

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra chemie

Využití paklitaxelu v chemoterapeutické léčbě a
možnosti jeho stanovení

Bakalářská práce

Autor: Lenka Beránková
Studijní program: B1407 Chemie
Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin
Vedoucí práce: PharmDr. Adam Skarka, Ph.D.

Hradec Králové

květen 2019

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.“

V Hradci Králové dne 7. května 2019

Beránková Lenka

Práce vznikla díky institucionální podpoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala PharmDr. Adamu Skarkovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a připomínky při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za trpělivost a podporu během studia.

Anotace

BERÁNKOVÁ, L. *Využití paklitaxelu v chemoterapeutické léčbě a možnosti jeho stanovení*. Hradec Králové, 2018. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Adam Skarka. 44 s.

Bakalářská práce se zabývá možnostmi léčby rakovinného bujení buněk. Podrobněji se zaměřuje na paklitaxel, látku ze skupiny taxanů, její vlastnosti, strukturu, využití v chemoterapeutické léčbě a možnosti její analýzy pomocí chromatografických systémů.

Klíčová slova

Paklitaxel, rakovina, léčba, chemoterapie, HPLC, LC-MS, LLE, SPE, proteinové srážení, Abraxane, Taxol

Annotation

BERÁNKOVÁ, L. *Usage of paclitaxel in chemotherapeutic treatment and possibilities of its analysis*. Hradec Králové, 2018. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis supervisor Adam Skarka. 44 p.

The bachelor thesis deals with the possibilities of treatment of cancerous cell proliferation. In more details it deals with the paclitaxel, it's a substance from a taxane group, its properties, structure, using in chemotherapeutic treatment and the possibility of its analysis by chromatographic systems.

Keywords

Paclitaxel, cancer, treatment, chemotherapy, HPLC, LC-MS, LLE, SPE, protein precipitation, Abraxane, Taxol

Obsah

Úvod.....	7
Teoretická část.....	8
1 Buněčný cyklus	8
2 Rakovina a možnosti léčby.....	10
2.1 Chemoterapeutika	11
2.1.1 Antimetabolity	11
2.1.2 Inhibitory topoizomeráz	13
2.1.3 Alkylační látky	13
2.1.4 Rostlinné alkaloidy.....	16
3 Paklitaxel.....	17
3.1 Historie a původ paklitaxelu	17
3.2 Vlastnosti paklitaxelu	18
3.3 Struktura paklitaxelu	18
3.4 Mechanismus účinku.....	19
3.5 Dávkování a farmakokinetika vybraných přípravků	19
3.5.1 Abraxane	19
3.5.2 Taxol.....	22
4 Analýza paklitaxelu	24
4.1 Příprava vzorku před analýzou.....	24
4.1.1 Proteinové srážení	24
4.1.2 LLE	25
4.1.3 SPE	28
4.2 Techniky využitelné při analýze PTX	31
4.2.1 HPLC-UV	31
4.2.2 LC-MS.....	35
Závěr	38
Seznam použité literatury	39

Seznam zkratek

μ LC-MS/MS – kapilární kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem

AUC – plocha pod křivkou

CNS – centrální nervová soustava

DDB – dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylendioxybifenyl-2,2' dikarboxylát

EDTA – ethylendiamin tetraacetát

ESI – elektroionizační sprej

FBA – hovězí sérum

GIT – gastrointestinální trakt

GPC – gelová permeační chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IEC – iontově výměnná chromatografie

KD – kostní dřev

LC-MS – kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

LC-MS/MS – kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem

LLC – rozdělovací chromatografie

LLE – extrakce kapaliny kapalinou

LOD – limit detekce

LOQ – limit kvantifikace

LSC – adsorpční chromatografie

MS – hmotnostní spektrometr/ie

PBS – fosfátem pufovaný fyziologický roztok

PTX – paklitaxel

SPE – extrakce pevnou fází

TBME – *terc*-butylmethylether

UHPLC-MS/MS – ultra účinná kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem

UV – ultrafialové záření

Úvod

Všeobecně nejčennější životní hodnotou každého jedince je zdraví. Čím jsme starší a zkušenější, tím více se strachujeme o zdraví své, i našich blízkých. Co to vlastně takové zdraví je? Existuje mnoho definic, které ho vysvětlují, avšak neznámější z nich je definována Světovou zdravotnickou organizací jako stav úplné tělesné, duševní a sociální pohody, nikoli jen jako nepřítomnost nemoci či vady. (WHO, 1946). [1]

Za determinanty zdraví lze považovat faktory osobní, společenské, ekonomické a faktory životního prostředí, které se vzájemně ovlivňují a zároveň mají výrazný vliv na zdravotní stav jedince či skupiny lidí. Lze sem zahrnout jak sociální, ekonomické a fyzické prostředí jedince, tak i jeho individuální charakteristiky či chování (životní styl, dědičnost). [1]

Podobně jako zdraví, i nemoc má biologický, psychologický i sociální aspekt. Přítomnost nemoci se promítá do fyzické stránky, společenského postavení i psychiky jedince a ovlivňuje jeho existenci. [2]

V současné době statisíce lidí i zvířat zemřelo na zdánlivě neporazitelnou nemoc rakovinu. Obsazuje druhé místo v nejčastější příčině smrti a je nejčastější příčinou pracovní neschopnosti či invalidity. [3]

Každoročně v České republice onemocní 96,5 tisíce lidí zhoubným nádorem, z toho přibližně 51 % mužů a 49 % žen. Ze statistiky vyplývá, že zhoubné nádorové onemocnění v ČR postihne každého třetího obyvatele, na které bohužel umírá každý čtvrtý obyvatel (data z roku 2016). [4]

Co je to rakovina? Jak vzniká? Proč je tak malá úspěšnost léčby?

Na pojmenování zákeřné nemoci má zásluhu řecký lékař a učenec Hippokrates (460-370 př. Kr.). Ve skutečnosti však nemoc byla známá mnohem dříve. Historici se domnívají, že rakovina je stará jako lidstvo samo, jen se o ní nevědělo. [5]

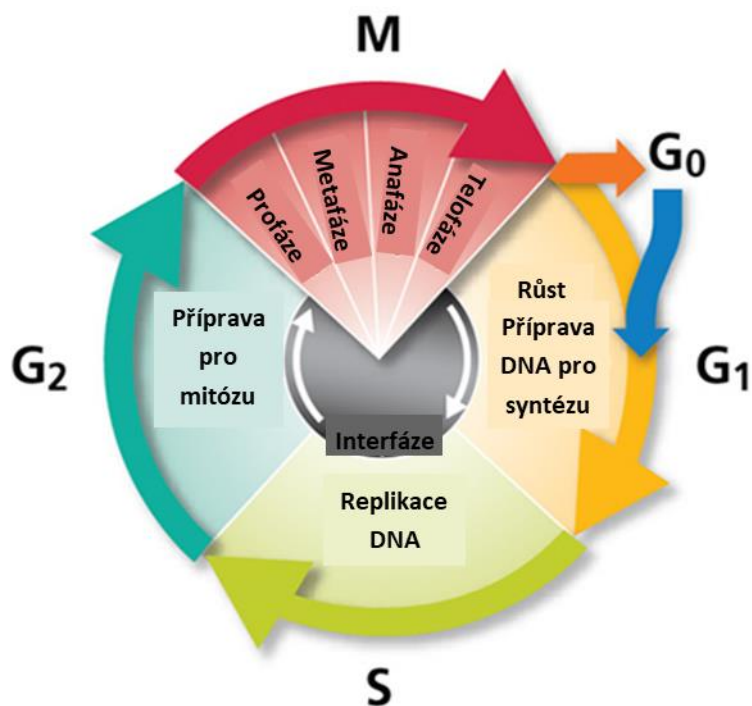
Lidské tělo je tvořeno z mnoha buněk, které se postupně dělí a rostou za účelem udržet organismus v chodu. Bohužel vznikají i situace, kdy se buňky začnou množit nekontrolovaně, a těmto vzniklým útvarům říkáme nádory. Nádory mohou být zhoubné (maligní) či nezhoubné (benigní). Více o rakovině a možnostech léčby se dozvíte v teoretické části.

Teoretická část

Cílem teoretické části je popsat rakovinné bujení a aktuálně používanou léčbu. Dále se práce soustředí na látku ze skupiny taxanů zvanou paklitaxel a možnosti její analýzy chromatografickými metodami zahrnujícími přípravu vzorku před analýzou a samotnou analýzu.

1 Buněčný cyklus

Jedná se o cyklické střídání S fáze (syntéza DNA) a M fáze (mitóza, neboli dělení buňky) oddělené dvěma tzv. klidovými fázemi G1 a G2 (Obr. 1). Lze jej také popsat jako sled **interfáze** (G1, S a G2 fáze), **profáze**, **metafáze**, **anafáze** a **telofáze** (úseky M fáze), zakončený cytokinezí, neboli vlastním dělením buňky. Buňky, které se nedělí (tzv. klidové buňky) zůstávají v G0 fázi (neurony, svalové buňky) – jsou sice metabolicky aktivní, ale mají nulový proliferační potenciál. Průchod buněčným cyklem je regulován širokým spektrem proteinů (kinázy, inhibitory). Přechody mezi jednotlivými fázemi jsou kontrolovány tzv. kontrolními body. Nacházejí se mezi G1-S a G2-M fázemi. [6]



Obrázek 1: Buněčný cyklus [7]

G1 fáze – v dceřiné buňce probíhá proteosyntéza, zvyšuje se počet organel a buňka roste, až dosáhne velikosti mateřské buňky.

S fáze – dojde k replikaci DNA v jádře a končí replikací centriolů.

G2 fáze – buňka roste, syntetizuje tubulin potřebný pro výstavbu dělicího vřeténka a připravuje se na mitózu.

Následuje **M fáze** (Obr. 2), kde probíhá **karyokineze** neboli jaderné dělení, které má čtyři na sebe navazující stádia – **profáze**, **metafáze**, **anafáze** a **telofáze**.

Profáze – rozpadne se jaderný obal a zanikne jadérko. Chromatin kondenzuje v chromosomy se dvěma chromatidy. Mezi centrioly se začíná tvořit dělicí vřeténko složené z mikrotubulů.

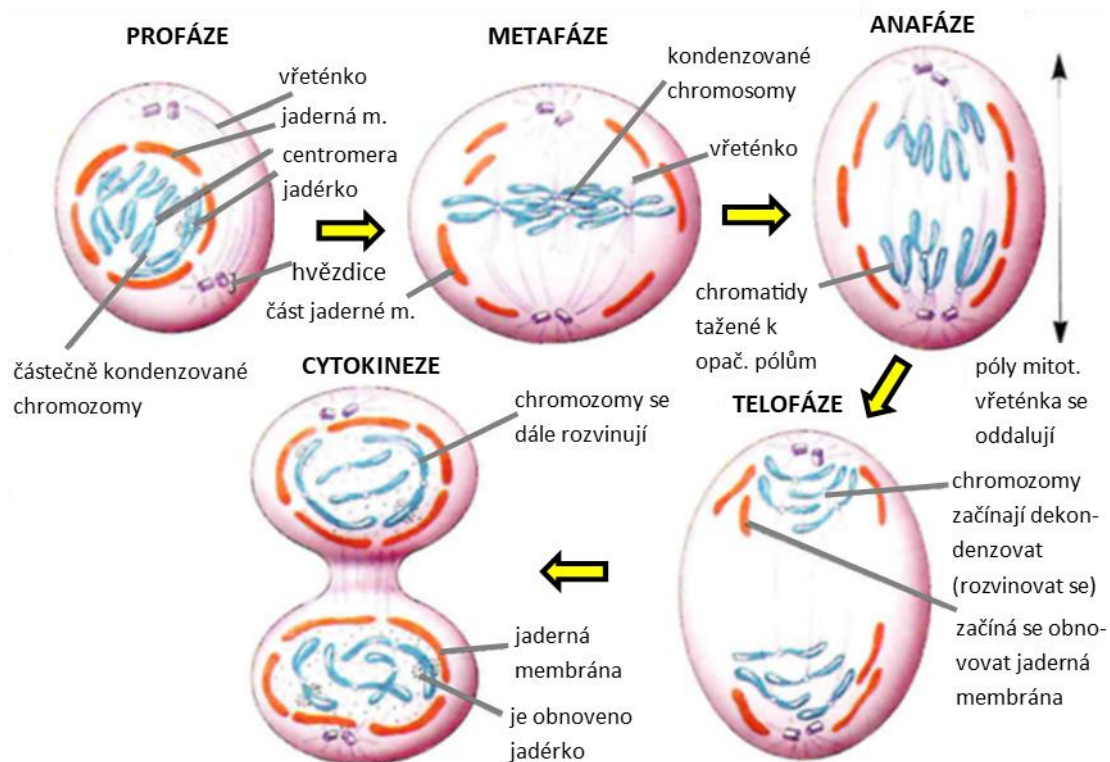
Metafáze – dochází k seskupení chromosomů a tvoří tzv. „hvězdičičku“.

Anafáze – oddělením sesterských chromatid chromosomů se vytvoří „hvězdičičky“ dvě.

Telofáze – zkracováním dělicího vřeténka se chromatidy přesunují k opačným pólům buňky, kde kondenzují v chromatin, obnovuje se jaderný obal a vytváří se opět jadérko.

Závěrečnou fází buněčného dělení je **cytokineze**. Dochází zde k rozdělení cytoplasmy a vzniknou dvě buňky dceřiné.

