UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta Katedra analytické chemie

STANOVENÍ NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:

Studijní obor:

Školitel:

Mgr. Jana Horská

Analytická chemie

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

OLOMOUC 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 31. března 2018

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé disertační práce doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. nejen za odborné vedení a připomínky, ale také za jeho trpělivost a veškerou spolupráci, kterou mi během zpracování práce poskytoval. Mé velké poděkování patří rovněž prof. RNDr. Juraji Ševčíkovi, Ph.D. za jeho cenné rady v otázkách vědy i mimo ni, jeho čas i pomoc, které mi neváhal věnovat kdykoliv jsem se obrátila s prosbou o pomoc. Děkuji též všem kolegům a členům Katedry analytické chemie.

Největší dík patří mým rodičům, kteří mi byli velkou podporou po celou dobu mého studia.

Dále bych ráda poděkovala za finanční podporu při řešení této disertační práce projektům MŠMT (CZ.1.05/2.1.00/03.0058 a NPU LO 1305), dále projektu FN Ostrava (MZ ČR – RVO – FNOs/2015), projektu GA ČR (16-23938Y) a interním grantům UP Olomouc (IGA_PrF_2018_027).

Jana Horská

SOUHRN

Předkládaná disertační práce se dotýká problematiky stanovení nízkomolekulárních látek pomocí kapilární elektroforézy (CE). První pasáž teoretické části se zabývá "novou" řadou protinádorových léčiv na léčbu leukémie (antileukemik) v čele s průlomovým preparátem imatinib. Seznamuje čtenáře s etiologií leukémie a mechanismem její léčby pomocí medikamentů této skupiny a podává detailní přehled stanovení antileukemik v biologických vzorcích pomocí různých analytických technik. Následuje krátká exkurze do světa nanočástic a jejich využití v medicíně. Další kapitoly popisují princip nepřímé UV detekce a způsoby ovlivnění selektivity separace pomocí této techniky. V následujících kapitolách je věnována pozornost alloxanu - látce používané k experimentálnímu vyvolání diabetu u laboratorních zvířat a v současné době šířeji diskutované kvůli jejímu možnému výskytu v mouce, kde může vznikat při jejím bělení a stát se tak potenciální hrozbou i pro člověka. Kapitoly zde popisují chemický a biologický pohled na alloxan. Teoretickou část uzavírá zmínka o kapilární elektroforéze jako analytické separační technice, pomocí které byly všechny látky studovány.

V rámci řešení experimentální části byly vyvíjeny metody pro stanovení výše zmíněných nízkomolekulárních látek. První z nich byla metoda pro simultánní stanovení vybraných antileukemik pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE), která může sloužit při kontrole kvality léčiv ve farmaceutickém průmyslu. Následně byla vyvíjena metoda pro stanovení kyseliny citrónové užitím CZE s nepřímou UV detekcí. Jako modelový vzorek byly poté vybrány zlaté nanočástice, které na svém povrchu obsahují citrát jako stabilizační činidlo bránící jejich agregaci. Pomocí běžně užívaných elektrolytů v CE lze citrát vytěsnit z povrchu nanočástic a tím ovlivnit chování nanočástic, což může být zásadní např. při studium interakcí nanočástic s buňkami. Závěrem byla vyvinuta metoda pro separaci alloxanu spolu s jeho prekurzory pomocí kapilární zónové elektroforézy. Vyvinutá metoda může nalézt uplatnění při kontrole kvality surovin v potravinářském průmyslu. Stabilitní studie alloxanu, která se ukázala jako naprosto zásadní, byla realizována simulací skladování mouky za různých podmínek a následným vyhodnocením přítomnosti alloxanu a jeho rozkladných produktů ve vzorcích pomocí přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru.

SUMMARY

This thesis provides the introduction into the problematics of determination of low molecular weight compounds using capillary electrophoresis. The theoretical part is devoted to the "new" series of anti-tumor drugs for the treatment of leukemia (antileukemics) with the breakthrough preparation imatinib. The etiology of leukemia and the mechanism of treatment with these drugs are briefly discussed. The detailed overview of the determination of antileukemics in different biological samples using different analytical techniques is delivered. A short excursion into the world of nanoparticles and their use in medicine follows. Other chapters describe the principle of capillary zone electrophoresis method with indirect UV detection and influencing selectivity of analysis by the parameters of analysis. Attention is paid also to alloxan – substance used for the experimental induction of diabetes in laboratory animals. A lot of discussions and controversies arose currently due to its possible occurrence in bleached flour, where it can be a significant issue and a potential threat for consumers. In this chapter, one can find the view of chemistry and/or biology on alloxan studies. The theoretical part is summarized with the description of capillary electrophoresis as an analytical separation technique used for the study of all the substances mentioned.

In the experimental part, methods for the determination of the above-mentioned low molecular weight molecules were developed. Firstly, a method for the simultaneous determination of antileukemics by capillary zone electrophoresis has been developed. This method can be used for the quality control in the pharmaceutical industry. Secondly, a method for the determination of citrate using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection was developed. Gold nanoparticles, which contain citrate as a stabilizing agent to prevent their aggregation, were as a real sample. Citrate molecules can be released from the surface using electrolytes which are common in capillary electrophoresis which can be helpful in clarification of the nanoparticles' surface chemistry. This can be consequently employed in further studies, e.g. on the interaction of nanoparticles with cells. In the last part, on developing the method for the separation of alloxan with its precursors by capillary zone electrophoresis as a quality control method in the food industry was developed. Alloxan and its decomposition products in flour samples after their simulated storage under various conditions had been studied by the direct injection mass spectrometry.

OBSAH

1	ÚVOD	. 1
2	TEORETICKÁ ČÁST	. 2
2.1	Nízkomolekulární látky	. 2
2.2	Antileukemika	. 3
2	.2.1 Leukémie	. 3
	2.2.1.1 Lymfatická (lymfoblastická) leukémie (LL)	. 3
	2.2.1.2 Myeloidní leukémie (ML)	. 6
2	.2.2 Receptory tyrosinkináz (RTK)	. 8
	2.2.2.1 TKI a současnost	. 8
	2.2.2.1.1 Imatinib	. 9
	2.2.2.2 Stanovení imatinibu v reálném vzorku	. 9
	2.2.2.2.1 Elektromigrační techniky	10
	2.2.2.2.2 Separační techniky	10
	2.2.2.3 Elektroanalytické techniky	11
	2.2.2.4 Další techniky	12
	2.2.2.3 Jednotlivá stanovení dalších TKI v reálném vzorku	13
	2.2.2.1 Simultánní stanovení TKI v reálném vzorku	13
• •	No	15
2.3	Nanocastice	15
2	 A Stanovaní (malýah) anarganialgíah ightů namogí CE 	15
Z	2.2.2.1 Nanžímá LIV datakce	10
	2.3.2.1 Neprinia UV detekce	10
		1 /
2.4	Alloxan	20
2	4.1 Alloxan z hlediska chemie	21
2	.4.2 Alloxan z hlediska biologie	22
		24
2.5	Kapilární elektroforéza	25
2	.5.1 Teoretické aspekty kapilární elektroforézy	25
	2.5.1.1 Elektroforetická pohyblivost	25
	2.5.1.2 Elektroosmotický tok	27
	2.5.1.3 Techniky kapilární elektroforézy	29
3	CÍLE PRÁCE	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1	Chemikálie	31
4.2	Instrumentace	31
4.3	Příprava vzorků	32

4. 4	Validace metod	. 33
4.5	Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií (CE-MS)	. 33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	. 34
5.1	Separace nových léčiv pro léčbu leukémie pomocí kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí .	. 34
	5.1.1 Vývoj metody	. 35
	5.1.2 Validace metody	. 37
	5.1.3 Test robustnosti	. 38
5.2	Stanovení citrátu uvolňovaného z povrchu Au NPs pomocí CZE s nepřímou UV detekcí	. 40
	5.2.1 Stanovení kyseliny citronové pomocí CZE s nepřímou UV detekcí	. 40
	5.2.1.1 Vývoj metody	. 40
	5.2.1.1 Validace metody	. 42
	5.2.1 Stanovení citrátu ve vzorcích zlatých nanočástic pomocí CZE s nepřímou UV detekcí	. 43
5.3	Separace alloxanu a jeho prekurzorů pomocí kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí	. 45
	5.3.1 Vývoj metody	. 46
	5.3.2 Stanovení základních parametrů metody	. 48
	5.3.2.1 Analýza alloxanu pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)	. 48
	5.3.2.1.1 Optimalizace MS parametrů	. 49
	5.3.2.1.2 Studium fragmentace v MS	. 50
	5.3.2.2 Studium hydrolýzy alloxanu	. 51
	5.3.2.3 Stabilitní studie alloxanu	. 52
	5.3.2.4 Studium přítomnosti alloxanu v krvi	. 55
6	ZÁVĚR	. 57
7	SEZNAM ZKRATEK	. 58
8	POUŽITÁ LITERATURA	. 61
9	PŘÍLOHY	. 79

"MOTTO"

50 odstínů barev kapilární elektroforézy?

"Nedívám se na svět černobíle"

Může se zdát, že vědecký svět je pouze černobílý. Že v něm není místo na pestrobarevnost, ale když se analytik dostane do nitra vědy, když detailně pozná chod laboratoře, pochopí, že tomu tak není. I vědecký svět v sobě ukrývá spousty barev a pestrosti. Kapilární elektroforéza je přístroj, který analytikovi prozradí odpověď na 2 základní otázky analytické chemie: "Co je ve vzorku"? "Kolik toho je ve vzorku"? Při práci na kapilární elektroforéze svítí na displeji vždy jedna ze tří barev. Červeně přístroj svítí v případě varovného signálu, kdy se vyskytl problém a je ho potřeba odstranit. Je-li v klidovém režimu, pak svítí oranžově. Funguje-li vše bez problémů, svítí na displeji zeleně. A ač se to nezdá, tyto pouhé tři barvy jsou hodně důležité, neboť provází každodenní práci analytika v chemické laboratoři. Nicméně kapilární elektroforéza nabízí i jiné barvy, ovšem ty už nejsou viditelné na diodách displeje. Tyto barvy, kterých je nebetyčně mnoho, analytik postupně objevuje až při práci samotné, když přístroj poznává hlouběji a hlouběji, když objeví pestrosti různých vzorků, které lze pomocí ní analyzovat, možnosti módů, které nabízí a když je současně otevřen zkoumání a objevování tajů a kouzel chemie jakožto vědy samotné.

1 ÚVOD

Nízkomolekulární látky tvoří široké spektrum sloučenin, kterými jsme v lidském životě obklopeni. Jejich zajímavé vlastnosti odrážejí spousty užitečných aplikací. Stanovení těchto látek je neméně významné a poslouží nám k tomu různé techniky analytické chemie, pomocí nichž lze stanovovat i stopová množství v různých matricích a usuzovat tak na přítomnosti či nepřítomnosti hledané látky.

V této práci jsem se zaměřila na tři aktuální témata současné vědy, zejména s přesahem do medicíny. Jmenovitě na skupinu "nových" léčiv na léčbu leukémie, stanovení citrátu uvolňovaného z povrchu nanočástic a alloxan, látku diskutovanou ve spojitosti s diabetem závislým na podávání inzulinu. Vývojem metody na separaci sedmi "nových" antileukemik v běhu jedné analýzy, odpadá nutnost vývoje metod pro každé léčivo zvlášť. Stanovení citrátu uvolňovaného z povrchu zlatých nanočástic nás přiblíží pochopení interakcí probíhajících na povrchu nanočástic. Vyvinutí metody na stanovení alloxanu ve vzorcích mouky pomocí kapilární zónové elektroforézy poskytne metodu ke kontrole kvality mouky v potravinářském průmyslu. V rámci této problematiky byla navázána spolupráce s Fakultní nemocnicí v Ostravě a společně bylo řešeno studium výskytu alloxanu nejen v různých typech mouk z různých zemí (USA, Bělorusko, Rakousko, ČR), ale i v lidské krvi.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nízkomolekulární látky

Nízkomolekulární látky či malé molekuly lze vydefinovat jako chemická individua, jejichž relativní molekulová hmotnost se pohybuje pod 1000 g/mol. Patří sem velká část chemických sloučenin ať již anorganické či organické povahy. Z organických např. sacharidy (ketosy, aldosy), flavonoidy, mastné kyseliny, aminokyseliny, nukleotidy, lipidy či vitamíny, hormony, feromony a syntetická léčiva. Z anorganických pak běžné kationty a anionty. Pro své zajímavé vlastnosti jsou základními stavebními složkami živých organismů, zdrojem energie či biokatalyzátory nezbytnými pro metabolismus či specifickými látkami, které ovlivňují fyziologické procesy. Mají poměrně jednoduchou strukturu, pročež není problém je stanovit obvyklými analytickými technikami, za ne příliš složitých podmínek analýz, např. i pomocí kapilární elektroforézy [1, 2].

2.2 Antileukemika

Léčiva pro léčbu leukémie zaznamenala významný rozkvět v průběhu posledních desetiletí objevením nové řady léčiv s lepšími účinky. Průkopníkem této skupiny preparátů byl imatinib. Jeho zavedením do klinické praxe došlo k revoluci v léčbě v jedné ze čtyř hlavních druhů leukémie - chronické myeloidní leukémie (CML). CML je příkladem onemocnění, u kterého nové poznatky v molekulární biologii umožnily jak důkladné poznání podstaty nemoci, tak současně objev nového principu léčby v podobě inhibice tyrosinové kinázy, jako hlavního terapeutického cíle. Na konci všeho úsilí dochází k dramatickému zvýšení úspěšnosti terapie, včetně kvality života pacienta. Než se dostaneme k sofistikovanosti účinku léku imatinib a možností jeho stanovení, je na místě blíže objasnit etiologii této choroby.

2.2.1 Leukémie

Jak již název pocházející z řečtiny napovídá ("leukos" = bílý, "haima" = krev; leukémie = "bělokrevnost"), dochází k onemocnění mateřské krvetvorné tkáně. Jedná se o poruchu charakterizovanou maligním zvýšením počtu dřeňových kmenových buněk [3], což způsobuje abnormálně zvýšené množství leukocytů v krvi. Jelikož jsou většinou nezralé, nejsou schopné plnit svoji funkci. Jejich počet se neustále zvyšuje maligní proliferací, přičemž v buněčném procesu nezanikají obvyklým způsobem jako zdravé buňky, přetrvávají a postupně osidlují krevní řečiště, kostní dřen i slezinu, kde utlačují zdravé krevní buňky a dávají tak vznik klinickému obrazu onemocnění. Tyto zhoubné hematologické novotvary jsou častější u dospělé populace, než u dětí. Existují čtyři hlavní typy leukémie na základě toho, jak rychle se onemocnění rozvíjí (akutní a chronická) a jaký druh leukocytů je zasažen (myeloidní řada nebo lymfocytická řada).

