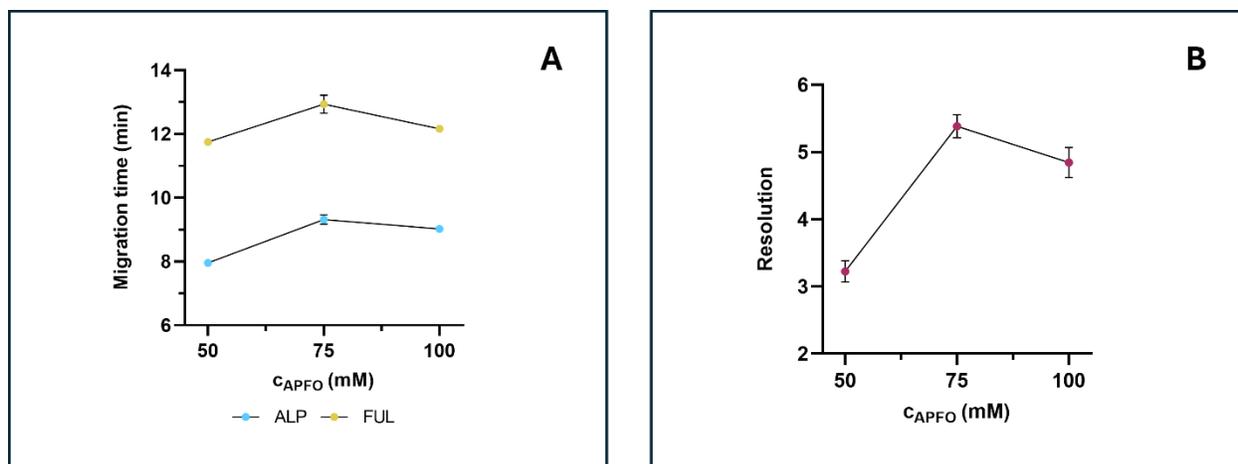


Figure S4. Effect of APFO concentration in the BGE on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

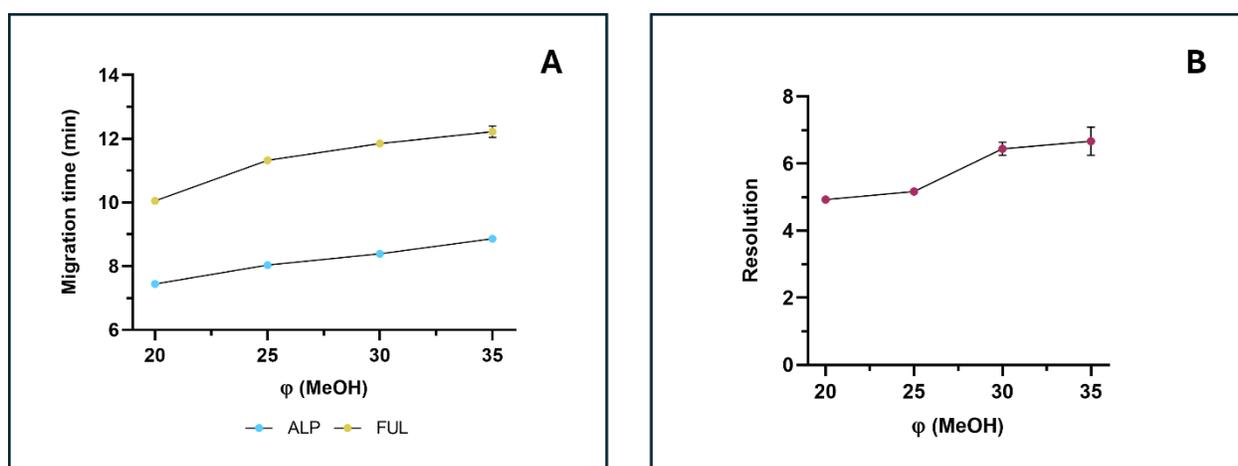


Figure S5. Effect of MeOH volumetric ratio in the BGE on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

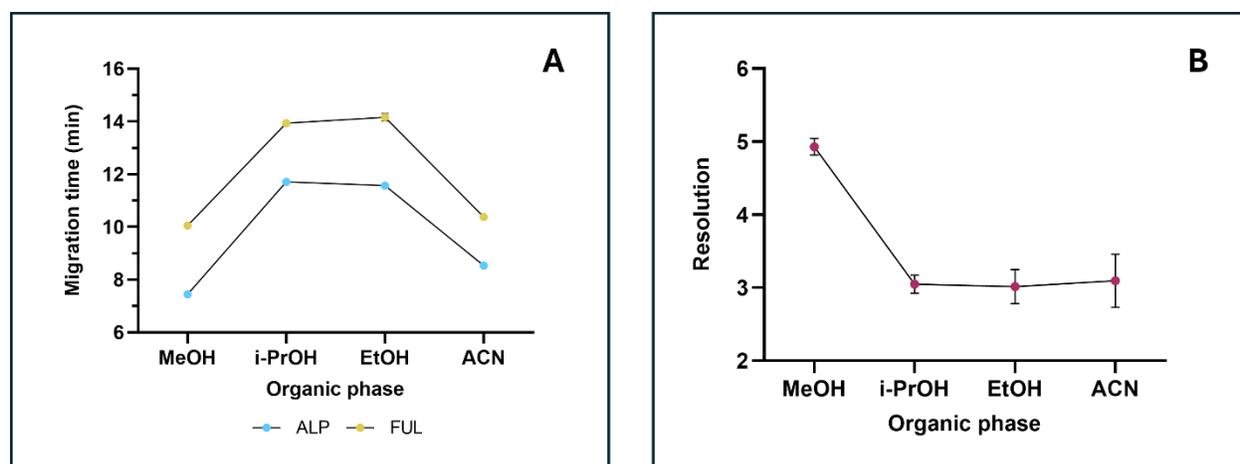


Figure S6. The effect of the different BGE compositions on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$). The BGE was composed of 20:5:75 (v/v/v) MeOH-organic solvent-APFO in water solution, where organic solvent was ACN, EtOH or i-PrOH.