Pokud karyokineze není následována cytokinezí, dojde ke vzniku mnohojaderných buněk. [6]



Obrázek 2: Mitotická fáze [8]

2 Rakovina a možnosti léčby

Rakovina je multifaktoriální nádorové onemocnění, které může postihnout kohokoliv z nás. Příčinou mohou být různé vlivy vnitřního i zevního prostředí. Nejvíce rizikovým faktorem bývá věk, v jehož důsledku dochází ke zvyšování frekvence nově vzniklých somatických mutací, ke snižování reparačních schopností a ke snadnější kumulaci chyb v DNA. Kumulací mutačních změn dochází k postupné poruše regulace proliferace, diferenciaci a k selekční růstové výhodě. Kromě přirozeného stárnutí organismu je dalším závažným rizikovým faktorem také expozice různým mutačním agens. Velká většina nádorů vzniká jako náhodný proces, pouze 5-10 % maligních onemocnění vzniká dědičně. [9]

Nádory vznikají z naší vlastní tkáně, dá se říci z jedné buňky, která se dramaticky mění po sérii genetických změn. V procesu replikace DNA hrozí vznik mutace, kde buňka ztrácí svůj tvar, nereaguje na růstově inhibiční signály a začíná se nekontrolovaně dělit. Nejen, že poškozují zdravou tkáň ve svém okolí, ale může se začít tvořit (metastázovat) i ve vzdálených tkáních a tím se nádor stává maligní (zhoubný). [10]

Rakovina má více než sto forem, téměř všechny tkáně v těle mohou podlehnout nádorovému bujení. Její léčba je mnohem obtížnější než samotný vznik a také velice individuální. Prozatím vyvinuté léčebné metody zahrnují chirurgické odstranění nádorů, radioterapie, chemoterapie a bioterapie. [10]

Cílem chirurgického zákroku je úplné odstranění nádorů, je-li to možné. Pokud tumor ještě nevytvořil metastázy, je po jeho dokonalém odstranění naděje na úplné vyléčení. V případě, že se již vytvořily metastázy, může operativní řešení odstranit primární nádor a zabránit tak vzniku novým metastázám či dalšímu poškození orgánu. Operace bývá často doprovázena chemoterapií a ozařováním (mnohdy i předoperačním zákrokem s cílem zmenšit nádor pro jeho snadnější odstranění). Chirurgický zákrok je pouze jedním stavebním kamenem z celkové terapie a léčby, která se stanovuje individuálně podle druhu a stadia onemocnění. [5]

Další léčebnou metodou je radioterapie – neboli léčba ozařováním. Patří k modernějším metodám v léčbě rakoviny. Základním mechanismem je poškození DNA pomocí ionizujícího záření (vysoce energetických paprsků), kde se dědičná informace v rakovinných buňkách poškodí tak silně, že následkem toho buňky odumřou. Je to lokální metoda, kterou podstupuje více než polovina pacientů s nádory v různých stádiích onemocnění. [5]

Principem chemoterapie je podávání cytostatik, což jsou léčiva, která působí cytotoxicky (toxické pro buňky) a mají antiproliferativní účinek (zastavují dělení buněk). Bohužel cytostatika podávaná v chemoterapii nenapadají pouze rakovinné buňky, ale působí i na zdravé buňky, což s sebou nese kromě terapeutického účinku také řadu nežádoucích účinků. Podrobněji se o skupině chemoterapeutik budu zabývat v následujících kapitolách práce.

Bioterapií se rozumí aplikace látek, které jsou chemicky shodné či podobné látkám produkovaným buňkami lidského těla. Proti fyziologické situaci se bioterapie liší aplikovanou dávkou a koncentrací, které vysoce překračují fyziologické hodnoty. Cílem je stimulace krvetvorby, ovlivnění imunity, ale i přímé zpomalení rychlosti růstu nádorových buněk. [3]

2.1 Chemoterapeutika

Chemoterapeutika neboli cytostatika, jsou látky, které působí cytotoxicky a zastavují dělení buněk (antiproliferativní účinek). Jejich účinek se projevuje především ve tkáních tvořených rychle se dělícími buňkami, například sliznice zažívacího ústrojí či kostní dřeň, které jsou cytostatiky poškozovány nejvíce.

Cytostatika způsobují inhibici syntézy nebo funkce nukleových kyselin, proteosyntézy, poškozují DNA a buněčné membrány. Podávají se ve formě tablet, infuzí či injekcí a jejich přítomnost v organismu snáší pacienti individuálně. [5] Na základě mechanismu účinku je rozdělujeme také na fázově specifická a nespecifická.

Fázově specifická působí pouze na buňky v určité fázi buněčného cyklu – např. antimetabolity v S-fázi, ve které dochází k replikaci DNA buňky, nebo rostlinné alkaloidy v M-fázi, ve které dochází ke vzniku dělicího vřeténka.

Fázově nespecifická cytostatika působí ve všech fázích buněčného cyklu – např. alkylační látky. [9]

Cytostatika se dělí na 4 podskupiny:

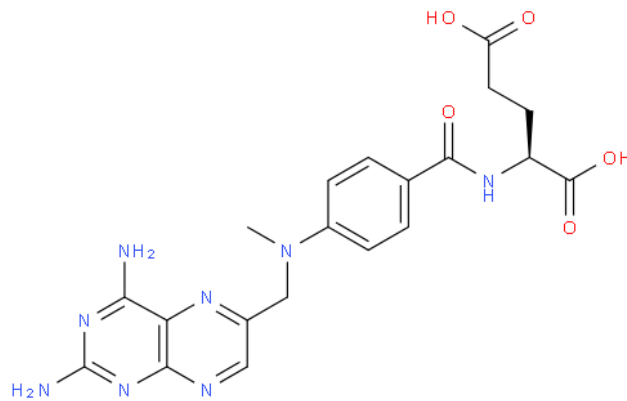
- antimetabolity
- inhibitory topoizomeráz
- alkylační látky
- rostlinné alkaloidy [10]

2.1.1 Antimetabolity

Jsou to léčiva strukturně podobná nukleovým kyselinám. Zasahují do metabolismu nukleových kyselin a brání biosyntéze jednotlivých nukleotidů. Antimetabolity cílově působí v maligních buňkách, ale částečně ovlivňují i zdravé buňky, kde způsobují orgánovou toxicitu. Dělí se do několika podskupin dle podobnosti s biogenními molekulami. [11]

- **Analog kyseliny listové – methotrexát** (Obr. 3)

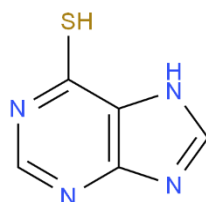
Léčba některých forem leukémie a lymfomů. Mezi nežádoucí účinky patří poškození trávicího traktu, útlum kostní dřeně (KD) a nefrotoxicita. [11]



Obrázek 3: Methotrexát [12]

- **Analog purinů – 6-merkaptopurin (Obr. 4)**

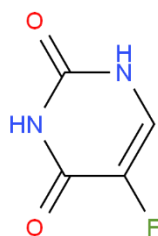
Používá se k léčbě některých forem leukémií. Hlavní funkcí je inhibice tvorby DNA a RNA. V nádorových buňkách se aktivuje na vlastní účinnou látku a nesmí se podávat v kombinaci s allopurinolem (došlo by ke kumulaci 6-merkaptopurinu a následnému zvýšení toxicity). Nežádoucími účinky jsou: pankreatitida, poškození jater a střevního epitelu a útlum KD. [11]



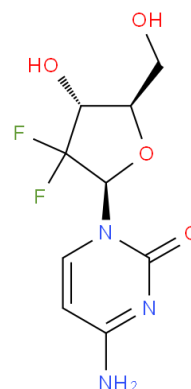
Obrázek 4: 6-merkaptopurin [13]

- **Analoga pyrimidinů – 5-fluorouracil (Obr. 5), gemcitabin (Obr. 6)**

Používá se v kombinaci při léčbě nádoru prsu, vaječníku, prostaty, plic a gastrointestinálního traktu. Nežádoucími účinky jsou například gastrointestinální toxicita či útlum KD. [11]



Obrázek 5: 5-fluorouracil [14]



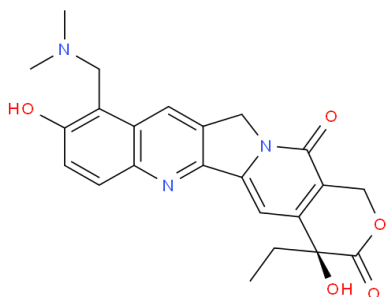
Obrázek 6: Gemcitabin [15]

2.1.2 Inhibitory topoizomeráz

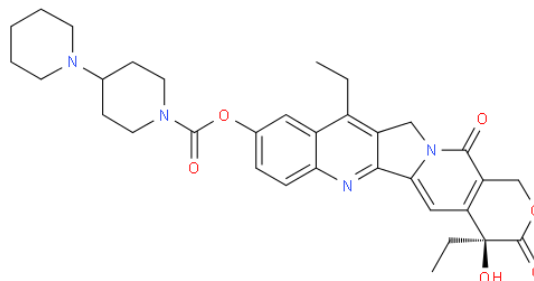
DNA topoizomeráza I a II jsou nezbytné pro replikaci DNA. Zabraňují překrucování vláken DNA a ovlivňují rozpojení a opětovné spojení DNA řetězců. [11]

- **Inhibitory topoizomerázy I – topotekan (Obr. 7), irinotekan (Obr. 8)**

Používají se při léčbě karcinomů ovaria, lymfomů a určitých typů solidních nádorů. Nežádoucími účinky jsou myelotoxicita a poruchy GIT. [11]



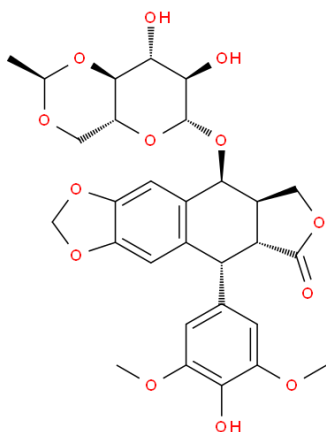
Obrázek 7: Topotekan [16]



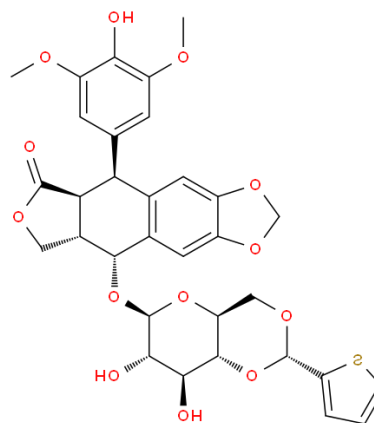
Obrázek 8: Irinotekan [17]

- **Inhibitory topoizomerázy II – etoposid (Obr. 9), teniposid (Obr. 10)**

Používají se při léčbě leukemie, lymfomů, ovariálních a testikulárních nádorů, a k terapii mozkových nádorů. Využívají se při transplantacích KD. Nežádoucími účinky jsou poškození krvetvorby, zvracení a alopecie (vypadávání vlasů, chlupů). [11]



Obrázek 9: Etoposid [18]



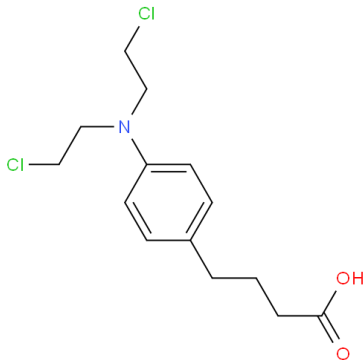
Obrázek 10: Teniposid [19]

2.1.3 Alkylační látky

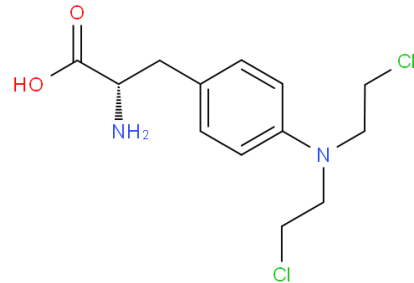
V organismu vytvářejí vysoce reaktivní meziproducty, které se vážou na nukleové kyseliny a tím je poškozují. Vytvářejí zlomy a brání nasedání replikačních enzymů. Alkylace navozuje inhibiční funkce DNA a následnou buněčnou smrt. Způsobují ji léčiva o různých chemických strukturách. [11]

- **β - chlorethylaminy -chlorambucil (Obr. 11), melfalan (Obr. 12), N-ypérit**

Používají se v kombinaci s jinými protinádorovými léčivy k léčbě karcinomu prsu, vaječníků a určitých typů lymfomů a leukémie. Nežádoucími účinky jsou útlum KD, zvracení, nauzea a při kontaktu s kůží vznik puchýřků. [11]



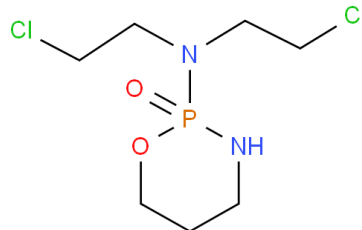
Obrázek 11: Chlorambucil [20]



Obrázek 12: Melfalan [21]

- **Oxizafosforiny - cyklofosfamid**

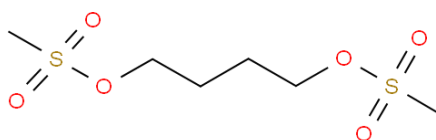
Cyklofosfamid (Obr. 13) je zařazen mezi nejvyužívanější cytostatika. Používá se k léčbě lymfomů a leukémií. Jeho imunosupresivní účinek je uplatňován při transplantaci orgánů i při některých autoimunitních chorobách. Mezi nežádoucí účinky patří alopecie a útlum KD. [11]



Obrázek 13: Cyklofosfamid [22]

- **Estery kyseliny metalsulfonové - busulfan**

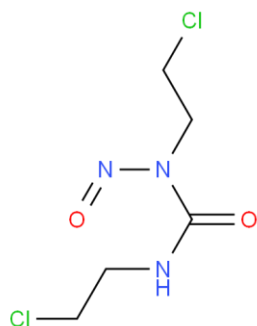
Busulfan (Obr. 14) má hlavní účinky na KD. Používá se k léčbě chronické leukémie. Mezi nežádoucí účinky patří gynekomastie (zvětšení prsní žlázy u mužů), intersticiální pulmonální fibróza (tzv. busulfanová plíce) a kožní pigmentace. [11]