2.2.1.1 Lymfatická (lymfoblastická) leukémie (LL)

U akutní lymfatické leukémie (ALL) dochází k rozšíření leukocytů typu T nebo B (lymfocytů T nebo B), pocházejících z maligní krvetvorné buňky. Za akutní formu a další formy akutní leukémie je považována polovina diagnostikované leukémie, přičemž všechny formy jsou nejrozšířenější u dětí. Precizní diagnostika je v medicíně základním předpokladem určení diagnózy a výzvou pro lékaře stejně jako pro vědce. Samostatné krevní testy nemusí vůbec včas poukázat na přítomnost leukémie v jejím raném stadiu či ve stadiu remise. Pro

potvrzení je nutná aspirace (punkce) kostní dřeně. Morfologie buněk kostní dřeně, rozlišení mezi lymfoblasty a myeloblasty, je významným vodítkem k rozdílu mezi ALL a akutní myeloidní leukémie (AML). Morfologické varianty buněk ALL je možno vidět na obrázku 1.



Obrázek 1: Společné morfologické varianty ALL; upraveno [4].

a) podtyp FAB L1 - lymfoblasty malé, jaderné, cytoplazmatické charakteristiky jsou rovnoměrné s nedostatečnou modrou cytoplazmou, pravidelnou jadernou formou, částečně kondenzovaným chromatinem se sotva viditelnými nukleoly a vysokým nukleocytoplazmatickým poměrem; b) subtyp FAB L2 - lymfoblasty jsou variabilní velikosti s nepravidelnými jadernými obrysy, heterogenním krajkovým chromatinem, středně bohatou slabou bazofilní cytoplazmou a variabilním nukleocytoplazmatickým poměrem; c) subtyp FAB L3 (Burkitt) - lymfoblasty jsou velmi velké a zcela homogenní s jemně zrnitým atomizovaným nukleárním chromatinem s prominentními nukleoly; cytoplazma je modrá a vakuolovaná (spíše uznávané jako non-Hodgkinův lymfom než ALL).

Je známo, že ALL vykazuje vždy postižení kostní dřeně, kde se musí podle definice nacházet alespoň 20 % blastů. Ovšem rozlišení mezi nezralými B a T lymfoblasty (nezralé lymfocyty) už bývá pravidelně problémem, protože neexistují žádná reprodukovatelná kritéria pro jejich diferenciální morfologii. Obdobný problém vyvstává při rozlišování mezi B- lymfoblasty a lymfoblasty z normálních lymfoidních prekurzorů typu B, známých jako hematogony, které se v periferní krvi běžně objevují při různých stavech, včetně hematologického onemocnění postihující kostní dřeň - primární myelofibrózy. Klasifikace lymfoidních novotvarů podle Světové zdravotnické organizace (WHO) rozlišuje 2 kategorie: neoplazmy odvozené od T lymfoidní linie prekurzorů (T - ALL) a od B lymfoidní linie prekurzorů (B – ALL). Tyto prekurzory jsou pak odvozené od zralých T, B nebo NK buněk. [5 - 7]. Oproti tomu chronická lymfatická leukémie typu B (B - CLL) je onemocnění charakterizované klonální proliferací a akumulací morfologicky zralých B- lymfocytů s funkční nedostatečností. K akumulaci lymfocytů může docházet jednak v kostní dřeni a periferní krvi, ale rovněž v lymfatických orgánech (lymfatické uzliny, játra a slezina), kde se akumulace může projevit až v průběhu času. V důsledku přežívání maligních lymfocytů začnou postupně být lymfocyty v těchto orgánech převládající buněčnou složkou. [8, 9] Tato forma leukémie se vyskytuje nejčastěji v západním světě u starší populace, kde průměrný věk pacientů s diagnózou CLL dosahuje 72 let a 70 % pacientů je starších 65 let. V roce 2008 bylo diagnostikováno 20 - 30 nových diagnóz ročně na 100 000 lidí této věkové skupiny. Lze konstatovat, že převaha starších pacientů vykazuje jistá úskalí léčby, proto je potřeba vyvíjet neustále nové postupy a metody včasného záchytu tohoto onemocnění. Během posledních let došlo k výraznému terapeutickému progresu díky pochopení molekulární biologie. Dopředu se posunula detekce klinických prognostických faktorů a došlo k rozkvětu cílených terapií zaměřených na specifické biochemické cesty. Za jejich vysokou léčebnou účinností stojí paralelní využití různých mechanismů působení a především nedávný objev léčiv ibrutinib, idelalisib a venetoclax. V tomto smyslu lze zmínit nárůst úspěšnosti diagnostického záchytu CLL v 70. letech u pacientů v asymptomatické fázi z 30 % na 40 % [10]. "Zlatým standardem" mezi léky dlouhodobě zůstává již 40 let [11] alkylační činidlo chlorambucil. Další hojně užívanými léky jsou analogy purinů např. fludarabin, fentostatin a kladribin. V 90. letech se objevila i kombinovaná chemoterapeutika, neboť jak alkylační činidla, tak purinové analogy mají různé mechanismy účinku a odlišnou toxicitu, což předurčuje jejich synergické účinky při kombinovaném užití [11, 12].

2.2.1.2 Myeloidní leukémie (ML)

Chronická forma myeloidní leukémie (CML) byla prvně popsána patology Virchandem a Bennettem v roce 1845. U tohoto typu leukémie dochází k výraznému zvýšení počtu všech elementů vývojové řady granulocytů v kostní dřeni a periferní krvi. Za nejkritičtější příčinu vzniku CML je považován defektní chromozom tzv. Philadelphský. V roce 1960 Nowell a Hungerford pracující ve Philadephii (původ názvu chromozomu) si prvně povšimli cytogenetické abnormality u pacientů s diagnostikovanou CML. Konzistentní cytogenetickou strukturu považovali za chromozomovou aberaci (deleci). V roce 1973 Rowley označila zkrácený chromozom 22 za Philadelphský [13]. Na molekulární úrovni je formován reciprokou translokací, tj. přenesením genetického materiálu po zlomení dlouhého ramene u chromozomu 9 a malého ramene chromozomu 22 [13, 14] (viz obrázek 2).



Obrázek 2: Vznik Philadelphského chromozomu [14].

Studie v 70. a 80. letech přinesly další poznatky, že tato genová mutace v normální buňce je onkogenní, protože dává vzniknout novému chimernímu (fúznímu) genu BCR-ABL1, kde bylo zjištěno, že delece 3'fragmentu regulační domény *c-ABL* je nejčastějším podkladem pro přeměnu protoonkogenu *c-ABL* ve virový onkogen *v-ABL* (virový onkogen Abelsonovy myší leukémie) a spolu s genem BCR utvářejí lokální koncentraci onkogenních kodonů v genomu (tzv. "breakpoint cluster region"). Hybridní mRNA poté kóduje konstitutivně aktivovanou tyrosinovou kinázu Brc-Abl, která je klíčovou molekulou vedoucí ke vzniku onemocnění [15]. O souvislosti mezi onkogeny a biochemií protein kináz tak

nemůže být pochyb [16, 17]. V molekulární biologii lze gen *BCR-ABL* kvantifikovat klasickým způsobem pomocí zmnožení cílových úseků DNA polymerázovou řetězovou reakcí spojenou s reverzní transkripcí (RT-PCR). Enzym reverzní transkriptáza slouží pro přepsání komplementární DNA z izolované RNA. RNA je izolována z buněk periferní krve. Proces je ukončen amplifikací transkribované *BCR-ABL* [18].

Přesná příčina vedoucí ke vzniku defektu doposud není známa a jediným dobře charakterizovaným rizikovým faktorem je expozice radioaktivnímu záření. CML vždy prochází 3 fázemi, kde postup každé fáze je jasně charakterizován. Chronická, první fáze, může trvat roky a je pro ni typická přítomnost blastů (nezralé buňky myeloidní linie) v hodnotách okolo 5 % či méně. Pacienti v této fázi nemají závažnější zdravotní problémy. Chronickou fázi následuje fáze akcelerační s výrazně rychlejším průběhem, při níž je počet blastů zvýšen na 6 - 30 %. V poslední, blastické fázi, už počet blastů přesahuje 30 % a může dojít až k blastické krizi projevující se horečkou a splenomegalií (zvětšením sleziny). Neléčená blastická krize může mít fatální následky [19]. Nezřídka se objevují oční projevy leukémie. Statistiky udávají výskyt leukemického hypopyonu u 60 - 90 % pacientů v určité fázi jejich onemocnění. Leukemický hypopyon je oční sediment tvořící se v závislé části přední komory oka (obrázek 3). Frekvence výskytu je závislá na typu leukémie, častěji se objevuje u akutní formy myeloidní leukémie [20].



Obrázek 3: (a) hypopyon na pravém oku, **(b)** hypopyon na levém oku, **(c)** náhlé zhoršení vidění na pravém oku **(d)** persistentní hypopyon levého oka; upraveno [20].

2.2.2 Receptory tyrosinkináz (RTK)

Tyrosinkinázy jsou enzymy přenášející fosfátové skupiny z makroenergetických molekul např. adenosintrifosfátu (ATP) na aminokyseliny tyrozinových zbytků v proteinech jednotlivých signálních drah na povrchu jejich buněčných receptorů. Fosforylace v proteinech aktivuje buněčné procesy od proliferace přes diferenciaci až po jejich apoptózu. Z popsaného je patrné, že v případě deregulované aktivity tyrosinkinázy hrozí transformace v onkogenní fenotyp buňky. Inhibitor RTK interakcí s bílkovinou Bcl-Abr zablokuje místo pro ATP, což přeruší přenos aktivního fosfátu na tyrosin bílkovin patřících k substrátům leukemické tyrosinové kinázy. Následně inhibicí fosforylace tyrosinových zbytků proteinů se zastaví aktivace signálních drah, podílejících se na vzniku leukemického fenotypu buňky [21]. Zajímavostí zůstává, že RTK hrají důležitou roli i v regulaci vývoje folikulů, jakožto první fáze ovariálního cyklu. Asadi-Azarbaijania a kol. osvětlili tento fakt zkoumáním vlivu účinku imatinibu na primární soubor folikulů a časnou folikulogenezi postnatálních samic potkanů závěrem, že imatinib ovlivňuje folikulogenezi v ovariích potkanů po narození tím, že zpomaluje rozpad klastru folikulární sestavy a časnou aktivaci primordiálního souboru folikulů [22].

2.2.2.1 TKI a současnost

V současné chvíli existuje široká škála relativně nových antileukemik a rozšiřuje se i spektrum jejich indikací u dalších forem rakoviny. Impuls pro vývoj dalších nových antileukemik vzešel z rostoucí rezistence či intolerance u pacientů s CML léčených imatinibem jako lékem první volby. Do druhé linie antileukemik řadíme např. bosutinib (inhibice *Abl* a *Src* proteinu) [23], dasatinib [24], poskytující pozitivní výsledky kromě terapie CML i v preklinických testech u rakoviny prsu (inhibice *Src* proteinu) [25], erlotinib (inhibice *EGRF)* pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic [26], pazopanib pro léčbu renálního karcinomu (RCC) [27] a vatalanib (inhibice *KIT*, *PDGFR* a *VEGFR-1*, *VEGFR-2* a *VEGFR-3)* pro léčbu maligních gastrointestinálních stromálních nádorů (GIST) [28]. Jelikož předmětem mé disertace je stanovení nízkomolekulárních látek, budu se v následující kapitole zabývat stanovením TKI v různých tělesných tekutinách. Dále s ohledem na to, že imatinib je nejvíce zkoumán napříč všemi studiemi, budu se zabývat detailním stanovením pouze u něho a stanovení ostatních léčiv zmíním pouze okrajově.

2.2.2.1.1 Imatinib

Imatinib (imatinib mesylát, obrázek 4A), vyráběný švýcarskou firmou Novartis a známý pod obchodním názvem Gleevec ve Spojených státech amerických a Glivec v ostatních zemích [29], byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 2001 pro léčbu CML [30] a GIST [31] v roce 2002 jako první molekulárně cílený lék v léčbě nádorového onemocnění. Další informace o něm nasvědčují, že jím lze léčit i nefrogenní systémové fibrózy [32]. Jak již bylo zmíněno dříve, jedná se o selektivní inhibitor proteinových tyrosinkináz. Inhibuje buněčný *ABL*, *v-ABL*, *ABL-BCR* [33], *ARG*, *PDGF-R*, α , β a *c-KIT* [34]. Je podáván orálně ve standardní dávce 400 mg/den. Metabolismus imatinibu v játrech je zprostředkován systémem několika izoenzymů cytochromu P450. Většina imatinibu je vyloučena v podobě metabolitů, jen 25 % odchází z těla v původní podobě. Hlavní aktivní metabolit imatinibu je N - demethylovaný derivát piperazinu (obrázek 4B), který je stejně hojně studován jako imatinib. Poločas zadržení v organismu se u obou pohybuje mezi 18 – 40 hod. [35].



Obrázek 4: Struktury (A) imatinib mesylát, (B) N - demethylovaný derivát piperazinu (metabolit), upraveno [35].

2.2.2.2 Stanovení imatinibu v reálném vzorku

Je nasnadě, že od doby objevení imatinibu, už vyšlo nespočetné množství studií zabývajících se kromě detailního popisu mechanismu účinku léku, jeho vlivu na lidský organismus, rezistencí a intolerancí lidského organismu na jeho terapeutické nasazení, rovněž jeho stanovením v biologických vzorcích. Pro stanovení plazmatických či intracelulárních hladin bioanalytickými metodami se využívá všestrannosti různých instrumentálních technik přítomných v běžných klinických laboratořích.