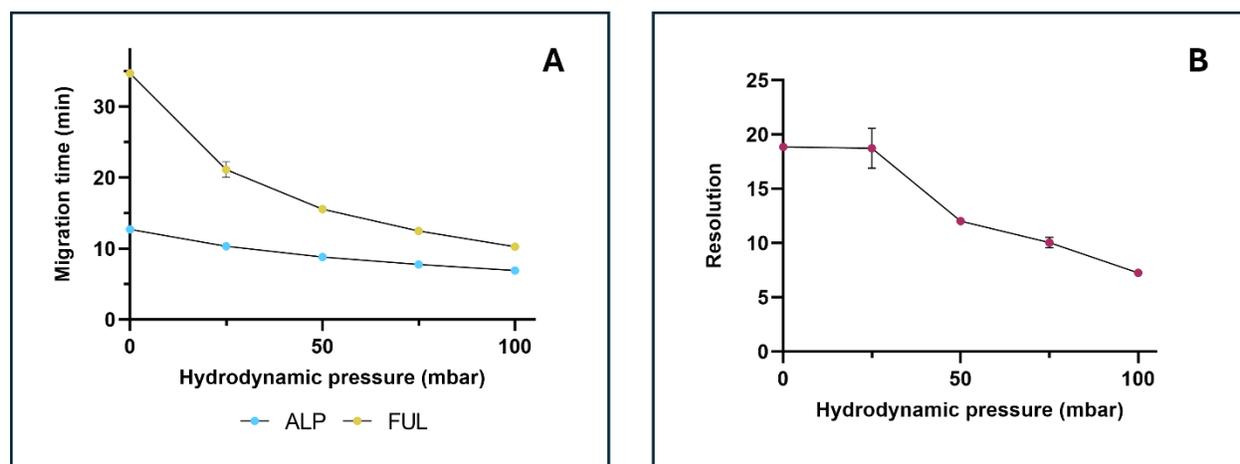


Figure S7. Effect of additional hydrodynamic pressure during the analysis on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

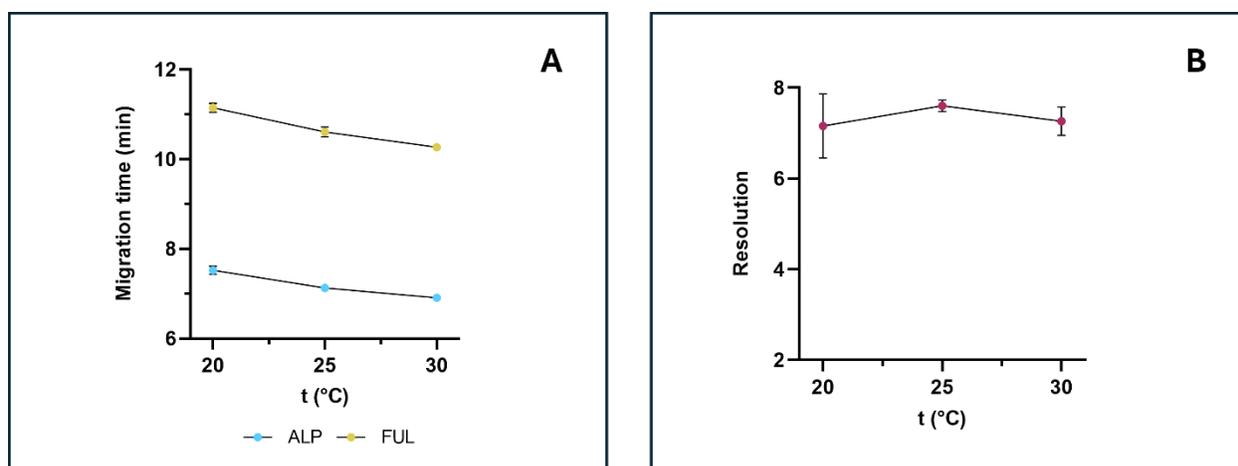


Figure S8. Effect of capillary temperature on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

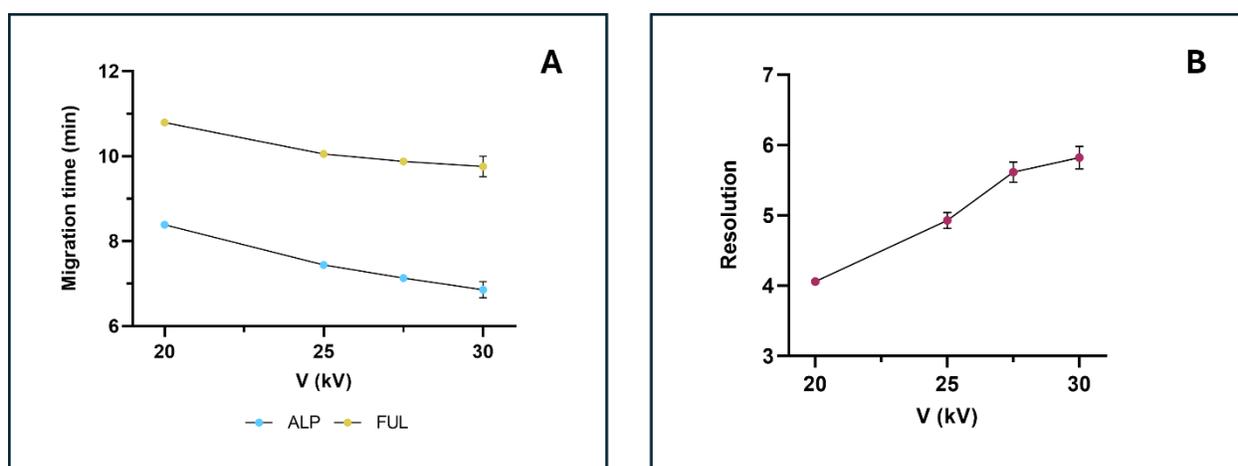


Figure S9. Effect of separation voltage on **A)** migration times and **B)** resolutions of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

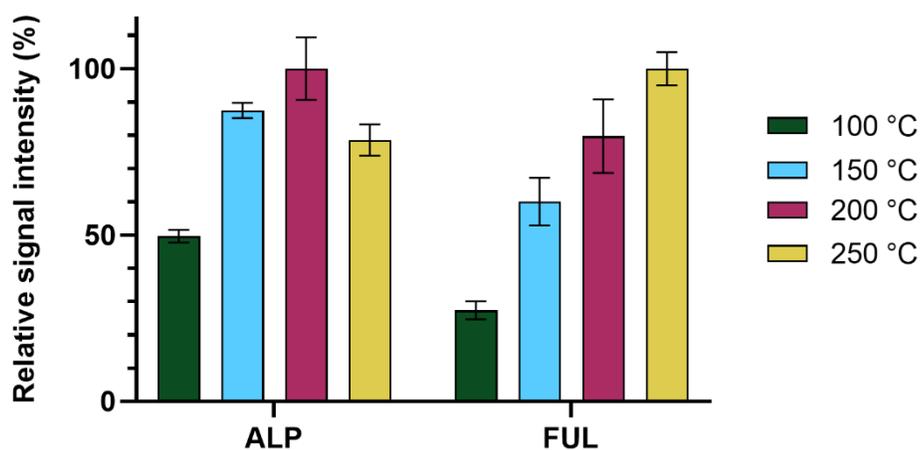


Figure S10. Effect of sheath gas temperature on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