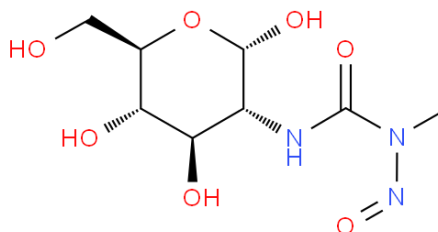
Obrázek 14: Busulfan [23]

- **Deriváty nitrosomočoviny – karmustin (Obr. 15), lomustin, fotemustin, streptozocin (Obr. 16)**

Tyto látky snadno pronikají do CNS, což je uplatňováno při terapii mozkových nádorů. Nežádoucím účinkem bývá opožděná myelotoxicita. Streptozocin je přirozeně se vyskytující antibiotikum, které selektivně poškozuje β -buňky Langerhansových ostrůvků štítné žlázy. Uplatňuje se při terapii inzulinem. [11]



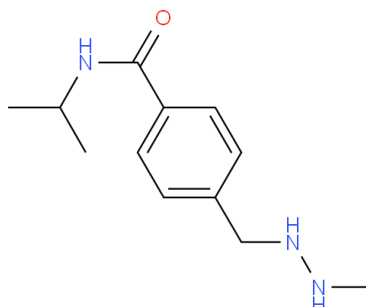
Obrázek 15: Karmustin [24]



Obrázek 16: Streptozocin [25]

- **Triazeny – prokarbazin (Obr. 17), dakarbazin**

Používají se k léčbě melanomu a Hodgkinovy choroby. Nežádoucími účinky bývá úporné zvracení, útlum KD a hemolytická anémie. V kombinaci s alkoholem vzniká disulfiramová reakce. [11]



Obrázek 17: Prokarbazin [26]

- **Sloučeniny platiny – cisplatina (Obr. 18), karboplatina**

Platinová cytostatika se volí u pacientů s testikulárním a ovariálním nádorem. Dále se používá v léčbě nádorů močového měchýře a nádorů krční, ušní a nosní oblasti. Mezi nežádoucí účinky patří nauzea, zvracení, nefrotoxicita a ototoxicita. [11]



Obrázek 18: Cisplatina [27]

2.1.4 Rostlinné alkaloidy

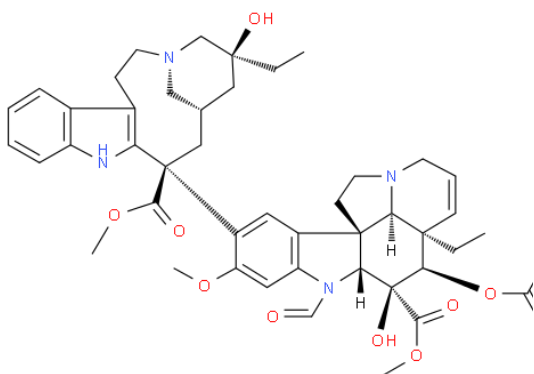
Rostlinné alkaloidy inhibují mitózu prostřednictvím poškození dělicího vřeténka a zabraňují tím dokončení buněčného dělení. [11]

- **Vinca alkaloidy – vinkristin, vinblastin**

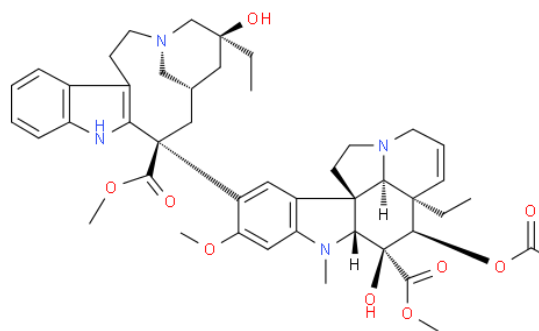
Přírodním zdrojem bývá barvínek *Vinca rosea*.

Vinkristin (Obr. 19) se využívá k léčbě karcinomu prsu, plic, lymfomů a k léčbě akutní myeloplastické leukémie. Nežádoucími účinky mohou být neurotoxické příznaky, jako je parestézie, poruchy nervosvalového přenosu a paralýza hladké svaloviny. Dále se může vyskytnout nefrotoxicita.

Vinblastin (Obr. 20) se využívá k léčbě testikulárního karcinomu a Hodgkinovy choroby. Mezi jeho nežádoucí účinky se řadí mírná neurotoxicita a myelotoxicita. [11]



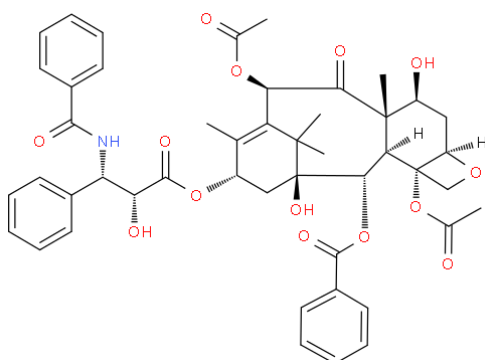
Obrázek 19: Vinkristin [28]



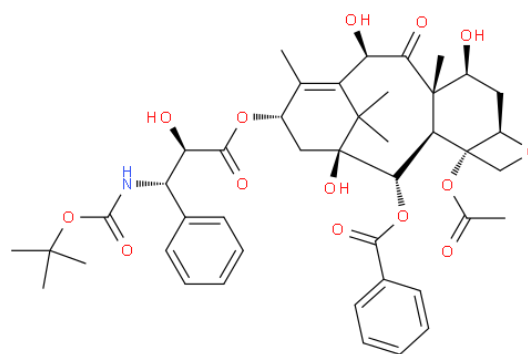
Obrázek 20: Vinblastin [29]

- **Taxany – paklitaxel (Obr. 21), docetaxel (Obr. 22)**

Jsou to jedny z nejsilnějších cytostatik. Jsou izolovány z tisů. Dnes se vyrábějí i semisynteticky. Používají se k léčbě karcinomu prsu, plic, vaječnicků, krku a hlavy. Nežádoucími účinky mohou být parestézie (periferní neuropatie), útlum KD, bradykardie a hypotenze. [11]



Obrázek 21: Paklitaxel [30]



Obrázek 22: Docetaxel [31]

3 Paklitaxel

Paklitaxel (PTX) je rostlinná látka používaná v chemoterapeutické léčbě. Konkrétně se jedná o alkaloid ze skupiny taxanů. Nachází se v rostlinách čeledi tisovitě (Taxaceae) a je vysoce studovanou terapeutickou látkou proti širokému spektru nádorů. V České republice se prodává v mnoha formách pod různými komerčními názvy.

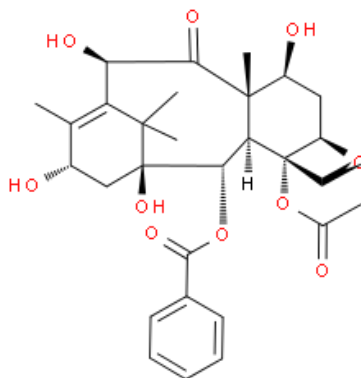
3.1 Historie a původ paklitaxelu

PTX je již dlouhou dobu studovaná chemoterapeutická látka. Poprvé byly jeho léčivé vlastnosti objeveny na počátku 60. let v programu screeningu rostlin zahájeného Národním onkologickým institutem (NCI) ve Spojených státech za účelem hledání nových látek s cytotoxickou aktivitou. V roce 1963 byl PTX izolován z kůry tisu západoamerického (*Taxus brevifolia*) a jeho objevitelé, vědci Monroe E. Wall a Mansukh C. Wani ho pojmenovali "taxol". Později v roce 1971 byla objasněna i jeho chemická struktura.

Později bylo zjištěno, že se PTX nevyskytuje pouze v již zmíněném tisu (*Taxus brevifolia*), ale je přítomen i u dalších druhů čeledi, jako je například tis červený (*T. baccata*) nebo tis japonský (*T. cuspidata*). Po důkladnějších studiích se ukázalo, že původní *T. brevifolia* zůstává největším zdrojem taxolu.

V roce 1979 byl určen mechanismus působení PTX a o několik let později začaly první klinické zkoušky.

Od roku 1992 Státní správa potravin a léčiv (FDA) Spojených států povolila uvedení na trh a taxol se začal vyrábět komerčně pro léčbu rakoviny vaječníků. V současné době se používá i pro léčbu Kaposiho sarkomu ve druhém stádiu nemoci, léčbu nádorového onemocnění prsu a mikrocytárního plicního nádoru. Díky jeho silné antineoplastické aktivitě je také využíván pro léčbu rakoviny jícnu, močového měchýře, prostaty, děložního čípku, žaludku, hlavy a krku, endometria, varlat a léčbu oligodendrogliomu mozku.



Obrázek 23: 10-deacetylbaccatin III [32]

PTX byl původně získáván extrakcí ze sušené kůry tisu. Avšak z kůry jednoho stromu lze získat pouze přibližně 0,5 g taxolu, což je velice nízký obsah léčivé látky pro klinické použití. Proto se látka získává semi-syntetickým způsobem acylací prekurzoru 10-deacetylbaccatinu III (Obr. 23), který se nachází v jehlicích *T. brevifolia* a *T. baccata*. Tímto způsobem lze dosáhnout vyššího výtěžku léčivé látky než původní extrakcí přímo ze stromu. Kromě semi-syntetické metody lze PTX získat také fermentací rostlinných buněk. Léčivá látka je extrahována z buněčné kultury tisu, pročištěná chromatografií a izolovaná krystalizací. Zcela syntetická výroba doposud nebyla zavedena kvůli příliš složité struktuře molekuly. [33]

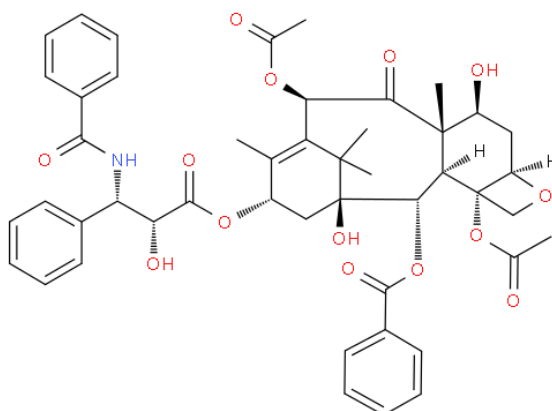
3.2 Vlastnosti paklitaxelu

Jedná se o bílý krystalický prášek, jehož teplota tání je 216-217°C. Je vysoce lipofilní a nerozpustný ve vodě. Rozpustný je v různých organických rozpouštědlech, například v ethanolu, methanolu, benzenu, chloroformu, methylenchloridu a dalších. [33]

Lék používaný v chemoterapeutické léčbě je prodáván pod ochrannou známkou „Taxol“ – zde je PTX rozpuštěn v Kolliphoru EL a v ethanolu (nosič). Novější přípravek se prodává pod značkou „Abraxane“, kde je PTX vázán přímo na albumin. Podává se ve formě infuze do krve.

3.3 Struktura paklitaxelu

PTX (Obr. 24) je podobně jako ostatní rostlinné deriváty neobvyklý svou strukturou. Jedná se o tricyklický diterpenoid, jehož součástí je taxanový komplexní kruh a díky své amidové funkční skupině se občas považuje za pseudoalkaloid.



Obrázek 24: Paklitaxel [30]

Pro jeho cytotoxickou aktivitu je nezbytný jednak taxanový kruh, ale také i C13 postranní řetězec. Oxetanový kruh a homochirální esterový řetězec je důležitý pro interakci léčivo-receptor. Významnou úlohu pro zvýšení aktivity má poloha 2 hydroxylové skupiny, která představuje ideální polohu pro vložení funkčních skupin

za účelem vytvoření prekurzorů nebo polymerních konjugátů. Naproti tomu hydroxylová skupina v poloze 7 není podstatná v protinádorové léčbě (může být esterifikována, epimerizována či dokonce vyloučena bez výrazné ztráty aktivity). Acetylace hydroxylové skupiny v poloze 10 také neovlivňuje protinádorovou terapii. [33]

3.4 Mechanismus účinku

PTX je v první řadě taxoidní antineoplastické, ale také antimikrotubulární činidlo. Narušuje růst mikrotubulů tím, že hyperstabilizuje jejich strukturu. Následkem toho se zničí schopnost buňky flexibilně využívat její cytoskelet. Přesněji se PTX váže na podjednotku β -tubulinu (tubulin je stavební jednotkou mikrotubulů) a v místě vazby dochází k blokadě stavební jednotky. Výsledný komplex PTX a mikrotubulů nelze rozdělit. To negativně ovlivňuje buněčnou funkci, protože dynamická nestabilita (zkracování a prodlužování mikrotubulů) je důležitá pro transport buněk – například chromozomy využívají tuto vlastnost mikrotubulů během mitózy.

PTX také indukuje v rakovinných buňkách tzv. programovanou buněčnou smrt (apoptózu) navázáním na anti-apoptický protein Bcl-2 (B cell leukemia 2) a tím zastaví jeho funkci. [34]

Potlačuje apoptózu (buněčnou smrt) v různých buněčných systémech. Kontroluje propustnost mitochondriálních membrán a tím reguluje smrt buněk.