2.2.2.1 Elektromigrační techniky

Stanovení imatinibu spolu s jeho hlavním metabolitem pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) v lidské moči popsali Rodriguez a kol [36]. Separace pomocí CZE probíhala v nepokryté křemenné kapiláře v kyselém prostředí fosfátového pufru o koncentraci 100 mmol/l titrovaným triethanolaminem na požadované pH 2,0 při obrácené polaritě. Metoda poskytla mez detekce (LOD) 0,1 mg/l. Vzorky moče nebyly nijak složitě upravovány. Před každou analýzou byly vzorky ředěny pouze deionizovanou vodou v poměru 1:1 (v/v). Stejní autoři publikovali výsledky kapilární elektroforézy v nevodném prostředí (NACE), kdy se elektrolyt rozpustí v organickém rozpouštědle či směsí několika rozpouštědel. Nevodné prostředí v sobě ukrývá zcela jiné chemicko - fyzikální vlastnosti (viskozita, permitivita, polarita atd.), což se odráží i ve zcela jiných podmínkách pro stanovení a objevení dalších vlastností studovaného vzorku. Mimo jiné výhody, jakými jsou vysoká účinnost či rozlišení, dojde k rozšíření využití metody pro hydrofobní látky, které jsou obtížně stanovitelné ve vodném prostředí. Imatinib spolu s jeho hlavním metabolitem byl stanoven v pufru obsahujícím 12 mmol/l octan amonný a 87,6 mmol/l kyselinu octovou v prostředí methanol acetonitril v poměru 80:20 (v/v) při 20 kV s výrazně nižšími LOD (24 µg/l), lepším rozlišením mezi imatinibem a jeho metabolity a žádným vlivem matrice v porovnání s CZE. Vzorky moče byly před analýzou upraveny pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) s použitím nepolární stacionární fáze - kolony C₁₈ [37]. Imatinib byl stanoven pomocí CE i v krevní plazmě. Plazma, která již obsahovala antikoagulant (heparin), byla po zalkalizování NaOH podrobena extrakci kapalina - kapalina do methyl-terc-butyl etheru (TMBE). Ke stanovení byl použit 50 mmol/l pufr fosfát/NaOH pH 2,5 [38].

2.2.2.2.2 Separační techniky

V klinické praxi pro lepší citlivost a reprodukovatelnost analýz oproti CE dominuje vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s UV detekcí [39-41], s detekcí diodového pole (DAD) [42], fluorescenční detekcí [43] či hmotnostní detekcí obvykle v tandemovém uspořádání (HPLC-MS/MS) [44, 45]. Vzhledem k chemické povaze imatinibu se v drtivé většině studií jedná o reverzní systém s polární mobilní fází tvořenou kyselým a methanolem/acetonitrilem. pufrem Jako nepolární stacionární fáze ie často užívána kolona C₁₈. Iontovými zdroji ve spojení s HPLC jsou v běžných sestavách chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) nebo elektrosprej (ESI). Ionizace probíhá v pozitivním módu a fragmenty jsou pozorovány v režimu sledovaných vybraných přechodů. Kvantifikace je pak prováděna buď s pomocí interního standardu (např. chinoxalin nebo klozapin) či s pomocí izotopů. Úpravu vzorku plazmy před analýzou lze zprostředkovat pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) užitím kolony C₁₈ [46] nebo polo-automatizovanou SPE za použití 96-jamkové destičky, což bylo v literatuře popsáno při stanovení v opičí [47] a lidské plazmě za užití srážení proteinů acetonitrilem [48]. V rámci potřeb stále rychlejších a efektivnějších analýz publikovali Mičová a kol. srovnání průtokové injekční analýzy a HPLC-MS/MS na koloně naplněné částečkami v řádech µm, dovolující díky svému velkému povrchu rychlou separaci při vysoké účinnosti. Jimi vyvinutou FIA metodou byla dosažena vysoká rychlost analýz (až 80 analýz/hod) [49]. Stejní autoři osvětlují stanovení metabolitů u vzorků pacientů léčených imatinibem pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-HRMS), kdy detekovali 24 nových strukturálně neočekávaných metabolitů. Některé z nich obsahovaly atomy síry, což korelovalo s navrhovanými adukty cysteinu a cystinu. Detekce dalších metabolitů síry odvozených může být nápomocná v dalších studiích popisu mechanismu hepatotoxicity či nefrotoxicity u člověka. Metoda byla představena na přístroji Ultimate 3000 Dionex ve spojení s Orbitrapem. Mobilní fáze s gradientovou elucí obsahovala směs 10 mM mravenčanu amonného o pH 4 a acetonitrilu [50]. Klawitter a kol. vyvinuli metodu na stanovení imatinibu ve vzorcích plné lidské krve a v leukemických buňkách v kombinaci s poloautomatickým obohacením vzorku, které zahrnuje srážení proteinů jako jediný manuální krok. V tomto provedení byly supernatanty po precipitaci naneseny na extrakční kolonu a promývány při vysokém průtoku mobilní fází (methanol/kyselina mravenčí v poměru 8:2, v/v) 5 ml/min po dobu 1 minuty [51]. Jiné HPLC metody stanovují za podobných experimentálních podmínek imatinib v mozkomíšním moku [52], lidských nádorových tkáních [53], myší plazmě a tkáních (játra, mozek, ledviny, slezina, žaludek a srdce), [54] a králičích tkáních (játra a srdce) [55].

2.2.2.3 Elektroanalytické techniky

Imatinib byl studován a stanovován i elektroanalytickými metodami a vyvinuté metody byly pro ověření aplikovány na vzorky moče a krve. Voltametrické chování imatinibu a jeho metabolitu popsali Rodríguez a kol. square wave voltametrií a adsorptivní rozpouštěcí square wave voltametrií (SWAdSV). Při studiu elektrochemického chování využívají silnou adsorpci imatinibu i jeho metabolitu na stacionární rtuťovou elektrodu. Lepší citlivost poskytla SWAdSV s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE). Oxidační mechanismus

imatinibu byl objasněn cyklickou voltametrií. Vyvinutou metodu aplikovali na reálné vzorky moči pacientů s CML [56]. Hammam a kol. studovali elektrochemický mechanismus imatinibu v Britton - Robinsonově pufru (B - R) v rozmezí pH 2 až 11 pomocí cyklické voltametrie s HMDE, kdy se na voltamogramu ukázal jeden nevratný katodický pík způsobený možnou redukcí ketonové skupiny ve struktuře molekuly. Silnou adsorpci na povrch elektrody vykazoval imatinib zejména v rozmezí pH 6 až 7, čehož bylo využito pro optimalizaci SWAdSV. Vyvinutou katodickou SWAdSV metodu následně úspěšně aplikovali na vzorky lidského séra s přídavkem standardu imatinibu [57]. Tendence eliminovat užití toxických látek vedla ke studii adsorpce imatinibu a jeho metabolitu na skelnou uhlíkovou elektrodu, kde oxidační produkt imatinibu vytváří kompaktní monovrstvu na povrchu elektrody, která dále zabraňuje oxidaci imatinibu [58]. Borem dopovaný diamant užili Bricht a kol. ve své studii pomocí diferenční pulzní voltametrie, kde imatinib poskytl anodický pík v B – R pufru. Následně metodu aplikovali na vzorky lidské moči po přídavku standardu imatinibu [59]. Mezi další kovové elektrody, na nichž byla oxidační degradace imatinibu studována patří např. titanová, platinová či cínová elektroda [60]. Imatinib byl stanoven i pomocí uhlíkových mikroelektrod s elektrochemickou úpravou povrchu nanokompozity. Pro výrobu senzoru bylo využito poly(amidoamin) dendrimerů (PAMAM), které byly adsorbované na redukovaném oxidu grafenu. Dendrimery jsou známé pro svůj velký vnitřní povrch a velké množství funkčních skupin na svém povrchu. Nanokompozit byl nejprve uložen na povrch grafitové tužkové elektrody, a to celé bylo poté opatrně vloženo do dutého vlákna pomocí nosiče v podobě iontové kapaliny [61].

2.2.2.4 Další techniky

Další možností stanovení imatinibu je využití fenoménu kvantových teček (CDs). Jedinečnost CDs spočívá v jejich enormních fluorescenčních vlastnostech. Yan a kol. představili fluorescenční metodu pro stanovení imatinibu založenou na kvantových tečkách jako fluorescenčních značkách na bázi biomasy. Popsali jejich rychlou a jednoduchou syntézu s použitím škrobu jako prekurzoru a vyvinutou fluorescenční metodu po optimalizaci podmínek (koncentrace CDs, pH, teplota, reakční kinetika) aplikovali na detekci imatinibu přidáním standardu do roztoku těchto nanočástic [62].

Stanovení imatinibu lze řešit i imunochemickými metodami. Je například popsána vysoce specifická sendvičová enzymová imunoanalýza (ELISA) pro stanovení imatinibu s použitím dvou nových protilátek imatinibu [63].

2.2.2.3 Jednotlivá stanovení dalších TKI v reálném vzorku

Vzhledem k tomu, že vývoj nových TKI postupuje stále kupředu, i k tomu, že mají podobné struktury, není velkým problémem vyvinutí metod na stanovení dalších jednotlivých léčiv v biologických vzorcích. Přehled stanovení "nových" protinádorových léčiv objevených po imatinibu shrnuje Tabulka I, vyjma cenartinibu, který je doposud ve fázi preklinického testování. Výběr léčiv je v souladu s náplní experimentální části disertace.

Tabulka I: Přehled stanovení některých dalších "nových" protinádorových léčiv v biologických vzorcích.

Léčivo (obchodní název)	Metoda	Biologický vzorek	Citace
bosutinib (Bosulif)	UHPLC- MS/MS	králičí plazma	[64]
dasatinib (Sprycel)	CV, DPV,SWV HPLC-FLD	lidské sérum, králičí plazma	[65] [66]
erlotinib (Tarceva)	HPLC-MS/MS	lidská plazma, plicní nádorová tkáň	[67]
pazopanib	HPLC-MS/MS	myší plazma, mozková tkáň	[68]
vatalanib	HPLC-MS/MS	lidská plazma	[69]

2.2.2.1 Simultánní stanovení TKI v reálném vzorku

Užití kombinace různých TKI může zkvalitnit léčbu nádorových onemocnění, a tudíž se existence bioanalytické metody pro simultánní stanovení různých TKI v klinické praxi může ukázat jako prospěšný nástroj pro sledování plazmatických koncentrací jednotlivých léků během léčby, aby nedošlo ke ztrátě léčebné odpovědi. Dsiadosz a kol. popsali validovanou metodu na stanovení sedmi léčiv (vatalanib, bosutinib, canertinib, tandutinib,

pazopanib, dasatinib - interní standard a erlotinib) v lidském séru, založenou na rychlé a jednoduché extrakci kapalina-kapalina (hexan:ethylacetát) pomocí HPLC-DAD [70]. S ohledem na výše zmíněný výskyt pokročilejších technik HPLC-MS či HPLC-MS/MS v klinických stanoveních je největší pozornost při vývoji nových metod věnována těmto technikám. Francia a kol. představili metodu pro plazmatické stanovení imatinibu, dasatinibu a nilotinibu na reverzních fázích s gradientovou elucí s mobilní fází ve složení acetonitril : voda s přídavkem 0,05 % kyseliny mravenčí. Analýza pomocí HPLC/MS trvala kolem 20 minut. Mez stanovitelnosti (LOQ) byla pro imatinib 78,1 ng/ml a pro dasatinib a nilotinib 62,5 ng/ml [71]. D'Avolio a kol. stanovili stejnou trojici léčiv v mononukleárních buňkách z periferní krve. Stanovení intracelulární hladiny léčiva je stejně důležité jako jejich plazmatické stanovení. V případě, že by lék účinně nevstoupil do buněk, dojde k výraznému snížení léčebné odpovědi. Buňky byly izolovány z odebrané krve pacientů (10 – 14 ml) pomocí centrifugace v hustotním gradientu na komerční vrstvě "Lymphoprep". Stejně jako Francia a kol. využili interní standard chinoxalin a obdobné složení mobilní fáze. Mez stanovitelnosti pro všechny léky byla 0,25 ng/ml [72]. Stanovení gefitinibu, erlotinibu, sunitinibu a sorafenibu je omezené jejich nedostatečnou přítomností chromoforů ve strukturách a tím pádem nedostatečnou citlivostí jejich UV detekce. HPLC-MS/MS jako jedna z mála pak může být použita pro jejich farmakokinetické stanovení při nízkých koncentracích. Extrakce vzorků krve (plazma, sérum a plná krev) byla provedena pomocí jednoduché techniky precipitace proteinů acetonitrilem [73]. Alavi-Tabari a kol. využili pro elektrochemické stanovení dasatinibu a doxorubicinu modifikovanou uhlíkovou elektrodu nanočásticemi oxidu zinečnatého a iontové kapaliny [74]. Jako první stanovili Haouala a kol. imatinib a pět dalších antileukemik (nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib a lapatinib) ve vzorcích plazmy [75]. Další studie stejnou metodou stanovuje šest léčiv (erlotinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib, sunitinib) [76] v lidské plazmě, zatímco jiná studie těchto šest léčiv (imatinib, sunitinib, nilotinib, dasatinib, pazopanib, regorafenib) spolu s dvěma aktivními metabolity (N - demethylovaný imatinib a N - desethylovaný sunitinib [77]. Největší počet, což je 17 TKI a dva metabolity stanovují v lidské plazmě Merienne a kol. [78]. Jedním z trendů v poslední době je ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), která nabízí extrémně rychlé analýzy oproti konvenční HPLC. UHPLC-MS/MS představili Zeng a kol. na stanovení tří TKI (imatinib, dasatinib a nilotinib) v plazmě [79], zatímco Bouchet a kol popsali vyvinutí analytické metody na stanovení devíti TKI v plazmě za užití SPE [80], která snižuje matricový efekt často se vyskytující při precipitaci proteinů. Ten je jedním z klíčových omezení při užití MS.

2.3 Nanočástice

Nanomateriály zaznamenaly v posledních letech "boom" díky svým fyzikálním a chemickým vlastnostem, které jsou závislé zejména na velikosti a které jsou odlišné od materiálu např. v řádech cm, ale také postupně i díky jejich uplatnitelnosti v komerční sféře pro vzrůstající aplikační potenciál. V této oblasti se studují všechny materiály vymezené v rozmezí 1 – 100 nm [81]. Tyto materiály disponují unikátními magnetickými, optickými, elektrickými a katalytickými vlastnostmi, které odráží jejich struktura. Nanočástice mohou být různých druhů, podle materiálu z jakého jsou vyhotoveny např. uhlíkové [82], magnetické [83], organické [84], kovové [85] apod. Pro moji práci jsou důležité zlaté nanočástice, které bývají na svém povrchu nejčastěji stabilizovány citrátovými anionty.

2.3.1 Nanočástice v medicíně

V současné době se aplikace nanočástic staly velice populární. Tabulka II podává přehled využití různých druhů nanočástic v současné medicíně.