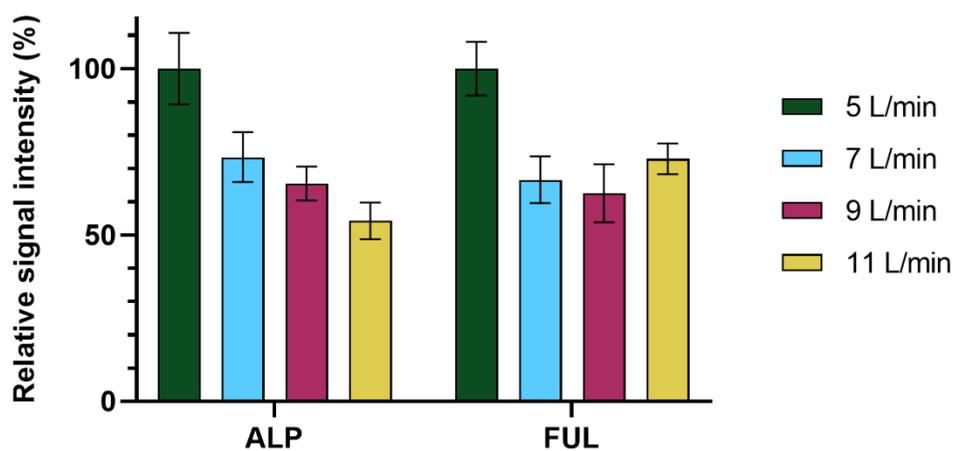


Figure S11. Effect of sheath gas flow rate on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

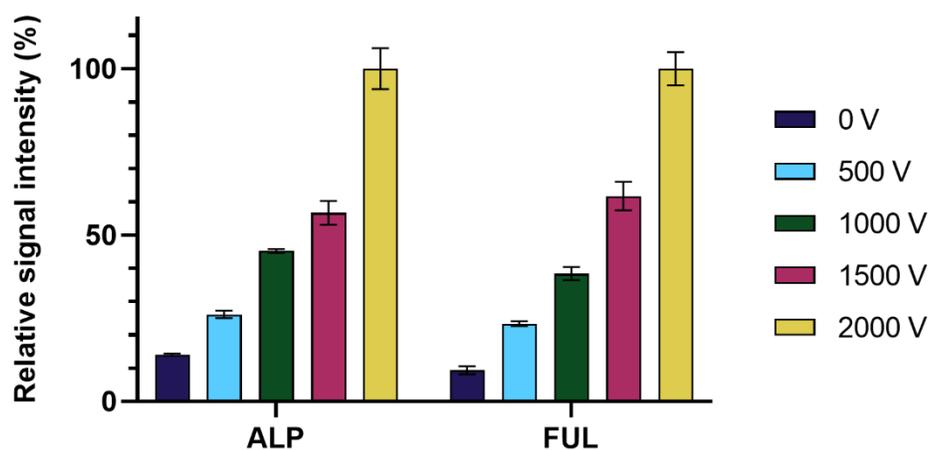


Figure S12. Effect of nozzle voltage on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

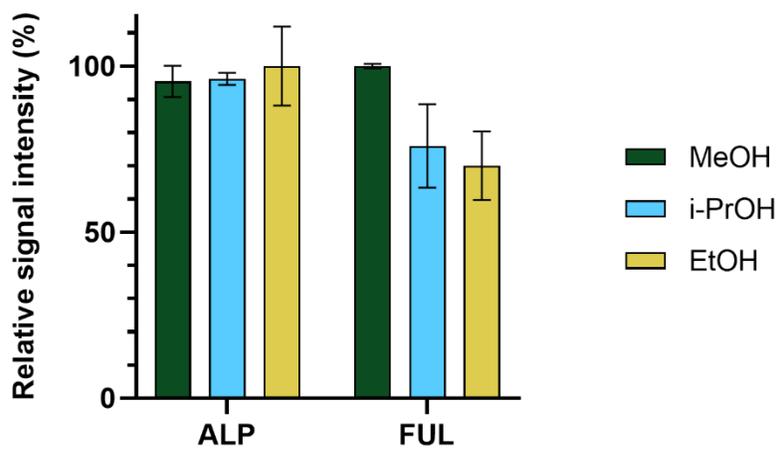


Figure S13. Effect of organic solvent type in the sheath liquid on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

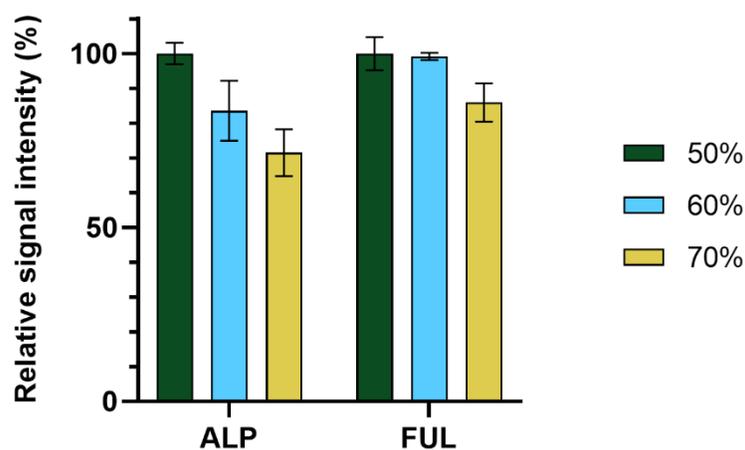


Figure S14. Effect of methanol content in the sheath liquid on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

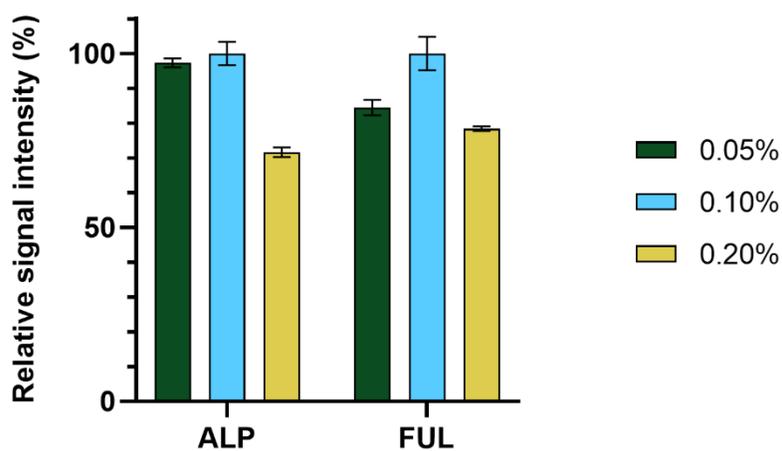


Figure S15. Effect of formic acid concentration in the sheath liquid on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

