

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie

STUDIUM ELEKTROCHEMICKÉHO CHOVÁNÍ DASATINIBU A ERLLOTINIBU

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:	Bc. Kateřina Ohrzalová
Studijní obor:	Analytická chemie
Forma studia:	prezenční
Vedoucí diplomové práce:	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Pavla Kučerová, Ph.D.

Olomouc 2015

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jany Skopalové Ph.D. a veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Kateřina Ohrzalová

Poděkování

Děkuji paní RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za odborné vedení a konzultace. Také bych ráda poděkovala Mgr. Pavle Kučerové, Ph.D. za odborné rady a připomínky.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem elektrochemického chování vybraných kancerostatik - dasatinibu a erlotinibu. Tato léčiva jsou hojně používaná na léčbu různých typů rakoviny. V práci bylo prokázáno, že obě tyto látky jsou elektrochemicky oxidovatelné, čehož lze využít k jejich stanovení.

Sledování elektrochemického chování těchto látek probíhalo pomocí lineární (DC) a diferenčně pulzní voltametrie (DPV) s tříelektrodovým zapojením. Jako pracovní elektroda byla zvolena elektroda ze skelného uhlíku (GCE), jako referentní argentchloridová (Ag/AgCl/1M-KCl) a pomocná platinová elektroda. U dasatinibu byl určen detekční limit $1,08 \cdot 10^{-6}$ mol/l diferenčně pulzní voltametrií. U erlotinibu se jevila pro stanovení vhodnější lineární voltametrie, která poskytla detekční limit $1,52 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

Potenciostatickou coulometrií bylo zjištěno, že oxidace obou látek je čtyřelektronová. Elektrolyzované roztoky byly dále podrobeny analýze hmotnostní spektrometrií. Nalezené oxidační produkty byly porovnány s produkty oxidativního metabolismu známými z literatury.

ABSTRACT

This thesis deals with a study of the electrochemical behavior of anticancer drugs - dasatinib and erlotinib. These drugs are widely used for treating various types of cancer. This thesis demonstrates that both compounds are electrochemically oxidizable, which can be used for their determination.

Investigation of the electrochemical behavior of these compounds was carried out by direct current (DC) and differential pulse voltammetry (DPV). Measurements were performed using glassy carbon electrode (GCE), a reference electrode (Ag/AgCl/KCl-1M) and the Pt wire counter electrode in one-compartment electrochemical cell. The detection limit of dasatinib $1.08 \cdot 10^{-6}$ mol/l was determined by differential pulse voltammetry (DPV). The linear voltammetry appeared to be more suitable for erlotinib and provided the detection limit $1.52 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

It was found using controlled potential coulometry that oxidation of both substances included 4 electrons. Electrolyzed solutions were further analyzed by mass spectrometry. Identified oxidation products were compared with the products of oxidative metabolism reported in the literature.

Obsah

1. Úvod	7
2. Teoretická část	9
2.1. Dasatinib	9
2.1.1. CML - Chronická myeloidní leukémie	9
2.1.2. Vlastnosti	12
2.1.3. Popis lékové formy a použití léčiva	13
2.1.4. Farmakologické vlastnosti.....	13
2.1.5. Metody stanovení.....	16
2.2. Erlotinib	17
2.2.1. Vlastnosti.....	17
2.2.2. Popis lékové formy a použití léčiva	19
2.2.3. Farmakologické vlastnosti ^{30,31,32,33}	19
2.2.4. Metody stanovení	22
2.3. Imatinib	23
2.4. Napodobení oxidativního metabolismu EC	24
3. Experimentální část	26
3.1. Chemikálie	26
3.2. Přístroje	27
3.3. Pracovní postupy	27
3.3.4. Příprava základních roztoků.....	27
3.3.5. Složení základního elektrolytu	27
3.3.6. Voltametrická měření.....	28
3.3.7. Coulometrická měření.....	31
3.3.8. MS analýza	32
4. Výsledky a diskuze	33
4.1. Měření dasatinibu a erlotinibu pomocí cyklické voltametrie	33
4.2. Závislost na pH dasatinibu a erlotinibu	38
4.3. Měření kalibračních závislostí	42
4.4. Potenciostatická coulometrie	44
4.5. Měření MS	45
4.5.1. Dasatinib	45
4.5.2. Erlotinib	50
5. Závěr	56
6. Seznam použitých zkratk	57
7. Slovník lékařských pojmů	58
8. Literatura	59

1. Úvod

Dasatinib je léčivo 2. generace tyrosin kináz, které se používá na léčbu chronické myeloidní leukémie u pacientů, kteří nereagují na léčbu tyrosin kinázami 1. generace. Erlotinib je lékem používaným v nejvyšších stádiích rakoviny pankreatu, dále pak na léčbu nemalobuněčné rakoviny plic (NSCLC) a dalších typů rakoviny.

Důležitým úkolem při vývoji léčiv je odhalení metabolismu daného léčiva a následná charakterizace jeho metabolitů v lidském organismu. Díky těmto metabolitům můžeme zjišťovat toxicitu daného léčiva, farmakologické chování a mechanismy metabolizace rodičovské struktury. Dasatinib a erlotinib jsou látky, které z lidského těla odcházejí hlavně ve formě svých metabolitů, jsou metabolizovány cytochromem P450. Patří do skupiny tyrosin kinázových léčiv, které díky své malé molekule blokují intracelulární signály, které řídí proliferaci mnoha maligních buněk. Tyto inhibitory jsou klíčem k regulaci mnoha buněčných cest, které zahrnují růst a odlišnost jedinců. V současnosti roste počet těchto inhibitorů kvůli cílené terapii rakoviny^[1].

V dnešní době existují metabolické studie, které popisují extrakci léčiva nebo jeho oxidativních metabolitů z lidské nebo zvířecí moče, krve nebo mikrosomálních buněk z jater. Také lze nasimulovat reakce léčiva s enzymy a následně toto léčivo a jeho metabolity izolovat z matrice vzorku a stanovovat nejčastěji pomocí separačních metod (HPLC, MS, GC, CE). Díky elektrochemickým metodám jsme schopni částečně nasimulovat některé oxidace probíhající v lidském organismu pomocí cytochromu P450 v jednoduchých organických maticích. Díky těmto schopnostem mohou být elektrochemické metody použity v těchto studiích.

V instrumentální analytické chemii patří elektrochemické metody k nejstarším a nejrozšířenějším. Vývoj těchto metod můžeme datovat od přelomu 18. - 19. století. Český chemik Jaroslav Heyrovský objevil v roce 1922 polarografii a položil základ elektroanalytických metod. Za svůj objev dostal v roce 1959 Nobelovu cenu. Tyto metody jsou v dnešní době zastíněny stále více se rozvíjejícími separačními a spektrálními technikami. Základní výhodou elektrochemických metod je nízká cena instrumentace a malé provozní náklady. Elektrochemické metody jsou schopny stanovit

kovy a organické látky v malých koncentracích v průmyslových výroбах, životním prostředí a v dalších oborech².

Cílem této diplomové práce bylo sledování dosud neprozkoumaných elektrochemických vlastností kancerostatik, dasatinibu a erlotinibu, cyklickou a diferenčně pulzní voltametrií. Pro získání bližších informací o počtu elektronů vyměňovaných při oxidaci byla použita potenciostatická coulometrie. Hmotnostní spektrometrie měla poskytnout informace o oxidativních produktech léčiv. Při studiu elektrochemických vlastností dasatinibu bylo možné se opřít o již popsané elektrochemické chování tyrosin kinázy 1. generace, imatinibu, který se vyznačuje podobnou strukturou a elektrochemickým chováním jako dasatinib. Tyto poznatky byly využity pro lepší pochopení elektrochemického chování studovaných kancerostatik.

2. Teoretická část

2.1. Dasatinib

2.1.1. CML - Chronická myeloidní leukémie

CML je jedním ze čtyř druhů základní leukémie, která postihuje mladší a starší pacienty. Jedná se o chronické nádorové onemocnění kostní dřeně způsobené poruchou hematopoetických kmenových buněk. Charakteristickým rysem onemocnění je reciproční translokace mezi chromozomy 9 a 22, které produkují tzv. „filadelfský“ (Ph⁺) chromozom, který obsahuje gen BCR-ABL kódující protein. Tento protein má velkou tyrosin kinázovou aktivitu a abnormálně reguluje buněčný cyklus ve směru zvýšení množení buňky a tím způsobí její nádorový zvrat. Příznaky této nemoci vypadají jako symptomy leukémie, ze začátku jsou spíše nespecifické (únava, horečky, noční pocení), pak se začínají ukazovat v kostní dřeni, lymfatických uzlinách a tělesných orgánech, což způsobuje chudokrevnost, ztrátu imunity, nedostatek krevních destiček (tvorba modřin, krvácení z nosu, krev ve stolici). Nádorové bílé krvinky jsou nezralé, a proto nejsou schopny podílet se na obranyschopnosti pacientů jako zralé bílé krvinky. Toto onemocnění se vyskytuje ve třech klinických stádiích^{1,3,4,5,8}:

1. Chronická fáze – ohrožení pacienta leukocytózou vyzrálých granulocytů. Tato forma může trvat i roky bez nějakých větších projevů. Léčbou této fáze je používání inhibitoru tyrosin kináz imatinibu (lékový přípravek Glivec, Novartis), standardní dávka je 400 mg/den, v případě nereagování se používají k léčbě inhibitory 2. generace tyrosin kináz dasatinib (Sprycel, Bristol-Myers Squibb), nebo Nilotinib (Tasigna, Novartis)^{3,4,7}.
2. Akcelerovaná fáze – u pacientů s pozdě stanovenou diagnózou může být někdy přeskočena. Provází ji zvýšená tvorba nádorových buněk a prohloubení příznaků. Léčba akcelerované fáze se zahajuje 600 mg/den imatinibem. Pokud dojde k akceleraci, použije se 2. třída inhibitorů. K této léčbě se aplikuje intenzivní chemoterapie s cílem provedení alogenní transplantace ihned, jakmile to je možné^{3,4,7}.

3. Blastický zvrát – klinicky velmi závažné stádium připomínající akutní leukémii, které bez úspěšné léčby vede k rychlé smrti^{3,4,7}.

Prognóza se u každého pacienta liší. Před samotným zavedením imatinibu, jako hlavního léčiva této nemoci, se spoléhalo na konvenční léčbu interferonem alfa (ROFERON-A, Roche, INTRON, Schering-Plough). Ten byl standardním léčivem před tyrosin kinázovou léčbou a dnes se používá jen okrajově na překlenutí gravidity pacienta, která by byla imatinibem kontraindikována. Imatinib je selektivním inhibítozem BCR-ABL kinázy v mnoha fázích onemocnění. Objevují se však důkazy, které naznačují, že pacienti, kteří jsou rezistentní nebo intolerantní k imatinibu, mohou být léčeni dasatinibem (tyrosin kináza 2.generace, TKI 2). Tato intolerance je způsobena vytvářením bodových mutací v ABL kinázové doméně BCR-ABL kináz. V druhé chronické fázi CML, nebo po akceleraci či blastickém zvrátu se používá jako léčba alogenní transplantace kostní dřeně, která poskytuje lepší výsledky než léčba imatinibem nebo TKI 2. Před samotnou transplantací musejí pacienti podstoupit chemoterapii^{3,5,6,7,9}.

2.1.1.1. Chemoterapie

Pod pojmem chemoterapie si můžeme představit nitrožilní vpravování chemických látek (cytostatik) do organismu, které mají zastavit dělení nádorových buněk. Tato léčba není přesně cílená, a proto zasahuje také zdravé buňky, které se rychle dělí, což jsou buňky trávicího traktu, krvetvorné buňky kostní dřeně a buňky vlasových váčků. Některé nádory odolávají chemoterapii a označujeme je jako chemorezistentní. Ty, které neodolávají, se nazývají chemosenzitivní. U většiny nádorů se chemoterapie používá jako doplňující léčba s ozařováním a chirurgickým zákrokem. Délka aplikace závisí na druhu nádoru a jeho rozšíření v organismu, na cílech léčby, její úspěšnosti, druhu cytostatika a na celkové reakci nemocného na léčbu. Pro zvýšení účinnosti léčby se často kombinují dva, tři nebo i více léků. V některých případech se dá chemoterapie aplikovat ambulantně ve speciální ambulanci pro podávání chemoterapie, nebo formou tablet, což lze také doma. Jiný postup vyžaduje

hospitalizaci. Léčba se opakuje v pravidelných intervalech, které stanoví lékař na základě stavu pacienta, ve většině případů to bývá 2-4 týdny. Čím více se chemoterapie opakuje, tím více se zvyšuje riziko její neúčinnosti. Mezi nežádoucí účinky patří nauzea, místní nekróza, kožní reakce, celková alergická reakce. Dlouhodobé následky pak mohou být sterilita, jaterní cirhóza, osteoporóza, encefalopatie. U některých pacientů se nežádoucí účinky nemusí vůbec vyskytovat. Pokud se vyskytnou, jsou lékaři schopni některé nežádoucí účinky potlačit podpůrnou léčbou nebo podáváním specializované výživy. Dobře podaná chemoterapie výrazně zlepšuje kvalitu života. Po chemoterapii se doporučuje vyhýbat se místům, kde hrozí přenos infekčních chorob (MHD, supermarkety) a pravidelně docházet na kontroly. Nedoporučuje se řídit motorové vozidlo a podstupovat jakékoli očkování. Chemoterapie má také svou alternativu, kterou je hormonální léčba u hormonálně citlivých nádorů (karcinomu prsu, karcinomu prostaty). Důležité je si uvědomit, že nepodání chemoterapie vede ke snížení pravděpodobnosti vyléčení a zkrácení celkové doby přežití^{10,11,12,13,14,15}.

2.1.1.2. Transplantace kostní dřeně

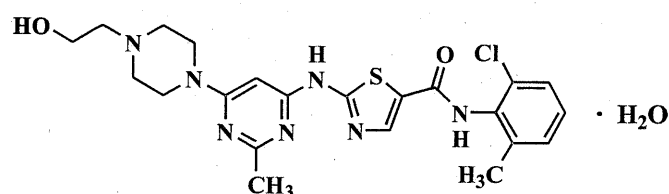
Kostní dřeň je měkká rosolovitá tkáň uprostřed kostí, ve které dozrávají všechny krvinky, než vstoupí do krve. Transplantace kostní dřeně je léčebný výkon, který je důležitý provést u pacientů se špatnou krvetvorbou. Obnovu této krvetvorby je možné zajistit pomocí výměny kmenových buněk pocházejících od jiného zdravého člověka (alogenní), nebo od sebe samého (autologní)^{10,16,17}.

- 1) Alogenní transplantace – provádí se u těžších poruch krvetvorby. Původní nemocná dřeň se rozpustí pomocí chemoterapie a na její místo se vpraví malé množství krvetvorných buněk od zdravého dárce. Tyto buňky se usadí v kostech a postupně se množí a obnoví tvorbu normálních buněk. U této transplantace je nutné najít dárce, který má velmi podobné tkáňové vlastnosti jako pacient. Nejlepší dárce jsou z řad rodinných příslušníků¹⁷.
- 2) Autologní transplantace – k obnově krvetvorby se používají buňky samotného pacienta. Tato transplantace se používá u některých nádorů, kdy se pacientovi

ve vhodné fázi nemoci odeberou jeho vlastní kmenové buňky, které se zamrazí a použijí v dalších fázích nemoci. Tato metoda je snazší, ale nehodí se vždy, protože se musí odebírat pouze zdravé kmenové buňky¹⁷.

2.1.2. Vlastnosti

Dasatinib, chemickým názvem *N*-(2-chlor-6-methylfenyl)-2-({6-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-2-methylpyrimidin-4-yl}amino)-1,3-thiazol-5-carboxamid monohydrát (obr.1), je aktivní složka farmaceutického přípravku Sprycel. Sumární vzorec dasatinibu je $C_{22}H_{26}ClN_7O_2S$ s molární hmotností bezvodé fáze 488,01 g/mol, jako monohydrát 506,02 g/mol^{18,19}.



Obr. 1: Strukturální vzorec dasatinibu

Tato léčivá látka je poměrně málo rozpustná ve vodě (0,008 mg/ml) při $24 \pm 4^\circ C$. Hodnota pH nasyceného roztoku dasatinibu ve vodě se pohybuje okolo 6,0. Fyzikálně chemické vlastnosti dasatinibu shrnuje Tabulka 1, Tabulka 2 shrnuje rozpustnost^{18,20}:

Tabulka 1: Fyzikálně chemické vlastnosti dasatinibu^{18,19}

molární hmotnost (bezvodý)	488,01g/mol
barva	bílá až krémově bílá
forma	prášek, granule, krystalická pevná látka
bod tání	280-285°C
bezpečnost	dráždivý
dicociační konstanty	$pK_1=3,1$ $pK_2=6,8$ $pK_3=10,28$
UV/VIS λ_{max}	320-330 nm

IR	3418 (N-H), 3200 (O-H), 1620 (C=O), 1582 (C=C a C=N), 1513 (CH=CH), cm ⁻¹
NMR	N-H – 11,47 a 9,88 ppm

Tabulka 2: Rozpustnost dasatinibu^{18,20}

rozpustný	methanol, DMSO
slabě rozpustný	etanol, polyetylglykol, propylenglykol
velmi málo rozpustný	aceton, acetonitril
nerozpustný	kukuřičný olej

2.1.3. Popis lékové formy a použití léčiva

Dasatinib je silným inhibitorem několika onkogenních kináz (tyrosin kináz) a buněčných enzymů, které se podílejí na přenosu růstových signálů z buněčné membrány do jádra. Byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv USA a v Evropské Unii v roce 2006, je aktuálně schválený pro léčbu pacientů s CML, jejichž nemoc nereaguje nebo je rezistentní na imatinib^{19,21}.