3.5 Dávkování a farmakokinetika vybraných přípravků

Existuje několik registrovaných přípravků obsahující látku paklitaxel pro léčbu zhoubných onemocnění. Je to například Abraxane, Paclimedac, Paclitaxel „Ebewe“, Paclitaxel Mylan, Paclitaxel Kabi a Taxol. Každý z nich má jiné dávkování, je používán na různé typy a stadia karcinogenních onemocnění a vykazuje jinou farmakokinetiku. Níže jsou uvedeny výtahy ze souhrnu údajů o přípravcích **Abraxanu** (Obr. 25) a **Taxolu** (Obr. 26) dostupných na internetových stránkách Státního ústavu pro kontrolu léčiv.

3.5.1 Abraxane

Je to bílý až žlutý prášek pro infuzní suspenzi, jeden ml suspenze obsahuje 5 mg PTX ve formě nanočástic vázaných na albumin. Přípravek je určen k léčbě metastazujícího karcinomu prsu u dospělých pacientů, u kterých selhala první linie léčby.

V kombinaci s gemcitabinem je označován jako lék první linie k léčbě dospělých pacientů s metastazujícím karcinomem pankreatu (slinivky břišní). V kombinaci s karboplatinou je označován jako lék první linie k léčbě nemalobuněčného karcinomu plic u dospělých, kteří nejsou čekatelé na chirurgický zákrok nebo radiační terapii.



Obrázek 25: Léčivo Abraxane [35]

Dávkování přípravku

Je-li diagnostikován karcinom prsu, doporučená dávka léku je 260 mg/m^2 podávaná nitrožilně po dobu 30 minut každé 3 týdny. Při výskytu neutropenie (počet neutrofilů $<500 \text{ buněk/mm}^3$) po dobu 7 dní a více nebo sensorická neuropatie během léčby, je dávkování v následujících cyklech sníženo na 220 mg/m^2 . Po opětovném výskytu neutropenie či sensorické neuropatie by mělo být provedeno další snížení dávky na 180 mg/m^2 . Přípravek nesmí být podáván, dokud na začátku léčby nebude počet neutrofilů $>1500 \text{ buněk/mm}^3$. U sensorické neuropatie třetího stupně je třeba pozastavit léčbu do doby, než se vrátí na první či druhý stupeň.

U karcinomu pankreatu je používaná dávka 125 mg/m^2 přípravku v kombinaci s gemcitabinem podávaná nitrožilně po dobu 30 minut 1., 8. a 15. den každého 28denního cyklu. Doporučená dávka souběžně podávaného gemcitabinu je 1000 mg/m^2 podávaná nitrožilně po dobu 30 minut ihned po ukončení každého podávání přípravku Abraxane. Je nutné před začátkem i v průběhu léčby kontrolovat, zda pacient netrpí neutropenií a/nebo trombocytopenií. Pokud první den před podáním léku bude počet neutrofilů $<1 \text{ } 500 \text{ buněk/mm}^3$ a počet trombocytů $<100 \text{ } 000 \text{ buněk/mm}^3$, je nutné odložit podání do obnovení počtu buněk.

Farmakokinetické vlastnosti

Po podání přípravku Abraxane se pacientům se zhoubným onemocněním PTX rovnoměrně distribuuje do krevních buněk plazmy a ve vysoké míře se váže na bílkoviny krevní plazmy (94 %). Ze studie *in vitro* vyplývá, že vazbu PTX na bílkoviny lidského séra neovlivňuje přítomnost cimetidinu, ranitidinu, dexametazonu ani difenhydraminu (při použití PTX v rozmezí koncentrací $0,1 - 50 \text{ } \mu\text{g/m}$). Z farmakokinetické analýzy lze říci, že celkový distribuční objem je přibližně 1741 l a tento velký distribuční objem značí rozsáhlou extravaskulární distribuci a/nebo vazbu PTX ve tkáních.

Ze studie *in vitro* prováděné s mikrozomy lidských jater a vzorky tkání lze říci, že PTX je metabolizován především na 6 α -hydroxypaklitaxel a na dva vedlejší metabolity: 3'-p-hydroxypaklitaxel a 6 α -3'-p-dihydroxypaklitaxel. Tvorbu těchto hydroxylovaných metabolitů katalyzují izoenzymy CYP2C8 a CYP3A4.

U pacientů s metastazujícím karcinomem prsu bylo po 30minutové infuzi přípravku Abraxane (v dávce 260 mg/m²) vyloučeno močí průměrné množství 4 % nezměněné léčivé látky z celkové podané dávky. Metabolitů 6 α -hydroxypaklitaxelu a 3'-p-hydroxypaklitaxelu bylo močí vyloučeno méně než 1 %, což naznačuje rozsáhlou non renální clearance. PTX se vylučuje zejména metabolismem v játrech a biliární exkrecí.

Při klinickém rozmezí dávek 80 až 300 mg/m² přípravku Abraxane se průměrná clearance PTX v plazmě pohybuje v rozmezí 13-30 l/h/m² a průměrný terminální poločas se pohybuje v čase 13 až 27 hodin.

Vliv poruchy funkce jater na populační farmakokinetiku přípravku Abraxane byl studován u pacientů s pokročilými solidními tumory. Do této analýzy byli zahrnuti pacienti s normální funkcí jater a již existující mírnou, středně těžkou a těžkou poruchou funkce jater. Výsledky prokazují, že mírná porucha funkce jater nemá klinicky významný vliv na farmakokinetiku PTX. U pacientů se středně těžkou a těžkou poruchou funkce jater dochází k poklesu maximální míry eliminace PTX o 22-26 % a ke zvýšení průměrné AUC (Area Under Curve = plocha pod křivkou) PTX přibližně o 20 % ve srovnání s pacienty s normální funkcí jater. Porucha funkce jater však nemá žádný účinek na průměrnou C_{max} PTX. Mimo to je eliminace PTX nepřímo úměrná množství celkového bilirubinu a přímo úměrná množství sérového albuminu.

Dle farmakokinetických/farmakodynamických zkoušek lze říct, že neexistuje žádná spojitost mezi funkcí jater (stanovenou počáteční hladinou albuminu nebo hladinou celkového bilirubinu) a neutropenií po úpravě expozice Abraxanu.

Byla také studována porucha funkce ledvin u pacientů se solidními tumory. Byli zde zahrnuti pacienti s normální funkcí ledvin a dříve existující mírnou, středně těžkou a těžkou poruchou funkce ledvin. Mírná až středně těžká porucha funkce ledvin nemá žádný klinicky významný účinek na maximální míru eliminace a systémovou expozici (AUC a C_{max}) paklitaxelu. Farmakokinetické údaje pro pacienty s těžkou poruchou funkce ledvin jsou nedostatečné a pro pacienty s terminálním selháním ledvin jsou nedostupné.

Do populační farmakokinetické analýzy byli zahrnuti pacienti ve věkovém rozmezí 24-85 let a bylo prokázáno, že věk nemá významný vliv na maximální míru eliminace a systémovou expozici PTX. Dále populační farmakokinetické analýzy ukazují, že pohlaví, rasa a typ solidního tumoru nemají klinický vliv na systémovou expozici PTX. Pacienti s váhou 50 kg měli AUC PTX přibližně o 25 % nižší než ti, kteří vážili 75 kg. Klinický význam těchto zjištění je nejistý. [36]

3.5.2 Taxol

Je to čirý, bezbarvý nebo lehce nažloutlý roztok. Jeden ml koncentrátu pro infuzní roztok obsahuje 6 mg PTX.

Taxol se využívá při primární léčbě karcinomu ovaria v pokročilém stadiu nebo s residuem nádorové tkáně větším než 1 cm po předchozí laparotomii či u pacientů s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic, u nichž primárně nelze provést chirurgický zákrok či ozáření. V těchto případech se používá v kombinaci s cisplatinou.

Dále se přípravek Taxol používá k iniciální léčbě metastazujícího karcinomu prsu nebo v pokročilém stadiu buď v kombinaci s antracyklinem (u pacientek, pro které je to vhodné) nebo trastuzumabem (u pacientek s nadměrnou expresí receptoru HER-2 na úrovni 3+ podle imunohistochemického vyšetření, či u pacientek, u kterých antracyklin není vhodný). Používá se také jako samostatný přípravek při léčbě metastazujícího karcinomu prsu po selhání předchozí standardní antracyklinové terapie nebo u pacientek, pro které není antracyklinová terapie vhodná.

V neposlední řadě je Taxol používán pro léčbu pacientů s pokročilým Kaposiho sarkomem u nemocných s AIDS, u kterých selhala předchozí liposomální antracyklinová terapie.



Obrázek 26: Léčivo Taxol [37]

Dávkování přípravku

Je-li diagnostikován karcinom ovaria, doporučuje se přípravek podávat s cisplatinou. Dávkováno je buď 175 mg/m² přípravku intravenózně v průběhu 3 hodin s následným podáním 75 mg/m² cisplatiny každé tři týdny nebo 135 mg/m² přípravku intravenózně v průběhu 24 hodin s následným podáním 75 mg/m² cisplatiny každé tři týdny.

U nemalobuněčného karcinomu plic je doporučená dávka přípravku 175 mg/m² podávaná v průběhu 3 hodin s následným podáním cisplatiny v dávce 80 mg/m² s třítýdenním odstupem.

Farmakokinetické vlastnosti

Po i.v. aplikaci přípravku Taxol bylo zjištěno, že účinná látka PTX vykazuje dvoufázový pokles plasmatické koncentrace.

Farmakokinetické vlastnosti PTX byly zjišťovány po 3 a 24 hodinových infuzích v dávkách 135 a 175 mg/m². Poločas eliminace se pohybuje v rozmezí 3 až 52,7 hodin a hodnoty celkové clearance mezi 11,6 až 24,0 l/hod/m². Celková clearance se při vyšších plazmatických hladinách PTX snižuje. Hodnota distribučního objemu se pohybuje v rozmezí 198 až 688 l/m², čímž lze vyvodit rozsáhlou extravaskulární distribuci, respektive vazbu ve tkáních.

Podle studií *in vitro* lze říci, že na proteiny lidského séra se váže 89-98 % léčivého přípravku. Přídavné látky (cimetidin, ranitidin, dexamethason a difenylhydramin) vazbu PTX na bílkoviny neovlivňují.

Způsob eliminace PTX u lidí nebyl zatím zcela objasněn. Močí se vyloučí 1,3-12,6 % podané dávky v nezměněné formě, což prokazuje rozsáhlou extrarenální clearance látky. Hlavními eliminačními mechanismy PTX jsou nejspíš metabolismus v játrech a vylučování žlučí. PTX se primárně metabolizuje enzymatickým systémem cytochromu P450. Po podání značeného PTX se průměrně 26 % radioaktivity vyloučilo stolicí v podobě 6 α -hydroxypaklitaxelu, 2 % jako 3'-p-hydroxypaklitaxel a 6 % jako 6 α -3'-p-dihydroxypaklitaxel. Vznik těchto hydroxylovaných metabolitů katalyzují izoenzymy CYP2C8 a CYP3A4 (eventuálně -2C8 a -3A4).

V klinických studiích, kde byl Taxol podáván současně s doxorubicinem, byla distribuce a eliminace doxorubicinu (a jeho metabolitů) prodloužena. Celková plasmatická expozice doxorubicinu byla o 30 % vyšší, pokud se Taxol podával ihned po doxorubicinu (než když byl mezi nimi 24hodinový interval). [38]

4 Analýza paklitaxelu

4.1 Příprava vzorku před analýzou

Před samotným LC stanovením musíme nejprve upravit a vyčistit vzorek. Hlavní nevýhodou HPLC-UV testů pro kvantifikaci taxanů je detekce při relativně nízké vlnové délce 227 nm, při které lze očekávat potencionální interference endogenních sloučenin. U LC-MS testů jsou preferovány čisté vzorky z důvodu snížení matricových efektů. Pro předběžnou úpravu vzorků před chromatografickou analýzou taxanů se využívá proteinové srážení vzorku, LLE a SPE. [39]

4.1.1 Proteinové srážení

Tato metoda není zcela preferována k předběžné úpravě vzorků pro HPLC-UV testy kvůli potencionálním interferencím endogenních sloučenin. Vzhledem k tomu, že spektrální interference pocházející z endogenních sloučenin jsou méně pravděpodobné při MS analýzách kvůli zvýšené specifičnosti, je tato metoda proteinového srážení více využívána u LC-MS testů.

U proteinové precipitace (srážení) musí rozpouštědlo zvýšit interakci protein-protein, což vede k agregaci (shlukování) a srážení proteinů. Kromě toho, rozpouštědlo musí vést k vysokému výtěžku požadovaných analytů. Výtěžnost vzorku se obvykle testuje porovnáním odezvy analytu ve zpracovaném vzorku s odezvou analytu v čistém roztoku nebo s odezvou analytu vzorku, který je zpracován na slepý vzorek. Jako srážecí činidlo se obvykle používá acetonitril, methanol nebo jejich kombinace a výtěžnost extrakce se pohybuje mezi 75-100 %. Pokud se k činidlu přidá 0,1% kyselina mravenčí, výtěžnost reakce se zvýší na 90 %. [39]

Proteinová precipitace je rychlou metodou v předběžné úpravě vzorku s velkou výtěžností. Vysoké signály na pozadí nebo endogenní interference však mohou bránit citlivé kvantifikaci. Endogenní sloučeniny ve vzorku mohou způsobit také iontovou supresi během ionizace v MS testech a robustnost LC metody může být negativně ovlivněna kvůli kovalentní vazbě proteinů na analytickou kolonu. To může vést ke zvýšení protitlaku analytické kolony a ke snížení počtu teoretických pater vedoucích ke snížení rozlišení metody. [39] Příklady úpravy vzorků proteinovým srážením jsou uvedeny níže.