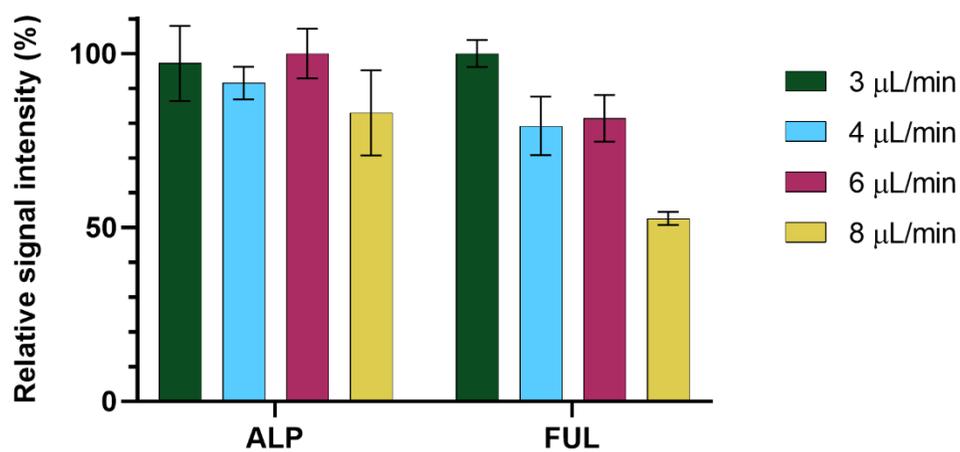


Figure S16. Effect of sheath liquid flow rate on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

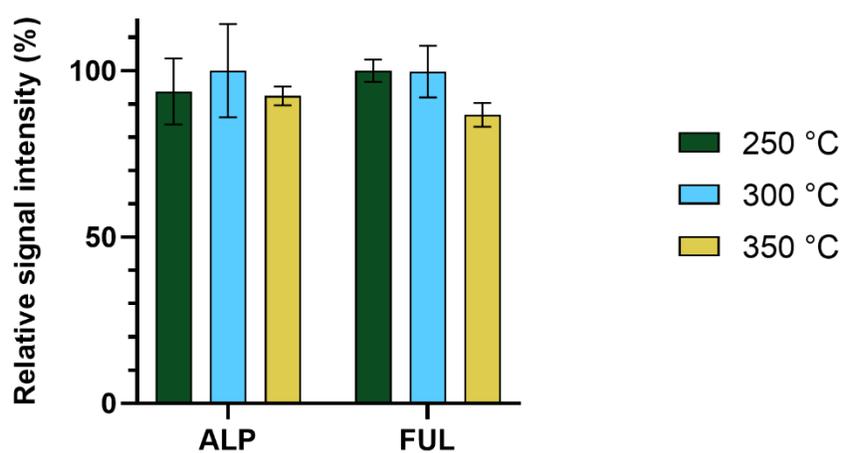


Figure S17. Effect of gas temperature on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

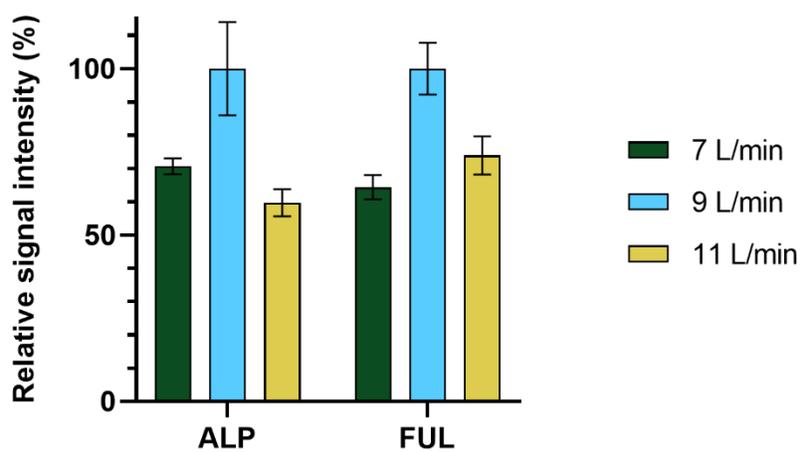


Figure S18. Effect of gas flow rate on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

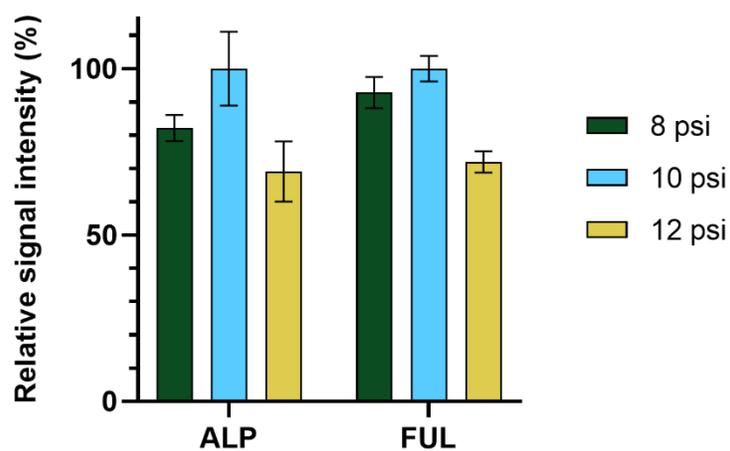


Figure S19. Effect of nebuliser pressure on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

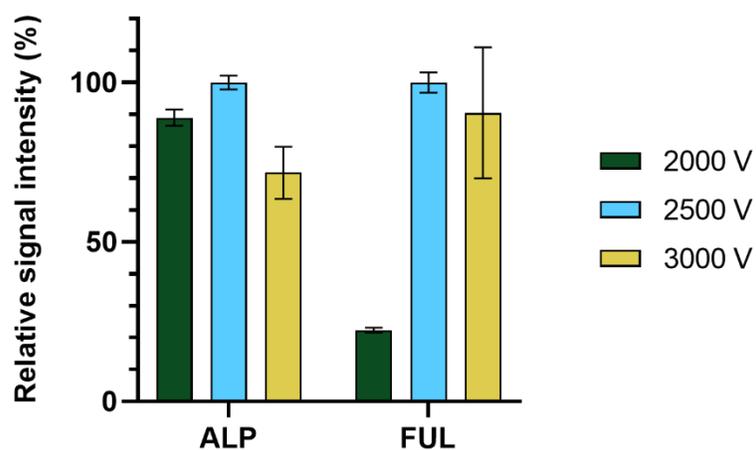


Figure S20. Effect of capillary voltage on relative signal intensities of the analytes (mean \pm SD, $n = 3$)

Table S2. Results of the dilution integrity assessment upon the 5-fold dilution of samples with alpelisib and fulvestrant concentrations above the ULOQ ($n = 5$)

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Replicate	Found concentration (ng/mL)	Mean bias (%)	RSD (%)
ALP	1000	1	1097.0	-1.5	7.9
		2	960.7		
		3	880.7		
		4	1047.6		
		5	938.9		
FUL	50	1	48.83	2.7	5.1
		2	48.89		
		3	46.15		
		4	53.22		
		5	48.13		