Sprycel se podává ve formě potahované tablety, která obsahuje dasatinib monohydrát. Další pomocné látky v tabletě jsou: laktóza, mikrokrytalická celulóza, sodná sůl kroskarmelosy, hydroxypropylcelulóza a stearát hořečnatý. Potah tablet obsahuje hypromelosu, oxid titaničitý a polyetylglykol^{18,21}.

2.1.4. Farmakologické vlastnosti

2.1.4.1. Farmakodynamika

Dasatinib inhibuje aktivitu kinázy BCR-ABL a SRC-kináz, inhibuje autofosforylaci a fosforylaci substrátu v závislosti na koncentraci. Je až 325krát účinnější než imatinib, protože se váže nejen na neaktivní (uzavřené), ale také na aktivní (otevřené) konformace BCR-ABL kináz. To je základem pro zvýšení vazebné afinity dasatinibu oproti imatinibu, což způsobuje snížení sklonu ke vzniku rezistence v důsledku vzniku mutací. Inhibuje signalizaci SRC, snižuje růst a indukuje zastavení

buněčného cyklu a apoptózu v podskupině nádorových buněk štítné žlázy. Protože má jinou chemickou strukturu než imatinib, můžou ho používat pacienti, kteří netolerovali Glivec. U většiny pacientů, kteří nemohli dále užívat Glivec z důvodu jeho nesnášenlivosti nebo neúčinnosti, dokázal Sprycel po několikaměsíčním užívání pozitivně ovlivnit průběh nemoci a dokonce ji významně potlačit^{19,22}.

2.1.4.2. Farmakokinetika^{19,20,21,22,23}

2.1.4.2.1. Absorpce

Dasatinib se musí podávat perorálně. Tablety se nesmí drtit nebo krájet, aby se minimalizovalo riziko dermální expozice. Mohou být podávány s jídlem nebo bez jídla, ale musí se užívat pravidelně, buď ráno, nebo večer. Absorpce může být ovlivněna některými léčivými, která se používají na snižování kyselosti žaludku. Nejvyšší koncentrace je dosaženo po 0,5 - 3 hodinách po požití.

2.1.4.2.2. Distribuce

Dasatinib se značně váže na lidské plazmatické proteiny (přibližně 96 %). U pacientů má velký distribuční objem (2505 l), což ukazuje, že lék je extenzivně distribuován do extravaskulárního prostoru.

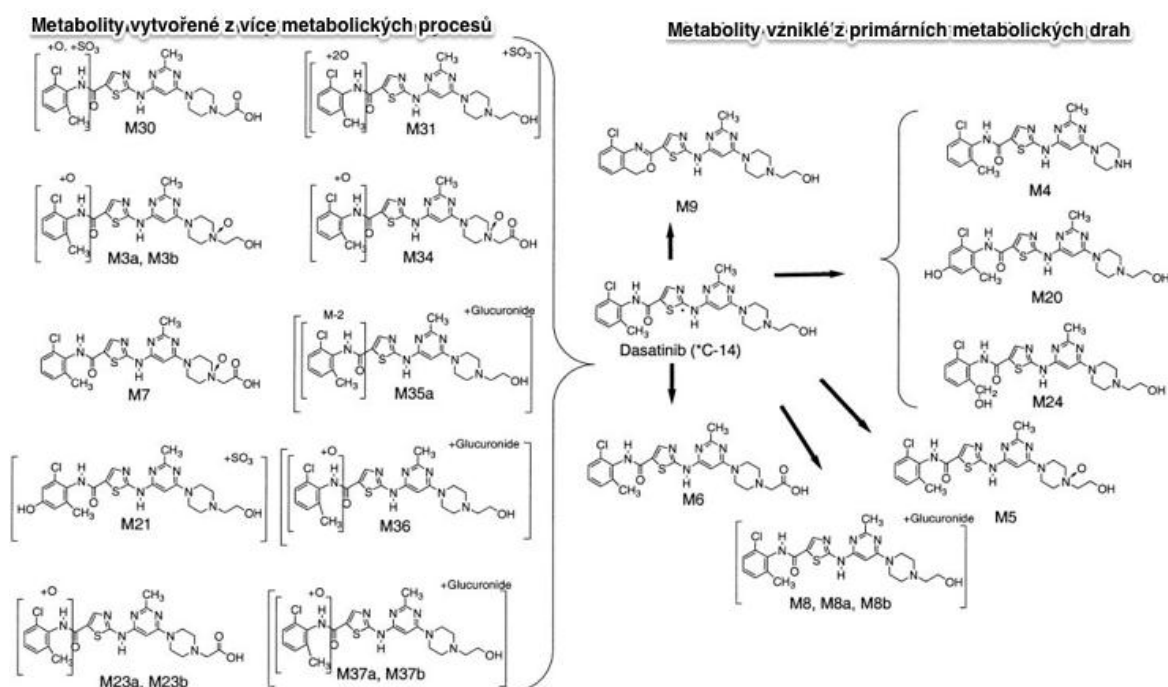
2.1.4.2.3. Metabolismus

Dasatinib se metabolizuje extenzivně několika enzymy, které se účastní na produkci metabolitů. Celkový poločas rozpadu je přibližně 5 – 6 hodin. Nejdůležitějším enzymem, který metabolizuje dasatinib, je CYP3A4.

Dasatinib má pět primárních metabolitů, z nichž tři vznikají pomocí CYP3A4 enzymu. Primární metabolity dasatinibu byly identifikovány jako produkty hydroxylace na fenylovém kruhu (M20 a M24), *N*-oxidace na piperazinovém kruhu (M5), *N*-dealkylace hydroxyethyl skupiny (M4) a oxidace hydroxyethylové skupiny na karboxylovou kyselinu (M6).

Na obrázku 2 jsou zobrazeny navrhované biotransformační cesty na základě metabolitů nalezených v plazmě, moči a stolici u lidí při podání 100 mg dasatinibu *per os*. Metabolity M20 a M24 jsou nejhojnějšími oxidativními metabolity. Metabolit

M21 je prominentním metabolitem v lidské plazmě a vyskytuje se také jako hlavní metabolit lidských hepatocytů. Další méně významné metabolity dasatinibu M4, M5, M6 identifikované v lidských hepatocytech byly také identifikovány jako minoritní v lidské plazmě²⁴.



Obr. 2: Biotransformační cesty nalezené v lidské plazmě, moči a stolici.

2.1.4.2.4. Eliminace

Vylučování probíhá převážně stolicí ve formě metabolitů. Při jednorázovém podání se vyloučí 89 % dasatinibu do 10 dnů od perorálního podání.

2.1.4.2.5. Indikace

Dasatinib je protinádorový léčivý přípravek, který je indikován k léčbě dospělých pacientů ve věku od 18 let s těmito typy leukémie:

- a) Chronická myeloidní leukémie (CML) – pacienti pozitivní na filadelfský chromozom (Ph⁺)

- b) CML – u pacientů, kteří špatně snášejí léčbu imatinibem, nebo na ni vůbec nereagují
- c) ALL – akutní lymfoblastická leukémie – rychlé množení lymfocytů

2.1.4.2.6. Nežádoucí účinky

Při používání dasatinibu se velmi často vyskytují infekce bakteriálního, virového nebo plísňového typu. Velmi častý je také útlum krvetvorby – pokles počtu krevních destiček, bílých a červených krvinek, poruchy gastrointestinálního traktu – průjem, zvracení, bolesti břicha. Mezi další nežádoucí účinky pak patří kožní vyrážky, sepse, pneumonie, poruchy chutě k jídlu, deprese, bolesti hlavy. Zvýšenou pozornost je nutné mít u pacientů s poruchou srdečního rytmu - je vhodné hlídat jejich hladiny draslíku a hořčíku v krvi. Tyto nežádoucí účinky se dají částečně odstranit přerušáním nebo snížením předepsané dávky.

2.1.4.2.7. Klinické studie

V hlavních studiích bylo prokázáno, že 90 % pacientů trpících chronickou fází CML reagovalo na léčbu, kdy hladiny krevních destiček a bílých krvinek se navrátily na předem definované hlavní hodnoty. A také u čtvrtiny až třetiny pacientů trpících ALL byla zaznamenána pozitivní léčba.

2.1.5. Metody stanovení

- a) V této studii byl dasatinib stanovován pomocí LC-ESI-MS v plasmě krysy, za použití C18 kolony (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) s rychlostí průtoku 0.4 ml/min, teplotou na koloně 40 °C. Hodnoty na kapiláře byly nastaveny na 350 °C a 3500 V s tlakem na nebulizéru 25 psi. Byla použita gradientové eluce a mobilní fáze skládající se z metanolu a 0,1% kyseliny mravenčí. Ionizace elektrosprejem byla provedena v pozitivním módu s cílem objevení fragmentu 488,2 *m/z*. Kalibrační křivka byla v celém svém rozsahu (10 - 1000 ng/ml) lineární. Tato metoda byla později validována²⁵.
- b) V další studii bylo také použito spojení kapalinové chromatografie

s tandemovou hmotnostní spektrometrií v pozitivním módu ionizace pomocí elektrospreje. Teplota na koloně (3.0 mm × 150 mm) byla nastavena na 35 °C, na kapiláře 300 °C, rychlost průtoku na kapiláře byla nastavena tak, aby poskytovala maximální citlivost dasatinibu. Na fragmentačním spektru se objevil fragment dasatinibu 488,2 *m/z*, a jeho metabolitů M4 - 444 *m/z*, M5 - 504 *m/z*, M6 - 502 *m/z*, M20 - 504 *m/z*, M24 - 504 *m/z*²⁶.

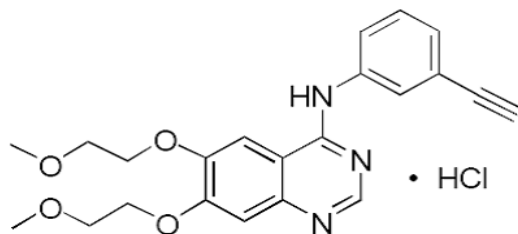
- c) V časopise *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* byl otištěn článek popisující stanovení dasatinibu pomocí metody LC-MS/MS, která byla následně zvalidována. Byla použita fenyl-hexylová kolona (50 mm × 2.0 mm, 3 μm) Mobilní fáze obsahovala octan amonný:vodu:metanol (10:37:53, v:v:v). Napětí na kapiláře bylo nastaveno na 5000 V při teplotě 400 °C (cit.²⁷).
- d) Další způsob stanovení dasatinibu je pomocí HPLC s fluorescenčním detektorem. Vzorky potřebné pro analýzu byly z králičí plasmy. Tato nově vvinutá metoda byla později validována. Jako interní standard byl použit montelukast. Dasatinib se nejprve extrahoval deproteinací. Chromatografické separace bylo využito na koloně C18 reverzní fáze, jako mobilní fáze byl použit 0,02 mol/l dihydrogenfosforečnan sodný s metanolem (10:90, v/v) s rychlostí průtoku 2ml/min. Analyty byly detegovány při excitaci 340 nm a emisi 370 nm (cit.²⁸).
- e) Další poměrně jednoduchou, ekonomicky méně náročnou metodou stanovení dasatinibu je kolorimetrie. Metoda je založena na vytvoření modrého komplexu dasatinibu s Fehlingovým činidlem a NaOH. Tento barevný komplex byl měřen při vlnové délce 745 nm (cit.²⁹).

2.2. Erlotinib

2.2.1. Vlastnosti

Erlotinib (aktivní substance farmaceutického přípravku Tarceva) chemickým názvem *N*-(3-ethynylfenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)4-chinazolinamin se používá

ve formě hydrochloridu. Strukturální vzorec erlotinibu je uveden na obrázku 3, sumární vzorec je $C_{22}H_{23}N_3O_4 \cdot HCl$ (cit. ^{30,31}).



Obr. 3: Strukturální vzorec erlotinibu.

V tabulkách 3 a 4 jsou zahrnuty základní fyzikálně chemické vlastnosti erlotinibu.

Tabulka 3: Některé fyzikálně-chemické vlastnosti erlotinibu³⁰

molekulová hmotnost (hydrochlorid)	429,9 g/mol
disociační konstanta pK při 25°C	5,42
bod tání	223-225 °C
skladování	-20 °C

Tabulka 4: Rozpusnost erlotinibu v jednotlivých rozpouštědlech³⁰

rozpustný	metanol, DMSO
velmi málo rozpustný	vodě
nerozpustný	acetonitril, aceton, hexan, ethylacetát

Rozpusnost erlotinibu hydrochloridu ve vodě je závislá na hodnotě pH. Při nižší hodnotě pH než 5 se rozpustnost zvyšuje vlivem protonace sekundárního aminu. Maximální rozpustnost v rozmezí pH 4,1-6,9 je přibližně 0,4 mg/ml.

2.2.2. Popis lékové formy a použití léčiva

Toto léčivo se aplikuje při léčbě pacientů s karcinomem plic (NSCLC), dále u zhoubných nádorů pankreatu a několika dalších typů rakoviny. Je reverzibilním inhibítozem tyrosin kinázy, který působí na receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR). Toto léčivo bylo schváleno v USA (FDA) k léčbě lokálně pokročilého nebo metastázujícího karcinomu plic, u kterého selhala samotná chemoterapie^{30,32}.

Erlotinib se podává v potahovaných tabletách. Tablety jsou bílé až nažloutlé. Doporučená denní dávka pro NSCLC je 150 mg užitá perorálně nejméně jednu hodinu před nebo dvě hodiny po jídle, pro pacienty s karcinomem pankreatu je 100 mg perorálně jednu hodinu před a dvě hodiny po jídle. Jádro tablet se skládá z: monohydrátu laktosy, mikrokrytalické celulosy, sodné sole karboxymetylškrobu typu A, natrium-lauryl-sulfátu a magnesium stearátu. Potah tablet se skládá z: hydroxypropylcelulosy, oxidu titaničitého, makrogolu, hypromelosy^{30,32}.

2.2.3. Farmakologické vlastnosti^{30,31,32,33}

2.2.3.1. Farmakodynamika

Erlotinib je inhibítozem tyrosin kinázy, receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Silně inhibuje intracelulární fosforylaci EGFR¹², který je exprimován na povrchu normálních a nádorových buněk.

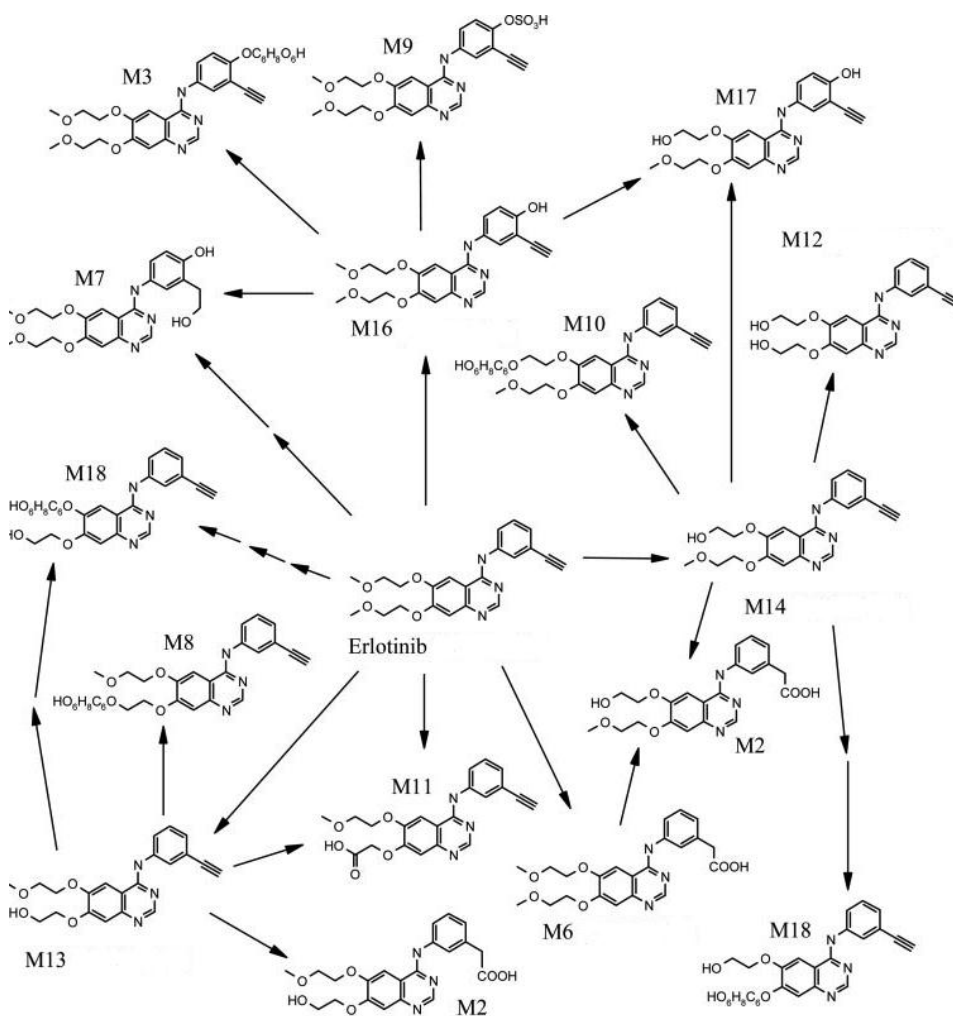
2.2.3.2. Farmakokinetika

Erlotinib se podává perorálně, maximální hladiny erlotinibu v plazmě se dosáhne po 4 hodinách po užití. Absolutní biologická dostupnost je 59 %. Distribuční objem erlotinibu je 232 litrů a je distribuován do lidských nádorových tkání.