Myší tkáň

Myší tkáňový homogenát obsahující PTX byl zpracován následovně. 200 μ l homogenátu bylo napipetováno do 1,7 ml mikrocentrifugační zkumavky. Bylo přidáno 400 μ l roztoku acetonitrilu s 0,1% kyselinou octovou obsahující 50 ng/ml vnitřního standardu (1 mg/ml docetaxel s acetonitrilem obsahující 0,1% kyselinu octovou). Po promíchání na vortexu se vzorky 10 minut centrifugovaly při 17000 ot/min. Poté bylo 20 μ l supernatantu vstříkováno do LC-MS/MS systému. [40]

Lidská plazma

Vzorky lidské plazmy byly 10 minut centrifugovány při 3000 ot/min, při teplotě 4°C. Do propylenových zkumavek bylo nadávkováno 100 µl standardu, kontrol a vzorků plazmy. Do každé zkumavky bylo přidáno 5 µl pracovního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 4 µg/ml (naředěním 100 µg/ml zásobního roztoku methanolem). Směs se krátce promíchala a poté se k ní přidalo 400 µl methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí, aby se dosáhlo proteinového srážení. Zkumavky se krátce promíchaly a nechaly se 15 minut centrifugovat při 16000 ot/min., při 4°C. 150 µl supernatantu bylo přeneseno do skleněné vialky s automatickým vzorkovačem pro analýzu LC-MS/MS. [41]

Psí plazma

Do 2 ml zkumavky se nadávkovalo 0,05 ml pracovního roztoku (vnitřní standard II = klopidogrel bisulfát), bylo přidáno 50 µl vzorku psí plazmy a 200 µl acetonitrilu. Zkumavky byly 1 minutu vortexovány a následně centrifugovány po dobu 5 minut při 6641 ot/min. 10 µl supernatantu bylo přeneseno do vialky pro analýzu pomocí LC-MS/MS. [42]

Kvalitu a výtěžnost proteinového srážení ovlivňuje hlavně použité precipitační činidlo. Správné promíchání, doba a rychlost centrifugace je také důležitý faktor u proteinového srážení. Z výše uvedených metod lze říci, že se žádná neshoduje v použitém precipitačním činidlem, ani v rychlosti a času centrifugace. Důvodem toho může být rozdílný druh vzorku.

Výše uvedené příklady srážení fungují na stejném principu, ale liší se druhem vzorku a každý vzorek využívá trochu odlišného postupu a precipitačních činidel. Například pro srážení myší tkáně se využívá kombinace acetonitrilu s kyselinou octovou, zatímco u lidské plazmy se využívá methanol s kyselinou mravenčí. Když porovnáme postupy, je zajímavé, jak moc odlišné jsou od sebe doby a rychlosti centrifugace – například, že lidská plazma se centrifuguje 15 minut při 16000 ot/min, zatímco psí plazma pouze 5 minut při 6641 ot/min. Metody se liší i časovou náročností, kde dle mého názoru bude časově nejnáročnější stanovení lidské plazmy, a naopak stanovení psí plazmy nám zabere nejméně času. Zajímavý je také poznatek, že lidskou plazmu je nutné udržovat při precipitaci i centrifugaci neustále při nízkých teplotách (4°C) chlazením. Nejlepší výtěžnost precipitace (kolem 90 %) bude mít lidská plazma a myší tkáňový homogenát z důvodu přítomnosti kyseliny. Naopak nejnižší výtěžnost (80 %) bude mít vzorek psí plazmy, u kterého se použil pouze acetonitril. Všechny tři skupiny použily své supernatanty pro stanovení kvantifikace metodou LC-MS/MS.

4.1.2 LLE

„Liquid – Liquid Extraction“ neboli extrakce z kapaliny do kapaliny. Je to časově náročnější metoda než precipitace bílkovin nebo SPE, ale zato dosahuje nejlepší hodnoty LLOQ při testování taxanů. [39]

Kapalinová extrakce je kombinace dvou nemísitelných kapalin (vodná a organická), kde v jedné je látka původně rozpuštěná a poté částečně přejde do druhé. Podmínkou je ustanovení fázové rovnováhy po protřepání dvou kapalin v dělicí nálevce, které popisuje Nernstův rozdělovací zákon:

$$K_D = \frac{c_{org}}{c_{aq}}$$

K_D rozdělovací konstanta (Nernstův rozdělovací koeficient)

c_{org} rovnovážná látková koncentrace složky v organickém rozpouštědle

c_{aq} rovnovážná látková koncentrace složky ve vodě

Rozdělovací konstanta popisuje danou látku v systému voda – organické rozpouštědlo při určité teplotě a tlaku. Větší hodnota K_D znamená větší podíl složky v organickém rozpouštědle. Její hodnota pro extrahovanou látku by měla být výrazně vyšší než 1. [43]

Několik pracovních skupin se pokoušelo nalézt nejlepší způsob a nejvhodnější kapalinu pro tuto metodu, aby dosáhli co největšího výtěžku čisté látky. Z jejich poznatků lze říci, že diethylether a *tert*-butylmethylether jsou nejlepšími extrakčními rozpouštědly pro LLE taxanů. Ovšem objem extrakčního rozpouštědla je vysoce variabilní. Používají se objemy v rozsahu 3 až 20-ti násobku objemu vzorku. [39] Příklady úpravy vzorků metodou LLE jsou uvedeny níže.

Lidská plazma

K 200 μ l vzorku lidské plazmy obsahující PTX bylo přidáno 20 μ l standardu, dále 1,3 ml studeného roztoku TBME a 2 minuty mícháno. Po deseti minutové centrifugaci při 10000 ot/min byl 1 ml výsledného supernatantu přenesen do další zkumavky a sušen pod proudem dusíku při 35°C. K vysušenému zbytku bylo přidáno 200 μ l roztoku methanol-voda obsahující 20mM chloridu sodného (80:20) a mícháno 30 sekund na vortexu a 10 minut centrifugováno při 10000 otáčkách/min. Supernatant byl přenesen do vialky autosampleru HPLC a 10 μ l alikvotní části vzorku se injikovalo do UPLC-MS-MS. [44]

Hlodavčí plazma

Jeden ze způsobů přípravy hlodavčí plazmy využívá následujícího postupu. Do centrifugačních zkumavek o objemu 10ml bylo nadávkováno 50 μ l pracovního roztoku PTX (připraveny v methanolu v koncentracích od 0,4016 ng/ml do 2,008 μ g/ml) a 40 μ l vnitřního standardu – docetaxel (o koncentraci 1,6 μ g/ml). Po odpaření rozpouštědla pod proudem dusíku bylo do zkumavek přidáno 100 μ l hlodavčí plazmy. Zkumavky byly krátce míchány a poté byly přidány 2 ml TBME. Následovalo míchání po dobu 3 minut na vortexu a odstředování 10 minut při 3000 ot/min. 1,5 ml z horní organické vrstvy se převedlo do nové zkumavky a odpařilo do sucha pod proudem dusíku ve vodní lázni při 35°C. Ke každému vysušenému zbytku bylo přidáno 100 μ l směsi methanol-voda (90:10), 30 sekund promícháno na

vortexu a zcentrifugováno při 15000 ot/min po dobu 5 minut. Poté byly supernatanty přeneseny do vialek HPLC autosampleru. Pro analýzu bylo do LC-MS-MS systému vstříkováno 20 μ l každého vzorku. [45]

Další z metod využívá extrakci ethylacetátem. 100 μ l myší plazmy se smíchalo s 10 ml ethylacetátu, který obsahoval 100 μ l DDB (dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylen dioxy bifeny-2,2'-dikarboxylát) o koncentraci 7,5 μ g/ml (vnitřní standard). Po pěti minutové centrifugaci při 2500 ot/min byla převedena organická vrstva do čisté zkumavky a následně odpařena do sucha tlakovým plynem při 40°C. Odpařený zbytek se smíchal se 100 μ l 40% roztoku acetonitrilu. 75 μ l bylo vstříkováno do HPLC systému. [46]

Na základě uvedených postupů je nejvhodnějším rozpouštědlem pro metodu LLE *tert*-butylmethylether, přičemž se dosáhne vysoké výtěžnosti a minimalizují se endogenní interference. Navíc matricové účinky v taxanových testech jsou snižovány právě *tert*-butylmethyletherem. [39]

Při porovnání tří výše zmíněných metod lze říci, že fungují na stejném principu, ale liší se rozpouštědly, dobou centrifugace, roztoky pro rekonstituci a konečným analyzátozem vzorku. První dvě metody jsou si hodně blízké, liší se akorát jinými poměry dávkovaných látek a trochu jinou dobou a rychlostí centrifugace.

U lidské plazmy a jednoho příkladu hlodavčí plazmy se použilo rozpouštědlo TBME. Zajímavé je, v jakém poměru se TBME nadávkovalo. Například u 200 μ l lidské plazmy se dávkovalo pouze 1,3 ml TBME a u 100 μ l hlodavčí plazmy se dávkovalo dokonce 2 ml TBME. Tudíž u hlodavčí plazmy je nutné použít mnohem více rozpouštědla. Třetí skupina také stanovovala hlodavčí plazmu, ale zvolila si ethylacetát jako rozpouštědlo. Další rozdíl, který bych ráda zmínila je, že u lidské plazmy se centrifuguje při 10000 ot/min, zatímco u hlodavčí plazmy je to mnohem méně (2500-3000 ot/min). Všechny tři skupiny sušily supernatant pod proudem dusíku při 35-40°C. První dvě skupiny použily stejnou rekonstituci směsí voda-methanol v podobném poměru a stejném objemu, kdežto třetí skupina zvolila pro rekonstituci 40% roztok acetonitrilu. Zvláštní poznatek je, že první dvě skupiny po rekonstituci ještě prováděly 5-10 minut centrifugaci a následně injikovaly určitý objem supernatantu do LC-MS/MS systému, zatímco třetí skupina ihned po rekonstituci injikovala zvolený objem do HPLC systému.

Při shrnutí všech tří skupin bych řekla, že časově nejméně náročná bude metoda třetí skupiny, kde neprovádí druhou centrifugaci po rekonstituci vysušeného vzorku. Bohužel se ale nedá říci, že tato metoda dosáhne největšího výtěžku čisté látky, z důvodu právě chybějící centrifugace, která oddělí supernatant od posledních nečistot. Navíc jejich stanovení dále pokračuje do HPLC systému, který je méně citlivý než LC-MS/MS systém.

4.1.3 SPE

„Solid Phase Extraction“ neboli extrakce pevnou fází je v současné době nejmocnější technikou pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Podstatou je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Využívá se fyzikálně-chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí zůstávají na sorbentu – je to tzv. “chemická filtrace“.

SPE je nejvyužívanější a výhodnější metodou přípravy vzorku než jiné separační techniky (LLE), a to díky dobré selektivitě, časové nenáročnosti a úspoře organických rozpouštědel. SPE lze snadno automatizovat a navázat na další metody.

Lze ji použít na čišťení látky, zakoncentrování stopových množství látek, k výměně rozpouštědel (analyt je převeden z jedné specifické matrice do jiné, např. z vodné do organické) nebo k derivatizaci, kde je analyt zachycován na sorbent, převeden na derivát a pak eluován.

Kapalný vzorek je veden přes SPE kolonu, která obsahuje sorbent, a sloučeniny ze vzorku se do něj zachycují. Nežádoucí směsi mohou být z kolony selektivně odstraněny promytím správným rozpouštědlem. Žádoucí analyty mohou být z kolony znovu získány elučním rozpouštědlem v podobě vysoce čistého extraktu (měl by mít vyšší koncentraci analytu, než měl původní vzorek).

Jako sorbent se nejčastěji používají chemicky modifikované částice silikagelu. Průtok kapaliny přes kolonu lze urychlit vakuem na výstupu z kolony, tlakem na vstupu kolony nebo centrifugací.

Při separaci využíváme různé mechanismy zachycování látek na základě různých molekulárních interakcí mezi analytem a sorbentem, např. van der Waalsovy síly (nepolární interakce), vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce (polární interakce) a kation-aniontové interakce (iontové interakce typu elektrostatických přitažlivých sil mezi opačně nabitými ionty). [43]

Jako u metody LLE, tak i u SPE se mnoho pracovních skupin snažilo přijít s nejjednodušší a nejlepší variantou. Z vědeckých diskuzí lze usoudit, že kolona C18 poskytuje velice dobrou výtěžnost s minimálními interferencemi. Jestliže je výtěžnost časově omezená, doporučuje se použití kyanové kolony z důvodu vyšší procentuální výtěžnosti (85-100 %). Pro další snížení rušivých elementů na pozadí je třeba optimalizovat rozpouštědlo. Online SPE může snížit čas manipulace se vzorkem pomocí přepínání mezi filtračními a analytickými kolonami ve srovnání s offline SPE bez ovlivnění vyčištění vzorku. Příklady úpravy vzorků metodou SPE jsou uvedeny níže.