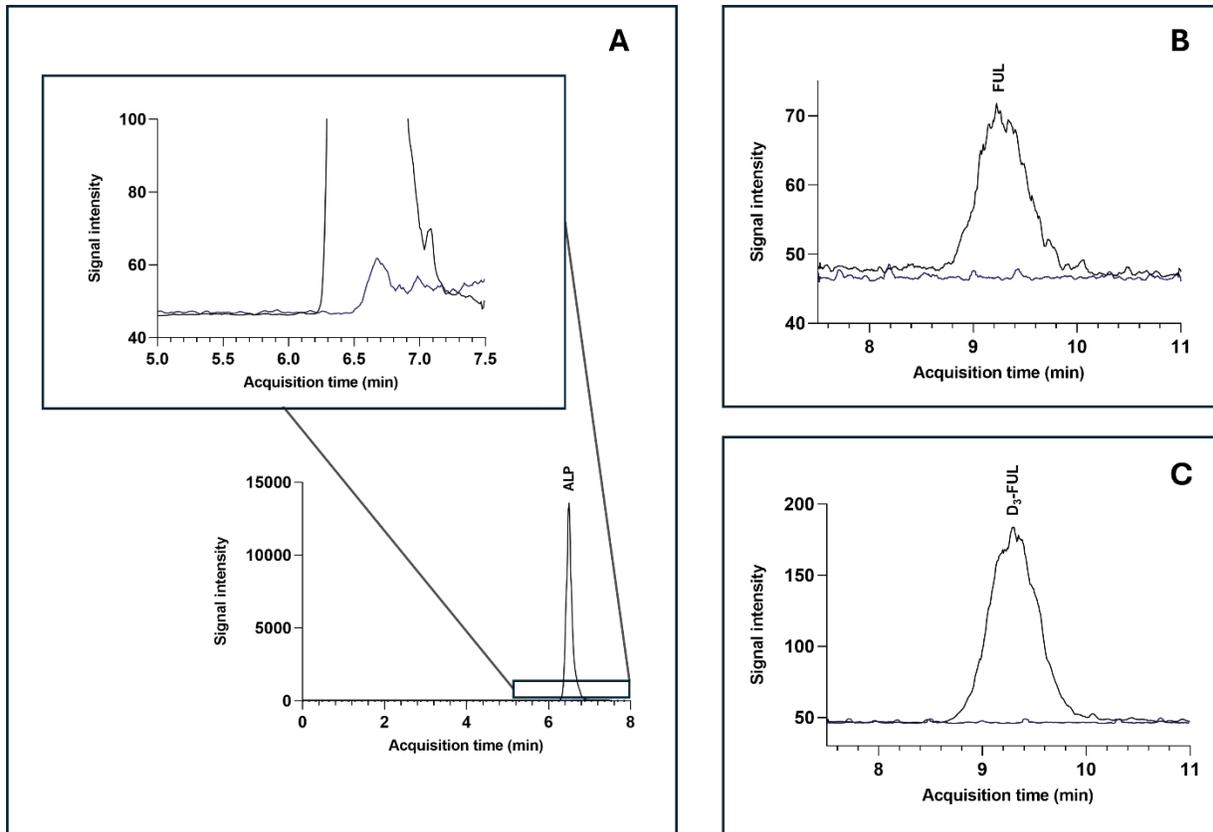


Figure S21. Results of carry-over assessment demonstrated by the overlaid extracted ion chromatograms (EIC) of each **A)** alpelisib, **B)** fulvestrant and **C)** D₃-fulvestrant at the LLOQ concentration level and blank plasma injected after the analysis of the highest concentration in the calibration range, at their quantifier m/z transitions.

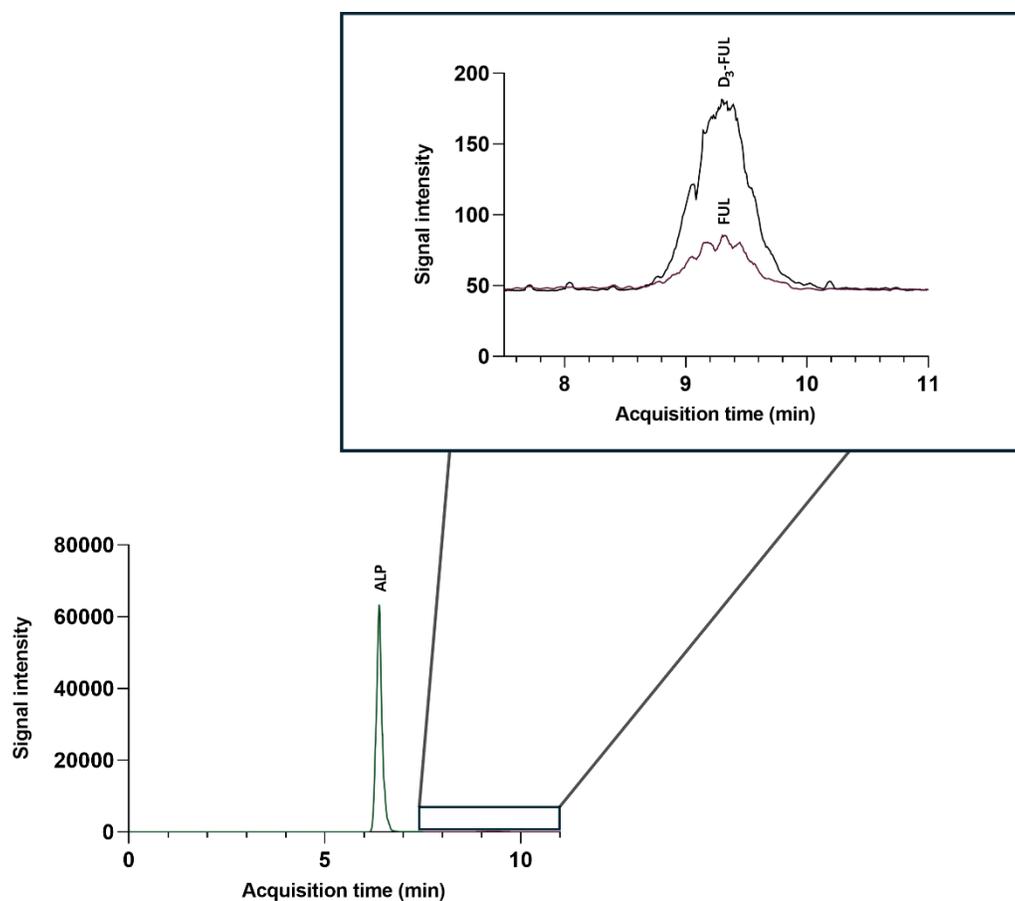


Figure S22. MRM mass electropherogram of a plasma sample from patient 1 treated with ALP and FUL