2.2.3.2.3. Metabolismus^{30,35}

Erlotinib je metabolizován především v játrech enzymem CYP3A4. Sloučeniny, které indukují tento enzym, mohou způsobit snížení koncentrace erlotinibu (např. látky obsažené v extraktu z třezalky tečkované).

Obrázek 4 zobrazuje tři hlavní metabolické dráhy: 1.) *O*-demetylace postranního řetězce nebo obou řetězců následovaná oxidací na karboxylové kyseliny M11 (29,4 %) 2.) oxidace acetylenové části molekuly na karboxylovou kyselinu M6 (21,0 %) následovaná *O*-demethylací na M2 a *O*-demethylací na postranních řetězcích na metabolické produkty M13, M14 a 3.) hydroxylace aromatického kruhu za vzniku produktu M16 (9,6 %).



Obr. 4: Metabolické dráhy erlotinibu s možnými strukturami jeho metabolitů.

2.2.3.2.4. Eliminace

Erlotinib je převážně vylučován ve formě metabolitů stolicí, v ledvinách se eliminuje pouze 9 %. K dosažení stabilní plazmatické koncentrace potřebujeme 7-8 hodin.

2.2.3.2.5. Nežádoucí účinky

Nejčastějším nežádoucím účinkem je vyrážka, která se vyskytuje u většiny pacientů. Tato vyrážka se podobá akné a vyskytuje se nejčastěji na krku nebo obličeji. Mezi další nežádoucí účinky patří průjem, ztráta chuti k jídlu, únava, zřídka kdy se objevuje dušnost, ztráta vlasů a oční poruchy.

2.2.3.2.6. Indikace

- a)** Nenalobuněčný karcinom plic (NSCLC) – indikován v první linii léčby pacientů s lokálně pokročilým nebo metastázujícím nenalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) s aktivujícími mutacemi EGFR. NSCLC se obvykle léčí chirurgickým zákrokem. 80 – 90 % pacientů s touto nemocí bylo dlouhodobě vystaveno tabákovému kouří, u 10 – 15 % pacientů dochází k této nemoci příčinou genetických faktorů, znečištěním vzduchu, nebo kouřem z pasivního kouření^{12,34}.
- b)** Karcinom pankreatu – operace nádoru je nejlepším řešením pro pacienta, která mu poskytuje velkou šanci na vyléčení. V pokročilejších stádiích nemoci je možná pouze léčba ozářením nebo chemoterapií v kombinaci s gemcitabinem, nebo fluorouracilem^{12,34}.

2.2.3.2.7. Klinická studie

Ukázalo se, že kouření cigaret snižuje expozici Erlotinibu o 50 - 60%. Proto je stávajícím kuřákům doporučeno přestat kouřit, protože cigarety snižují množství tohoto léku v krvi a může být tedy méně účinný.

U pacientů používajících toto léčivo se může postupem času vytvořit rezistence. U Erlotinibu k tomu dochází okolo 8. – 12. měsíce od zahájení léčby.

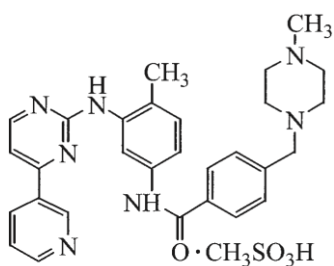
2.2.4. Metody stanovení

- a) V tomto článku byla použita C18 kolona (50 mm × 4.6 mm, 2.6 μm, Phenomenex) a mobilní fáze tvořená acetonitrilem a mravenčanem amonným (10 mmol/l) o pH 4,0. Teplota na koloně při separaci byla 20 °C. Byla použita gradientová eluce s rychlostí průtoku 0,3 ml/min. Byl použit pozitivní mód ionizace elektrosprejem, napětí na kapiláře bylo 3000 V s proměnlivou teplotou od 140 - 350 °C. Tato metoda byla později validována. Ve fragmentačním spektru měl pík 394,0 m/z odpovídající molekulárnímu iontu erlotinibu³⁶.
- b) V dalším článku se na chromatografickou separaci použila SB-C18 kolona (2,1 mm × 150 mm, 5 μm, Zorbax). Byla použita gradientová eluce, jako mobilní fáze se použila směs acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí. Ionizace byla v pozitivním módu pomocí elektrospreje. Sušící rychlost byla 6 l/minutu s 25 psi, teplota sušícího plynu byla 350 °C a napětí na kapiláře 3 000 V. Tato metoda byla validována³⁷.
- c) V tomto článku se na chromatografickou separaci použila C18 kolona (50 mm × 3 mm, 3 μm, Dionex Co, USA) s mobilní fází složenou z acetonitrilu a vody. Ionizace byla provedena v pozitivním módu pomocí elektrospreje, s napětím na kapiláře 4 500 V při 400 °C a 50 psi. Byly navrženy chemické struktury rodičovských a fragmentovaných iontů. 394,4 m/z → 278,1 m/z a 394,4 m/z → 336,2 m/z (cit.³⁸).
- d) Kapilární zónová elektroforéza byla použita pro stanovení erlotinibu a dasatinibu. Byla použita křemenná kapilára, 100 mmol/l fosfátový puff o pH 2,75. Napětí na kapiláře bylo zvoleno 25 kV, s časem vstřikování 5 s za tlaku 5 mbar a detekcí při 240 nm. Za těchto podmínek analýza trvala asi 8 minut (cit.³⁹).
- e) Erlotinib se dá také stanovovat pomocí spektrofotometrických metod. Tato metoda je založena na reakci erlotinibu s fenolovou červení, bromokresolovou

zelení a eriochromčerní T. Absorpční maxima byla zjištěna pomocí spektrofotometrie při 418 nm, 424 nm a 333 nm. I po více než 4 hodinách od smíchání byla intenzita barev stejná⁴⁰.

2.3. Imatinib

Imatinib (účinná látka farmaceutického přípravku Glivec) je velmi podobnou látkou jako dasatinib. Jedná se o tyrosin kinázu 1.generace. Je jedním z nejúčinnějších *in vitro* a *in vivo* inhibitory ABL-kináz, který patří do skupiny 2-fenylaminopyrimidinu. Toto kancerostatikum se používá na léčbu chronické myeloidní leukémie. Jeho molekulová hmotnost je 493,603 g/mol se strukturním vzorcem (obr. 5) (cit.⁴¹).



Obr 5: Strukturní vzorec imatinibu

Elektrochemické vlastnosti imatinibu jsou do značné míry prozkoumané. V článku *Voltammetric Behavior of Antileukemia Drug Glivec. Part I –Electrochemical Study of Glivec*⁴² se na elektrochemické měření použili tříelektrodové zapojení s pracovní GCE, pomocnou platinovou a referentní argentchloridovou elektrodou.

Elektrochemické chování imatinibu bylo zkoumáno metodami cyklické, diferenční pulzní a square-wave voltametrie. Bylo zjištěno, že oxidace závisí na pH. Ve velmi kyselém prostředí se neprojeví žádné oxidační píky imatinibu. Oxidace probíhá pouze v rozmezí pH 2,6 – 9,2 a zahrnuje přenos 2 elektronů a 2 protonů za vzniku elektroaktivního produktu, P_{glivec}, který se silně adsorbuje na povrchu GCE. Tento elektroaktivní produkt se na cyklických voltamogramech projevil reverzibilní dvojicí píků. Elektrochemická redukce je také závislá na pH a ireverzibilní proces zahrnuje přenos 2 elektronů a 2 protonů, při které už nevzniká elektroaktivní produkt.

Difúzní koeficient byl spočítán na $7,35 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ při pH 4,5 v octanovém pufru (0,1 mol/l). Mechanismus elektrochemických reakcí imatinibu nebyl navržen.

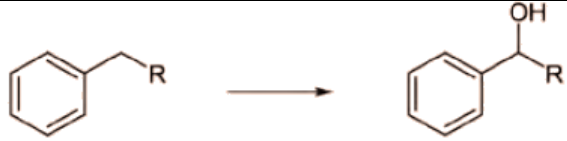


2.4. Napodobení oxidativního metabolismu EC

Toxicita celé řady léků, například paracetamolu, bývá spojena s jejich schopností tvořit reaktivní metabolické meziprodukty. Tyto meziprodukty vznikají oxidací látky na elektrofilní meziprodukt, který následně může reagovat s nukleofilními funkčními skupinami buněčných biomakromolekul, jako jsou proteiny a DNA. Některé reaktivní metabolické meziprodukty, například, některé epoxidy a acylglukuronidy, mají poměrně dlouhý poločas rozpadu a proto mohou být detekovány v biologických vzorcích. Ostatní reaktivní metabolity, například, chinony a chinonaldehydy, iminy, mají krátký poločas rozpadu v biologických vzorcích a často mohou být identifikovány pouze nepřímo, jako reakční produkty vytvořené s endogenními molekulami jako jsou konjugáty glutathionu⁴³.

Elektrochemie je používána jako nástroj pro napodobování biologických reakcí jako je oxidační metabolismus léčiv. Používá se k napodobení aromatické hydroxylace, dehydrogenace, *O*- a *N*-dealkylace, tabulka 5. Cyklická voltametrie se pak používá k získávání informací o reakčních rychlostech mezi elektrochemicky generovanými produkty⁴⁴.

Tabulka 5: Oxidační reakce napodobené pomocí EC⁴⁵

Typická katalytická oxidace CYP450		EC simulace
hydroxylace allylového a alifatických řetězců	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_3$	úspěšně napodobena při vysokých potenciálech
dealkylace aminu	$\text{>N}-\text{CH}_2-\text{R} \longrightarrow \text{>NH} + \text{R}-\text{CHO}$	snadno napodobitelná
oxidace na heteroatomu (N)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{NH}-\text{R} \\ \\ \text{R} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{R}-\text{C}^+-\text{N}-\text{R} \\ \\ \text{R} \end{array}$	dobře napodobitelná pouze v

		kyselé oblasti
hydroxylace benzylu		napodobitelná
hydroxylace na aromatickém jádře		velmi úspěšné napodobení, pro aromáty s donorem
dehydrogenace		snadné napodobení, zvláště pokud následuje chinon

On-line spojení EC s LC-MS se vyvinulo jako silný nástroj pro objasnění a studium metabolických reakcí léčiv. Reakce oxidačního metabolismu jsou simulovány elektrochemicky a metabolity jsou odděleny pomocí HPLC a identifikovány MS. Ačkoli standardní *in vivo* a *in vitro* přístupy, jako je například analýza jaterních mikrosomů, určitě nelze nahradit EC-LC-MS, čistě instrumentální technika však našla své uplatnění k získávání doplňujících informací^{44,45}.

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

Základní roztoky dasatinibu (volné báze) a erlotinibu hydrochloridu (oba Woburn, MA, USA) byly připraveny rozpouštěním naváženého množství těchto látek v metanolu, aby jejich výsledná koncentrace činila 10^{-3} mol/l.

Octanový pufr byl připraven ze zásobního roztoku 99,7 % kyseliny octové (p.a., Sigma-Aldrich, Německo) jejím naředěním na 0,1 mol/l a úpravou pH pomocí 0,2M-NaOH na 4,5.

Fosfátový pufr byl připraven ze zásobního roztoku 85 % kyseliny fosforečné (p.a., Penta, Chrudim) jejím zředěním na 0,1 mol/l a úpravou pH na 7,17 titrací 0,2-M NaOH.

Základní Britton-Robinsonův pufr byl připraven z kyseliny borité (p.a., Chemapol, Praha), 85 % kyseliny fosforečné (p.a., Penta, Chrudim) a 99 % kyseliny octové (p.a., Sigma-Aldrich, Německo) jejich zředěním destilovanou vodou tak, že výsledná koncentrace každé kyseliny byla 0,04 mol/l. Série pufrů v rozmezí pH 2 – 12 byla připravena smícháním 20 ml základního pufru, s potřebným množstvím 0,2 mol/l hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice) a vypočteným množstvím 1 mol/l chloristanu sodného (p.a., Fluka, Neu Ulm, Německo) na úpravu iontové síly na hodnotu $I = 0,15$. Pro měření kalibrační závislosti jsem tento pufr upravila titrací 0,2M-NaOH na pH 5,02 pro dasatinib a na pH 2,08 pro erlotinib.

Posledním používaným elektrolytem byla 0,01 molární kyselina chloristá (připravená ze 70 % HClO_4 , p.a., Lachema, Neratovice), jejíž hodnota pH byla 2.

Pro coulometrická měření byly připraveny roztoky pufrů z 80 % kyseliny mravenčí (p.a., Merck, Darmstadt, Německo), která byla zředěna 25 % vodným roztokem amoniaku (p.a., Lach-Ner, Neratovice), pro dasatinib na pH = 5,30 a pro erlotinib na pH = 2,30.

3.2. Přístroje

Voltametrická měření byla prováděna na přístroji Eco-Tribo-Polarograf (Polaro-Sensors, Praha) s tříelektrodovým zapojením řízený programem Polar v.4. V tomto programu byly také vyhodnocovány voltametrické křivky. K přípravě a kontrole pH všech pufrů sloužil pH-metr inoLab 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 41 (vše WTW, Německo). Získaná data byla zpracována v programu Microsoft Excel 2010 a QC.Expert (TriloByte Statistical Software).

Pro potenciostatickou coulometrii byl použit přístroj Autolab PGSTAT 128N (Metrohm, Utrecht, Holansko). Hmotnostně spektrometrická analýza byla provedena na přístroji LC/MSD TRAP 1100 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) s ionizací elektrosprejem. Vzorky byly do hmotnostního spektrometru dávkovány mikrostříkačkou Hamilton (250 μ l) pomocí lineární pumpy NE-1002X (New Era Pump Systems, Farmingdale, USA).

3.3. Pracovní postupy

3.3.4. Příprava základních roztoků

Základní roztok dasatinibu byl připraven rozpuštěním 1,95 mg dasatinibu volné báze ve 4 ml metanolu. Získaná koncentrace dasatinibu činila 10^{-3} mol/l. Rozpuštěním 1,78 mg erlotinibu hydrochloridu ve 4 ml metanolu jsem získala koncentraci 10^{-3} mol/l. Tyto roztoky je nutné skladovat při -20° C.

3.3.5. Složení základního elektrolytu

Před každým voltametrickým měřením byl připraven základní elektrolyt (ZE) do malé voltametrické nádoby o objemu 2 ml. Elektrolyt tvořila vždy směs 0,5 ml příslušného pufru, 0,4 ml destilované vody a 0,1 ml metanolu. Pouze v případě kyseliny chloristé bylo smícháno 0,9 ml kyseliny s 0,1 ml metanolu. Při měření roztoku dasatinibu nebo erlotinibu byl přidáván místo metanolu roztok vzorku. Získaná koncentrace léčiva v roztoku vzorku ve voltametrické nádobce činila 10^{-4} mol/l, viz. 3.3.1. V případě měření kalibračních závislostí jsem přidávala takové množství

roztoku vzorku a metanolu, aby byl zajištěn konstantní obsah metanolu (10 %, v/v) definovaný objem 1 ml v malé 2 ml voltametrické nádobce.

3.3.6. Voltametrická měření

Pro samotné měření jsem používala tříelektrodové zapojení, skládající se z: pracovní elektrody ze skelného uhlíku (GCE), argentchloridové referenční elektrody (Ag/AgCl/1M KCl) a platinové pomocné elektrody. Celkový objem měřeného roztoku byl 1 ml. Před začátkem samotného měření byl roztok vzorku probubláván dusíkem, sloužícím k odstranění rušivých vlivů kyslíku. Před každým měřením byl obnovován povrch pracovní elektrody na leštící tkanině (Buehler, USA) se suspenzí aluminy (< 50 nm, Sigma-Aldrich, Německo). V některých případech měření, hlavně u roztoku erlotinibu, toto obnovení povrchu nestačilo, protože se látka příliš silně adsorbovala na povrchu elektrody. Proto byl vyvinut systém čištění s parametry (tabulka 6), které pomohly obnovit povrch elektrody. Nejprve jsem vyčistila elektrodu na alumině a poté jsem dala elektrody do roztoku pufru, nacházející se ve voltametrické nádobce 20 ml, a provedla voltametrické měření.

Tabulka 6: Parametry pro čištění GCE.

počáteční potenciál	- 400 mV
konečný potenciál	1350 mV
rychlost skenu	100 mV/s
počet skenů	2
bublání	600 s
čištění	1 s
výška pulzu	50 mV
šířka pulzu	80 ms

3.3.6.1. Závislost na rychlosti skenu

Pro měření závislosti na rychlosti skenu jsem používala pufrы o rozdílných hodnotách pH, pro roztoky dasatinibu a erlotinibu. Jednalo se o pufr octanový (pH 4,5),

fosfátový (pH 7,2), Britton-Robinsonův (pH 10) a kyselinu chloristou (pH 2). V tabulce 7 jsou shrnuty základní parametry pro oba základní roztoky dasatinibu a erlotinibu, jejichž výsledná koncentrace ve voltametrické nádobce byla 10^{-4} mol/l. Používanou metodou byla cyklická voltametrie (CV). Rychlosti skenu byly: 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mV/s. Měření jsem začínala vždy od nejvyšší rychlosti po nejnižší, abych zabránila absorpci látky na povrchu elektrody. Měření probíhalo ve dvou cyklech, hodnocený byl vždy první anodický pík látky.