Druh nanočástic	Aplikace	Citace
Magnetické nanočástice. liposomy, dendrimery, NPs polymery	Cílený transport léčiv Cílený monitoring	[83] [84]
Keramické nanočástice	Tkáňové inženýrství	[86]
Nanočástice oxidů (zejména oxidy železa)	Kontrastní látky pro MRI	[87]

Tabulka II: Přehled aplikací různých druhů nanočástic v medicíně.

Příslibem "růžové budoucnosti" může být např. "nanorobot" – hypotetické zařízení schopné pracovat na molekulární úrovni (manipulovat jednotlivými molekulami či pohybovat jejich svazky) a pozměnit chirurgii v méně invazní metodu [88].

2.3.2 Stanovení (malých) anorganických iontů pomocí CE

V případě stanovení malých, obvykle anorganických iontů (kationtů a aniontů) je iontová chromatografie (IC) metodou první volby. Přesto kapilární elektroforéza ukázala komplementárnost díky podobné selektivitě, navíc nabídla výhody v lepší separační účinnosti, kratší době analýzy a nízké spotřebě vzorku a všech ostatních chemikálií během analýzy. Jako první publikovali stanovení malých iontů pomocí CE Jandík a kol. pod názvem kapilární iontová elektroforéza (CIE) v roce 1991 [89] a firma Waters pod obchodním názvem kapilární iontová analýza (CIA) v témže roce [90]. Většina publikací zaměřuje svoji pozornost na výběr vhodného elektrolytu, který zásadně ovlivňuje selektivitu separace. Stanovujeme-li anorganické ionty pomocí CE, musíme brát v potaz otázku nepřímé UV detekce a modifikace elektroosmotického toku (EOF).

2.3.2.1 Nepřímá UV detekce

Chceme-li nejběžnějším UV/VIS detektorem získat signál u analytů, které nemají ve své molekule vhodný chromofor (funkční uskupení atomů které poskytuje charakteristickou absorbci v oblasti UV záření), pak jednou z možností, jestliže nebudeme uvažovat derivatizaci analytů, je nepřímá UV detekce. Principem je přídavek iontu označovaného jako proba či koion (ion s nábojem stejného znaménka jako analyty), který UV záření absorbuje. Proba se buď přidává do elektrolytu, nebo jí může být sám elektrolyt jako tomu je např. v případě chromanu. Jestliže máme v kapiláře elektrolyt, který UV záření absorbuje, pak putující zóny pro optický detektor představují zóny zředění a přítomnost neabsorbujících iontů v detekční cele, se následně projeví poklesem signálu, který na výsledném elektroferogramu poskytne negativní píky [91]. Detekci si lze zjednodušeně vysvětlit výměnou UV absorbujícího iontu/iontů za ionty analytu. Klíčovým pro získání nejlepších výsledků separace je zvážení znaménka a elektroforetické mobility absorbujících iontů [91, 92]. V případě velice odlišných elektroforetických mobilit mezi probou a analytem mají vrcholy píku tendenci "frontovat" (analyty migrují rychleji než proba) nebo "chvostovat" (analyty migrují pomaleji než proba), což zhoršuje účinnost separace, potažmo selektivitu i rozlišení [93]. Citlivost detekce je rovněž určena molárním absorpčním koeficientem proby a dále tzv. přenosovým poměrem [94]. Tyto dva faktory můžou být ovšem kontroverzní v případě, když malé ionty mají vysokou mobilitu. Silně absorbující proby jsou většinou vysokomolekulární látky s nízkou mobilitou, což vede k nízkému přenosovému poměru a vysoké elektrodisperzi. Z výše

popsaného vyplývá, že optimální systém pro stanovení malých iontů jako jsou např. aminy je nízkomolekulární proba s jedním nábojem, vysokou mobilitou a vysokým molárním absorpčním koeficientem [95].

Nespočetné množství studií nepřímé UV detekce iontů se detailněji zabývá problémem optimalizace separace a citlivostí detekce. Wang a Hartwick uvažovali pro lepší symetrii píků a zvýšení selektivy při nepřímé UV detekci o použití binárního systému (2 kyseliny a 1 báze). Ukázali teoreticky i prakticky model, kde mobilita analytu se nachází mezi mobilitou prob [96]. Dobble a Haddad pokračovali v této teorii na modelu stanovení anorganických a organických iontů (směsi 15 různých iontů) v elektrolytech, které obsahovali multisystém prob (2 - 3 proby) a hledali nejoptimálnější složení elektrolytu versus nejlepší podmínky separace. Opět došli k závěru, že analyt posunuje probu s nejpodobnější mobilitou a výhradně vytlačuje probu se stejnou mobilitou. Empiricky odvodili jednoduchý vztah mobility interferujících systémových píků v elektrolytu obsahujícího 2 proby vypočítáním mobility a příslušné koncentrace koiontu každého z nich [97].

2.3.2.1.1 Ovlivnění selektivity separace

Jak je známo, v CE lze selektivitu ovlivnit i přídavkem aditiv, což ovlivní elektroosmotický tok (EOF) změnou zeta potenciálu, viskozity a permitivity prostředí. Salimi-Moosavi a Cassidy studovali efekt přídavku methanolu a dimethylformamidu na separaci anorganických iontů a zaznamenali změny migračního pořadí vzhledem k systému bez přídavku aditiv [98]. Diress a Lucy studovali v rámci optimalizace elektrolytového systému pro separaci šesti aniontů koncentraci a pH elektrolytu a poté vliv methanolu. Po přídavku 30 % methanolu zaznamenali snížení doby separace pod 2, 5 min., čímž se potvrdilo, že přídavek organických aditiv má vliv nejen na selektivitu, ale též urychluje analýzu [99]. Vliv organických aditiv na stanovení aniontů (chloridy, dusičnany a sírany) v říční vodě studovali Yang a kol. v základním elektrolytu obsahujícím borátový pufr s přídavkem chromanu a CTAB. Přídavek 10 % methanolu ovlivnil migrační pořadí SO42- a NO3-. Iontv SO42migrovaly až za ionty Cl⁻ a NO³⁻ a nerušily tak stanovení těchto iontů v případě své vyšší koncentrace [100]. Chroman sodný se stal jedním z nejobvyklejších koiontů díky své vhodné mobilitě a vysokému absorpčnímu koeficientu, ale přesto skýtá omezení ve své nízké pufrační kapacitě. Dobble a kol. studovali pufrační kapacitu po přidání vhodného protiiontu v podobě báze. Rozpuštěný oxid chromitý byl titrován bází tris(hydroxymethyl)-aminomethanem (TRIS, pKa = 8,5) a diethanolaminem (DEA, pKa = 9,2) na pH blízko disociačním

konstantám bází. Tyto elektrolyty poskytly lepší opakovatelnost migračních časů analytů, stejně tak opakovatelnost velikosti ploch analytů. [101]. Jinými alternativami popsanými v mnoha studiích jsou aromatické karboxylové kyseliny jmenovitě pyromelitová [102] 2,6-naftalendikarboxylová [103], benzoová, ftalová, [104] a 5-sulfosalicylová [105].

Druhou otázkou v případě stanovení anorganických aniontů je ovlivnění EOF. V nepokryté kapiláře anionty migrují stejnou rychlostí, ale v opačném směru, než se pohybuje EOF a jeho obrácení je tak nezbytné pro optimalizaci doby analýzy (výrazně redukuje čas analýzy) a zlepšení selektivity. Obrácení EOF lze docílit modifikací stěny kapiláry tzv. dynamickým pokrytím pomocí modifikátorů EOF přidávaných do elektrolytu. Separace aniontů pak probíhá v módu EOF směřujícího k anodě a obrácené polaritě. K dynamickému pokrytí kapiláry se používají např. povrchově aktivní látky (PAL). Dochází v podstatě k nastolení dynamické rovnováhy mezi povrchem kapiláry a PAL. Míra snížení či obrácení EOF závisí na koncentraci přidané PAL. Aby došlo k obrácení EOF, musí koncentrace PAL v elektrolytu překročit kritickou micelární koncentraci (CMC) [106]. Jako modifikátory pro nepřímou UV detekci aniontů jsou obvykle užívány dlouhé alkylové řetězce povrchově aktivních látek, hexadecyltrimethylammonium bromid např. (CTAB), tetradecyltrimethylammonium bromid (TTAB) apod. [106, 107] S ohledem na rychlost EOF a potažmo migrační čas analytů je pro reprodukovatelnost důležité právě ustanovení dynamické rovnováhy mezi volným modifikátorem a absorbovaným modifikátorem na povrchu kapiláry. Za účelem udržení této rovnováhy byly studovány různé metody ustavení podmínek před analýzou prostřednictvím promytí kapiláry zásadou, pufrem nebo kyselinou. Ehmann a kol. prokázali, že proplach kyselinou místo proplachu pufrem před analýzou má signifikantní vliv na reprodukovatelnost migračních časů analytů, zejména při užití CTAB [108]. Stanovení anorganických iontů v systému 3 mM K₂CrO₄, jako UV absorbující složkou elektrolytu, 30 µM CTAB a 3 mM kyselině borité při pH 8,0 bylo použito ve vzorcích tekoucích a povrchových vod, kde bylo separováno a stanoveno 13 iontů [109]. Jiné studie popisují užití chromanového elektrolytu pro stanovení iontů ve vzorcích pitné, odpadní a podzemní vody [110], moči [111] či při zpracování bauxitu Bayerovým procesem [112, 113]. Je známo, že výbušniny obsahují charakteristické organické a anorganické složky. Sarazin a kol. využili tohoto faktu a představili simultánní stanovení 10 aniontů na reálném vzorku před- a povýbuchových reziduí v systému oxidu chromitého, chromanu sodného a TRIS (pH = 8,2) užitím CE. Metoda může posloužit i k identifikaci výbušnin v přírodním prostředí [114]. Geiser vyvinuli metodu na stanovení disiřičitanu a jeho oxidačního produktu ve farmaceutických substancích, kdy použili pyromelitová kyselinu jako UV absorbující složku a TTAB jako modifikátor EOF [115]. Stanovením stabilizátorů (kaprylát sodný a Nacetyltryptofan) a zbytků citrátu jako vedlejších produktu frakcionace v roztocích lidského albuminu pomocí nepřímé UV detekce se zabývala Jaworska a kol. Nejlepší podmínky separace poskytl elektrolyt obsahující mono- nebo dikarboxylové kyseliny [116].

2.4 Alloxan

Alloxan je spojován s diabetem již řadu let [117, 118]. První informace sahají do roku 1818, kdy tato organická látka byla prvně izolována Brugnatellim, ale jméno alloxan jí bylo přiděleno o 20 let později Wöhlerem a Liebigem [119], kteří popsali syntézu pyrimidinového derivátu oxidací kyseliny močové. O mnoho let později, až v roce 1943, se alloxan postupně stal významnou látkou ve výzkumu diabetu. Dunn a kol. prvně zpozorovali jeho toxický účinek na specifické pankreatické β-buňky u zvířat [120], načež po jejich selektivní destrukci ustává sekrece inzulinu až k jeho úplnému deficitu a rozvoji stavu odpovídajícímu diabetes mellitus I. typu u lidí. Od té doby je popsán a znám experimentální stav diabetes mellitus u zvířat nazývaný "alloxanový diabetes" [121]. Následné studie poukázaly, že tento diabetes lze vyvolat kromě králíků i u dalších zvířat (myši, krysy, opice, kočky či psa) [123, 124]. Alloxan je experimentálním zvířatům podávám perorálním způsobem, intraperitoneálně, intravenózně či subkutánně. Požadovaná efektivní dávka pro vyvolání stavu diabetu musí zohlednit druh zvířete, stav jeho výživy a také způsob podávání [125]. Potřebná intravenózní dávka k vyvolání diabetu u potkanů se udává 65 mg/kg t. hm. (tělesné hmotnosti) [126]. V případě, že alloxan je podáván intraperitoneálně či subkutánně, je potřeba pro efektivní účinek zvýšit dávku na trojnásobek hodnoty. Katsumata a kol. potvrdili, že dávka pod 150 mg/kg t. hm. u potkanů se jeví jako nedostatečná pro vyvolání diabetického stavu [127]. Jiná studie udává, že při intraperitoneálním podání je nejvíce efektivní dávka v rozmezí 170 – 200 kg/mg t. hm. [128]. Experimentálně bylo dále zjištěno, že vyhladovělá zvířata snáz podléhají účinkům, zatímco zvýšená hladina glukózy v krvi jim poskytuje částečnou ochranu [129]. Z výše uvedeného vyplývá, že vytvořit jasný vztah mezi podanou dávkou alloxanu a jeho koncentrací v pankreatu, která vyvolá morfologické a funkční změny tkáně, je prakticky nemožné. Zajímavostí navíc je, že lidská tkáň pankreatu, je na rozdíl od tkáně pankreatu potkanů a myší vůči alloxanu značně rezistentní, což může být způsobeno odlišnými mechanismy absorpce glukózy [130]. "Alloxanový diabetes" vykazuje klasické známky diabetu jako u lidí – hyperglykémii, výrazný úbytek hmotnosti, glykosurii (přítomnost cukru v moči), polydipsii (nadměrnou žízeň), polyurii (časté a vydatné močení), ketonurii (přítomnost ketolátek) a acidózu (překyselení organizmu) [131]. I z tohoto důvodu výzkum "alloxanového diabetu" pomohl porozumění patologie a fyziologie pankreatických β-buněk objasnit diabetes mellitus I. typu u lidí. Kromě indukce diabetu, byl prokázán také karcinogenní účinek alloxanu u potkanů a ryb. Dále může indukovat rakovinu adenohypofýzy u myší [132]. V roce 1994 Mrozikiewicz a kol. publikovali předběžnou studii dokumentující zvýšené hladiny alloxanu v krvi u některých dětských pacientů s diabetem I. typu, na základě čehož usuzují, že může existovat souvislost mezi zvýšenou hladinou alloxanu v organismu a mechanismem rozvoje inzulin-dependentního diabetu u člověka. Ve své práci spektrofotometricky stanovili fyziologické koncentrace alloxanu u zdravých jedinců kolem 2,20 μ g/ml, což je všeobecně považováno za hodnotu nedostatečnou pro indukci morfologických změn pankreatu u člověka. Oproti tomu u dětských pacientů s diabetem I. typu byly v některých případech koncentrace alloxanu v krvi až na úrovni 30 – 40 μ g/ml. Není pochyb, že tato hodnota je již k vyvolání morfologických změn pankreatu dostatečná [133]. Přestože se jedná o mimořádně zajímavé výsledky s dalekosáhlým potenciálním impaktem na studium etiologie diabetu, nebyly od té doby zveřejněny žádné další navazující studie, který by se touto problematikou zabývaly.