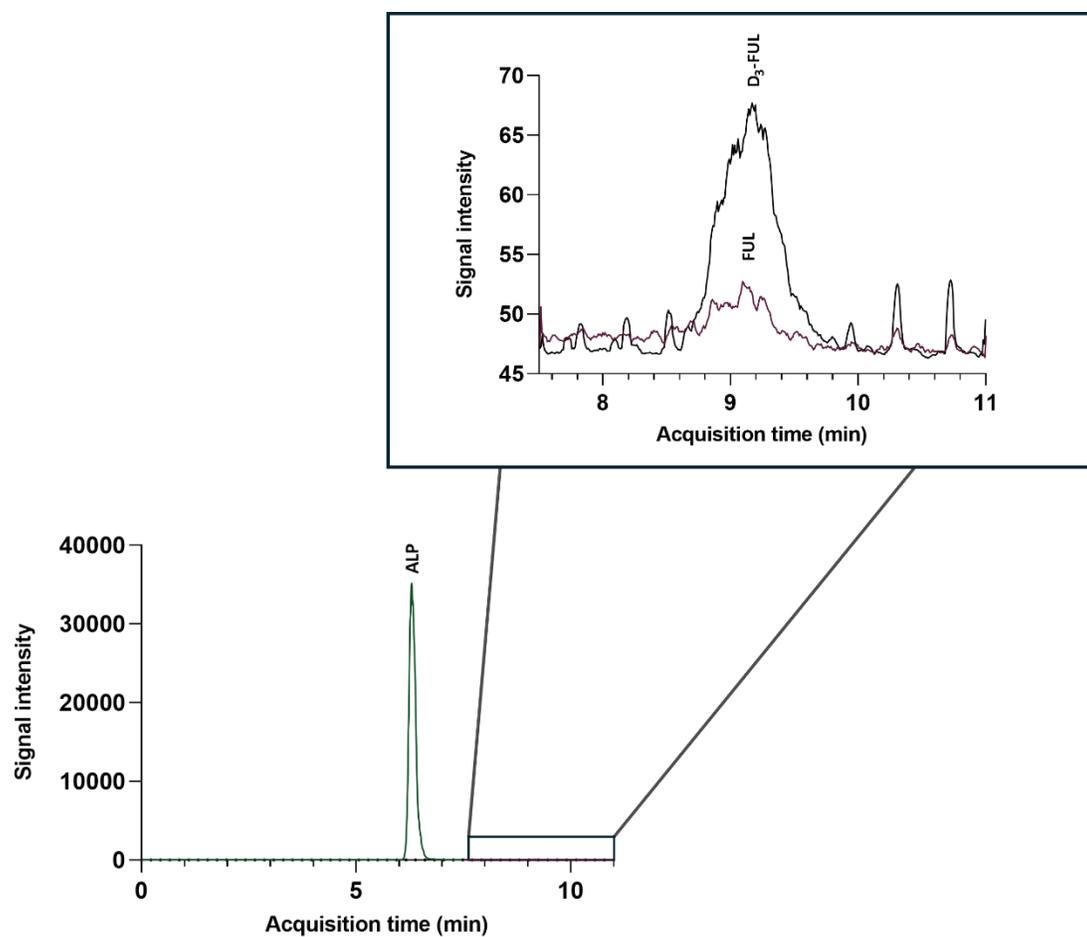


Figure S23. MRM mass electropherogram of a plasma sample from patient 2 treated with ALP and FUL

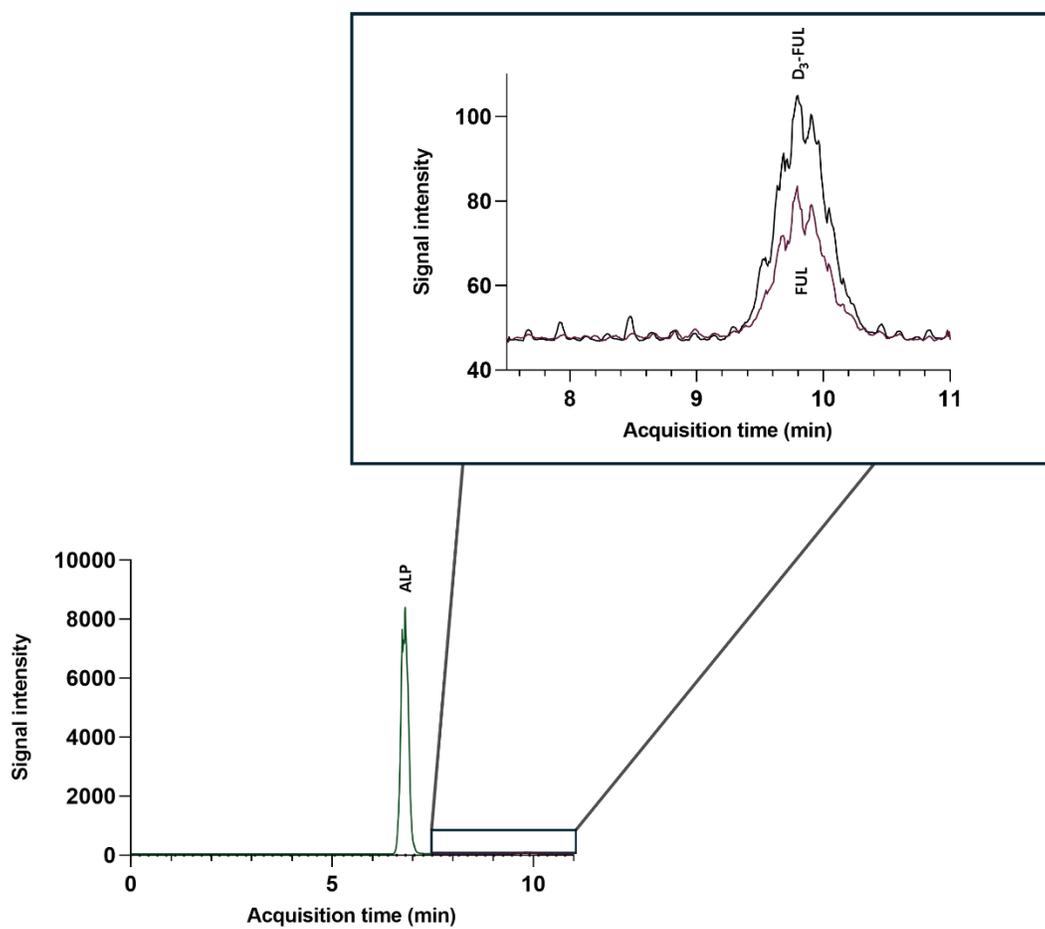


Figure S24. MRM mass electropherogram of a plasma sample from patient 3 treated with ALP and FUL