Tabulka 7: Parametry cyklické voltametrie pro měření závislosti na rychlosti skenu.

počáteční potenciál	- 400 mV
konečný potenciál	1350 mV
rychlost skenu	5, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mV/s
počet skenů	2
bublání	600 s
čištění	1 s
výška pulzu	40 mV
šířka pulzu	80 ms

3.3.6.2. *Závislost na pH*

Pro měření závislosti na pH jsem si nejprve připravila sérii 19 pufrů s hodnotami pH v rozsahu 2 – 12 a iontovou silou 0,15. Samotné voltametrické měření probíhalo dvěma metodami a to CV a diferenčně pulzní voltametrie (DPV). Pro obě látky jsem používala stejné parametry (tabulky 8, 9).

Tabulka 8: Parametry pro cyklickou voltametrii při měření závislosti na pH.

počáteční potenciál	0 mV
konečné potenciál	1 300 mV
rychlost scanu	100 mV/s
počet scanu	2
bublání	600 s
čištění	1 s

Tabulka 9: Parametry pro diferenčně pulzní voltametrii pro měření závislosti na pH.

počáteční potenciál	600 mV
konečný potenciál	1 300 mV
rychlost scanu	10 mV/s
počet scanu	1
doba čištění	1 s
klidová doba	5 s
výška pulzu	50 mV
šířka pulzu	80 ms

3.3.6.3. Kalibrační závislost

Kalibrační závislosti dasatinibu byly měřeny metodou DPV v roztoku B-R pufru pH 5,02. U erlotinibu byl použit B-R pufr o pH 2,08 a měření bylo provedeno metodami DC a DPV. Parametry měření uvádí tabulky 10, 11. Výsledky získané oběma metodami byly vzájemně porovnány.

Tabulka 10: Parametry diferenčně pulzní voltametrie při měření kalibračních závislosti pro dasatinib a erlotinib.

	dasatinib	erlotinib
počáteční potenciál	550 mV	700 mV
konečný potenciál	1 200 mV	1 300 mV
rychlost scanu	10 mV/s	10 mV/s
počet scanu	1	1
doba čištění	1 s	1 s
klidová doba	5 s	0
výška pulzu	50 mV	50 mV
šířka pulzu	80 ms	80 ms

Tabulka 11: Parametry lineární voltametrie proměření kalibračních závislostí erlotinibu.

počáteční potenciál	700 mV
konečný potenciál	1 300 mV
rychlost scanu	10 mV/s
počet scanu	1

3.3.7. Coulometrická měření

Pro potenciostatickou coulometrii (CPC) bylo použito tříelektrodové zapojení, skládající se z pracovní velkoplošné grafitové elektrody, argentchloridové referenční elektrody (Ag/AgCl/1M KCl) a platinové pomocné elektrody. Byla použita dvoukomorová nádobka s anodovým a katodovým prostorem odděleným porézní fritou. Celkový objem měřeného roztoku v anodovém prostoru byl 1 ml. Katodový prostor obsahoval pomocnou a referenční elektrodu v roztoku příslušného pufru. V průběhu celého měření byl roztok v anodovém prostoru probubláván dusíkem, který zajišťoval míchání roztoku a současně inertní atmosféru.

Elektrolyzovaný roztok léčiva obsahoval vždy směs mravenčanového pufru o pH 5,3 (pro dasatinib) resp. pH 2,3 (pro erlotinib) a methanolu v objemovém poměru 1:1. Koncentrace příslušného léčiva v roztoku byla 10^{-4} mol/l. Roztok

dasatinibu byl elektrolyzován při potenciálu 900 mV, roztok erlotinibu při 1300 mV. Doba elektrolyzy byla v obou případech 120 min. S frekvencí 1 Hz byly registrovány hodnoty proudu v závislosti na čase. Jako slepý pokus byla za stejných podmínek elektrolyzována směs pufru s methanolem bez léčiva. Elektrolyzované vzorky léčiv byly dále analyzovány hmotnostní spektrometrií.

Náboj potřebný pro oxidaci léčiva byl zjištěn integrací plochy pod $I - t$ křivkou zaznamenanou s roztokem vzorku léčiva po odečtení plochy pod $I - t$ křivkou základního elektrolytu. Ze získaného náboje byl pomocí Faradayova zákona vypočten celkový počet vyměněných elektronů.

3.3.8. MS analýza

Hmotnostní spektrometrií byly analyzovány jednak standardy obou léčiv, jednak roztoky léčiv elektrolyzované za konstantního potenciálu (kap. 3.3.4). . Vzorky byly do hmotnostního spektrometru dávkovány mikrostříkačkou Hamilton (250 μ l) pomocí lineární pumpy rychlostí 8 μ l/min. Oba analyty byly ionizovány v pozitivním módu elektrospreje. Napětí na kapiláře bylo 4500 V, tlak sušícího plynu (dusíku) byl 20 psi při rychlosti průtoku 10 l/min a sušící teplotě 300 °C. Jako kolizní plyn v iontové pasti bylo použito hélium. Celkový iontový proud se skenoval v rozsahu m/z 50 – 1000. Vybrané ionty byly v iontové pasti izolovány a fragmentovány. Příslušná MS^2 spektra byla zaznamenána. K vyhodnocení spekter byl použit program DataAnalysis 3.3 (Bruker Daltonik, Brémy, Německo).

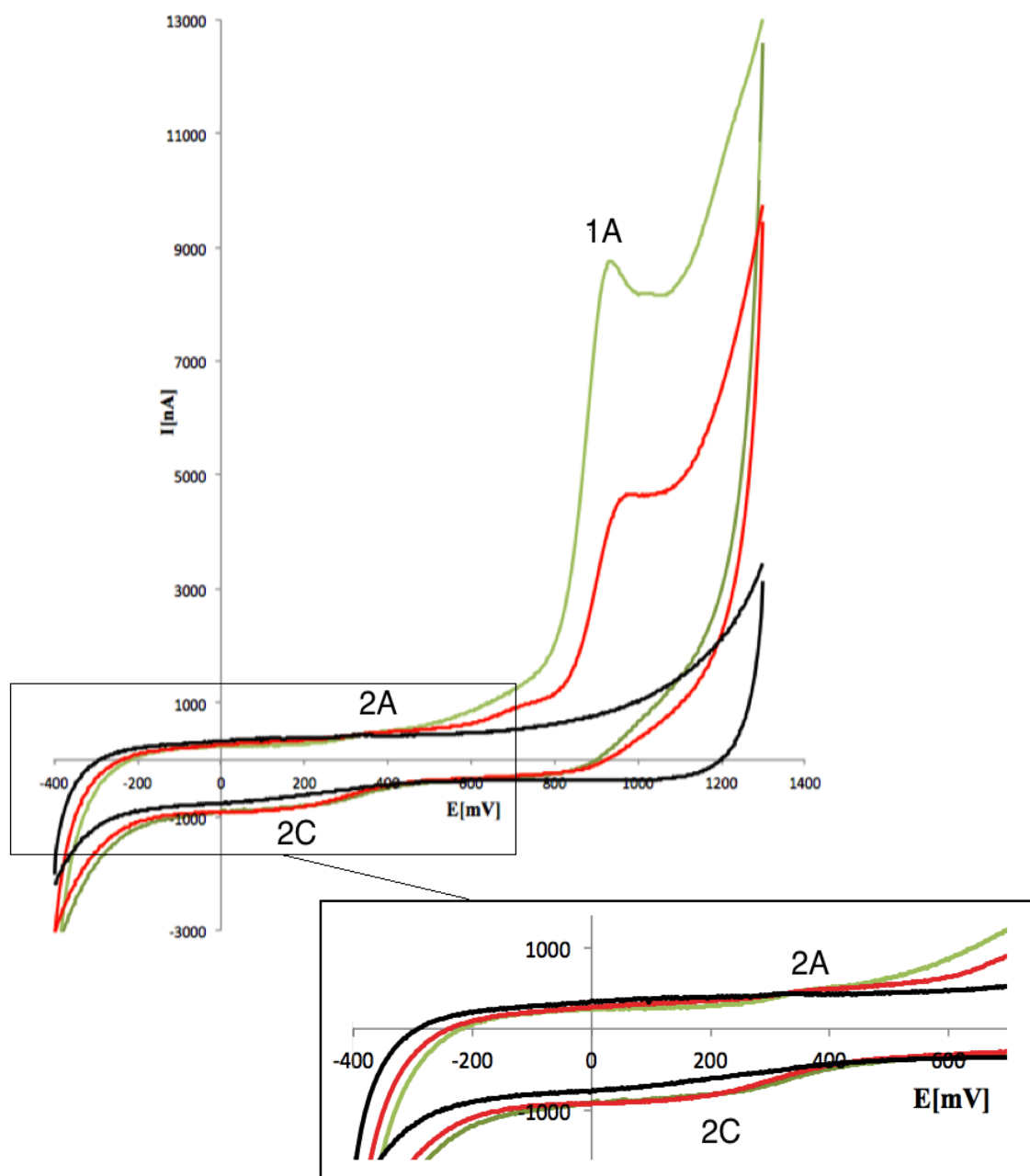
4. Výsledky a diskuze

4.1. Měření dasatinibu a erlotinibu pomocí cyklické voltametrie

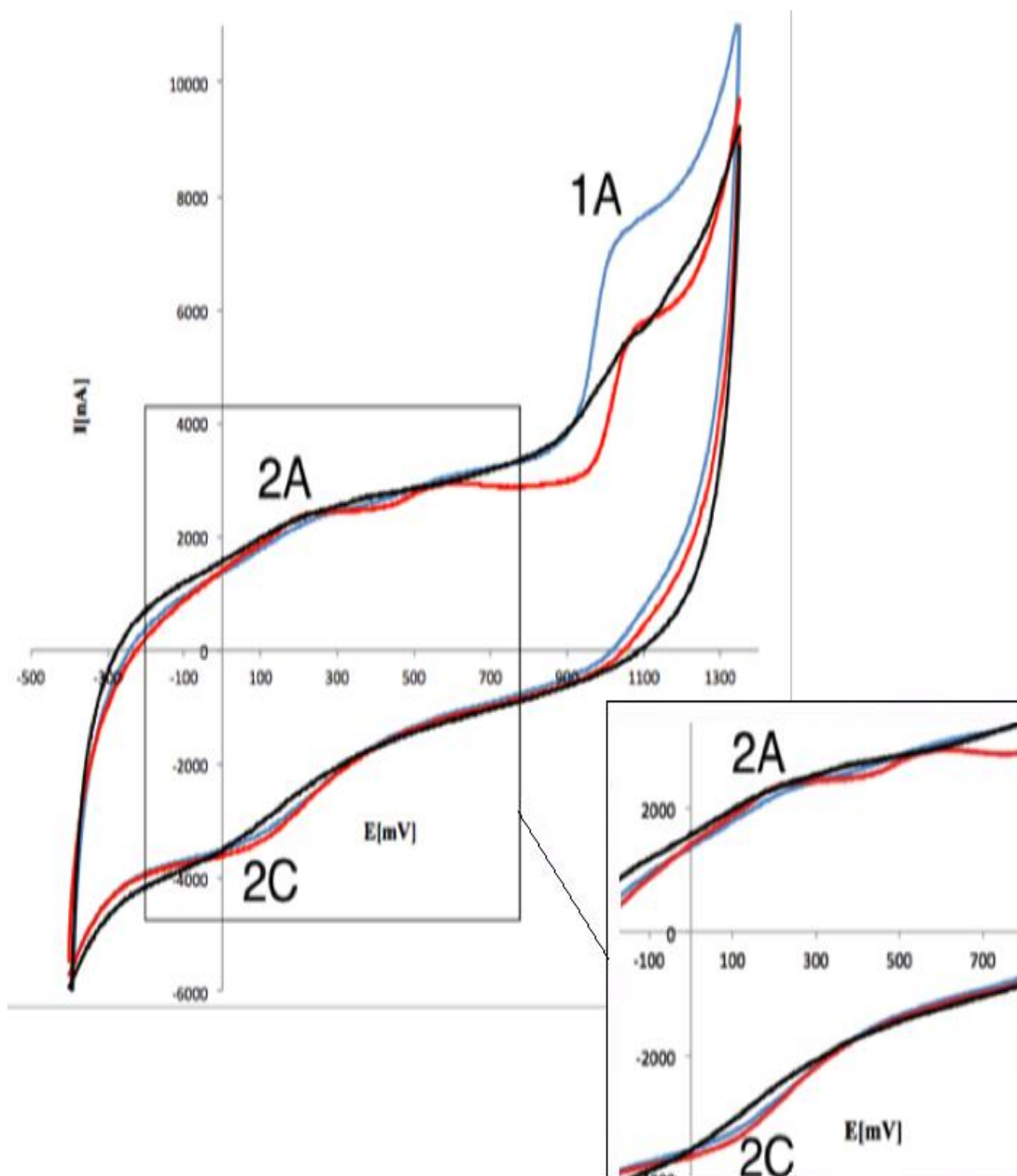
Oxidace dasatinibu a erlotinibu na GCE byla nejprve proměřována v roztoku octanového pufru s pH 4,5. Na obrázcích 6, 7 vidíme jeden anodický pík dsatinibu ($E_{p1A} = + 923 \text{ mV}$) a jeden pík erlotinibu ($E_{p1A} = + 1030 \text{ V}$) zaznamenané v roztocích léčiv o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$, při rychlosti scanu 100 mV/s . V obráceném směru polarizace byl u obou látek zřetelný poměrně menší redukční pík s potenciálem $E_{p2C} = + 135 \text{ mV}$ pro dasatinib, $E_{p2C} = + 105 \text{ mV}$ pro erlotinib. Tento katodický pík souvisí s oxidací dasatinibu, popřípadě erlotinibu, neboť je pozorovatelný po přepnutí směru polarizace elektrody v hodnotě potenciálu píku léčiva nebo vyšší. Tento pík byl viditelný až při rychlosti scanu 100 mV/s a více.

Ve druhém cyklu se na voltamogramech obou látek objevil nový anodický pík 2A s potenciálem nižším, než má oxidační pík 1A původního léčiva ($E_{p,2A} = 360 \text{ mV}$ pro dasatinib a 197 mV pro erlotinib). Současně byl sledován značný pokles proudu prvního anodického píku (o $62,5 \%$ u dasatinibu, o $32,7 \%$ u erlotinibu). Pokles proudu zřejmě souvisí se zmenšenou plochou elektrodového povrchu dostupnou pro oxidaci původní látky v důsledku adsorpce produktů elektrochemické oxidace.

Ve stejném experimentu opakovaném s vyšší rychlostí skenu (100 mV/s) aplikovanou na vyčištěnou elektrodu byl zaznamenán rozdíl hodnot $E_{p2A} - E_{p2C} = 106 \text{ mV}$ pro erlotinib a 134 mV pro dasatinib, což naznačuje kvazireverzibilní elektrochemickou reakci adsorbovaných oxidačních produktů kancerostatik nazvaných P_{das} , P_{erl} . Proud katodického píku 2C se zvyšoval s rostoucí rychlostí skenu. Hodnota rozdílu se od nižší rychlosti po vyšší zvyšovala, což vede k dalšímu potvrzení kvazireverzibilní reakce ($106 \text{ mV/s} \rightarrow 137 \text{ mV/s}$ – pro erlotinib).



Obr. 6: Cyklický voltamogram dasatinibu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) v octanovém pufru pH 4,5; polarizační rychlost 100 mV/s, 2 cykly, ZE (černá) 1 cyklus.



Obr. 7: Cyklický voltamogram erlotinibu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) v octanovém pufru pH 4,5; polarizační rychlost 100 mV/s, 2 cykly, ZE (černá) 1 cyklus.

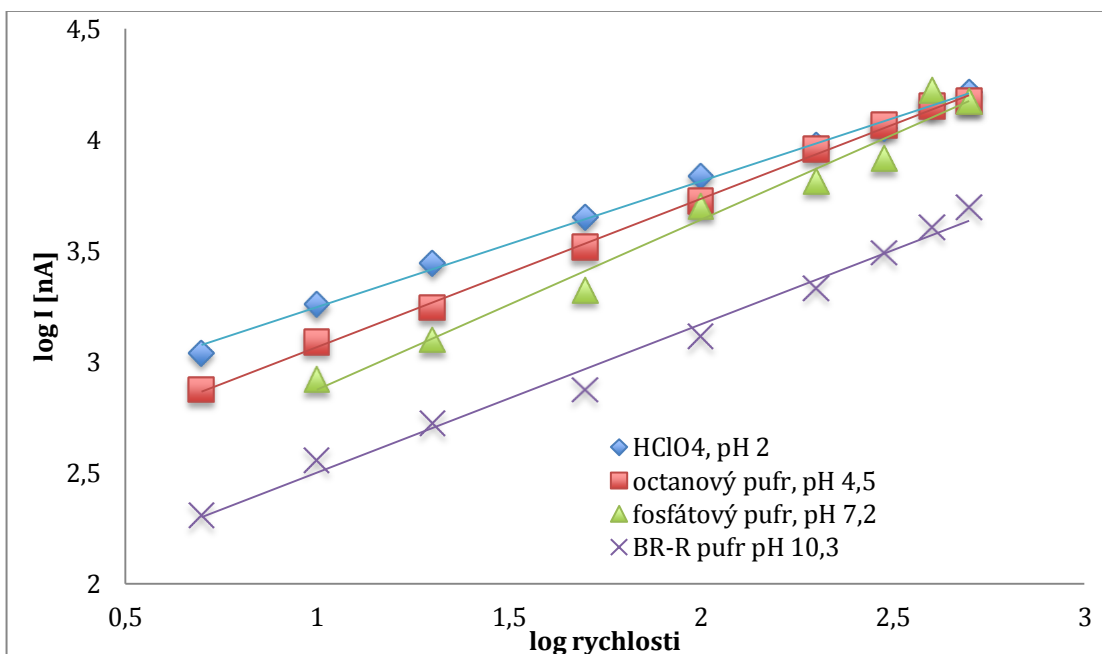
Při zkoumání závislosti proudu píku 1A na odmocnině z rychlosti skenu v roztoku o stejné koncentraci dasatinibu resp. erlotinibu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l), se objevily menší odchylky od linearity, což může být způsobeno adsorpcí P_{das} resp. P_{erl} na povrchu elektrody. Závislosti logaritmu proudu píku na logaritmu rychlosti skenu (obr 8, 9) jsou lineární. Z hodnot směrnic těchto závislostí, uvedených v tabulce 12,13, je patré,

že reakce jsou řízeny difúzí. S narůstající hodnotou pH dochází k většímu vlivu adsorpce na povrchu elektrody. V neutrálním pH (fosfátový pufr) je vliv adsorpce největší, v alkalickém (B-R pufr) je opět menší. V zásaditém prostředí jsou CV píky obou látek ploché a špatně odečitatelné.