2.4.1 Alloxan z hlediska chemie

Z chemického hlediska je alloxan oxidovaný pyrimidinový derivát [(2,4,5,6tetraoxopyrimidin)] s poměrně jednoduchou strukturou (viz obrázek 5). Ve své molekule obsahuje 4 silné akceptory protonů a 2 silné donory protonů, díky nimž může přecházet na různé tautomerní formy, o nichž se předpokládá, že jsou zodpovědné za jeho biologickou aktivitu [134].



Obrázek 5: Struktura alloxanu

Vyskytuje se v hydratované formě jako monohydrát či tetrahydrát (obrázek 6), kdy aktivní karbonylová skupina je hydratována. Jak již publikovali ve své studii elektronových spekter alloxanu Patterson a kol., alloxan je stabilní okolo pH 7,0 a nestabilním se stává v kyselém a zásaditém prostředí. Hydratovaná karbonylová skupina má bazický charakter

a bude se ionizovat v kyselém prostředí (pKb < 1) oproti tomu karbamidová skupina je kyselá a bude se ionizovat v zásaditém prostředí (pKa 7,2 – 10,0). Vzhledem k jeho nestabilitě je vhodné připravovat roztoky v kyselém prostředí (pH 3,0) a hodnocení experimentálních výsledků při vyšším pH musí tuto nestabilitu brát v potaz [135]. Richardson a Cannan pomocí potenciometrických metod zjistili poločas rozpadu alloxanu okolo 1 min při pH 7,4 a teplotě 30° C [136]. Vzniklá kyselina alloxanová diabetické účinky už nevykazuje [137]. Z logiky věci stejný problém vyvstává při stanovení alloxanu *in vivo* za fyziologických podmínek. Pomocí jedné z nejcitlivějších spektrofotometrických metod (fluorimetrie) byly v roce 1945 stanoveny koncentrace alloxanu v plazmě psí i lidské, tak v moči pod 0,02 mg/100 ml [138], což bylo považováno za nedostačující koncentraci pro jeho stanovení. Na druhou stranu z hlediska rozpustnosti se jedná o poměrně dobře rozpustnou látku. V protických rozpouštědlech dosahuje maximální rozpustnosti v methanolu, nejmenší v ethan-1,2-diolu. V aprotických rozpouštědlech je lépe rozpustný v tetrahydrofuranu než v acetonu. Rozpustnost byla stanovována v teplotním rozmezí od 293,15 do 323,15 K [139].



Obrázek 6: Hydratované formy alloxanu: (A) monohydrát; (B) tetrahydrát

2.4.2 Alloxan z hlediska biologie

Ovlivnění procesu glykolýzy probíhá mutací genu ve specifických pankreatických buňkách. Jakožto strukturnímu analogu glukózy mu nic nebrání ve vstupu přes glukózový transportér (GLUT 2) v cytoplazmatické membráně do cytosolu buněk pankreatických ostrůvků, a jeho akumulaci v nich [140]. Selektivně blokuje sekreci inzulínu inhibicí enzymu glukokináza, čímž se značně sníží inzulínová sekrece β-buněk Langerhansových ostrůvků.

Mechanismus patofyziologického působení alloxanu je v zásadě dvojí. Jednak prostřednictvím inhibice glukokinázy (hexokinázy typ IV), nejcitlivějšího thiolového enzymu, fosforylujícího glukózu vstřebanou do buňky, omezuje produkci ATP oxidativní fosforylací a nepřímo tak potlačuje ATP signál sekrece inzulínu [141, 142]. Za druhé indukuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) v průběhu cyklické redoxní reakce s jeho redukčním produktem kyselinou dialurovou [143]. Takto vzniklé volné radikály kyslíku jsou toxické pro β-buňky a způsobí jejich nekrózu. Lenzen předkládá návrh schématu, podle kterého probíhá soubor redoxních cyklických reakcí mezi alloxanem a kyselinou dialurovou. Tvorbě ROS předchází redukce alloxanu na kyselinu dialurovou za přítomnosti redukčních činidel. Vysokou afinitu k reakci s karbonylovou skupinou alloxanu vykazují v buňkách thiolové sloučeniny, obsahující ve své molekule sulfanylovou skupinu (redukovaný glutathion GSH, cystein a sulfhydrolové skupiny vázané na proteiny). V případě glukokinázy, alloxan váže dvě SH skupiny v místě vazby glukózy s enzymem za vzniku disulfidických vazeb, čímž inaktivuje enzym. Inhibice glukokinázy přeruší glykolytický proces, potlačí fosforylaci glukózy a generování adenosintrifosfátu (ATP), v důsledku čehož potlačí signál ATP nezbytný k aktivaci enzymu. Postupně narůstá defekt inzulínové sekrece [144, 145]. Jedná se o velmi rychlý proces, k inhibici dojde do jedné minuty od expozice alloxanu [146]. Glukokináza tohoto typu není přítomna jen v buňkách tkáně pankreatu, rovněž v hepatocytech, které jsou vůči ROS odolnější a tak chráněné proti toxicitě alloxanu [147] [148]. Autooxidace kyseliny dialurové generuje další formy ROS (superoxidové radikály, peroxid vodíku a při Fentonově reakci (za přítomnosti železa jako katalyzátoru) také hydroxylové radikály) [149, 150]. Dalším faktorem hrajícím roli při diabetogenním působení alloxanu je porucha intracelulární homeostázy vápníku. Bylo zjištěno, že alloxan zvyšuje koncentraci Ca²⁺ β-buněk Langerhansových ostrůvků [151]. Zjednodušené schéma je možno vidět na obrázku 7.



Obrázek 7: Mechanismus alloxanem vyvolané tvorby reaktivních forem kyslíku v B buňkách potkaního pankreatu. GK_a – glukokináza aktivní, GK_n – glukokináza neaktivní, HA[•] - alloxanové radikály, [Ca₂⁺]_i – intracelulární koncentrace vápníku; upraveno [117].

2.5 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforézu (CE) řadíme mezi separační elektromigrační techniky. Jako každá analytická technika i tato nabízí mnohé výhody. Jmenovitě: malá spotřeba vzorku (μl - nl) [152], malá spotřeba rozpouštědel, vysoká separační účinnost (až miliony teoretických pater), rychlost analýzy a jednoduchost instrumentace. Nevýhodou CE je nižší detekční citlivost v případě spektrofotometrického detektoru vzhledem k malému průměru detekční cely. Citlivost CE metod lze zvýšit použitím prekoncentračních systémů či užitím jiného detektoru např. fluorescenčního či spojení CE s hmotnostní spektrometrií. V literatuře lze nalézt užití CE metod pro stanovení široké škály vzorků od malých molekul (např. léčiva), přes nanočástice [153], mikroorganismy [154] až po makromolekuly (např. proteiny či velké fragmenty DNA [155]) a široké škále odvětvích jakými jsou především farmaceutická analýza [156], potravinářská analýza [157] či environmentální analýza [158]. Trend moderní doby vede k rozvinutí miniaturizovaných systémů pro analýzu a dal rozvinout i tady mikrofluidice (elektroforéza na čipech) [159].

2.5.1 Teoretické aspekty kapilární elektroforézy

2.5.1.1 Elektroforetická pohyblivost

Separace probíhá v kapiláře o malém průměru v řádu desítek mikrometrů na základě rozdílů v pohyblivostech (mobilitách) iontů v elektrickém poli. Elektroforetická pohyblivost (mobilita) μe charakterizuje rychlost iontu v elektrickém poli (migraci) o jednotkové intenzitě E a je charakteristická pro každý ion. Její hodnoty uvažujeme konstantou pro daný ion pouze za ideálních podmínek, tj. kdy je extrapolována k nekonečnému ředění a mezi ionty předpokládáme úplnou disociaci látky ($\alpha = 1$).

$$\mu e = \frac{v}{E} \tag{1}$$

Pod vlivem elektrického pole působí na nabité částice síly dvojího charakteru: odporová (frikční) síla F_f daná Stokesovým zákonem, která pohyb iontu brzdí a elektrická síla F_e , která ion naopak uvádí do pohybu

$$Ff = -6\pi\eta rv \tag{2}$$

$$Fe = qE \tag{3}$$

kde η je dynamická viskozita prostředí, r je efektivní poloměr iontu (včetně solvatačního obalu), v je rychlost pohybu daného iontu, E je intenzita vloženého elektrického pole a q je náboj daného iontu.

Nastane-li stacionární stav, dojde k vyrovnání obou sil, a pro elektroforetickou pohyblivost iontu pak lze odvodit následující vztah:

$$\mu e = \frac{q}{6\pi\eta r} \tag{4}$$

Je nutné přihlédnout k faktu, že velikost a tvar částic se může značně lišit v důsledku solvatace v daném kapalném prostředí. Avšak pro teoretické výpočty se tato skutečnost zjednodušuje a uvažuje se, že ion má kulovitý tvar o efektivním poloměru r. Z výše uvedeného vyplývá, že částice s velkým nábojem a malým poloměrem budou mít elektroforetickou mobilitu značně větší a projdou kapilárou rychleji, oproti částicím, jejichž náboj je malý, ale poloměr je větší a budou mít mnohem menší elektrolytickou pohyblivost v daném prostředí. Neutrální molekuly mají nulovou elektrolytickou pohyblivost, protože mají nulovou hodnotu náboje q. Rovněž je znám vliv teploty na elektroforetickou mobilitu. Viskozita prostředí η je závislá na teplotě T, takže můžeme předpokládat, že s nárůstem teploty se bude elektroforetická pohyblivost zvyšovat, a tudíž lze očekávat i větší pohyblivost částic. V závěru lze podotknout, že elektroforetická pohyblivost není závislá na aplikovaném elektrickém napětí na koncích kapiláry.

V praxi se však elektroforetická pohyblivost liší od experimentálně změřené a zavádí se tzv. efektivní pohyblivost (hodnota bývá menší), která zohledňuje vlastnosti základního elektrolytu (pH, iontová síla) a další látky (např. organická rozpouštědla) přidávané do elektrolytu [160 - 162].

$$\mu_{eff} = \alpha \,.\,\mu \tag{5}$$

2.5.1.2 Elektroosmotický tok

Vliv elektroosmotického toku dává zavést další veličině tzv. zdánlivé elektroforetické mobilitě μ_{av} , která je vektorovým součtem elektroforetické mobility μ_{ep} a elektroosmotické mobility μ_{eof}

$$\mu_{av} = \mu_{ep} + \mu_{eof} \tag{6}$$

Elektroosmotický tok je druhým důležitým transportním jevem v elektroforetickém systému, který zprostředkovává pohyb analytů v kapiláře. Jeho vznik je přikládán přítomnosti silanolových skupin na vnitřním povrchu křemenné kapiláry, které jsou schopné disociace.

$$-Si-OH + H_2O \rightleftharpoons -Si-O^- + H_3O^+$$

V prostředí kyselého pH nad 3 – 4 (pKa 3 – 5) jsou silanolové skupiny záporně nabité a jejich náboj je vysycen naadsorbovanou vrstvou protiiontů ze základního elektrolytu, čímž vzniká na vnitřním povrchu kapiláry elektrická dvojvrstva [163]. Tato elektrická dvojvrstva je tvořena tzv. Sternovou vrstvou (nepohyblivou) a difúzní vrstvou (pohyblivou). Sternova vrstva vzniká bezprostředně vedle nabitého vnitřního povrchu kapiláry s protiionty, které v ní jsou nepohyblivé díky silným elektrostatickým interakcím. Protiionty mimo Sternovu vrstvu tvoří vrstvu difuzní. Zde jsou ionty vázány slabší elektrostatickou interakcí a můžou se pod vlivem vloženého elektrického pole pohybovat směrem ke katodě a s sebou strhávat i okolní prostředí uvnitř kapiláry. Tento jev nazýváme elektrosmotickým tokem. Difúzní vrstva je charakterizována zeta potenciálem ζ , který vzniká na rozhraní vrstev a lze si ho představit jako elektrické rozhraní vrstvy [164] (obr. 8).



Obrázek 8: Vznik elektrické dvojvrstvy na povrchu kapiláry; upraveno [165].

Rychlost elektroosmotického toku lze pak definovat vztahem:

$$veof = \mu eof. E \tag{7}$$

kde *µeof* je již výše zmíněná elektroosmotická mobilita a *E* je intenzita elektrického pole

Elektroosmotická pohyblivost (mobilita) je pak vyjádřena vztahem:

$$\mu_{eof} = \frac{\zeta \,\varepsilon}{4\pi\eta} \tag{8}$$

kde ϵ je relativní permitivita prostředí, ζ je zeta potenciál, η je dynamická viskozita prostředí.

Díky EOF můžeme stanovit pomocí CE během jedné analýzy kationty i anionty, kde kationty budou díky svému zápornému náboji migrovat jako první a anionty budou následně migrovat po nich. Mezi nimi se pohybují neutrální látky, které však všechny migrují stejnou rychlostí, bez separace, z důvodu absence náboje. Jako hybná síla CE může ovlivnit dobu analýzy i rozlišení separace [166].

Je nasnadě, že EOF lze ovlivnit faktory, které ovlivňují disociaci. Na EOF má signifikantní vliv pH a iontová síla základního elektrolytu. Zvýšením iontové síly elektrolytu dochází ke stlačení elektrické dvojvrstvy (ovlivňujeme zeta potenciál), redukuje se EOF a to obvykle vede k nárůstu doby analýzy. EOF ovlivňuje i přídavek organických rozpouštědel do základního elektrolytu prostřednictvím změny disociace a viskozity prostředí [167]. Nejčastěji používanými jsou methanol a acetonitril [168].

V některých případech (eliminace adsorpce analytů na vnitřní stěnu kapiláry) je na místě EOF zpomalit, potlačit či dokonce změnit jeho směr. Jednou z nejčastějších možností jak ovlivnit EOF je modifikace povrchu kapiláry tzn. navázání určitých skupin látek na vnitřní povrch kapiláry. Běžně užívané postupy zahrnují přídavek další komponenty do základního elektrolytu (dynamické pokrytí), trvalým navázáním polymeru (kovalentní pokrytí) či aplikace radiálního elektrického pole. Dynamické pokrytí lze provést užitím některých aminů (např. kadaverin, putrescin, spermidin), polymerů (např. polybren, polyethylen oxid, polydimethylakrylamid) či povrchově aktivních látek typu kationtových tenzidů např. CTAB či DDAB, které dokáží EOF zpomalit, eventuálně se vzrůstající koncentrací až obrátit [169]. Poměrně známou možností je semipermanentní pokrytí kapiláry užitím několika vrstev tzn. kde negativně nabitý povrch kapiláry je pokryt pozitivně nabitým polybrenem, poté negativně
nabitým dextransulfátem, opět pozitivně nabitým polybrenem atd. Vytvořená vrstva je velmi stabilní a umožňuje provést více než 100 analýz, aniž by došlo k jejímu znehodnocení [170].