8. POPIS KRATICA I OZNAKA

4-ABA – 4-aminobenzojeva kiselina

ABE – abemaciclib

ACN – acetonitril

AGREE – engl. *Analytical Greenness Metric*

AGREEprep – engl. *Analytical Greenness Metric for Sample Preparation*

AIBN – azobisisobutironitril

AJS – Agilent Jet Stream

ALP - alpelisib

ANA – anastrozol

ANA-D₁₂ – deuterirani anastrozol

APCI – kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku, engl. *atmospheric pressure chemical ionisation*

APFO – amonijev pentadekafluoroktanoat, engl. *ammonium pentadecafluorooctanoate*

APPI – fotoionizacija pri atmosferskom tlaku, engl. *atmospheric pressure photoionisation*

AqS – vodeni uzorak, engl. *aqueous sample*

BAGI – engl. *Blue Applicability Grade Index*

BEN – benzimidazol

BRCA – gen podložnosti za rak dojke, engl. *breast cancer susceptibility gene*

C18 – oktadecilsilil

CDK4/6 – o ciklinu D ovisne kinaze 4 i 6, engl. *cyclin D-dependent kinases 4 and 6*

CE – kapilarna elektroforeza, engl. *capillary electrophoresis*

CHAPS – 3-[(3-**chol**amidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

CLF – kloroform

CMC – kritična micelarna koncentracija, engl. *critical micellar concentration*

CTAC – cetiltrimetilamonijevog klorid

CYP – citokrom P450

CZE – kapilarna zonska elektroforeza, engl. *capillary zone electrophoresis*

DAD – detektor niza dioda, engl. *diode array detector*

DLLME – disperzivna tekućinska mikroekstrakcija, engl. *dispersive liquid-liquid microextraction*

DLS – dinamičko raspršenje svjetlosti, engl. *dynamic light scattering*

DSPME – disperzivna mikroekstrakcija na čvrstoj fazi, engl. *dispersive solid-phase microextraction*

EGDMA – etilen-glikol-dimetakrilat

EIC – ekstrahirani ionski kromatogram, engl. *extracted ion chromatogram*

EMA – Europska agencija za lijekove, engl. *European Medicines Agency*

EOF – elektroosmotski tok, engl. *electroosmotic flow*

ESI – ionizacija elektroraspršenjem, engl. *electrospray ionisation*

EtOH – etanol

FA – mravlja kiselina, engl. *formic acid*

FASS – sabijanje uzorka pojačanjem polja, engl. *field-amplified sample stacking*

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove, engl. *Food and Drug Administration*

FTIR – Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*

FUL – fulvestrant

FUL-D₃ – deuterirani fulvestrant

GAC – zelena analitička kemija, engl. *green analytical chemistry*

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

G-CSF – faktor stimulacije rasta granulocita, engl. *granulocyte colony-stimulating factor*

HEMA – 2-hidroksietil-metakrilat

HER2 – receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2, engl. *human epidermal growth factor receptor 2*

HETP – duljina ekvivalentna jednom teorijskom tavanu, engl. *height equivalent to a theoretical plate*

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. *high-performance liquid chromatography*

HR – hormonski receptor, engl. *hormone receptor*

ICH – Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku upotrebu, engl. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

ICP – induktivno spregnuta plazma, engl. *inductively coupled plasma*

IM – ionska mobilnost

i-PrOH – propan-2-ol

IS – unutarnji standard, engl. *internal standard*

LC – tekućinska kromatografija, engl. *liquid chromatography*

LET – letrozol

LLE – tekućinska ekstrakcija, engl. *liquid-liquid extraction*

LLME – tekućinska mikroekstrakcija, engl. *liquid-liquid microextraction*

LLOQ – donja granica određivanja, engl. *lower limit of quantification*

LPC 18:0 –1-stearoil-sn-glicero-3-fosfokolin

LOD – granica dokazivanja, engl. *limit of detection*

LOQ – granica određivanja, engl. *limit of quantification*

MAA – metakrilna kiselina, engl. *methacrylic acid*

MALDI – matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija, engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization*

ME – učinak matrice, engl. *matrix effect*

MEKC – micelarna elektrokinetička kromatografija, engl. *micellar electrokinetic chromatography*

MeOH – metanol

MIP - molekularni utisnuti polimer, engl. *molecularly imprinted polymer*

MRM – praćenje višestrukih reakcija, engl. *multiple reaction monitoring*

MS – spektrometrija masa, engl. *mass spectrometry*

MS/MS – tandemna spektrometrija masa

NEMI – nacionalni okolišni indeks metoda, engl. *national environmental methods index*

NIP - neutisnuti polimer, engl. *non-imprinted polymer*

PAL – palbociklib

PAL-D₄ – deuterirani palbociklib

PARP – poli(ADP-riboza) polimeraza

PDI – indeks polidisperznosti, engl. *polydispersity index*

PFOA – pentadekafluoroktanska kiselina, engl. *pentadecafluorooctanoic acid*

PI3K – fosfatidilinozitol-3-kinaza

PPT – taloženje proteina, engl. *protein precipitation*

PTFE – politetrafluoretilen

QC – kontrolni uzorak, engl. *quality control*

RGB-12 – indeks crveno-zeleno-plavo-12, engl. *Red-Green-Blue-12 Index*

RIB – ribociklib

RSD – relativna standardna devijacija

SDS – natrijev dodecil sulfat, engl. *sodium dodecyl sulfate*

SEF – faktor povećanja osjetljivosti, engl. *sensitivity enhancement factor*

SE-LLME – disperzivna tekućinska mikroekstrakcija potpomognuta surfaktantom, engl. *surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction*

SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi, engl. *solid-phase extraction*

TDM – terapijsko praćenje lijekova, engl. *therapeutic drug monitoring*

TN – trostruko negativni

UHPLC – tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti, engl. *ultra high-performance liquid chromatography*