Lidská moč

Byla použita kolona Cyano Bond Elut (1 ml, Betron Scientific, Rotterdam, Nizozemsko), která byla postupně promývána 2 ml methanolu a 0,01M pufrém octanu amonného o pH 5. Dále byl na kolonu nanesen 1 ml vzorku – zředěná směs moči s 0,2M pufrém octanu amonného (pH 5). Kolona se poté promyla 2 ml 0,01M octanem amonným, 1 ml směsí methanolu a 0,01M octanu amonného (2:8, obj./obj.), a 1 ml hexanu. Kolona byla sušena 1 min ve vakuu. Analyty byly vymývány z kolony 2 ml směsí acetonitrilu a triethylaminu (1000:1, obj./obj.). Eluent byl odpařen do sucha pod proudem dusíku při 30°C. Vzorek byl rekonstituován 200 µl AMW (směs acetonitrilu, methanolu a destilované vody v poměru 4:5:1) a promíchán na vortexu. Rekonstituovaný vzorek byl přenesen do vialek autosampleru a 50 µl každého vzorku bylo vstříkováno do HPLC-UV systému. [47]

PTX není v lidské moči stabilní. Ke stabilizaci se k moči přidává směs dehydrovaného alkoholu Cremophor EL. Stabilizace je vysoce účinná po dobu 17 měsíců. Nestabilizované vzorky mohou být extrahovány pomocí SPE metody, ale musí být zpracovány do 7 dnů po odběru. Výhodou SPE je vysoká citlivost. Stabilizované vzorky moči však nemohou být zpracovány pomocí SPE kvůli přítomnosti dehydrovaného alkoholu Cremophoru EL, proto byl vyvinut a upřednostňován postup LLE (butylchlorid). Nevýhodou LLE je relativně dlouhá doba chodu a nižší citlivost. [47]

Buněčné kultury A121a ovariálního karcinomu

Kultury buněk A121a byly pěstovány v 25 cm³ baňkách při 37°C v kultivačním médiu. Po odstranění kultivačního média byla buněčná vrstva rychle promyta 3 ml fosfátem pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS) obsahujícího 5% FBS (hovězí sérum), poté dalšími 3 ml PBS a nakonec byly inkubovány při 37°C v 0,5 ml 0,05% trypsinu obsahující 1mM EDTA (ethylendiamin tetraacetát). Po 3-4 minutách inkubace byly disociované buňky přemístěny do zkumavky a baňka po buněčných kulturách byla promyta 1,5 ml PBS, v kombinaci s buněčnou suspenzí. Z baňky byly odebrány 2 ml suspenze, kde 0,2 ml bylo použito na počítání buněčné koncentrace a ke zbytku (1,8 ml) bylo přidáno 3,2 ml 50% methanolu ředěného vodou. Vzorky byly rychle zmrazeny v kapalném dusíku a rozmrazeny ve vodní lázni při 37°C. Rychlé zmrazení a rozmrazení se provedlo 2x a poté byly vzorky skladovány při -80°C až do analýzy.

Dvě různé skupiny použily následující přípravu vzorku před jeho chromatografickým stanovením. Postup byl téměř totožný až na pár drobných výjimek.

Pro analýzu se vzorky rozmrazily, přidala se k nim kyselina fosforečná pro dosažení 3% koncentrace (aby došlo k disociaci léčiva navázaného na protein) a promíchaly se. Do každého vzorku byl přidán vnitřní standard (docetaxel) do koncentrace 600 pg/ml (první skupina) a do koncentrace 300pg/ml (druhá skupina). V obou případech byly použity Oasis HLB kolony (Waters, Milford, USA), které se

kondiciovaly 5 ml methanolu a 5 ml vody. Poté bylo napipetováno 5 ml vzorku první skupinou a 1,8 ml buněčných lyzátů druhou skupinou. Následovalo promývání, kde první skupina použila 10 ml vody a 5 ml 70% methanolu. Pro eluci analytu použila 5 ml 97,5% methanolu. Druhá skupina promývala 5 ml 35% methanolu obsahující 3% kyselinu fosforečnou a 5 ml 70% methanolu. Pro eluci analytu použila 5 ml 97,5% methanolu s obsahem 0,1% kyseliny mravenčí.

Eluáty obou skupin byly sušeny pod proudem dusíku, rekonstituovány byl nejdříve 1 ml methanolu, znovu byly sušeny pod dusíkem, podruhé rekonstituovány (první skupina použila 200 μ l, druhá skupina pouze 100 μ l) 35% methanolem a byly převedeny do propylenových centrifugačních zkumavek. Centrifugovány byly 20 minut při 7600 (první skupina) a 10000 ot/min (druhá skupina). Supernatant byl poté zanalyzován systémem μ LC-MS/MS. [48], [49]

Výše uvedené tři příklady SPE mají stejný princip, ale lze poukázat i na jejich odlišnosti.

Důležitou roli v SPE stanovení hraje použitá kolona. V první skupině zvolili pro stanovení lidské moči kolonu Cyno Bond Elut, která používá kyano skupinu, díky které je schopná navazovat nenabitě polární ionty, což taxol splňuje. Druhá a třetí skupina zvolila kolonu Oasis HLB, která je schopna navazovat hydrofilní i lipofilní látky a je vhodná pro stanovení PTX ve vzorku buněčných lyzátů.

Dalším důležitým faktorem je také volba elučního rozpouštědla. První skupina zvolila směs acetonitrilu a triethylaminu v poměru 1000:1. Zatímco druhá a třetí skupina použila k eluci podobné složení rozpouštědla a to 97,5% methanol, s tím rozdílem, že třetí skupina ho navíc zkombinovala s 0,1% kyselinou mravenčí, která zlepšuje výtěžnost PTX téměř na 100%.

První skupina PTX dále stanovovala HPLC-UV metodou, zatímco druhá a třetí skupina pokračovala ve stanovení koncentrace PTX hmotnostním spektrometrem.

Časově nejnáročnější budou metody druhé a třetí skupiny z důvodu delšího odstředování, naopak nejméně časově náročná bude metoda první skupiny, kde v podstatě neprobíhá žádná zdlouhavá centrifugace, ale postačí pouhé 30 sekundové promíchání na vortexu. Největší procento účinnosti metody bude mít ovšem metoda třetí skupiny díky přítomnosti kyseliny mravenčí v elučním rozpouštědle, která zaručí téměř 100% výtěžnost PTX.

4.2 Techniky využitelné při analýze PTX

4.2.1 HPLC-UV

„High-Performance Liquid Chromatography“ neboli vysoce-účinná kapalinová chromatografie s detekcí pomocí ultrafialového záření, je běžně používanou kvalitativní i kvantitativní metodou pro analýzu léčiv, a je tedy využívána i pro kvantitativní analýzu taxanů. Většina testů bylo vyvinuto pro analýzu PTX, ale existují také testy pro další členy skupiny taxanů, jimiž jsou docetaxel, larotaxel, felotaxel a ortotaxel. Existují testy na stanovení jednoho taxanu, ale také existuje kombinovaná analýza pro více druhů zároveň. Většina testů pro analýzu taxanů se provádí v lidské nebo hlodavčí plazmě, některé metodiky jsou však použitelné také na analýzu séra, tkáně, moči či výkalů. [39] Samotná analýza se provádí na moderních chromatografických systémech (Obr. 27).

HPLC je instrumentální analytická metoda určená k separaci (oddělování) a detekci jednotlivých složek z kapalně směsi vzorku. Pomocí této metody lze zanalyzovat široké pole přírodních vzorků. Stanovení lze provést z velmi malého množství (nebo koncentrace) analytů, zejména organických, i v komplikovaných maticích. [50]

Principem separace je interakce jednotlivých látek směsi s mobilní fází (pohyblivá) a stacionární fází (nepohyblivá), která je ukotvená na koloně. [50] Jako mobilní fází využívá kapalinu, která unáší vzorek kolonou, kdežto stacionární fáze se skládá z kolony (nejčastěji z nerezové oceli), která je naplněná kapalinou (LLC), gelem (GPC) či pevnou látkou (LSC). Jednotlivé dělené látky (analyty) se liší afinitou ke stacionární fází. [51]

Je zde využíváno různých fyzikálně-chemických vlastností látek, jako je například jejich rozpustnost, schopnost adsorpce, velikost oddělovaných částic či elektrostatická síla. Při průchodu kolonou je směs látek rozdělována na jednotlivé složky, které postupně prochází detektorem a jsou vyhodnocovány. [50]



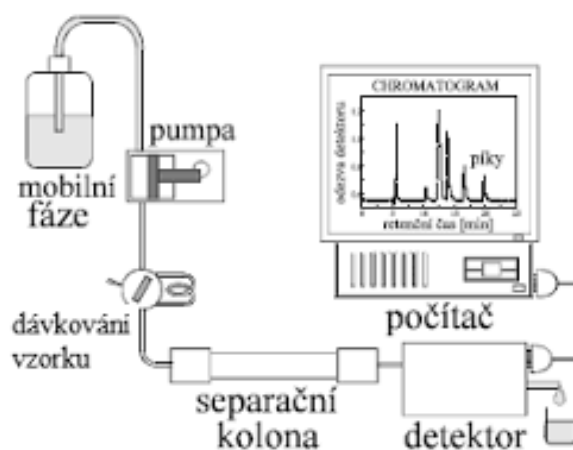
Obrázek 27: Gradientový HPLC systém ECOM series 200, jehož součástí je gradientové čerpadlo, dávkovací ventil, kolonový termostat, UV/VIS detektor, HPLC kolona C8 a C18, datastanice CLARITY s řízením LC Control [52]

Hlavní součásti moderního HPLC chromatografu (Obr. 28) jsou:

- zásobník mobilní fáze
- pumpa
- zařízení pro dávkování vzorku
- separační kolona
- detektor spojený se zapisovačem

Mobilní fáze postupně protéká všemi součástmi. Pumpa tlačí kapalinu kolonou za pomoci vysokého tlaku (několika MPa) kvůli velkému odporu kapaliny. Kolona je trubice plněná stacionární fází o velikém povrchu tvořená částicemi o velikosti 1,7-10 μm , ve které probíhá chromatografické dělení. Detektor podává informace o složení mobilní fáze pomocí píků vyobrazených v chromatogramu v závislosti signálu detektoru na čase.

Moderní chromatograf je řízen počítačem, který obstarává dávkování vzorku, řízení průtokové rychlosti, časový průběh gradientu teploty i složení mobilní fáze, záznam a vyhodnocení chromatogramu, které obnáší porovnání plochy pod píkem s kalibrační křivkou. [53]



Obrázek 28: Schéma kapalinového chromatografu [54]

Separací mechanismy u HPLC:

- **Gelová permeační chromatografie (GPC)** – Založena na dělení molekul v pórech gelu na základě jejich rozdílných velikostí.
- **Rozdělovací chromatografie (LLC)** – Založena na rozdílné rozpustnosti molekul v analytu mezi dvěma nemísitelnými kapalinami.
- **Adsorpční chromatografie (LSC)** – Založena na rozdílné adsorpci molekul v analytu na povrchu pevné fáze s aktivními centry.
- **Iontově výměnná chromatografie (IEC)** – Založena na rozdílné výměnné adsorpci iontů (analytů) na povrchu iontového měniče. [51]

Sloučeniny se určují na základě jejich retenčního času ve sloupci s použitím grafu – tzv. chromatogramu. Retenční čas je uveden na ose x, zatímco osa y závisí na metodě detekce, což je UV detektor, který měří intenzitu absorbance. Může být použit i jiný

detektor, např. MS neboli hmotnostní spektrometr, který zajišťuje vyšší citlivost než UV detektor. [55] Příklady stanovení PTX metodou HPLC-UV jsou uvedeny níže.

1)

HPLC systém se skládal z čerpadla (Waters Assoc., Milford, MA, USA) a autosampleru (Spectra Physics, Santa Clara, CA, USA) s objemem vstřikování 50 µl. Byla použita APEX oktylová analytická HPLC kolona (Jones Chromatography, Lakewood, CO, USA), která byla chráněna předkolonou naplněnou materiálem LiChrospher RP-8 (Merck, Darmstadt, Německo). Mobilní fáze se skládala ze směsi acetonitrilu, methanolu a 0,02M pufru octanu amonného při pH 5 (4:1:5, obj./obj.). Detekce byla provedena UV detektorem SP 200 při vlnové délce 227 nm. Pro zpracování dat byl použit integrátor SP 4290 propojený s datovým systémem WINner. Při této analýze byly využity 2 metody úpravy vzorku SPE a LLE. Výťažnost analýzy PTX v moči SPE metodou byla 103-114 % s relativní odchylkou 1,1–4,0 %. LOQ byl definován při koncentraci 0,01 µg/ml při injikaci 50 µl vzorku. Výťažnost analýzy LLE metodou byla výtěžnost 100,0-100,4 % s relativní odchylkou 3,8–7,3 % a LOQ byl definován při koncentraci 0,25 µg/ml při injikaci stejného množství vzorku. Ve výsledku lze říci, že záleží na správném výběru předběžného zpracování vzorku, ale obě metody jsou správné a přesné pro analýzu PTX v lidské moči. [47]

2)

HPLC systém série HP1100 (Agilent Technologies, USA) se skládal z odplyňovače G1322A, binárního čerpadla G1312A, autosampleru G1313A, termostatu G1316A a detektoru - diodového pole G1315A. Data byla zpracována chromatografickým softwarem HP Chemstation (LC Rev. A.06.03 [509], Agilent Technologies). Chromatografických separací bylo dosaženo za použití kolony 218MR54 (C18, Vydac, USA) při teplotě 25°C. Mobilní fáze se skládala z deionizované vody a acetonitrilu. Rychlost průtoku byla 1,0 ml/min. UV detekce byla prováděna při vlnové délce 227 nm. Pro předúpravu vzorku použili metodu LLE a limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) byl 5 ng/ml a 10 ng/ml při použití 100 µl vzorku plazmy. V této citlivé a přesné metodě byl poprvé použit DDB jako vnitřní standard pro analýzu PTX a byl úspěšně aplikován i na kvantifikaci PTX v myší plazmě. [46]

3)

HPLC systém se skládal z čerpadla constaMetric 3200 (LDC Analytical, Fl, USA), autosampleru Waters 717 plus (Milford, USA), kolonové pece SpH99 (Spark Holland, USA) a UV detektoru 2000 Spectra Physics (San Jose, USA). Stacionární fází byla kolona ODS-80A z nerezové oceli vyplněná 5 µm vrstvou Inertsilu (GL Science, Tokyo, Japan), chráněná kolonou Lichospher 100 RP-18. Mobilní fáze byla směs složená z vody, methanolu, tetrahydrofuranu a hydroxidu amonného (37,5:60:2,5:0,1 obj./obj.) s upraveným pH na 6 pomocí kyseliny mravenčí. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,1 ml/min. Chromatografické stanovení proběhlo při vlnové délce 230 nm, při teplotě kolony 60°C. Pro zpracování dat byl využit systém Chrom-Card připojený k ICW chromatografické stanici (Fisons, Italy). Pro

předběžnou úpravu vzorku použili metodu LLE a LOQ byl stanoven na 10 ng/ml. Lze říci, že tato metoda je citlivá, přesná a dostatečná pro stanovení PTX v klinických studiích. [56]

Kalibrační rozsah PTX bývá v rozmezí koncentrací 25 ng/ml až 10 mg/ml. Pro předúpravu vzorků se ve většině případů využívá metoda LLE. LOQ se pohybuje v rozmezí 3-10 ng/ml a objemy vzorku 100-500 μ l. Například lidská plazma má LOQ 3 ng/ml při použití 500 μ l vzorku, zatímco na hlodavčí plazmu nám postačí pouze 100 μ l vzorku, ale LOQ je až 10 ng/ml. Pro UV detekci se používají nízké vlnové délky (227-230 nm). Metodou HPLC-UV lze stanovit moč, tkáň i plazmu a časová náročnost metody je 10-25 minut. [39]

V první skupině jako mobilní fázi použili směs acetonitril-methanol-octan amonný. Ve druhé skupině použili směs acetonitril-deionizovaná voda, a ve třetím případě byla použita směs voda-methanol-tetrahydrofuran-hydroxid amonný o pH 6 díky kyselině mravenčí.