2.5.1.3 Techniky kapilární elektroforézy

V rámci CE máme na výběr z několika různých technik lišících se svým uspořádáním a mechanismem separace. Jmenovitě kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární gelová elektroforéza (CGE), izotachoforéza (CITP), kapilární izoelektrická fokusace (CIEF) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). CZE je nejužívanějším módem z nich. Jedná se o poměrně jednoduchou techniku, která užívá základní elektrolyt a separace probíhá na základě elektroforetických mobilit jednotlivých analytů. Využití nachází pro stanovení nabitých látek [171]. CGE se odlišuje tím, že separace probíhá v kapiláře naplněné gelem a molekuly jsou separovány na základě svých mobilit a velikostí skrz póry gelu. Tato technika je vhodná pro separaci makromolekul např. proteinů [172]. CITP je charakteristická použitím diskontinuálních elektrolytů - vedoucí (obsahuje koion s nejvyšší mobilitou) a koncový elektrolyt (obsahuje koion s nejnižší mobilitou). Během analýzy dochází k separaci analytů do úzkých vzájemně sousedících zón podle klesající elektroforetické pohyblivosti a je možné separovat pouze ionty jednoho znaménka [173]. V případě CIEF je separace uskutečněna v pH gradientu vytvořeném užitím směsi amfolytů jako elektrolytu, kde separace látek je pak na základě rozdílů v jejich izoelektrickém bodě pI [174]. MEKC (kombinace chromatografie a elektroforézy) je poslední technikou, kde jsou do elektrolytu přidány surfaktanty v koncentraci dostatečné pro vytvoření micel a separace pak probíhá na základě rozdělovací rovnováhy analytu mezi vytvořenou pseudostacionární fázi a vodnou fázi [175].

3 CÍLE PRÁCE

Cíle této práce lze shrnout do tří bodů:

- Vývoj rychlé a účinné metody simultánní separace sedmi nových antileukemik pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) s UV detekcí a micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) zejména pro rychlou farmaceutickou kontrolu. Validace metody. Test robustnosti.
- Vývoj rychlé a jednoduché metody při stanovení kyseliny citrónové pomocí CZE s nepřímou UV detekcí. Analýza uvolněného množství kyseliny citronové ze vzorků zlatých nanočástic po jejich umístění do jiných pufrů. Validace metody.
- 3. Vývoj metody pro separaci alloxanu a jeho prekurzorů pomocí CZE s UV detekcí. Stabilitní studie alloxanu a jeho produktů simulací skladování mouky v různých prostředích pomocí přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

Komponenty základních elektrolytů: kyselina fosforečná, kyselina boritá, kyselina ftalová, hydroxid sodný, hydroxid amonný, kyselina octová, TRIS, DMSO, SDS, CTAB, DDAB, PB, MOPS, kyselina trichloroctová, chlorid sodný, 1-propanol, acetonitril byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Standardy: bosutinib, dusičnan amonný, molybdenan amonný, kyselina citronová, alloxan, kyselina barbiturová, kyselina močová byly též zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Standardy: imatinib, dasatinib, pazopanib, erlotinib, canertinib a vatalanib byly zakoupeny od firmy LC Laboratories (Woburn, USA). Zlaté nanočástice (20 nm) stabilizované citrátem byly taktéž zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Všechny použité chemikálie byly čistoty p. a.

4.2 Instrumentace

Analýzy byly prováděny na instrumentu kapilární elektroforézy HP ^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) s detektorem s diodovým polem (DAD). Pro analýzy byly použity nepokryté křemenné kapiláry (MicroSolv Technology Corporation, NJ, USA) o vnitřním průměru 50 µm s celkovou délkou 33,0 cm a efektivní délkou 24,5 cm v případě stanovení antileukemik nebo s celkovou délkou 48,5 cm a efektivní délkou 40,0 cm v případě stanovení citrátu ve vzorcích nanočástic a stanovení alloxanu. Prostor kapiláry během všech analýz byl termostatován na 25°C. V případě stanovení léčiv a alloxanu, byla každý den před prvním experimentem kapilára promývána 10 min 0,1 M NaOH, 20 min deionizovanou vodou a 10 min příslušným elektrolytem. V případě stanovení citrátu, byla každý den před prvním experimentem kapilára promývána 10 min 0,1 M NaOH, 20 min deionizovanou vodou, 30 min polybrenem a 10 min příslušným elektrolytem. Mezi jednotlivými experimenty byla kapilára promývána 2 min 0,1 M NaOH, 3 min deionizovanou vodou a 5 min příslušným elektrolytem. Veškeré promývání bylo automatické, tlakem 925 mbar.

Elektrolyty byly připravovány rozpuštěním vypočteného množství kyseliny v deionizované vodě (18 MΩcm, Millipore, USA), následně bylo pH byl upraveno titrací příslušnou bází (např. 50 % (w/w) NaOH). Pro CE-MS byly elektrolyty připravovány ve vodě zakoupené od firmy Merck (LC-MS kvalita). V případě použití aditiv byla aditiva přidávána až k finálnímu roztoku po titraci pH. Všechna měření byla prováděna 5 x, není-li uvedeno v textu jinak.

4.3 Příprava vzorků

Zásobní roztoky roztoky šesti léčiv – antileukemik byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml v methanolu, pazopanib byl rozpuštěn v DMSO. Roztoky byly poté ředěny v deionizované vodě na přípravu pracovních roztoků na požadované koncentrace. Všechny roztoky byly uchovávány v podmínkách pod -20°C bez přístupu světla. Zásobní roztoky modelové směsi (chlorid sodný, molybdenan amonný, dusičnan amonný a kyselina citronová) pro separaci aniontů (chloridový, molybdenanový, dusičnanový a citrátový) byly připraveny v koncentraci 1 mg/ml v deionizované vodě a poté ředěny deionizovanou vodou na přípravu pracovních roztoků. Zásobní roztoky alloxanu spolu s kyselinou barbiturovou a močovou byly připraveny v koncentraci 1 mg/ml v deionizované vodě a poté ředěny deionizovanou vodou na přípravu pracovních roztoků.

Vzorky zlatých nanočástic (5 nm, 10 nm, 20 nm a 50 nm) byly koupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Použité nanočástice byly skladovány v lednici při teplotě 4°C.

Pro analýzu mouky byl vybrán vzorek bělené mouky z USA, Gold Medal, zakoupený v běžném obchodním řetězci (Walmart). Mouka byla poskytnuta spolupracujícím pracovištěm FN Ostrava (MUDr. Václav Procházka, Ph.D.). K naváženému cca 1 g mouky byl přidán standard alloxanu (2 mg), popřípadě 0 mg (blank – slepý pokus). Vzorky mouky byly extrahovány kyselým výluhem. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml 0,01 M HCl a vzorek byl sonifikován po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni. Po dekantaci byl supernatant odebrán, přefiltrován přes stříkačkový filtr (0,45 μm, PTFE, Membrane Solutions) a dávkován přímo do hmotnostního spektrometru.

Pro analýzu alloxanu ve vzorcích krve byla použita krev zdravého dobrovolníka. Krev byla ihned po odběru zamražena na -80°C a takto uchována až do analýzy. Vzorky krve byly před analýzou upraveny. Bylo provedeno rychlé rozmražení vzorku a následná deproteinace

kyselinou trichloroctovou (TCA). 350 μ l vzorku bylo smícháno se 650 μ l 1 mol/l TCA a směs byla promíchána na vortexu po dobu 5 s. Posléze byla sonifikována v ultrazvuku po dobu 30 s a následně centrifugována po dobu 1 minuty při 5000 otáčkách/min. Supernatant byl zfiltrován přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,45 μ m a rekonstituován methanolem. Ke vzorku krve byl přidáván standard alloxanu (finální koncentrace 1 x 10⁻⁴ mol/l) v různých fázích procesu jejího zpracování následujícím způsobem: a) do plné krve, b) do deproteinované krve c) do filtrované krve.

Se všemi vzorky krve bylo nakládáno jako s potenciálně infekčním materiálem. Byly použity základní ochranné pomůcky pro práci s infekčním materiálem a odpad byl ukládán do zvláštních kontejnerů a následně zlikvidován předepsaným způsobem.

4.4 Validace metod

Identifikace píků analytů byla prováděna porovnáváním UV spekter a metodou standardních přídavků ("spajkování") jednotlivých analytů. K validaci bylo použito vyhodnocení pomocí statistického programu QC Expert 2.5 (TriloByte Statistical Software, Pardubice, Česká republika). Přesnost v rámci jednoho dne byla vyhodnocena z kalibračních závislostí na příslušných koncentračních hladinách vztažením ke koncentraci interního standardu. Jednotlivé kalibrace byly měřeny po určené dny s tím, že byla spočtena průměrná hodnota relativní směrodatné odchylky. Přesnost v rámci více dnů byla poté určena jako relativní směrodatné odchylka všech měření v určených dnech. Meze detekce (LOD) a meze kvantifikace (LOQ) byly odhadnuty v použitém softwaru jako hodnoty 3S/N a 10S/N. Výtěžnost byla spočítána jako podíl mezi známým přidaným množstvím analytu a vzorku bez přídavku analytu.

4.5 Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií (CE-MS)

Pro analýzy hmotnostní spektrometrií s přímým nástřikem byl využit hmotnostní spektrometr Agilent 6460 (Agilent, Waldbronn, Německo) s trojitým kvadrupólovým analyzátorem. Stříkačková mikropumpa (New Era Pump System, Farmingdale, NY, USA) byla využita pro dopravu vzorku do elektrospreje. Průtok byl nastaven na hodnotu 3 μl/min. Software MassHunter, verze B.06.00, byl použit pro ovládání přístroje i sběr signálu. Data byla sbírána po stabilizaci signálu nejméně 3 minuty a pak bylo analyzováno průměrné spektrum.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Separace nových léčiv pro léčbu leukémie pomocí kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí

Jak je známo, pH elektrolytu má signifikantní vliv na ionizaci silanových skupin na vnitřní stěně kapiláry a elektroforetickou mobilitu analyzovaných složek [37]. Všechny analyty (imatinib, bosutinib, dasatinib, pazopanib, erlotinib, canertinib a vatalanib) mají poměrně podobnou strukturu (obr. 9) a jejich disociační konstanty (pKa) se pohybují v rozmezí 2,3 – 5,0 (odhadnuto programem MarvinSketch) [176]. Je tak patrné, že budou kladně nabité v kyselé oblasti pH a proto bylo zvolené nízké pH pro experimenty v módu kapilární zónové elektroforézy (CZE) a vysoké pH pro experimenty v módu micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC), kde naopak budou všechny analyty neutrální.



Obrázek 9: Struktury analytů protinádorových léčiv.

5.1.1 Vývoj metody

V rámci hledání optimálních CZE podmínek byl zvolen jako startovací pufr fosfátový pufr o koncentraci 100 mM a kyselá oblast 2,0 – 3,0. Nejprve byl studován vliv pH na separaci všech sedmi analytů během jedné analýzy. Jako protiionty v pufru byly použité sodíkové ionty. Efekt pH byl studován při pH 2,0; 2,25; 2,5; 2,75 a 3,0. Úplnou separaci, tj. separaci všech sedmi analytů poskytlo pH 2,75, a proto byla tato hodnota vybrána pro další experimenty. Ostatní hodnoty pH poskytly pouze částečnou separaci.

Dalším studovaným parametrem byl vliv protiiontů. Protiionty jsou dalším důležitým parametrem, který může ovlivnit separaci prostřednictvím jejich interakce s analyty. Rovněž je možná jejich interakce se silanovými skupinami na stěně kapiláry a tím změna zeta potenciálu potažmo EOF. Za tímto účelem byl fosfátový pufr o koncentraci 100 mM titrován pomocí TRIS na pH 2,75; ovšem nebyl zaznamenán žádný signifikantní vliv v efektivních mobilitách analytů oproti použitým sodným iontům.

Posledním studovaným parametrem byla koncentrace elektrolytu. Je obecně známo, že iontová síla má vliv jak na elektroosmotický tok, tak na vlastní separaci látek, neboť ovlivňuje disociaci. Zvýšení koncentrace elektrolytu vede ke snížení EOF. Byly studovány tři koncentrace fosfátového elektrolytu: 50 mM, 75 mM a 100 mM. Nižší koncentrace elektrolytu opět neposkytly separaci všech sedmi analytů. Nejlepší separace byla získána při koncentraci 100 mM. Vyšší koncentrace nebyla zkoušena z důvodu generování relativně velkého elektrického proudu (při použití této koncentrace byl generován proud 60 μ A při +15 kV). Vyšší koncentrace by tak pravděpodobně vedly ke generování Jouleova tepla a tím k horší opakovatelnosti analýz.

Pod optimalizovanými podmínkami proběhla analýza všech sedmi analytů do osmi minut v následujícím migračním pořadí: vatalanib; imatinib; bosutinib; canertinib; dasatinib; pazopanib; erlotinib (obrázek 10A).

Jako další otázka v rámci vývoje metody na separaci všech sedmi léčiv byl řešen mód MEKC. Pro tyto experimenty, jak již bylo výše zmíněno, byla použita zásaditá oblast a byly studovány dva elektrolyty. Jako startovací elektrolyt byl zvolen borát/NaOH o koncentraci 100 mM a pH 9,5.

Významným parametrem v MEKC je přídavek tenzidu (např, SDS) a tvorba micel. Přídavek SDS ovlivní separací tím, že ovlivňuje retenční faktory analytů. Byly studovány následující koncentrace SDS: 50 mM, 75 mM, 100 mM a 150 mM. Žádná z těchto koncentrací nevedla k separaci všech analytů. Jako druhý studovaný elektrolyt byl 50 mM fosfát/NaOH pH 8,0 s přídavkem SDS o koncentracích 10 mM, 25 mM a 50 mM. V tomto případě byla získána opět pouze částečná separace analytů (4 píky) a navíc analýza trvala okolo 30 min (obrázek 10B). Proto pro další kroky byla vybrána CZE separace v optimalizovaných podmínkách (100 mM fosfát NaOH pH 2,75).