Se zvyšujícím se počtem opakovaných skenů se proudy píků 1A dasatinibu i erlotinibu postupně snižují. Toto je také jedna z charakteristik oxidace kancerostatik na povrchu elektrody, podobně, jak to bylo popsáno u léčiva imatinibu [2.3.]. Důvodem poklesu proudu je pravděpodobně zmenšení dostupného povrchu elektrody. Během elektrolýzy se na povrchu elektrody tvoří vrstvička oxidativního produktu, která pokrývá určitou plochu elektrody, vytváří na ní tenký povlak, který brání volným molekulám kancerostatika difundujícím z roztoku vzorku v jejich oxidaci.

Tabulka 12: Parametry regresních přímek závislostí $\log I - \log v$ pro dasatinib.

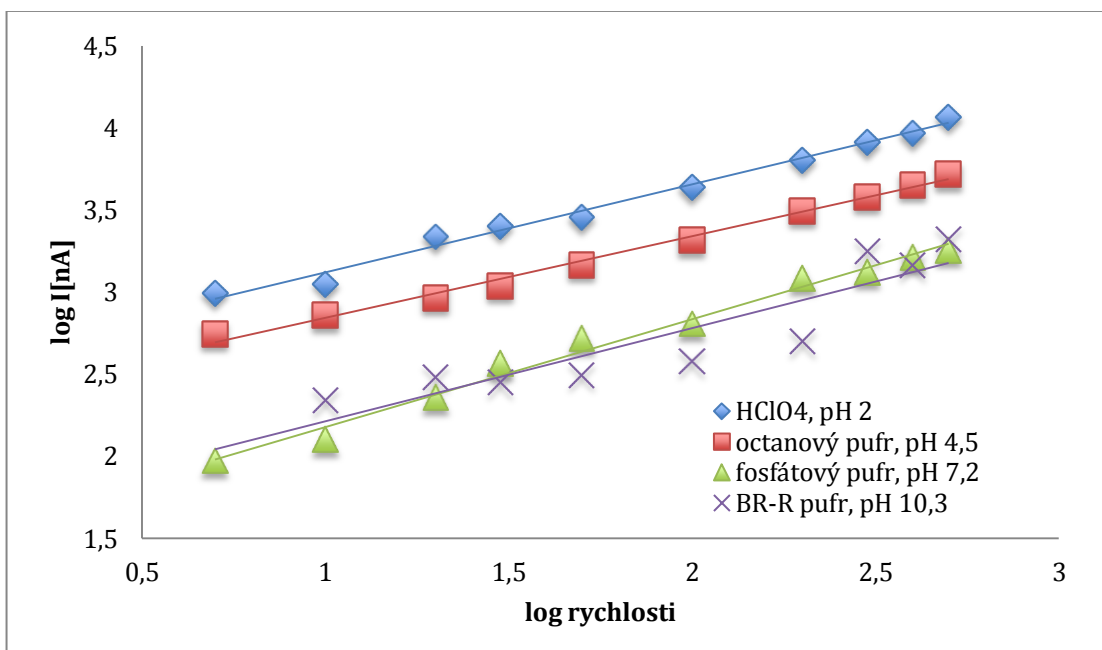
prostředí	úsek [μA]	směrnice [$\mu A \cdot l/mol$]	R²
<i>HClO₄</i>	2,68	0,56	0,99703
<i>octanový pufr</i>	2,40	0,66	0,99843
<i>fosfátový pufr</i>	2,11	0,76	0,97577
<i>B-R pufr</i>	1,83	0,67	0,98843



Obr. 8: Závislost logaritmu proudu píku 1A dasatinibu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) na logaritmu rychlosti měřená v různých elektrolytech skenu.

Tabulka 13: Parametry regresních přímek závislostí $\log I - \log v$ pro erlotinib.

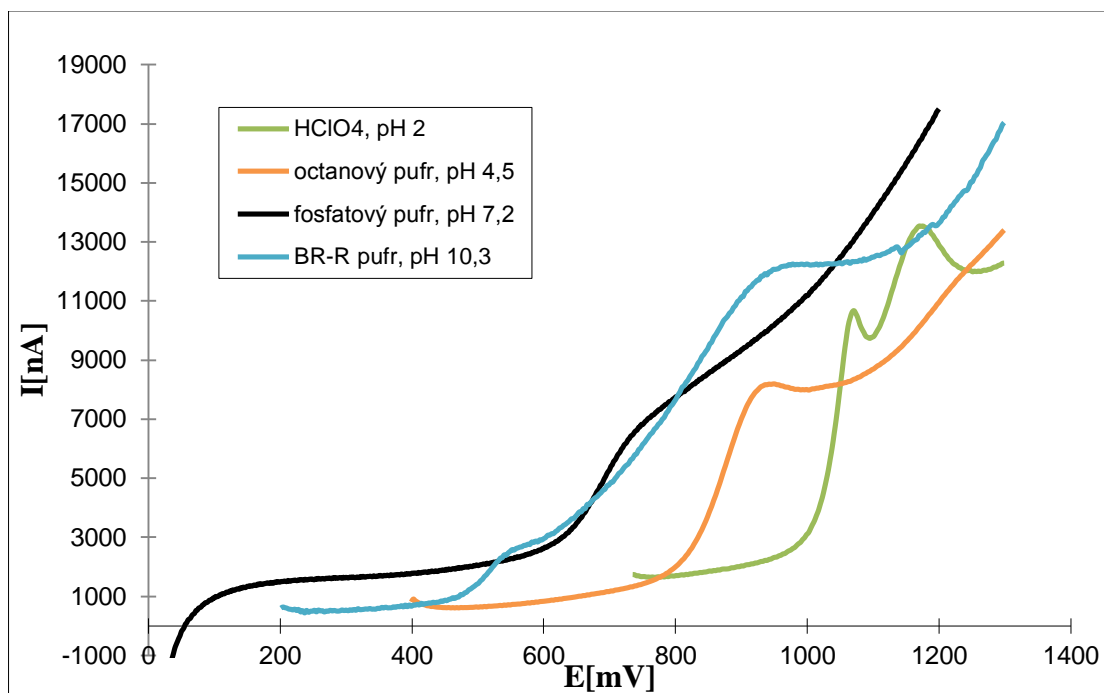
prostředí	úsek [μA]	směrnice [$\mu A \cdot l/mol$]	R^2
<i>HClO₄</i>	2,59	0,53	0,98887
<i>octanový pufr</i>	2,35	0,50	0,993
<i>fosfátový pufr</i>	1,52	0,66	0,98741
<i>B-R pufr</i>	1,65	0,57	0,82541



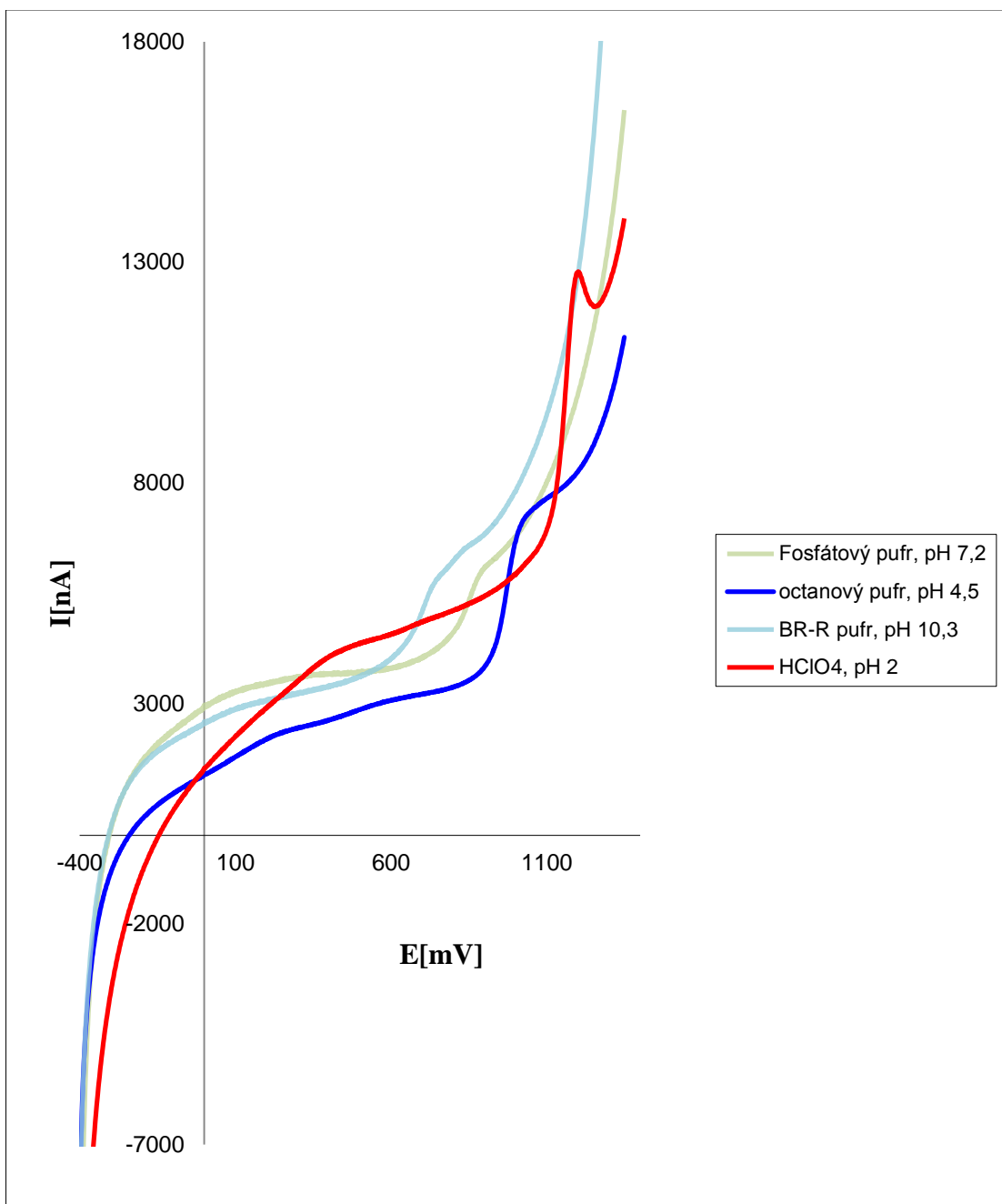
Obr. 9: Závislost logaritmu proudu na logaritmu rychlosti skenu pro erlotinib.

4.2. Závislost na pH dasatinibu a erlotinibu

Elektrochemická oxidace dasatinibu a erlotinibu byla studována v rozmezí pH 2 – 12 Britton-Robinsonových pufrů. Diferenčně pulzní voltamogramy byly zaznamenávány v roztoku vzorku o koncentraci kancerostatika $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. V rozmezí hodnot pH 1,81 – 2,5 byly vidět dva anodické píky u dasatinibu, druhý pík dasatinibu se v zásaditější oblasti ztrácel, až zmizel úplně. V rozmezí pH 3 - 6,8 byly vidět dobře definované píky 1A, pro obě léčiva. S bazičtější oblastí pH se píky více rozlišovaly a jejich maxima byla obtížně odečitatelná pro obě kancerostatika (obr. 10, 11).



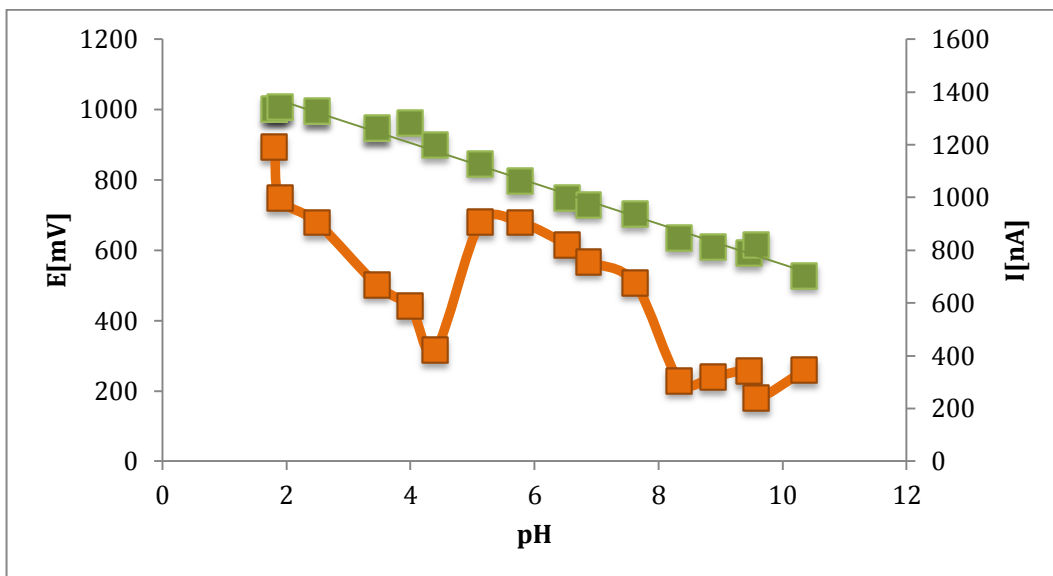
Obr. 10: Anodické větve cyklických voltamogramů dasatinibu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) v různých pufrch při rychlosti skenu 100 mV/s.



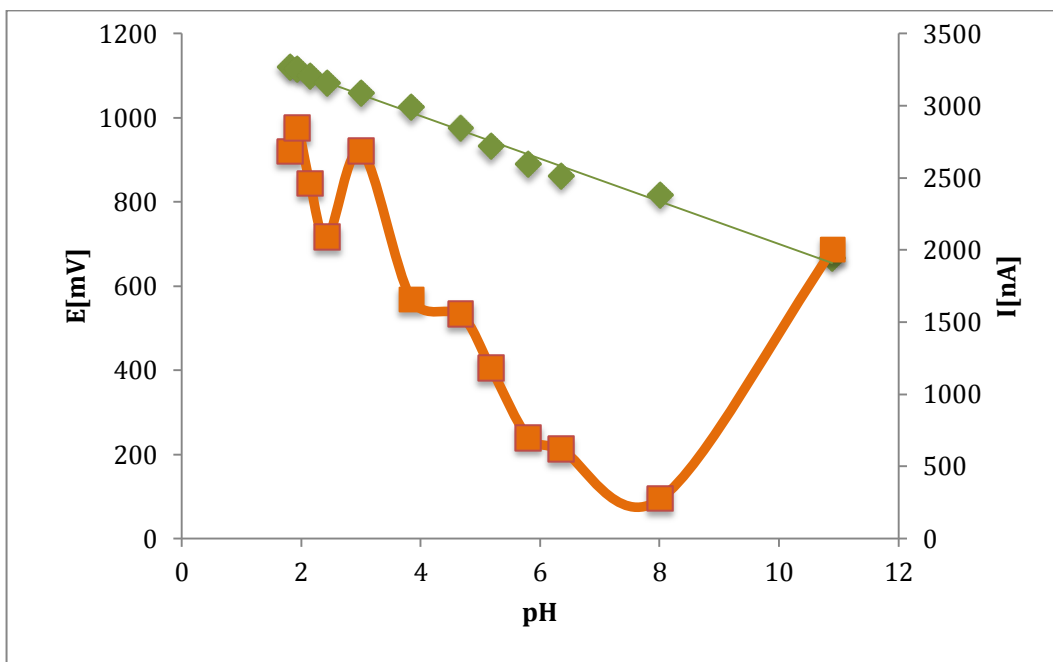
Obr. 11: Anodické větve cyklických voltamogramů erlotinibu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) v různých pufrch při rychlosti skenu 100 mV/s.

Závislost potenciálu DPV píku dasatinibu na pH je lineární se směrnicí - 57 mV na jednotku pH (obr. 12). Tato hodnota vypovídá o výměně stejného počtu protonů jako elektronů při oxidaci dasatinibu. U erlotinibu je hodnota směrnice lineární závislosti

proudu píku - 51 mV na jednotku pH (obr. 13). Tato hodnota určuje, že při oxidaci erlotinibu se vyměňuje stejný počet elektronů a protonů.



Obr. 12: Závislost potenciálu (■) a proudu (■) píku dasatinibu na pH.



Obr. 13: Závislost potenciálu (■) a proudu (■) píku erlotinibu na pH.

Pro každé kancerostatikum jsem vybrala vhodné pH, při kterém poskytovaly látky nejlépe tvarované píky s nejvyššími proudy: pro dasatinib pH 5,3 a pro erlotinib pH 2,1. Toto prostředí jsem pak použila pro další kalibrační měření.