První skupina se soustředila na stanovení PTX v lidské moči a dospěla k závěru, že lze použít SPE i LLE k předúpravě vzorků, aby následná kvantifikace byla citlivá, dostatečně rychlá a přesná. Zjistili, že koncentrace vylučovaného PTX močí je o 10 % nižší než u původní podané látky. Jako problém by se mohla zdát nízká reprodukovatelnost – PTX nebyl stabilní při dlouhodobém skladování při -30°C a musel se stabilizovat dehydrovaným alkoholem Cremophor EL, aby se jeho životnost prodloužila minimálně na 17 měsíců. Bohužel stabilizované vzorky nelze zpracovávat metodou SPE. Tudíž se využívá spíše metody LLE, která je však časově náročnější a méně citlivá.

Druhá skupina použila vzorek myších tkáňových homogenátů a plazmy, a dospěly k závěru, že byla tato metoda správně použita k rychlé a přesné kvantifikaci PTX. Pro předúpravu vzorků použili metodu LLE a maximální koncentrace PTX byla zjištěna v nádoru 1-2h po intravenózním podání.

Třetí skupina se zabývala stanovením PTX v lidské plazmě a též lze říci, že jejich metoda byla selektivní, vysoce přesná, reprodukovatelná a rychlá. Celková doba chromatografie byla 30 minut a nevyskytovaly se žádné interference jiných složek (kromě léčiva paroxetin podávaného při léčbě). Lze tímto způsobem určit koncentrace PTX v rozmezí 10-500 ng/ml. V této metodě byl také aplikován Cremophor EL kvůli eliminaci interferencí s jinými léčivy. Tato metoda byla aplikována při studii PTX v kombinaci s cisplatinou u pacientů s pokročilým solidním karcinomem. Závěrem lze říci, že tato metoda pro stanovení PTX v lidské plazmě je specifická, přesná, selektivní a citlivá (10 ng/ml), a je dostačující pro klinické studie. Tato metoda využívá LLE jako jednostupňovou extrakci. Lze však použít jako předúpravu SPE, ale je to drahá technika používaná při dřívějších analýzách.

Při porovnání těchto metod nelze určit, která je nejvíce vyhovující, nejrychlejší a nejpresnější, protože se jedná vždy o rozdílný klinický vzorek. Přesto všechno

můžeme říci, že všechny metody jsou správné, přesné a trvají přiměřeně stejnou dobu. Pro všechny tři metody je nejvíce vyhovující zpracovávat vzorek metodou LLE.

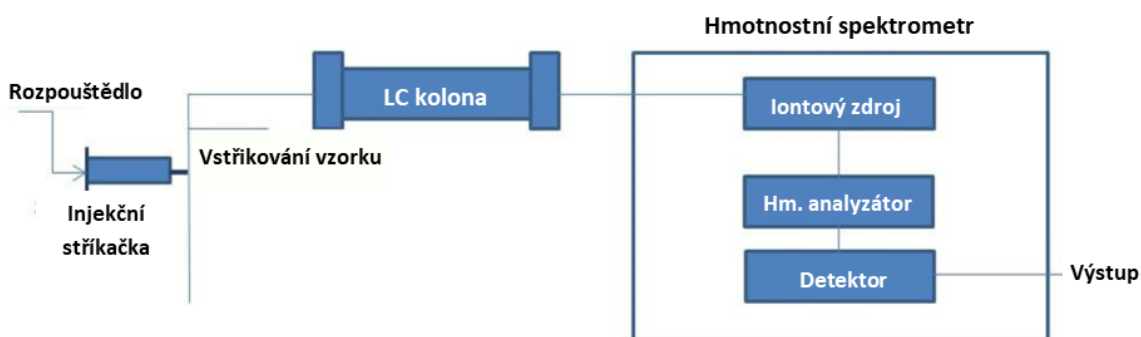
4.2.2 LC-MS

„Liquid Chromatography – Mass Spectrometry“ neboli kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (Obr. 29). Metoda LC-MS kombinuje separační schopnost metody HPLC pro látky s vysokou molekulární hmotností a schopnost hmotnostního spektrometru selektivně detekovat identitu molekul. Kombinace dvou analytických metod snižuje experimentální chyby a zlepšuje přesnost. [57]

Hmotnostní spektrometrie (MS) ionizuje atomy nebo molekuly, aby ulehčila jejich detekci v souladu s jejich molekulární hmotností a náboji (hmotnostní poměr m/z). Vzorek se v nebulizéru převádí na aerosol (s výjimkou plyných vzorků a tepelně stabilních vzorků) a zavede se přes vstup do ionizační komory. Dojde k ionizaci, při níž vzorek vlivem elektrického pole vytváří kationty nebo anionty. Následuje separace, v níž se vzniklé ionty oddělují podle poměru hmotnost/náboj hmotnostním analyzátozem a nakonec detekce, při které detektor určí druh a množství každého iontu.

MS je velmi přesná a vysoce citlivá metoda pro detekci molekul. Avšak pokud je požadovaná látka přítomna ve velmi složité směsi, je ideální kombinovat MS s jiným separačním procesem, jako je právě HPLC. [55]

Kombinace LC-MS je často používána při kvantitativní analýze taxanů v biologických materiálech. Podobně jako u HPLC metody je většina LC-MS testů prováděna z lidské a hlodavčí plazmy. U této metody lze pro kvantifikaci taxanů ještě navíc použít psí plazmu, lidské a hlodavčí sérum, tkáň, ultrafiltrát, moč, výkaly, orální tekutiny, a dokonce i vzorky v postmortálním stavu. [39] Příklady stanovení PTX metodou LC-MS jsou uvedeny níže.



Obrázek 29: Jednoduché schéma systému LC-MS [58]

LC-MS zahrnuje separaci směsí podle jejich fyzikálních a chemických vlastností, identifikaci složek v každém píku a detekci na základě jejich hmotnostního spektra. Průtoky v LC-MS jsou obvykle nižší než u HPLC, čímž je zajištěna úplná ionizace a

zachovaná citlivost. Pro vstřikování vzorku lze ruční dávkování pomocí injekční stříkačky nebo vstřikovacího čerpadla, nebo je možné tento proces automatizovat a využít autosampler, který je součástí chromatografické části přístroje. [55]

1)

UPLC-MS-MS systém byl složený z binární pumpy, autosampleru, odplyňovače a UPLC BEH kolony C18 (Water Corporation). Mobilní fáze (methanol a 0,1% kyselina mravenčí v poměru 75:25) byla čerpána přes kolonu při průtokové rychlosti 0,4 ml/min po dobu 2 minut při 25°C. LC eluát byl napojen přímo k hmotnostnímu spektrometru obsahující ionizační elektrosprej (ESI). Technika MRM+ (positive multiple reaction monitoring) byla použita pro kvantifikaci pomocí softwaru MassLynx 4.1. Hmotnostní přechody m/z 876,2 \rightarrow 307,9 a 882,2 \rightarrow 313,9 byly optimalizovány pro paklitaxel Na⁺ adukt a ¹³C₆ paklitaxel adukt, respektive s prodlením 0,5 sekund a interním skenováním 0,02 sekund. Parametry zdroje elektrospreje byly následovné – kapilární napětí 3,5 kV, kuželové napětí 50 V, teplota zdroje 100°C, desolvatační teplota 250°C. Dusík byl použit jako rozprašovací plyn (30 l/h) i jako desolvatační plyn (300 l/h). Jako kolizní plyn byl použit argon (3x10⁻³ mbar) a energie při střetu byla 31 eV. Násobič napětí byl nastaven na 650 V. Kalibrační křivka byla vytvořena ze 7 roztoků PTX v lidské plazmě o známé koncentraci. Při použití objemu vzorku 200 μ l bylo zjištěno, že LOD PTX je 2 ng/ml a LOQ je 5 ng/ml. Pro předúpravu vzorku použili LLE metodu s TBME. [44]

2)

Použitý HPLC systém se skládal z autosampleru, detektoru fotodiodového pole a LC čerpadla – všechno značky Finnigan (Thermo Electron San Jose, CA). Chromatografická separace probíhala na koloně C₁₈ Hypersil (Hanbon Science & Technology Co., Jiangsu, China). Mobilní fáze se skládala z methanolu a 0,1% kyseliny mravenčí (80:20). Průtok kolonou trval 6 minut rychlostí 1 ml/min při teplotě 30°C. TSQ Quantum Ultra AM trojkvadrupólový hmotnostní spektrometr Finnigan, pracující v režimu ESI⁺-SRM, byl použit pro všechny analýzy. Jako nebulizační a krycí plyn byl použit dusík a jako kolizní plyn byl použit argon. Pro kvantifikaci PTX v hlodavčí plazmě byly použity následující parametry: iontový sprej při napětí 5 000 V, kapilární teplota 350°C, tlak krycího plynu 35 psi, kolizní energie 30 V, disociace vyvolaná zdrojem kolizního napětí 12 V a tlak pomocného plynu 2 psi. Režim SRM byl použit pro kvantitativní stanovení analytu s následujícími parametry: 876,3 \rightarrow 307,9 pro PTX Na⁺ adukt a 830,3 \rightarrow 549,1 pro docetaxel adukt, s dobou prodlevy 0,5 sekund. Systém byl provozován se softwarem Thermo Finnigan Xcalibur 1.4 SRI. Poměry plochy píku PTX k vnitřnímu standardu byly vyneseny do grafu proti nominální koncentraci a byla použita lineární regrese metodou nejmenších čtverců pro vygenerování kalibrační křivky, s váhou 1/x. Veškeré zpracování dat bylo řízeno pomocí aplikace Microsoft Excel (verze 2003). LOQ byl v plazmě hlodavců 0,2 ng/ml s přesností 84-112 %. Pro předúpravu vzorku zvolili LLE metodu s TBME. Lze říci, že metoda této skupiny byla úspěšně použita pro kvantifikaci PTX v hlodavčí plazmě. [45]

3)

Sytém HPLC 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) se skládá z binárního čerpadla, vakuového odplyňovače a autosampleru. Byla použita kolona C18 Phenomenex Luna. Mobilní fáze A byla 0,1% kyselina octová s acetonitrilem (70:30, obj./obj.) a mobilní fáze B byla 0,1% kyselina octová s acetonitrilem (10:90, obj./obj.). Rychlost průtoku byla 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ a celková doba běhu byla 3,5 min. Výstup byl připojen na trojkvadrupólový hmotnostní spektrometr ABI/MDS Sciex Model API 4000 vybavený turbo-ionizačním sprejem. Nulový vzduch pro nebulizační a turbo plyny a dusík pro krycí a kolizní plyn byly poskytnuty generátorem Peak Scientific. Pro kvantifikaci PTX v plazmě a ve tkáních byla nastavena teplota 215°C a napětí iontového spreje bylo 5900 V. Přechod pro PTX byl nastaven na 854,4 \rightarrow 286,2 a přechod vnitřního standardu na 808,5 \rightarrow 527,5. Veškeré zpracování dat bylo řízeno softwarem Analyst, verze 1,2. LOQ byl naměřen 0,2 ng/111ml u PTX v plazmě. V tkáňové směsi byl LOQ naměřen 0,495 ng/ml PTX. Pro předúpravu vzorku použili metodu LLE s TBME. Tato rychlá, citlivá a jednoduchá metoda byla úspěšně použita pro kvantifikaci PTX v myší plazmě a tkáních. [40]

Při použití MS techniky je citlivost analýz výrazně vyšší než při použití UV detekce.[39] Extrakty vzorků se injikují na C18 HPLC kolonu a kvantifikují se za použití hmotnostního spektrometru. Metodou LC-MS lze kvantifikovat hodnoty 0,1-0,25 ng/ml. Metoda vyžaduje objemy 10-200 μl vzorku. Pro úpravu vzorků se využívá většinou LLE s TBME, někdy ale i proteinová precipitace. Hmotnostní přechod u PTX bývá nastaven na 854 \rightarrow 286 nebo 854 \rightarrow 509. Metodou LC-MS lze stanovit plazmu a vzorky tkání. Časová náročnost metody je 3-10 minut. [39]

Při srovnání jednotlivých metod všech tří skupin lze najít pár shod. Vždy byla použita kolona se sorbentem C18, pro úpravu vzorku metoda LLE za pomoci *tert*-butylmethyletheru. Rozprašovací nebulizační a krycí plyn byl dusík a kolizní plyn byl argon. Dále dvě z nich se shodovali složením mobilní fáze (methanol a kyselina mravenčí) a hmotnostní spektrometr využíval ESI. Všechny tři zmíněné metody jsou přesné, vysoce citlivé, jednoduché a rychlé pro stanovení PTX v různých vzorcích.