Obrázek 10: CZE a MEKC elektroferogram protinádorových léčiv;

(A) CZE: BGE: 100 mM fosfát/NaOH pH 2,75; separační napětí 25 kV, teplota 25°C, hydrodynamické dávkování 5 s tlakem 50 mbar, koncentrace analytů: vatalanib, imatinib, canertinib and dasatinib 10 μ g/ml; bosutinib 100 μ g/ml; pazopanib 33 μ g/ml; erlotinib 25 μ g/ml; (B) MEKC: BGE: 50 mM fosfát/NaOH pH 8,00; separační napětí 25 kV, teplota 25°C, hydrodynamické dávkování 5 s tlakem 50 mbar, koncentrace všech analytů: 10 μ g/ml.

Doposud byla všechna léčiva stanovena odděleně jednotlivými analýzami. Vyvinutá metoda umožňuje stanovit všech sedm léčiv během jediné analýzy. Další výhodou je její rychlost (analýza je hotova do 8 minut) a jednoduchost. Vyvinutá metoda může být použita pro kontrolu kvality léčiv ve farmaceutickém průmyslu.

5.1.2 Validace metody

U vyvinuté metody za použití následujících optimálních podmínek byly validovány základní parametry metody, viz tabulka III. Relativní směrodatné odchylky migračních časů (RSD t_m) analytů nepřesáhly 0,9 % a RSD ploch (area) byly nižší než 6,6 % vyjma pazopanibu (12,4 %). V tomto případě lze usuzovat degradaci pazopanibu během analýz. Je zřejmé, že vyvinutá metoda poskytuje dobré výsledky umožňující její použití pro farmaceutickou analýzu (koeficienty determinace pro všechny analyty byly vyšší než 0,96).

Léčivo	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
	Přesi	nost korig	ovaných n	nigračních	n časů		
RSD (%) jednodenní ^a	0,2	0,4	0,2	0,3	0,4	0,4	0,3
RSD (%) mezidenní ^a	0,5	0,8	0,6	0,5	0,9	0,8	0,6
	Pì	esnost ko	rigovanýc	h ploch pí	Ŕů	1	I
RSD (%) jednodenní ^a	2,2	2,7	3,7	3,9	4,7	8,5	2,1
RSD (%) mezidenní ^a	5,5	4,4	5,5	4,1	6,4	12,4	6,6
		Výtěžnost	(recovery)), kalibrac	e		
Výtěžnost (%) ^b	95,33	i.s.	96,26	100,41	83,6	95,52	85,58
Linearita (µg/ml)	5 - 100	5 - 100	5 - 100	5 - 100	5 - 100	5 - 100	5 - 100
Koeficient determinace	0,9989	i. s.	0,9992	0,9990	0,9634	0,9993	0,9999
Limity detekce a kvantifikace							
LOD ^c (µg/ml)	0,5	0,9	2,0	1,5	0,5	0,5	0,75
LOD ^c (µg/ml)	1,7	3,0	6,7	5,0	1,7	1,7	2,5

Tabulka III: Parametry validace vyvinuté metody

(a) vatalanib, (b) imatinib, (c) bosutinib, (d) canertinib, (e) dasatinib, (f) pazopanib, (g) erlotinib

^a Přesnost jednodenní ("intraday") byla počítána z kalibrací z poměru plochy píku a plochy píku interního standardu (imatinib 100 μ g/mL) jako průměr z kalibračních závislostí (kalibrace 5 μ g/mL až 100 μ g/mL, 6 bodů, n = 5) měřených v jednom dni, přesnost mezidenní ("interday") byla vypočtena jako průměr z kalibračních závislostí (kalibrace 5 μ g/mL až 100 μ g/mL, 6 bodů, n = 5) měřených po 3 po sobě jdoucích dnech.

^bLOD a LOQ hodnoty byly vypočteny softwarem QC Expert (Pardubice) jako hodnoty 3σa 10σ.

[°]Výtěžnost byla vypočtena z přídavku 10 μg/ml standardů jednotlivých léčiv do směsi standardů 7 léčiv.

5.1.3 Test robustnosti

Pro zhodnocení robustnosti validované metody byl použit Youdenův test robustnosti. [176]. Bylo testováno sedm vybraných parametrů metody (Tabulka IV.). Parametry proměnných byly zvoleny podle nejčastějších zdrojů změn podmínek v laboratoři např. při přípravě roztoků, nestabilita teploty v laboratoři či změny způsobené přístroji např. stará UV lampa. Pro návrh 8 experimentů byla použita kombinace faktorů, viz příloha P1. Výsledky těchto experimentů (migrační časy a velikosti ploch) jsou uvedeny v přílohách P2 a P3. Z těchto výsledků pak byly vypočteny tzv. kontrasty představující změny migračních časů a velikosti ploch. Nakonec byly kalkulovány intervaly spolehlivosti vypočítaných kontrastů (viz příloha P4 - P10), kde se metoda prokázala býti robustní pro všechny analyty (jelikož kontrasty na úrovni spolehlivosti 0,05 nejsou statisticky významné, což svědčí o tom, že přesnost stanovení není ovlivněna malými změnami laboratorních podmínek).

	Analytický	"X "	"X"
	parametr	(nominální hodnota)	(proměnná)
A /a	pH elektrolytu	2,75	2,6
B/b	Koncentrace elektrolytu	100 mM	100 mM
C /c	Teplota	25°C	25°C
D/d	Napětí	20 kV	20 kV
E /e	Doba dávkování	5 s	5 s
F/f	Tlak dávkování	50 mbar	50 mbar
G /g	Vlnová délka	214 nm	214 nm

Tabulka IV: Analytické parametry a odchylky pro hodnocení robustnosti metody

5.2 Stanovení citrátu uvolňovaného z povrchu zlatých nanočástic pomocí CZE s nepřímou UV detekcí

Nanočástice bývají na svém povrchu stabilizovány během syntézy, což brání jejich agregaci. Nejčastěji užívaným stabilizačním činidlem je citrát (kyselina citrónová), především v případě zlatých (Au NPs) a stříbrných nanočástic (Ag NPs). Nicméně, citrát v případě zlata a stříbra není kovalentně vázán k povrchu. Tento fakt vedl k myšlence, že pokud jsou nanočástice vloženy do elektrolytu obsahujícího různé koionty, pak zákonitě dochází ke změně povrchu nanočástic a celkově ke změně chování nanočástic v tomto prostředí. Tento velmi výrazný efekt lze pozorovat při studiu nanočástic pomocí CE (např. nanočástice mají různou mobilitu v prostředí o stejném pH, stejné iontové síle, nicméně různém chemickém složení), která je známým nástrojem pro charakterizaci nanočástic [177]. Stejný efekt lze předpokládat, i pokud jsou nanočástice přítomny např. v buňkách.

5.2.1 Stanovení kyseliny citronové pomocí CZE s nepřímou UV detekcí

Pro studium množství citrátu uvolňovaného z povrchu nanočástic, je nejprve nutné vyvinout vhodný elektrolytový systém pro nepřímou UV detekci. Jako modelová směs byly vybrány anionty: molybdenanový, citrát, chloridový a dusičnanový. Chloridový a dusičnanový byly vybrány na základě toho, že se používají při syntéze NPs a mohly by být zdrojem interferencí. Molybdenanový byl použit jako interní standard, vzhledem k jeho nepravděpodobnosti výskytu ve vzorcích nanočástic a podobnému elektroforetickému chování k ostatním analytům.

5.2.1.1 Vývoj metody

První otázkou v rámci vývoje metody s nepřímou UV detekci je výběr vhodné UV absorbující proby. Ta má mít co nejbližší mobilitu vzhledem k analytu (citrátu). Díky tomu byla vybrána kyselina ftalová (odhad softwarem Peakmaster s korekcí na iontovou sílu pro pH 5,5; μ (ftalát) = - 37,5 x 10⁻⁹ m² V⁻¹ s⁻¹, μ (citrát) = - 46,2 x 10⁻⁹ m² V⁻¹ s⁻¹). Kyselina ftalová byla použita jako základní elektrolyt. Nejdříve byl studován efekt koncentrace kyseliny ftalové a to o koncentracích 1 mM, 5 mM, 15 mM a 30 mM vytitrované NaOH na pH 5,5. Při těchto experimentech byla kapilára pokryta polybrenem. Nejlepší separaci všech 4 analytů poskytla koncentrace 5 mM.

Při stanovení aniontů pomocí CZE je naprosto zásadní otázka změny směru EOF, čehož bylo dosaženo dynamickým pokrytím kapiláry. Jako druhý krok byl studován efekt modifikátoru EOF, kdy byly vybrány kationtové tenzidy CTAB a DDAB (oba v koncentraci 10 mg/mL), které byly přidány přímo do elektrolytu a polymer PB, kterým byl použit k pokrytí vnitřní stěny kapiláry před analýzou (promytí po dobu 30 minut). Jako elektrolyt byla použita výše popsána 5 mM kyselina ftalová vytitrovaná NaOH na pH 5,5. Nejlepší výsledky (opakovatelnost migračních časů) byly získány při pokrytí s PB.

Posledním byl studován efekt pH použitého elektrolytu. Bylo testováno pH 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 a 7,0 opět s NaOH jako protiionty. Nejlepšího rozlišení separace a tvaru píků bylo dosaženo při pH 6,5.

Za optimalizovaných podmínek (5 mM ftalát/NaOH pH 6,5) bylo dosaženo separace všech čtyř iontů do 2 minut s následujícím migračním pořadím: chloridový, dusičnanový, molybdenanový a citrát (obr. 11).



Obrázek 11: CZE separace aniontů s nepřímou UV detekcí

BGE: 5 mM ftalát/NaOH pH 6,5; separační napětí - 15 kV, teplota 25°C, hydrodynamické dávkování 5 s tlakem 50 mbar, koncentrace analytů: 50 μg/ml.

5.2.1.1 Validace metody

Dalším krokem byla validace metody pro stanovení kyseliny citrónové. Základní analytické parametry metody jsou uvedeny v tabulce V. Kalibrační závislosti byly lineární v oblasti mezi 10 μ mol/l a 100 μ mol/l (5 bodů; n = 5), s koeficientem determinace 0,998.

Parametr	Hodnota		
Přesnost korigovaných migračních časů ^a			
RSD (%) jednodenní ^a ,	0,6 %		
RSD (%) mezidenní ^a	1,5 %		
Přesnost korigov	vaných ploch ^a		
RSD (%) jednodenní ^a	2,8 %		
RSD (%) mezidenní ^a	4,5 %		
Výtěžnost (recovery), kalibrace			
Výtěžnost (%) ^b	96,4 %		
Rovnice regrese	y = 8470 (27) x 12 (5)		
Koeficient determinace	0,9978		
Limit detekce a kvantifikace			
LOD ^c (µmol/l)	7,0		
LOQ ^c (µmol/l)	22		

Tabulka V: Parametry validace vyvinuté metody

^aPřesnost jednodenní ("intraday") byla počítána z kalibrací z poměru plochy píku a plochy píku interního standardu (molybdenan amonný 50 mmol/l) měřených po 3 po sobě jdoucích dnech, přesnost "mezidenní" ("interday") byla vypočtena jako průměr z kalibračních závislostí měřených po 3 sobě jdoucích dnech (každý den 3 měření). Koncentrace kyseliny citronové byla 0,1 mmol/l.

^b Výtěžnost byla vypočtena z přídavku 0,5 mmol/l standardu kyseliny citronové ke vzorku Au NPs.

 c LOD a LOQ hodnoty byly vypočteny softwarem QC Expert (Pardubice) jako hodnoty $3\sigma a$ 10 $\sigma.$

5.2.1 Stanovení citrátu ve vzorcích zlatých nanočástic pomocí CZE s nepřímou UV detekcí

Jak již bylo popsáno, dáme-li nanočástice zlata, původně stabilizované kyselinou citrónovou, do prostředí např. MOPS pufru, dojde ke změně jejich náboje, což se projeví např. jejich různým elektroforetickým chováním. Pravděpodobně dochází k výměně iontů mezi povrchem nanočástic a elektrolytem. Pro studium tohoto modelového případu, tj. uvolnění kyseliny citrónové z povrchu nanočástic v prostředí MOPS pufru, je nutné dobře zvolit pracovní elektrolyt. Pokud dávkujeme vzorek nanočástic s uvolněným citrátem v MOPS pufru, je MOPS přítomen ve velkém nadbytku. Pokud by MOPS migroval rychleji než citrát, byl by pravděpodobně pík kyseliny citrónové nedetekovatelný. Nicméně podle softwaru Peakmaster má citrát pohyblivost -53,0 x 10^{-9} m² V⁻¹ s⁻¹, zatímco ionty MOPS mají nižší pohyblivost (MOPS -4,6 x 10^{-9} m² V⁻¹ s⁻¹), takže zvolený systém (pH 6,5) je vhodný pro toto stanovení.

Komerčně prodávané zlaté nanočástice (20 nm), které jsou na svém povrchu stabilizovány citrátem, byly použity jako modelový vzorek. Tyto NPs mají odlišný zeta potenciál v různých elektrolytech běžné používaných v CE (např.: $-11 \pm 1 \text{ mV v} 50 \text{ mM}$ acetátu pH 4,5; $-28 \pm 2 \text{ mV v} 50 \text{ mM}$ MOPS pH 7,5 nebo $-77 \pm 3 \text{ mV v} 50 \text{ mM}$ borátu pH 9,5 (všechny údaje byly měřeny pomocí přístroje Malvern Zetasizer). Se změnou zeta potenciálu souvisí i migrace těchto NPs v elektrolytech. Změny v zeta potenciálu popsané výše jsou pravděpodobně způsobeny ligandem/iontovou výměnnou rovnováhu, kde jsou citrátové ionty vyměněné jinými ionty z roztoku, jak je poznamenáno také v nedávné publikaci [178]. Pro studium tohoto efektu byla přidána různá množství MOPS do vzorků NPs a po 30 minutách kvantifikováno množství uvolněného citrátu z povrchu NPS pomocí výše popsané vyvinuté metody. Za výše popsaných optimálních podmínek byla provedena CZE analýza nanočástic (obr. 12) a to se stejnými výsledky, jaké předpovídal program Peakmaster. Je zřejmé, že metoda může být použita pro studium množství citrátu uvolňovaného ze vzorku nanočástic.