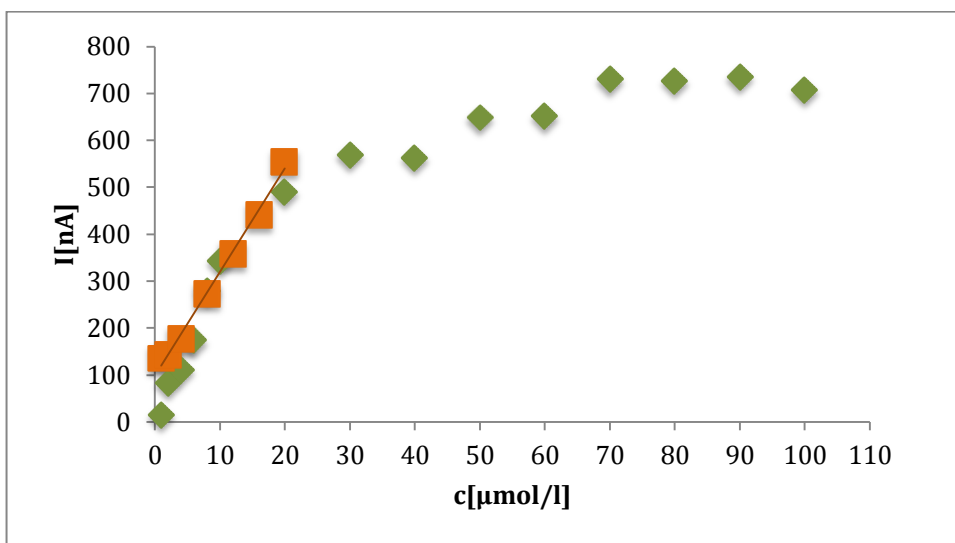
4.3. Měření kalibračních závislostí

Kalibrační závislost pro dasatinib jsem měřila metodou diferenčně pulzní voltametrie (DPV) v rozsahu $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Tato závislost je lineární pouze v rozsahu $1 \cdot 10^{-6}$ - $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l (obr. 14), což můžeme vysvětlit adsorpcí dasatinibu na pracovní elektrodě, která se projevuje při vyšší koncentraci molekul dasatinibu v roztoku vzorku. Vypočtené meze detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) podle rovnic 1, 2 jsou uvedeny v tabulce 14. Ze statistického softwaru QC.Expert jsou LOD a LOQ vypočtené metodou podle IUPACu: LOD $2,1 \cdot 10^{-6}$ mol/l a LOQ $3,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

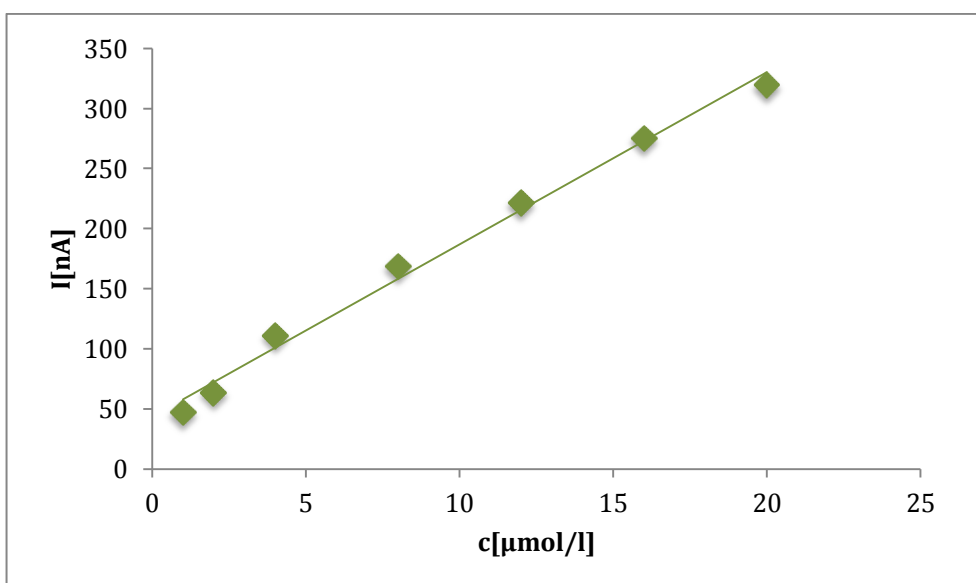
Erlotinib jsem měřila metodou diferenčně pulzní a lineární voltametrií. Při měření DC byla závislost lineární v rozsahu $1 \cdot 10^{-6}$ - $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l a poté se mírně zahýbala od $2 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l (obr.16). Tento ohyb můžeme opět připisovat silné adsorpci erlotinibu a jeho oxidativního produktu na pracovní elektrodě. Při měření DPV byla kalibrační závislost v rozsahu $1 \cdot 10^{-6}$ - $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l také mírně zahnutá v důsledku adsorpce analytu, nicméně model kalibrační přímky statisticky vyhovoval (obr.15). Při porovnání těchto dvou metod jsem zjistila, že lepších výsledků je dosaženo pomocí lineární voltametrie (DC). Podle rovnic 1, 2 jsem vypočítala LOD a LOQ pro jednotlivé metody (tabulka 14). Ve statistickém softwaru QC.Expert jsou hodnoty LOD a LOQ podle IUPACu: LOD_{DPV} $2,9 \cdot 10^{-6}$ mol/l, LOQ_{DPV} $4,2 \cdot 10^{-6}$ mol/l, LOD_{DC} $2,6 \cdot 10^{-6}$ mol/l, LOQ_{DC} $3,7 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot \text{směrodatná odchylka}}{\text{směrnice}} \quad (1)$$

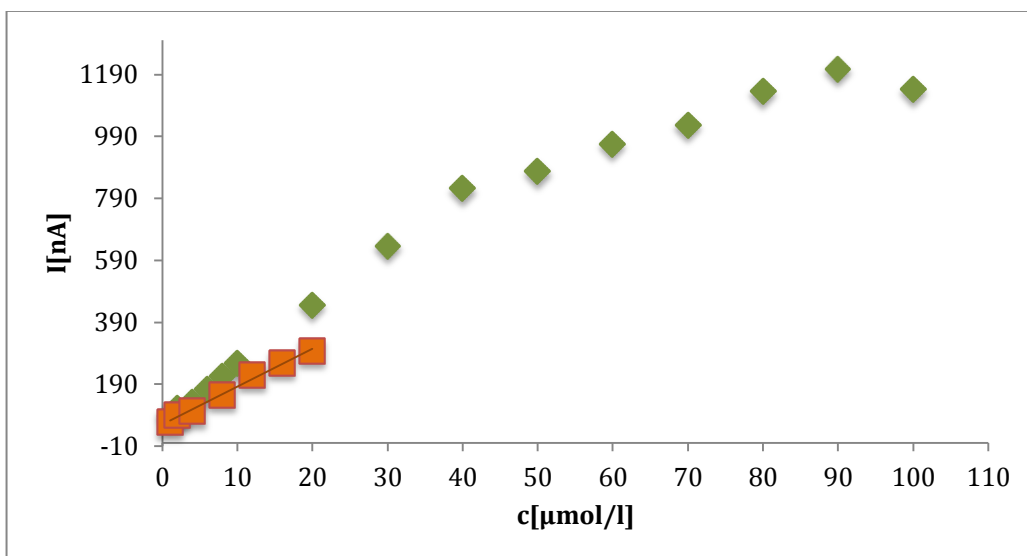
$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \text{směrodatná odchylka}}{\text{směrnice}} \quad (2)$$



Obr. 14: Kalibrační závislosti dasatinibu, DPV, (■) 0,1 - 20 $\mu\text{mol/l}$, (◆) 0,1 - 110 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. 15: Kalibrační závislosti erlotinibu, DPV voltametrie, (◆) 10 - 20 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. 16: Kalibrační závislosti erlotinibu, DC voltametrie, (■) 0,1 - 20 $\mu\text{mol/l}$, (◆) 0,1 - 110 $\mu\text{mol/l}$.

Tabulka 14: Parametry regresních kalibračních přímek, meze detekce a stanovitelnosti pro dasatinib a erlotinib.

sloučenina	c [mol/l]	úsek [μA]	směrnice [$\mu\text{A} \cdot \text{l/mol}$]	R^2	LOD [mol/l]	LOQ [mol/l]	metoda
<i>dasatinib</i> (volná báze)	10^{-6} - $2 \cdot 10^{-5}$	97,8	2E+07	0,9958	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$3,6 \cdot 10^{-6}$	DPV
<i>erlotinib</i> (hydrochlorid)	10^{-6} - $2 \cdot 10^{-5}$	43,5	1E+07	0,9914	$2,0 \cdot 10^{-6}$	$6,7 \cdot 10^{-6}$	DPV
<i>erlotinib</i> (hydrochlorid)	10^{-6} - $2 \cdot 10^{-5}$	59,6	1E+07	0,9933	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$5,1 \cdot 10^{-6}$	DC

4.4. Potenciostatická coulometrie

Coulometrická měření byla prováděna za účelem určit počet elektronů vyměňovaných při elektrochemické oxidaci zkoumaných léčiv. Do voltametrické nádoby byl napipetován 1 ml roztoku vzorku obsahující $1 \cdot 10^{-7}$ mol léčiva, a při konstantním potenciálu pracovní elektrody ($E_c = 900$ mV pro dasatinib a 1300 mV pro erlotinib) byl každou sekundu zaznamenáván proud po dobu dvou hodin. Za stejných podmínek byl elektrolyzován i roztok samotného elektrolytu. Po ukončení měření byla provedena integrace ploch pod $I - t$ křivkami a náboj potřebný

k elektrolýze léčiva byl získán odečtením hodnot plochy vzorku a základního elektrolytu, (tabulka 15). Z Faradayova zákona (rovnice 3), byl určen počet vyměněných elektronů z pro obě látky:

$$z = \frac{Q}{n \cdot F} \quad (3)$$

kde Q je náboj spotřebovaný na oxidaci léčiva, n je látkové množství léčiva a F je Faradayův náboj (96 485,34 C/mol). V tabulce 15 jsou uvedeny náboje zjištěné z jednotlivých měření a počty elektronů určené pro obě látky.

Tabulka 15: Výsledky coulometrických měření a počty vyměněných elektronů.

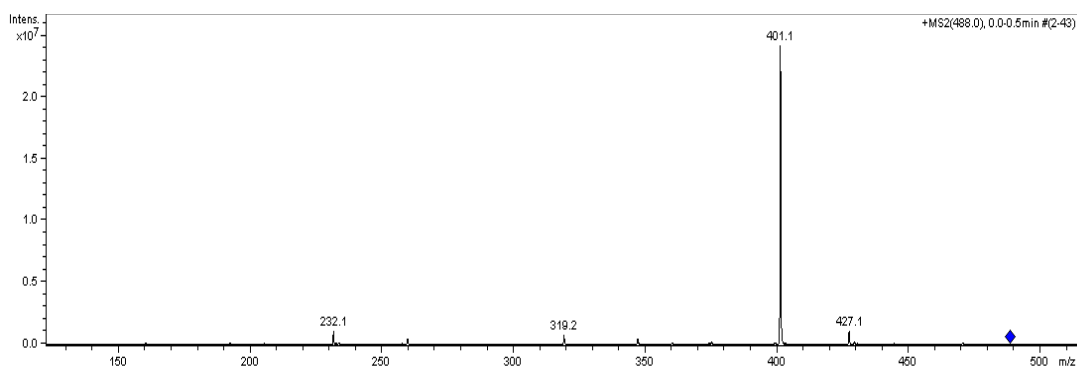
sloučenina	náboj při elektrolýze vzorku (C)	náboj při elektrolýze elektrolytu (C)	počet vyměněných elektronů
<i>dasatinib</i> (volná báze)	0,0517	0,0142	3,9
<i>erlotinib</i> (hydrochlorid)	0,0760	0,0363	4,1

Výsledky ukazují, že elektrochemická oxidace obou léčiv je čtyřelektronová.

4.5. Měření MS

4.5.1. Dasatinib

Nejprve bylo změřeno hmotnostní spektrum roztoku dasatinibu v prostředí 50% metanolu a mravenčanového pufru o pH 5,3. Molekulární ion $[M+H]^+$ s m/z 488 byl izolován a fragmentován. Fragmentační spektrum (obr.17) ukazuje píky hlavních fragmentových iontů s m/z 427, 401, 319, 232, v tabulce 16 jsou zaznamenány neutrální ztráty molekulárního iontu dasatinibu m/z 488.

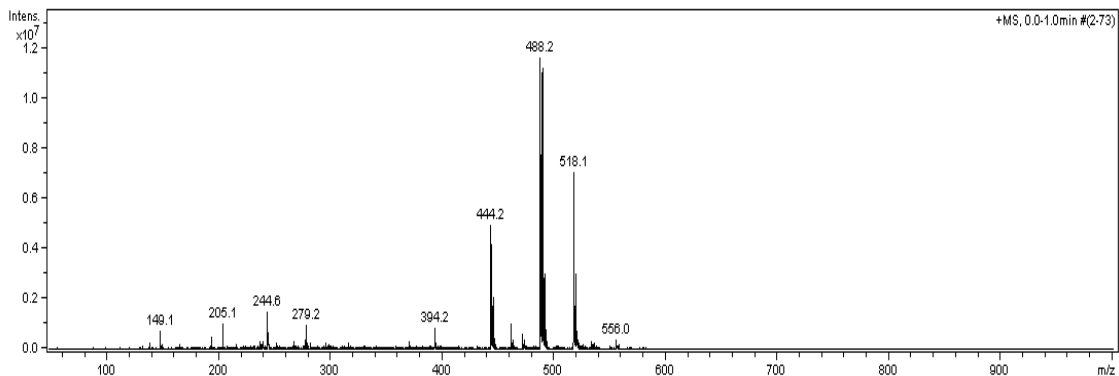


Obr. 17: Fragmentační spektrum molekulárního iontu m/z 488 dasatinibu.

Tabulka 16: Neutrální ztráty molekulárního iontu dasatinibu m/z 488.

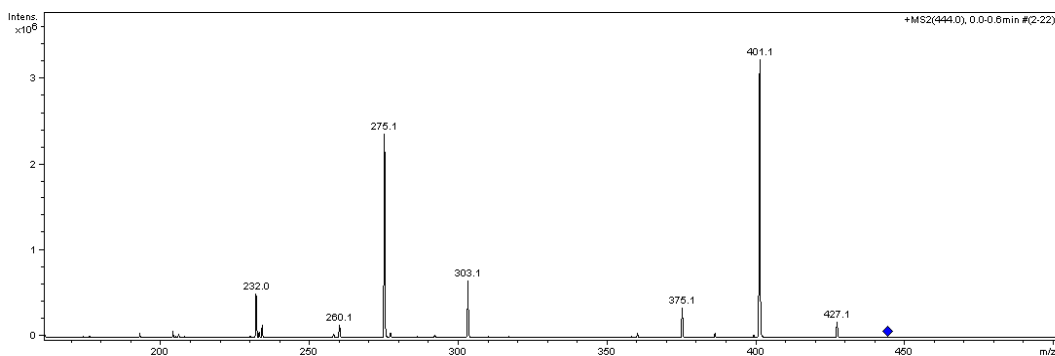
m/z	neutrální ztráta	
$[M+H]^+$	relativní hmotnost	možný vzorec
488		
470	18	H ₂ O
444	44	CH ₂ =CH-OH
427	61	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -OH
401	87	CH ₂ =CH-NH-CH ₂ -CH ₂ -OH
375	113	(CH ₂ =CH) ₂ -NH-CH ₂ -CH ₂ -OH
319	169	C ₆ H ₃ Cl(CH ₃)-NH-COH
260	228	CH ₂ =CH-NH-CH ₂ -CH ₂ -OH, C ₆ H ₃ Cl(CH ₃)-NH ₂
232	256	CH ₂ =CH-NH-CH ₂ -CH ₂ -OH, C ₆ H ₃ Cl(CH ₃)-NH-COH

Poté bylo v přímém nástřiku vzorku po ustálení signálu změřeno hmotnostní spektrum roztoku dasatinibu elektrolyzovaného v coulometrickém experimentu. Vedle píku s m/z 488 (obr.18) protonizované molekuly dasatinibu $[M+H]^+$ se ve spektru objevil další intenzivní pík s m/z 444 který náležel oxidačnímu produktu PD1. Podle rešerše by produkt PD1 mohl odpovídat metabolickému produktu M4 (obr.2 v teoretické části), který vzniká odštěpením hydroxyethylové skupiny z piperazinového kruhu.



Obr. 18: Hmotnostní spektrum elektrolyzovaného roztoku dasatinibu.

Fragmentační spektrum izolovaného iontu m/z 444 je znázorněno na obrázku 18. V tabulce 17 jsou uvedeny neutrální ztráty a jejich možné struktury, které odpovídají příslušným iontům nalezeným ve fragmentačním spektru.