Závěr

Ve své práci jsem se zabývala taxoidní látkou jménem paklitaxel, jejím vlivem na léčbu určitých typů rakoviny a jejím stanovením. Paklitaxel se používá hlavně v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu prsu, ovaria a pankreatu. Lék existuje v několika formách, jimiž jsou například Abraxane, Taxol, Paclimedac. Většinou se podává intravenózně a účinky jsou individuální stejně jako samotná léčba.

Bakalářská práce je zpracována formou rešerže, kde se podrobněji zabývám teorií rakoviny, možnostmi její léčby a analytickým stanovením, kde popisuji metody přípravy a chromatografického stanovení paklitaxelu ve vzorku.

Byla vyvinuta spousta možností pro stanovení kvantifikace taxanů od biochemických testů, imunotestů až po chromatografické testy. Nejvíce jsou však využívány HPLC-UV a LC-MS/MS, protože splňují požadavky z hlediska selektivity a citlivosti. Systém HPLC-UV je levnější a dostupnější metoda než LC-MS/MS, ale LC-MS/MS poskytuje větší selektivitu a citlivost. LC-MS/MS je také díky své citlivosti vhodná pro stanovení i velmi malého množství taxanů. Závěrem srovnání těchto metod lze vyvodit, že LC-MS/MS je nejlepší vhodná metoda pro kvantifikaci taxanů, a LLE metoda pro předběžné zpracování vzorku. Pomocí LLE *tert*-butylmethyletherem lze totiž získat nejnižší hodnoty LOQ, díky redukci spektrálních interferencí a matricových efektů. Sice je metoda LLE časově náročnější a pracnější než SPE metoda, ale kvůli své citlivosti je upřednostňována. I když v dnešní době lze využít i SPE metodu, protože již existují nové hmotnostní spektrometry se zvýšenou citlivostí. Nelze opomenout zmínit, že neustále se vyvíjejí nové citlivější a jednodušší metody s rychlejším průchodem vzorku. [39]

Každý z nás si často klade otázku, proč je tak malá úspěšnost léčby v boji s rakovinou, když existuje tolik léčebných možností? Proč někteří lidé umírají i přesto, že se jim rakovina podchytí v samém začátku? Tímto problémem se zabývají lékaři, vědci a vývojáři celého světa a nikdo zatím nezná odpověď. Jak říká americký lékař a vědec Dan Theorodescu: „Už dnes jsme schopni některé typy rakoviny vyléčit, sprovodit z povrchu zemského ji ale nedokážeme nikdy.“

Bohužel rakovina je smutnou součástí života každého z nás, ať už v nás samotných nebo v okolí našich blízkých. Rakovina má mnoho příčin a zatím nikdo neví, jak jejímu vzniku předejít. Můžeme ale doufat, že jednou nad ní nadobro zvítězíme.

Seznam použité literatury

- [1] JANOVSÁ, Kateřina, Lumír KOMÁREK, Jaroslav KŘÍŽ, Jarmila RÁŽOVÁ a Stanislav WASSERBAUER. Podpora zdraví, prevence zdravotních rizik a nemoci. *Praha: Krajská hygienická správa Královéhradeckého kraje se sídlem v Hradci Králové* [online]. 2013 [vid. 2019-03-27]. Dostupné z: <http://www.khshk.cz/e-learning/kurs6/index.html>
- [2] JARO KŘIVOHLAVÝ. *Psychologie nemoci*. Praha: Grada, 2002. ISBN 80-247-0179-0.
- [3] VORLÍČEK, Jiří, Jitka ABRAHÁMOVÁ a Hilda VORLÍČKOVÁ. *Klinická onkologie pro sestry*. 2., přepra. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3742-3.
- [4] Česká republika a rakovina v číslech. *Česká republika: Linkos - Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně* [online]. [vid. 2018-10-12]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/narodni-onkologicky-program/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/>
- [5] MARCUS OEHLRICH. *Jak na rakovinu: prevence a boj s nemocí*. Praha: Reader's Digest, 2014. ISBN 978-80-7406-261-2.
- [6] 2.8 Buněčný cyklus a dělení buňky. *Česká republika: Ústav histologie a embryologie* [online]. [vid. 2018-07-21]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/histology/MedAtlas_2/OH_txt2-8.htm
- [7] Cell cycle phases. *Kanada: BD Biosciences* [online]. 2019 [vid. 2019-01-21]. Dostupné z: http://www.bdbiosciences.com/wcmimages/apoptosis_analysis_cellcycle_phases_lrg.jpg
- [8] GYMNÁZIUM EDUCANET OSTRAVA. Dělení buněk. Průběh mitózy. *Ostrava: Gymnázium EDUCAnet* [online]. 2010 [vid. 2019-04-03]. Dostupné z: http://ostrava.educanet.cz/www/biologie/images/stories/img_ob_mitoz_a.jpg
- [9] JIŘÍ TOMÁŠEK. *Onkologie: Minimum pro praxi*. Praha: Axonite CZ, 2015. ISBN 978-80-88046-01-1.
- [10] HOFMANOVÁ, Jiřina. *Genotoxicita a karcinogeneze* [online]. 2013 [vid. 2018-10-16]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/docs/Genotoxicita_karcinogeneze.pdf?fbclid=IwAR0Bi8INI-cOcceF0b2hlybFAlFd6MuBl0ByPOIgvqUgqWT_Ky2afZrIU_g
- [11] Terapie. *Česká repulika: Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola, Hradec Králové, Komenského 234* [online]. 2008 [vid. 2019-01-25]. Dostupné z: https://ose.zshk.cz/vyuka/terapie.aspx?tid=88&fbclid=IwAR28wx0y7bxgLfekrD8CGwWu1LwxuRcFpfAc-8FhqP9qydT7hHO_jcimF0k

- [12] Methotrexate. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-30]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=112728>
- [13] Mercaptopurine. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-30]. Dostupné z: www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=580869%0D
- [14] Fluorouracil. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-30]. Dostupné z: www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=3268%0D
- [15] Gemcitabine. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-30]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=54753>
- [16] Topotecan. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-30]. Dostupné z: www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=54705%0D
- [17] Irinotecan. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=54825>
- [18] Etoposide. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=33510>
- [19] Teniposide. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=398606>
- [20] Chlorambucil. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=2607>
- [21] Melphalan. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=405297>
- [22] Cyclophosphamide. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=2804>
- [23] Busulfan. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=2384>
- [24] Carmustine. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=2480>

- [25] Streptozotocin. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=27273>
- [26] Procarbazine. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=4746>
- [27] TP2450000. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=76401%0D
- [28] Vincristine. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=5758>
- [29] Velban. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=211446%0D
- [30] Paclitaxel. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=10368587>
- [31] Docetaxel. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=130581>
- [32] 10-deacetylbaccatin III. *United Kingdom of Great Britain: Royal Society of Chemistry* [online]. 2015 [vid. 2019-01-31]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=135935>
- [33] BERNABEU, Ezequiel, Maximiliano CAGEL, Eduardo LAGOMARSINO, Marcela MORETTON a Diego A. CHIAPPETTA. Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, **526**(1–2), 474–495. ISSN 18733476. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ijpharm.2017.05.016](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.016)
- [34] Paclitaxel. *DrugBank, Canada* [online]. 2005 [vid. 2018-08-26]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01229>
- [35] Abraxane_celgene_lung_cancer.jpg. *United Kingdom of Great Britain: Pancreatic Cancer Action* [online]. 2016 [vid. 2019-04-03]. Dostupné z: https://pancreaticcanceraction.org/wp-content/uploads/2015/09/abraxane_celgene_lung_cancer.jpg
- [36] Souhrn údajů o přípravku Abraxane, INN-paclitaxel. *European Medicines Agency* [online]. 2013 [vid. 2019-02-01]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/abraxane-epar-product-information_cs-0.pdf

- [37] INDIAMART. Taxol Paclitaxel Injection, Packaging Type: Vial. *India: IndiaMART InterMESH* [online]. 2019 [vid.2019-04-03]. Dostupné z: <https://m.indiamart.com/proddetail/paclitaxel-injection-16543073488.html>
- [38] TAXOL: 6MG/ML INF CNC SOL 1X50ML. *Praha: SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. 2010 [vid.2019-02-01]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0050083&tab=texts>
- [39] HENDRIKX, ROSING, SCHINKEL, SCHELLENS a BEIJNEN. Quantification of taxanes in biological matrices: a review of bioanalytical assays and recommendations for development of new assays. 2014, 993–1010.
- [40] GUO, Wei, Jenifer L JOHNSON, Sumsullah KHAN, Ateeq AHMAD a Imran AHMAD. Paclitaxel quantification in mouse plasma and tissues containing liposome-entrapped paclitaxel by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetics study. *Analytical biochemistry*. 2005, **336**(2), 213–220. ISSN 0003-2697.
- [41] POSOCCO, Bianca, Mauro BUZZO, Andrea FOLLEGOT, Luciana GIODINI, Roberto SORIO, Elena MARANGON a Giuseppe TOFFOLI. A new high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of paclitaxel and 6 α -hydroxy-paclitaxel in human plasma: Development, validation and application in a clinical pharmacokinetic study. *PloS one*. 2018, **13**(2), e0193500. ISSN 1932-6203.
- [42] GAO, Yangyang, Junying CHEN, Xiqian ZHANG, Huiru XIE, Yanran WANG a Shuquan GUO. Quantification of Paclitaxel and Polyaspartate Paclitaxel Conjugate in Beagle Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. *Journal of chromatographic science*. 2017, **55**(3), 222–231. ISSN 0021-9665.
- [43] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. uprav. 2003. ISBN 978-80-86369-075.
- [44] ZHANG, Shuang-Qing a Guo-Hua CHEN. Determination of paclitaxel in human plasma by UPLC-MS-MS. *Journal of chromatographic science*. 2008, **46**(3), 220–224. ISSN 1945-239X.
- [45] TONG, Xinyong, Jianping ZHOU a Yan TAN. Determination of Paclitaxel in Rat Plasma by LC—MS—MS. *Journal of chromatographic science*. 2006, **44**(5), 266–271. ISSN 1945-239X.
- [46] KIM, Sung Chul, Jaewon YU, Jang Won LEE, Eun-Seok PARK a Sang-Cheol CHI. Sensitive HPLC method for quantitation of paclitaxel (Genexol®) in biological samples with application to preclinical pharmacokinetics and biodistribution. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2005, **39**(1–2), 170–176. ISSN 0731-7085.
- [47] HUIZING, M T, H ROSING, F KOOPMAN, A C F KEUNG, H M PINEDO a J H BEIJNEN. High-performance liquid chromatographic procedures for the

- quantitative determination of paclitaxel (Taxol) in human urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1995, **664**(2), 373–382. ISSN 0378-4347.
- [48] GASPAR, Julio R, Jun QU, Ninfa L STRAUBINGER a Robert M STRAUBINGER. Highly selective and sensitive assay for paclitaxel accumulation by tumor cells based on selective solid phase extraction and micro-flow liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analyst*. 2008, **133**(12), 1742–1748.
- [49] YU, Haoying, Robert M STRAUBINGER, Jin CAO, Hao WANG a Jun QU. Ultra-sensitive quantification of paclitaxel using selective solid-phase extraction in conjunction with reversed-phase capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1210**(2), 160–167. ISSN 0021-9673.
- [50] MUSIL, Karel. Stanovení acetylsalicylové kyseliny metodou HPLC. nedatováno.
- [51] COUFAL, Pavel. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. *Praha: Univerzita Karlova* [online]. 1996 [vid. 2018-11-13]. Dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html?fbclid=IwAR2akA_I0sKwIq46ZnwefNjDVeCD2Zj3ljIEBCx9gPnxF5ntFMMsllTqKjw
- [52] Gradientový HPLC systém ECOM Series 2000. *Bratislava: AZ chrom s.r.o* [online]. 2015 [vid. 2018-11-13]. Dostupné z: <http://www.azetchrom.sk/images/ecombanner8.jpg>
- [53] BARTOŮŠEK, Miloš a Jiří PAZOUREK. ZÁKLADY METOD ANALYTICKÉ CHEMIE pro bakalářské studijní programy. 2000.
- [54] DOHNAL, Vlastimil a Ivana KADLEČKOVÁ. Analýza látek pomocí HPLC. Schéma kapalinového chromatogramu. *Ústí nad Labem: Univerzita J. E. Purkyně* [online]. 2013 [vid. 2018-11-13]. Dostupné z: http://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/Analýza_latek_pomoci_HPLC_Mevapox17102013.pdf
- [55] ALINA. Basic Principles of LC, HPLC, MS, & MS. *United States: Chemyx* [online]. 2019 [vid. 2019-01-25]. Dostupné z: <https://www.chemyx.com/support/knowledge-base/applications/basic-principles-hplc-ms-lc-ms/>
- [56] SPARREBOOM, Alex, Peter DE BRUIJN, Kees NOOTER, Walter J LOOS, Gerrit STOTER a Jaap VERWEIJ. Determination of paclitaxel in human plasma using single solvent extraction prior to isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1998, **705**(1), 159–164. ISSN 0378-4347.
- [57] Aplikace v analytických laboratořích: Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS). *Česká republika: Air Products and*

Chemicals [online]. 2019 [vid. 2019-01-15]. Dostupné z: <http://www.airproducts.cz/industries/Analytical-Laboratories/analytical-lab-applications/product-list/liquid-chromatography-with-mass-spectrometer-lc-ms-analytical-laboratories.aspx?itemId=BA1AEFB4DC584D8495B390A4877D0387>

- [58] ALINA. Simple Schematics of LC-MS System. *United States: Chemyx* [online]. 2019. Dostupné z: <https://cdn.chemyx.com/wp-content/uploads/2018/04/image1.jpg>