ULOQ – gornja granica određivanja, engl. *upper limit of quantification*

VV – vodikova veza

φ , V/V – volumni udio

γ – masena koncentracija

9. ŽIVOTOPIS

Zvonimir Mlinarić rođen je 17. prosinca 1997. u Zagrebu gdje završava osnovnu i srednju školu. U srednjoj školi sudjeluje na više državnih natjecanja, a 2016. godine na Međunarodnoj kemijskoj olimpijadi u Gruziji osvaja brončanu medalju. Iste godine upisao je studij farmacije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija je nagrađen trima Rektorovim nagradama te je dobitnik Stipendije za izvrsnost Grada Zagreba. Također, u jednom mandatu služi kao predsjednik Studentskog zbora Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Tijekom studija kao koautor objavljuje dva izvorna znanstvena rada u laboratoriju prof. dr. sc. Branke Zorc. Diplomski rad izradio je na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Tome Kesera. Studij je završio 2021. te se iste godine zapošljava kao asistent na uspostavnom istraživačkom projektu Hrvatske zaklade za znanost „Nova bioanalitička rješenja za personalizaciju terapije raka dojke“ (UIP-2019-04-8461) voditeljice izv. prof. dr. sc. Mirande Sertić, u Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova. Poslijediplomski doktorski studij upisuje 2022. godine na istom fakultetu. Sudjeluje u izvođenju nastave iz Analitike lijekova, Instrumentalnih tehnika, Farmaceutske informatike i Farmaceutske etike i deontologije. Do sada je u koautorstvu objavio 11 izvornih znanstvenih radova indeksiranih u bazi Web of Science Core Collection, jedno pismo uredniku te 3 stručna rada. Rezultate svojih istraživanja prezentirao je na domaćim i međunarodnim skupovima s 35 posterskih priopćenja i jednim usmenim izlaganjem. Održao je i 4 pozvana i 2 plenarna predavanja. Uz to, održao je i više od 60 popularizacijskih predavanja za učenike, studente i širu javnost. Do sada je sudjelovao u organizaciji 15 domaćih i međunarodnih kongresa. Pri Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu član je nekoliko povjerenstava i vijeća te je član jedne Radne skupine Ministarstva zdravstva. Aktivni je član Hrvatske ljekarničke komore, Hrvatskog farmaceutskog društva, Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, Hrvatskog kemijskog društva, Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa i Hrvatskog društva za istraživanje raka.

Znanstveni radovi (WoSCC):

1. Kristian Morić-Španić, **Zvonimir Mlinarić**, Lu Turković, Tajana Silovski, Biljana Nigović, Miranda Sertić. Sustainable CZE method for the determination of talazoparib in a pharmaceutical dosage form: greenness, blueness and whiteness assessment and comparison with HPLC. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 51 (2026), 102376.
2. **Zvonimir Mlinarić**, Lu Turković, Biljana Nigović, Miranda Sertić. Surfactant-enhanced emulsification liquid-liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of alpelisib and fulvestrant in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 418 (2025), 793-804.
3. Lu Turković, **Zvonimir Mlinarić**, Mila Lovrić, Tajana Silovski, Biljana Nigović, Miranda Sertić. Three sample preparation methods for clinical determination of CDK4/6 inhibitors with endocrine therapy in breast cancer patient plasma using LC-MS: Cross-validation (red), ecological (green) and economical (blue) assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 225 (2024), 116586.
4. **Zvonimir Mlinarić**, Lu Turković, Ivor Babić, Tajana Silovski, Nina Kočevar Glavač, Miranda Sertić. Development, cross-validation and greenness assessment of capillary electrophoresis method for determination of ALP in pharmaceutical dosage forms – an alternative to liquid chromatography. *RSC Advances*, 14 (2024), 45; 32876-32882.
5. **Zvonimir Mlinarić**, Lu Turković, Miranda Sertić. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by sweeping micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry for determination of six breast cancer drugs in human plasma. *Journal of Chromatography A*, 1718 (2024), 464698, 10
6. Lu Turković, Dragana Mutavdžić Pavlović, **Zvonimir Mlinarić**, Anamarija Skenderović, Tajana Silovski, Miranda Sertić. Optimisation of solid-phase extraction and LC-MS/MS analysis of six breast cancer drugs in patient plasma samples. *Pharmaceuticals*, 16 (2023), 10, 1445, 20.
7. Lu Turković, Koraj, Natan, **Zvonimir Mlinarić**, Tajana Silovski, Slaven Crnković, Miranda Sertić. Optimisation of dispersive liquid-liquid microextraction for plasma sample preparation in bioanalysis of CDK4/6 inhibitors in therapeutic combinations for breast cancer treatment. *Heliyon*, 9 (2023), 8, e18880, 13.

8. Dinko Šoić, **Zvonimir Mlinarić**, Gordan Lauc, Olga Gornik, Mislav Novokmet, Toma Keser. In a pursuit of optimal glycan fluorescent label for negative MS mode for high-throughput N-glycan analysis // *Frontiers in chemistry*, 10 (2022), 999770, 13.
9. **Zvonimir Mlinarić**, Lu Turković, Iva Begović, Biljana Nigović, Miranda Sertić. Rapid capillary electrophoresis method for simultaneous determination of abemaciclib, ribociclib, and palbociclib in pharmaceutical dosage forms: a green approach. *Molecules*, 27 (2022), 21, 7603, 13.
10. Maja Beus, Zrinka Rajić, Dušica Maysinger, **Zvonimir Mlinarić**, Maja Antunović, Inga Marijanović, Diana Fontinha, Miguel Prudêncio, Jana Held, Sureyya Olgen, Branka Zorc. SAHAquines, Novel Hybrids Based on SAHA and Primaquine Motifs, as Potential Cytostatic and Antiplasmodial Agents. *ChemistryOpen*, 7 (2018), 624-638.
11. Kristina Pavić, Zrinka Rajić, **Zvonimir Mlinarić**, Lidija Uzelac, Marijeta Kralj, Branka Zorc. Chloroquine urea derivatives: synthesis and antitumor activity in vitro. *Acta Pharmaceutica*, 68 (2018), 4, 471-483.

Stručni radovi:

1. Lu Turković, **Zvonimir Mlinarić**, Tajana Silovski, Mario Šekeriya, Miranda Sertić. Terapijsko praćenje lijekova kao način poboljšanja ishoda onkološke terapije. *Farmaceutski glasnik*, 78 (2022), 11-12, 551-565
2. **Zvonimir Mlinarić**, Zrinka Duvnjak, Ana Fajdetić, Lidija Gavran, Anja Kučević, Tea Kuvek, Mia Levatić, Mirza Bojić. Utjecaj odabranih ksenobiotika na boju urina. *Farmaceutski glasnik*, 77 (2021), 5-6, 229-246
3. Filip Kozlina, **Zvonimir Mlinarić**, Zrinka Rajić Džolić. Prenamjena lijekova kao strategija u razvoju novih lijekova. *Farmaceutski glasnik*, 74 (2018), 3, 201-208

Pismo uredniku:

1. **Zvonimir Mlinarić**. Limitations in LC-MS/MS application for adagrasib and pembrolizumab quantification in rat plasma. *Journal of chromatography B*, 1248 (2024), 124354.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-
biokemijski fakultet
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

Nove metode kapilarne elektroforeze spregnute sa spektrometrijom masa za analizu odabranih antitumorskih lijekova

Zvonimir Mlinarić

SAŽETAK

XXX

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

Rad sadrži: XXX stranica, 74 grafičkih prikaza, 35 tablica i 154 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: XXX

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

Ocjenjivači: XXX

XXX

XXX.

Rad prihvaćen: XXX

Basic documentation card

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

Doctoral dissertation

Novel methods of capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for the analysis of selected antitumor drugs

Zvonimir Mlinarić

SUMMARY

XXX

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

Thesis includes: XXX pages, 74 figures, 35 tables and 154 references. Original is in Croatian language.

Keywords: XXX

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

Reviewers: XXX

XXX

XXX

The thesis was accepted: XXX