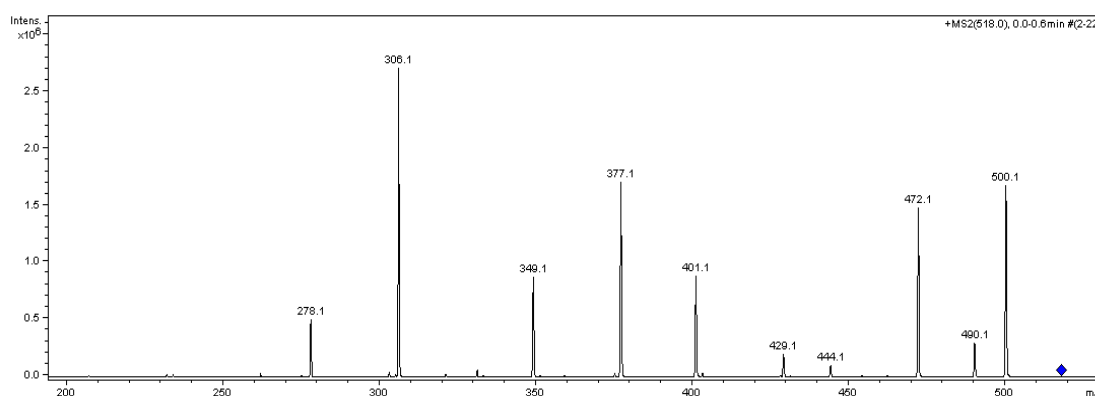
Obr. 18: Fragmentační spektrum izolovaného iontu s m/z 444.

Tabulka 17: Neutrální ztráty oxidačního produktu PD1 s m/z 444.

m/z	neutrální ztráty	
	relativní hmotnost	možný vzorec
[M+H]⁺		
444		
427	17	NH ₃
401	43	CH ₂ =CH-NH ₂
375	69	(CH ₂ =CH) ₂ -NH
303	141	C ₆ H ₃ Cl(CH ₃)-NH ₂

275	169	$C_6H_3Cl(CH_3)-NH-COH$
260	184	$CH_2=CH-NH_2,$ $C_6H_3Cl(CH_3)-NH_2$
232	212	$CH_2=CH-NH_2,$ $C_6H_3Cl(CH_3)-NH-COH$

Další intenzivní pík s m/z 518 ve spektru elektrolyzovaného roztoku dasatinibu patřil oxidačnímu produktu PD2. Molekulární ion se stejnou hodnotou m/z poskytují produkty oxidativního metabolismu dasatinibu M7 a M23 (obr. 2 v teoretické části), které vznikají hydroxylací a oxidací na karboxylovou kyselinu. Podle literatury (cit.24) však tyto metabolity poskytují jiná fragmentační spektra než produkt elektrochemické oxidace PD2 nalezený v této práci. Na základě analýzy fragmentačního spektra produktu PD2 (obr.19) lze říct, že substituovaný fenyl tohoto produktu je stejný jako u dasatinibu a k oxidaci (či hydroxylaci a následné oxidaci) dochází zřejmě na piperazinovém a pyrimidinovém kruhu a/nebo jejich substituentech. Na fenylovém kruhu k hydroxylaci nedochází, jak vyplývá z fragmentačního spektra iontu m/z 518.

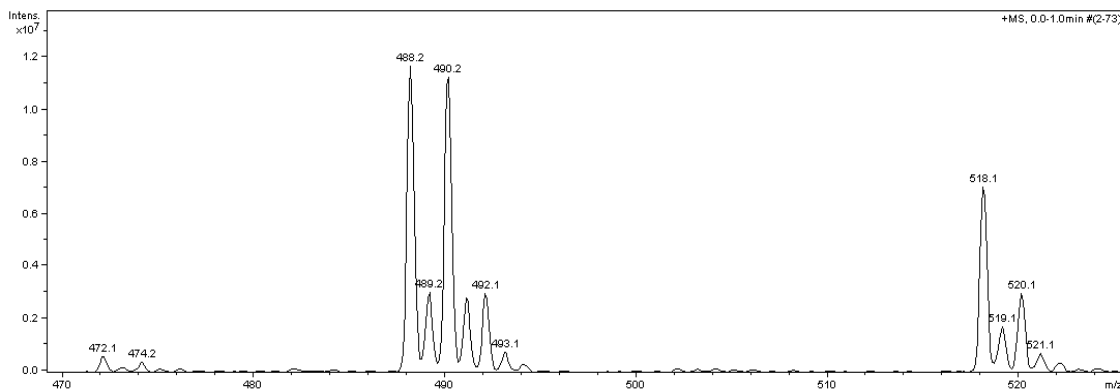


Obr. 19: Fragmentační spektrum oxidačního produktu dasatinibu PD2 s m/z 518.

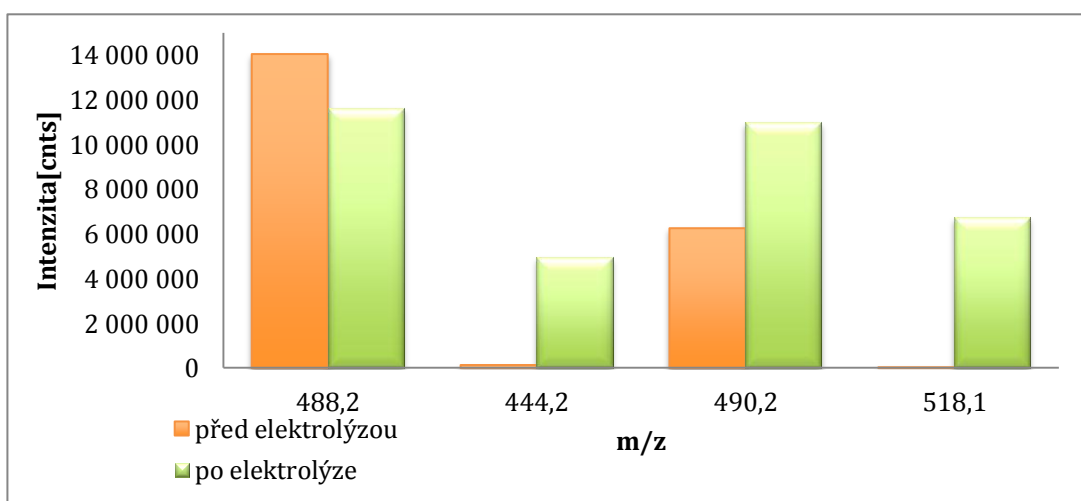
Tabulka 18: Neutrální ztráty oxidačního produktu PD2 s m/z 518.

m/z	neutrální ztráty	
	relativní hmotnost	vzorec
518		
500	18	H ₂ O
490	28	CO
472	46	CH ₃ -CH ₂ -OH
444	74	CO, CH ₃ -CH ₂ -OH
429	89	CH ₂ =NO-CH ₂ -CH ₂ -OH
401	117	CO, CH ₂ =NO-CH ₂ -CH ₂ -OH
377	141	C ₆ H ₃ Cl(CH ₃)-NH ₂
349	169	C ₆ H ₃ Cl(CH ₃)-NH-COH

Jako PD3 byl označen oxidační produkt dasatinibu s m/z 490 (obr.20). Z dat naměřených na použití hmotnostním analyzátoru nemůžeme s jistotou tvrdit, jak se tento oxidační produkt fragmentuje, protože hodnota m/z 490 je společná pro produkt PD3 a izotopický ion m/z 488, samotného dasatinibu. Fragmentační spektrum izolovaného iontu m/z 490 proto poskytuje píky příslušející jak oxidačnímu produktu PD3, tak i dasatinibu. MS analýza struktury produktu PD3 by byla možná po předchozí chromatografické separaci složek elektrolyzovaného roztoku.



Obr. 20: Hmotnostní spektrum elektrolyzovaného roztoku dasatinibu s iontem oxidačního produktu PD3 s m/z 490

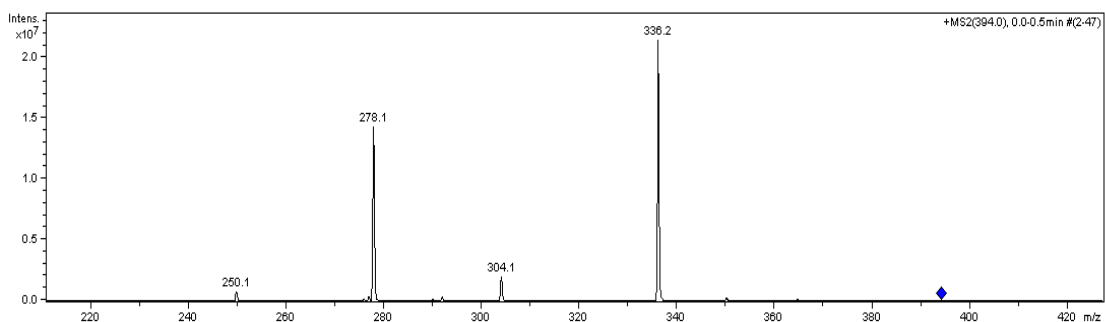


Obr. 21: Intenzity signálu vybraných iontů před a po elektrolýze dasatinibu.

Z tohoto obrázku 21 vyplývá, že roztok vzorku dasatinibu se chová odlišně před a po elektrolýze. Intenzity pík oxidačních produktů PD1 (m/z 444), PD2 (m/z 518) a PD3 (m/z 490) se po elektrolýze výrazně zvětšily, kdežto intenzita píku dasatinibu s m/z 488 se snížila, protože došlo k oxidaci tohoto léčiva.

4.5.2. Erlotinib

Podmínky měření na MS byly pro erlotinib zvoleny stejné jako pro dasatinib.

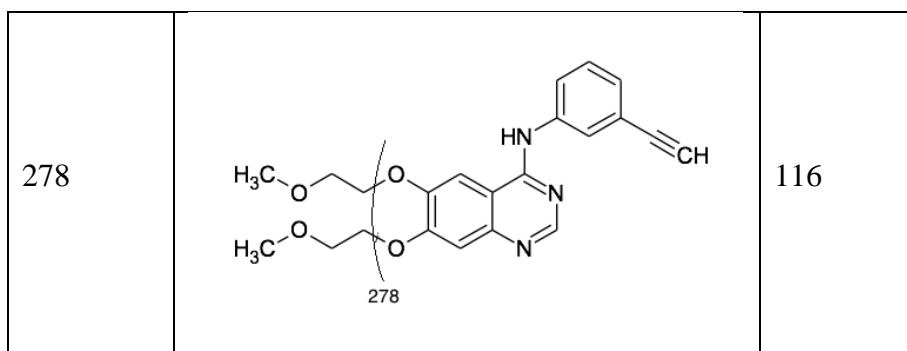


Obr. 22: Fragmentační spektrum izolovaného molekulárního iontu erlotinibu (m/z 394).

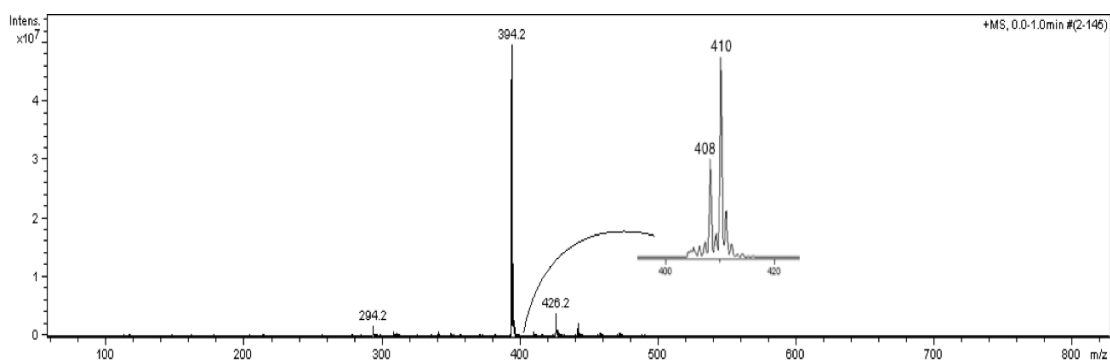
Na obrázku 22 je zobrazeno fragmentační spektrum protonizované molekuly erlotinibu m/z 394. Hlavní fragmenty poskytují píky s m/z 336 a 278. V tabulce 19 jsou zobrazeny navržené struktury těchto fragmentů. Hodnota m/z 426,2 zřejmě odpovídá aduktu s metanolem.

Tabulka 19: Navržené struktury hlavních fragmentů erlotinibu.

m/z	navržené struktury	neutrální ztráty
$[M+H]^+$		relativní hmotnost
394		
336		58

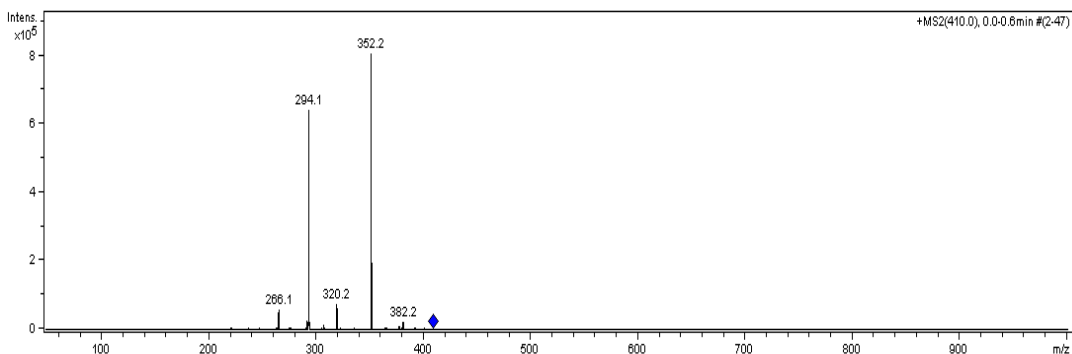


Po přímém nástřiku elektrolyzovaného roztoku erlotinibu do hmotnostního spektrometru s rychlostí průtoku 8 ml/min a ustálení signálu byl proveden sken celkového hmotnostního spektra elektrolyzátu erlotinibu (obr.23). Byly nalezeny dva hlavní produkty označené jako PE1 (m/z 408) a PE2 (m/z 410).



Obr. 23: Hmotnostní spektrum elektrolyzovaného roztoku dasatinibu.

Obrázek 24 zobrazuje fragmentační spektrum oxidačního produktu erlotinibu PE2 m/z 410. V tabulce 20 jsou zobrazeny navržené neutrální ztráty oxidačního produktu erlotinibu PE2.

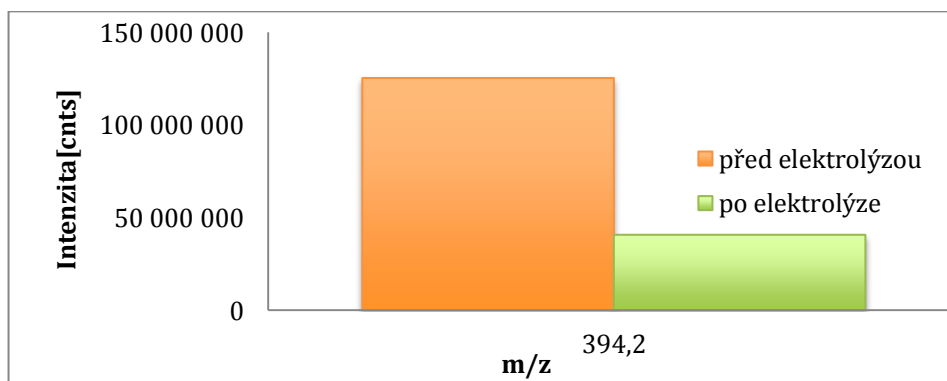


Obr. 24: Fragmentační spektrum oxidačního produktu erlotinibu PE2 (m/z 410).

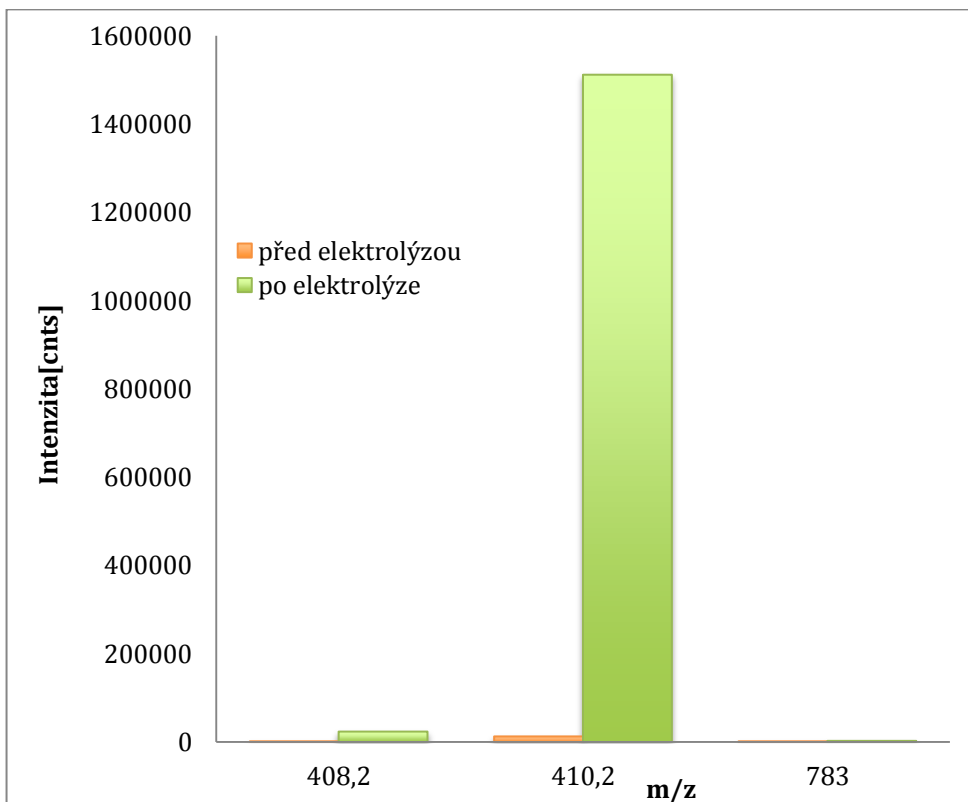
Tabulka 20: Neutrální ztráty oxidačního produktu PE2 m/z 410.

m/z	neutrální ztráta	
$[M+H]^+$	relativní hmotnost	vzorec
382	28	CO
352	58	$H_2C=CH-O-CH_3$
320	90	$H_2C=CH-O-CH_3,$ H_3C-OH

Byl proveden pokus oxidovat ERL v přímém zapojení coulometrické průtokové cely s uhlíkovou nebo platinovou pracovní elektrodou k hmotnostnímu spektrometru (EC/MS). ERL se však silně adsorboval na povrch pracovních elektrod, takže v MS spektru standardu erlotinibu nebyl viditelný molekulární pík ERL o dostatečné intenzitě. Proto byla provedena off-line analýza roztoku ERL elektrolyzovaného v coulometrické cele (obr.25).



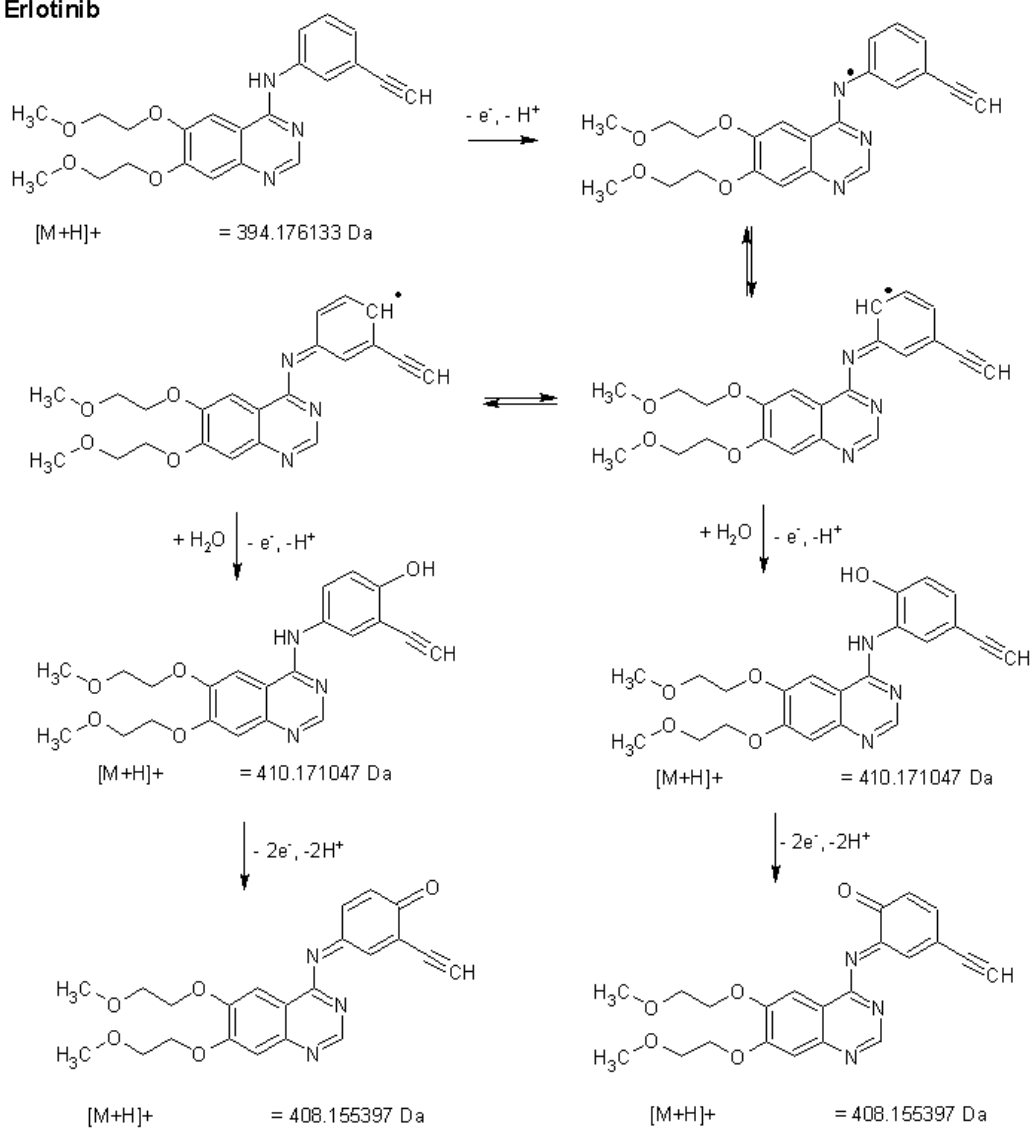
Obr. 25: Intenzity signálů iontů m/z 394 před a po elektrolýze erlotinibu.



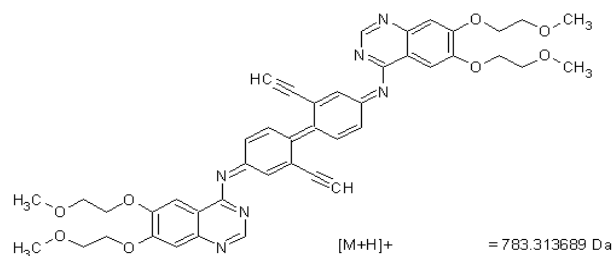
Obr. 26: Intenzity signálů vybraných iontů před a po elektrolýze erlotinibu.

Obrázek 26 zobrazuje intenzity hlavních MS píků zaznamenaných v roztocích erlotinibu před a po elektrolýze. Intenzity píků s m/z 408 a 410 po elektrolýze vzrostly. Lze tedy usuzovat, že se jedná o produkty oxidace erlotinibu. Z coulometrického měření bylo zjištěno, že oxidace erlotinibu je čtyřelektronová. Tomu odpovídají i struktury nalezených oxidačních produktů PE1 (m/z 408) PE2 (m/z 410). Na obr. 27 je uvedeno navržené schéma oxidace erlotinibu. Pík m/z 783 je dimerní molekulou erlotinibu (obr. 28). Intenzita MS píku tohoto dimeru po elektrolýze také vzrostla.

Erlotinib



Obr. 27: Struktury nalezených oxidačních produktů PE1 m/z 408, PE2 m/z 410.



Obr. 28: Struktura dimerní molekuly erlotinibu m/z 783.

5. Závěr

Byla analyzována kancerostatika dasatinibu a erlotinibu diferenčně pulzní a cyklickou voltametrií. Při oxidaci těchto léčiv byl zaznamenán anodický pík 1A. V obráceném směru polarizace byly zaznamenány poměrně menší redukční píky 2C, které souvisí s produkty oxidace kancerostatika na povrchu GCE. Ve druhém skenu byl zaznamenán nový oxidační pík 2A s nižším potenciálem, než měl oxidační pík 1A původního kancerostatika a současně došlo k poklesu píku 1A. Tento pokles je způsoben pasivací GCE adsorbovaným oxidačním produktem.

Dalším potvrzením adsorpce léčiva na povrchu GCE byl fakt, že při zkoumání závislosti proudu píku na odmocnině rychlosti došlo k menším odchylkám od linearity. Také při zvyšování počtu opakovaných skenů docházelo ke snižování anodického píku 1A. Ze směrnice závislosti logaritmu proudu na logaritmu rychlosti je patrné, že reakce jsou ovlivňovány difúzí.

V kyselém prostředí se kancerostatika oxidovala s menšími obtížemi, než to bylo u prostředí zásaditějšího, ve kterém byly píky špatně odečitatelné z voltamogramů. Jako nejvhodnější prostředí pro dasatinib bylo zvoleno pH 5,3 a pro erlotinib pH 2,8.

Lineární kalibrační závislost dasatinibu byla měřena pomocí DPV, hodnota LOD byla $1,1 \cdot 10^{-6}$ mol/l a LOQ $3,6 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Erlotinib byl měřen DPV s LOD $2,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l, LOQ $6,7 \cdot 10^{-6}$ mol/l a CV s LOD $1,5 \cdot 10^{-6}$ mol/l, LOQ $5,1 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Cyklická voltametrie byla shledána jako citlivější metoda pro stanovení erlotinibu.

Z měření potenciostatické coulometrie bylo zjištěno, že oxidace obou léčiv je čtyřelektronový děj. Směrnice lineárních úseků závislostí potenciálů DPV píků na pH naznačily, že oxidace je provázena odštěpením stejného počtu, tedy 4 protonů.

Z hmotnostních a fragmentačních spekter naměřených v roztocích léčiv elektrolyzovaných za konstantního potenciálu byly získány informace o oxidačních produktech dasatinibu a erlotinibu. Oxidační produkt dasatinibu PD1 (m/z 444) je podle fragmentačního spectra totožný s metabolitem vznikajícím v lidském organismu. U erlotinibu byly nalezeny dva oxidační produkty PE1 a PE2 a navrženo schéma elektrochemické oxidace tohoto léčiva.

6. Seznam použitých zkratk

DAS	dasatinib
DC	lineární voltametrie
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
CML	chronická myeloidní leukemia
CPC	potenciostatická coulometrie
EC	elektrochemie
ERL	erlotinib
FDA	Food and Drug Administration – úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MS	hmotnostní spektrometrie
NSCLC	nemalobuněčná rakovina plic
TK1	tyrosin kináza 1. generace
TK2	tyrosin kináza 2. generace

7. Slovník lékařských pojmů

BCR-ABL	Je enzym produkovaný leukemickými buňkami, způsobuje nekontrolované množení.
CYP3A4	Je důležitým enzymem v lidském těle, který oxiduje malé, cizorodé organické látky (xenobiotika-jedy,toxiny,léky), aby mohly být z těla odstraněny.
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
EGRF	Epidermální růstový faktor je buněčný povrchový protein, který se váže na epidermální růstový faktor. Skládá se z 53 aminokyselin a stimuluje buněčné dělení mnohých eukaryotických buněk. Vazba proteinu s ligandem indukuje dimerizaci receptoru a tyrosin autofosforylaci a vede k buněčné proliferaci. Mutace v tomto genu jsou spojeny s rakovinou plic.
Encefalopatie	poškození mozku
Granulocyty	typ bílých krvinek
Jaterní cirhóza	poškození jater
Karcinom	zhoubný nádor
Leukémie	rakovina bílých krvinek
Lymfocyty	typ bílých krvinek
Místní nekróza	odumření tkání v místě vpichu
Nauzeum	pocit zvracení
Ph ⁺	Filadelfský chromozom, který produkuje enzym vedoucí ke vzniku leukémie.
Pneumonie	zánět plic
Osteoporóza	zvýšená křehkost kostí
SRC	Je genem a stejnojmenným proteinem ze Src rodiny, který funguje jako nereceptorická tyrosinkináza.
Sepse	těžká infekce
Sterilita	neploďnost

8. Literatura

1. Zhou S., Zheng T., Chen Z, Zhang J., Li L., Lu F., Zhu J.J.: *Biosensirs and Bioelectronics* **61**, 648-654, (2014).
2. Čermáková L., Feltl L. atd.: *Analytická chemie 2 – Instrumentální analýza*, SNTL Praha, 1987, II. Vydání.
3. Marek J. a kolektiv: *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, Praha: Grada, 2010, 4.zcela přepracované vydání.
4. Faber E., Urbanová R.: *Interní medicína* **12(6)**, 321-324, (2010).
5. Obecné informace o CML
Dostupné z:
<http://www.cancer.gov>
staženo 21. listopadu 2014
6. Obecné informace o CML
Dostupné z:
<http://www.cancer.org/cancer/leukemia-chronicmyeloidcml>
staženo 21. listopadu 2014
7. Crain S., Sharf G., Hughese T.: *Úvod do problematiky léčby CML*, Austrálie, (2009).
8. Onkologický informační dokument
Dostupný z:
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/briefing/2006-4220-B1-01BristolMyersSquibb-Background.pdf>
staženo 21. listopadu 2014
9. Brien O., Radich S., Abbomd JP., Camille N.: *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 1327-1340, (2013)
10. Copelan E.A. Avalos B.R., Ahn K.H., a kolektiv: *Biology of blood and Marrow Transplantation* **21**, 552-558, (2015)
11. Informace o chemoterapii
Dostupné z:
<http://www.koc.cz/pro-verejnost/typy-lecby/chemoterapie/>
staženo 1. prosince 2014

12. Vokurka M., Hugo J. a kolektiv: *Velký lékařský slovník*, Praha: Maxdorf, 2010, 9. přepracované vydání
13. Informace o chemoterapii
Dostupné z:
<http://cs.medlicker.com/783-chemoterapie>
staženo 1. prosince 2014
14. Chemoterapie – Informovaný souhlas
Dostupné z:
http://www.fno.cz/documents/informovane-souhlysy/Chemoterapie_IS_r03.pdf
staženo 1. prosince 2014
15. Pedersen J.B., Nielsen K.B., Karle H., Johansson B.: *Leukemia* 11, 1571-1574, (1997)
16. Transplantační centrum
Dostupné z:
<http://www.ikem.cz/>
staženo 1. prosince 2014
17. Švojgrová M., Koza V., Hamplová A.: *Průvodce Vaší léčbou-Transplantace kostní dřeně*, Plzeň: F.S. Publishing, 2006.
18. Korashy H.M., Rahman A.F.M.M., Kassem M.G.: *Profiles of drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 205-237, (2014).
19. Příbalový leták – Sprycel[®]
Dostupná z:
<http://www.ema.europa.eu/>
staženo 21. února 2015
20. Sprycel[®]
Dostupný z:
<https://www.sprycel.com/index.aspx>
staženo 19. února 2015
21. Sprycel[®] – Produkt
Dostupný z:
http://packageinserts.bms.com/pi/pi_sprycel.pdf
staženo 21. února 2015

22. Luo F.R., Barrett Y.Ch., Yang Z., Camuso A., McGlinchey K., Wen M.L., Smykla R., Fager K., Wild R., Palme H., Galbraith S., Blackwood-Chirchir A., Lee F.Y.: *Cancer Chemother Pharmacol* **62**, 1065-1074, (2008).
23. Brave M., Goodman V., Kaminskas E., et al.: *Clinical Cancer Research*, 325-359, (2008).
24. Christopher L.J., Cui D., Wu Ch., Luo R., Manning J.A., Bonacorsi S.J., Lago M., Allentoff A., Lee F.Y.L., BMcCann B., Galbraith S., Reitberg D.P., He K., Barros A., Blackwood-Chirchir A.: *Drug Metabolism and Disposition* **36**, 1357-1364, (2008).
25. WEN C., ZHANG Q., HE Y., DENG M., WANG X., MA J.: *Acta Chromatographica* **27**, 81-91, (2015).
26. Wang L., Christopher L.J., Cui D., Li W., Iyer R., Humphreys W.G., Zhang D.: *Drug Metabolism and Disposition* **36**, 1828-1839, (2008).
27. Furlong M.T., Agrawal S., Hawthorne D., Lago M., Unger S., Krueger L., Stouffer B.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **58**, 130-135, (2012).
28. Kassem G., Ezzeldin E., Korashy H.M., Mostafa G.A.E.: *Journal of Chromatography B* **939**, 73-79, (2013).
29. Vadia N., Rajput S.: *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **3**, 188-190, (2011).
30. Příbalový leták – Tarceva[®]
Dostupný z:
http://www.gene.com/download/pdf/tarceva_prescribing.pdf
staženo 21. září 2014
31. Tarceva[®]
Dostupný z:
<http://www.tarceva.com/patient/>
staženo 21. září 2014
32. National Cancer Institute
Dostupný z:
<http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/drugs/fda-erlotinib-hydrochloride>

staženo 22. září 2014

33. Shepherd F.A., Pereira J.R., Ciuleanu T., Tan E.H., Hirsh V., Thongprasert S., Campos D., Maoleekoonpiroj S., M.D., Smylie M., at all.: *The New England Journal of Medicine*, 123-132, (2005)

34. NSCLC – vědecké informace

Dostupné z:

<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003115-pdf.pdf>

staženo 26. září 2014

35. Ling J., Johnson K.A., Miao Z., Rakhit A., Pantze M.P., Hamilton M., Lum B.L., Prakas Ch.: *Drug Metabolism and Disposition* **34**, 420-426, (2005).

36. Lutz Götze L., Hegele A., Metzelder S.K., Renz H., Nockher W.A.: *Clinica Chimica Acta* **413**, 143-149, (2012).

37. Lin Ch., Chen M., Zhang X., Wen C., Zhang Q., Cai J.: *Latin American Journal of Pharmacy* **32**, 1298-1303, (2013).

38. Li M.Y., Wu Q., Li H.Q., Ning M.R., Chen Y., Li L., Zhou T.Y., Lu W.: *Journal of Chinese Pharmaceutical Science* **21**, 296-303, (2012).

39. Horská J., Ginterová P., Ševčík J., Petr J.: *Chromatographia* **77**, 1477-1782, (2014).

40. Padmalatha M., Kulsum S., Rahul C., Reddy D.T., Vidyasagar G.: *International Journal of Pharmaceutical Research and Development* **3**, 103-109, (2011).

41. Rodríguez J., Berzas J.J., Castaneda G., Rodríguez N.: *Talanta* **66**, 202-206, (2005).

42. Diculescu V.C., Vivan M., Brett A.M.O.: *An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis* **18**, 1800-1807, (2006).

43. Madsen K.M., Olsen J., Skonberg Ch., Hansen S.H., Jurva U.: *Chemical Research in Toxicology* **20**, 821-831, (2007).

44. Jahn S., Karst U.: *Journal of Chromatography A*, 16-49, (2012).

45. Lohmann W., Baumann A., Karst U.: Ústav anorganické a analytické chemie Německo, *LC-GC Europe*, 1-7, (2010).

46. Johansson T., Weidolf L., Jurva U.: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 2323-2331, (2007).