Obrázek 12: CZE elektroferogram citrátu ve vzorku Au NPs, BGE: 5 mM ftalát/NaOH pH 6,5; separační napětí - 15 kV, teplota 25°C, hydrodynamické dávkování 5 s tlakem 50 mbar, koncentrace analytů: 50 µg/ml.

Závislost plochy píku citrátu na koncentraci MOPS je nelineární (obr. 13). Plocha píku citrátu byla konstantní do přídavku 5 mmol/l MOPS, poté křivka lineárně rostla až do přídavku 0,3 mol/l MOPS, kde pravděpodobně došlo k vysycení povrchu nanočástic, resp. ustanovení rovnováhy mezi citrátovými a MOPS ionty na povrchu nanočástice. Je patrné, že přídavek elektrolytu mění iontové chování NPs. Tento účinek taktéž odráží, že NPs nejsou stabilizovány kovalentně. Závěrem lze konstatovat, že tato práce potvrzuje, že chování nanočástic může být např. v přítomnosti biologických struktur (proteiny, buňky, DNA) odlišné od jejich chování ve vodném prostředí. Tato informace může být naprosto zásadní pro studium NPS v živých organismech, kde mají sloužit jako potenciální "nanopřenašeči" léčiv v živých systémech a kde vyvstává otázka, zda tato cílená terapie může být úspěšnou, když celulární prostředí *de facto* mění chování NPs.



Obrázek 13: Příklad závislosti plochy citrátu na koncentraci přídavku MOPS.

5.3 Separace alloxanu a jeho prekurzorů pomocí kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí

Alloxan je v posledních dvou dekádách považován rovněž za kontroverzní látku díky hypotéze jeho vzniku v průběhu procesu bělení mouky. Bělená mouka ("bleached flour") se v Evropě příliš nepoužívá, nicméně je hojně využívána v USA. Zároveň, obzvlášť v USA, je pozorován zvýšený výskyt diabetu, zejména u dětí. Jedna z teorií říká, že tento zvýšený výskyt diabetu může být důsledkem přítomnosti alloxanu v bělené mouce. Ve Spojených státech jsou ovšem chlór a chlornany (používané pro bělení mouky) považovány za bezpečné sloučeniny pro potravinářské zpracování, konkrétně chlór spadá do seznamu přídatných látek podle Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). [179]. V jiných zemích platí zákaz přidávat alloxan do jakékoliv potraviny [180]. Tyto látky mohou v procesu oxidačních reakcí produkovat alloxan jako minoritní složku mouky, (viz dále). Literatura uvádí, že alloxan vzniká jako vedlejší produkt oxidace proteinů, čímž proces bělení mouky, při němž se mouka stává "čistější" a "bělejší", se vlastně stává toxickým [181]. Mouka sama o sobě podléhá přirozeným procesům stárnutí během svého skladování, kdy probíhá řada oxidačních reakcí zahrnujících reakcí s karotenoidy a sulfhydrylovými skupinami proteinů [182]. Potravinářský průmysl za účelem tento proces urychlit a získat tak dřív "kvalitnější" mouku cíleně přidává bělící prostředky do mouky (benzoylperoxid, plynný chlor, oxid chloričitý, nitrosylchlorid a oxidy dusíku) [183]. Probíhající oxidační procesy mohou modifikovat složky mouky [184] a hypoteticky produkovat toxické látky jako je alloxan. Fukayama a kol. publikovali studii, ve které se zabývají spojitostí bělících prostředků mouky a diabetem [185]. V současné době existuje pouze jedna odborná studie potvrzující přítomnost alloxanu ve vzorcích bělené mouky. Giaccone a kol. analyzovali 175 vzorků ze 3 druhů mouk získaných přimo od výrobce či ze sicilských supermarketů pomocí LC-MS/MS s pre-kolonovou derivatizací alloxanu na alloxazin [186]. Alloxan nalezli pouze ve variantě označované jako "cake bleached flour" (42 vzorků mouk) s LOD 0,73 mg/kg a výtežností mezi 94 % až 102 %. Kvůli derivatizaci je metoda LC-MS/MS pracná a časově náročná, z tohoto důvodu jsem se zaměřila na vývoj metody na stanovení alloxanu pomocí CE.

5.3.1 Vývoj metody

Kyselého charakteru alloxanu, kyseliny močové a kyseliny barbiturové bylo využito v CZE experimentech. V zásaditém prostředí se budou tyto sloučeniny chovat jako anionty (obr. 14). Z tohoto důvodu byl jako výchozí elektrolyt pro prvotní experimenty vybrán bazický elektrolyt - borát sodný. Spolu s alloxanem byly při analýze dále separovány kyselina barbiturová a kyselina močová, možné syntetické prekurzory alloxanu, které lze ale i využít v kontrolní fázi potravin jako interní standardy (kyselina barbiturová se v potravinách pravděpodobně vyskytovat nebude).



Obrázek 14: Struktury: (A) alloxan, (B) kyselina barbiturová, (C) kyselina močová.

V rámci optimalizace podmínek byl nejprve testován efekt pH borátu (50 mM) při hodnotách 8,0; 8,25; 8,5; 8,75 a 9,0. Nejlepší separace dle rozlišení a tvaru píků bylo dosaženo při pH 8,0 (úplná separace). Následně byl studován efekt koncentrace elektrolytu. Byly studovány tyto koncentrace borátu: 25 mM, 50 mM, 75 mM a 100 mM. Optimální hodnota byla 50 mM. Nižší koncentrace vedly k širším píkům, zatímco vyšší koncentrace způsobily nestabilitu elektrického proudu při analýzách. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo při pH 8,0. Tyto podmínky vedly k separaci všech tří analytů do 2 minut. (obr. 15).



Obrázek 15: CZE separace alloxanu, kyseliny barbiturové a močové; BGE: 50 mM borát/NaOH pH 8,0; separační napětí 20 kV; 25°C; hydrodynamické dávkování po dobu 5 s, tlakem 50 mbar, koncentrace analytů 50 µg/mL.

Dalším významným parametrem ovlivňující rychlost analýzy je separační napětí. Ovlivňuje jak migrační čas analytů, tak vznikající Jouleovo teplo. Napětí bylo studováno v rozsahu od 5 kV až po 30 kV v optimálních podmínkách (50 mM borát/NaOH pH 8,0), za hydrodynamického dávkování vzorku tlakem 50 mbar po dobu 5 s. Optimální hodnota byla 10 kV. Při nižších hodnotách napětí dochází k prodloužení migračních časů analytů a tedy i analýzy, naopak v případě vyššího napětí dochází ke zvýšenému generování Jouleova tepla a analýza se stává neopakovatelnou.

Poslední parametr, který je potřeba brát v potaz, je vliv teploty. Stejně jako napětí i teplota ovlivňuje délku analýzy díky ovlivnění viskozity prostředí. Efekt teploty byl studován při 25°C, 40°C a 60°C. Optimální hodnota byla 25°C. Zvýšení teploty urychlí analýzu změnou viskozity prostředí, ale zároveň způsobí nestabilitu signálu, jelikož se bude generovat více Jouleova tepla.

Na základě výše uvedeného je zřejmé, že není potřeba testovat přídavky aditiv, protože separace všech tří analytů je úplná, rychlá a s dostatečným rozlišením.

5.3.2 Stanovení základních parametrů metody

Vyvinutá metoda byla částečně validována. Základní parametry metody jsou uvedeny v tabulce VI.

Parametr	Hodnota		
Přesnost korigovaných migračních časů ^a			
RSD (%) jednodenní ^a ,	1,2		
Přesnost korigovaných ploch ^a			
RSD (%) jednodenní ^a	4,7		
Kalibrace			
Linearita (µmol/l)	10 - 100		
Rovnice regrese	y = 217 (12) x 101 (26)		
Koeficient determinace	0,993		
Limit detekce a kvantifikace			
LOD ^b (µmol/l)	8		
LOQ ^b (µmol/l)	27		

Tabulka VI: Základní parametry vyvinuté metody

^aPřesnost jednodenní "intraday" byla počítána z kalibrací z poměru plochy píku a plochy píku interního standardu (kyselina barbiturová 50 μ g/ml) měřených po 3 po sobě jdoucích dnech. ^b LOD a LOQ hodnoty byly vypočteny softwarem QC.Expert (Pardubice) jako hodnoty 3 σ a 10 σ .

5.3.2.1 Analýza alloxanu pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

Jak bylo popsáno výše, před úplnou validací metody mi bylo umožněno, využít přístroje CE-MS pro analýzu alloxanu. Tato možnost je z pohledu analýzy reálných vzorků (z pohledu identifikace) natolik zajímavá, že jsem se rozhodla využít této možnosti.

Nejprve byl analyzován vodný roztok alloxanu o koncentraci 10⁻⁴ mol/l ve skenovacím režimu, aby bylo zjistěno MS spektrum alloxanu. Použité podmínky pro MS detekci jsou v následující tabulce (Tabulka 7).

Parametr	Podmínky	
Sprejovací napětí	-4000 V	
Tlak nebulizačního plynu	15 psi (1 psi = 6894,76 Pa)	
Průtok nebulizačního plynu	10 1/min	
Teplota plynu	300°C	
Napětí na fragmentoru	70 V	

Tabulka VII: Parametry MS detekce pro pilotní studii alloxanu

V MS spektru alloxanu (obr. 16) je patrný molekulový ion alloxanu $[M-H]^-$ o m/z 141, dále jeho "adukt s vodou" představující kyselinu alloxanovou $[M-H+H_2O]^-$ o m/z 159 a dekarboxylovanou formu kyseliny alloxanové $[M-H+H_2O-CO_2]^-$ o m/z 115 (Δ m/z 44 představuje logickou ztrátu CO₂).



Obrázek 16: Příklad MS spektra alloxanu

5.3.2.1.1 Optimalizace MS parametrů

Dalším krokem byla optimalizace parametrů MS detekce pro dosažení co nejlepšího signálu alloxanu. Bylo měněno sprejovací napětí v rozsahu -4,0 kV, -3,5 kV, -3,0 kV a -2,5 kV, teplota nebulizačního plynu v rozsahu 150°C, 200°C, 250°C a 300°C a napětí na fragmentoru v rozsahu 135 V, 120 V, 100 V, 90 V, 80 V, 70 V a 60 V. Nejlepšího signálu bylo dosaženo při použití sprejovacího napětí -3,0 kV, teploty nebulizačního plynu 200°C a napětí na fragmentoru 70 V. První dva parametry ovlivňovaly stabilitu elektrospreje, zatímco

poslední parametr především podobu MS spektra – při použití výrobcem nastaveného napětí 135 V byl detekován pouze produktový ion o m/z 59.

5.3.2.1.2 Studium fragmentace v MS

Po této optimalizaci bylo přistoupeno ke studiu fragmentace alloxanu a kyseliny alloxanové pomocí skenu produktových iontů (m/z 141 a m/z 159) při kolizních energiích 0, 2, 5, 10, 15 a 20 eV. V případě alloxanu (m/z 141) vzniká při nízkých kolizních energiích (2 a 5 eV) pouze jediný produktový ion o m/z 59. Pravděpodobně se jedná o ion vzniklý fragmentací obou vazeb CO-NH ve struktuře alloxanu. V případě kyseliny alloxanové (m/z 159) dochází opět při nízkých kolizních energiích (2 a 5 eV) k tvorbě fragmentu o m/z 115, m/z 59 a m/z 42. Nejintenzivnější ion o m/z 115 odpovídá již zmíněnému odštěpení CO₂ (Δ m/z 44). Zbylé ionty odpovídají pravděpodobně fragmentům vzniklým štěpením CO-NH vazeb, viz obrázek 16.

Pro potvrzení této hypotézy byla fragmentována molekula kyseliny barbiturové, která má obdobnou strukturu jako alloxan. Zároveň byla kyselina barbiturová využita i jako interní standard v předchozím studiu – vývoji metody na stanovení alloxanu pomocí CE s UV detekcí.

Kyselina barbiturová má molekulový ion [M-H]⁻ o m/z 127. Tento je i optimálně pozorovatelný v předchozích podmínkách (200°C, -3,0 kV) s použitím napětí na fragmentoru 135 V. V případě použití 70 V je pozorovatelný molekulový ion s velmi malou intenzitou, zatímco nejvyšší intenzitu má produktový ion o m/z 59. Kolizní spektrum kyseliny barbiturové (při 200°C, -3,0 kV, napětí na fragmentoru 70 V a kolizní energii 15 eV) poskytuje produktové ionty o m/z 84, 59, 42 a 40.

Z výše uvedeného je zřejmé, že pro CE-MS analýzu alloxanu v případě analýzy v MRM módu ("multiple reaction monitoring") bude nutné pro identifikaci využít jak vlastní migrační čas, tak hmotnostně-spektrometrická data. Alloxan totiž poskytuje pouze jediný fragmentační přechod m/z 141 \rightarrow 59, kde produktový ion ale není charakteristický (kyselina barbiturová jej poskytuje rovněž). Jako charakteristický proces se ve vodě jeví hydrolýza alloxanu (m/z 141) na kyselinu alloxanovou (m/z 159) a její dekarboxylace (m/z 115). Nicméně kyselina alloxanová je již z pohledu struktury jinou molekulou, která může mít jiné elektroforetické vlastnosti a může dojít k její separaci od alloxanu. A proto ani tento proces nemusí být charakteristický pro vlastní identifikaci alloxanu. Proto bude pro identifikaci nutné použít i data ze separace (např. migrační čas).

5.3.2.2 Studium hydrolýzy alloxanu

Výše popsaný jev hydrolýzy alloxanu na kyselinu alloxanovou je v literatuře popsaný (viz teoretická část) jako relativně rychlý proces. Pokud by tento proces byl velmi rychlý (rychlejší než je vlastní separace), tak nemusí dojít k odseparování alloxanu a kyseliny alloxanové pomocí kapilární elektroforézy (bylo by možné využít tento jev pro identifikační účely). Na druhou stranu je ale popsáno, že kyselina alloxanová na rozdíl od alloxanu nevyvolává experimentální diabetes, takže *de facto* by bylo daleko zajímavější mít informace o koncentraci alloxanu než o koncentraci obou látek dohromady.

Pro ověření rychlosti hydrolýzy byl proveden pokus, při kterém byl alloxan smíchán s vodou a ihned analyzován pomocí MS. Doba od prvního kontaktu vody s alloxanem do nástřiku do MS byla 20 sekund (poločas rozpadu alloxanu v organismu byl publikován jako 1 minuta). Na následujícím obrázku 17 je vidět srovnání MS spekter průměrovaných z měření po 0,5 - 0,8 minutě a po 4,5 - 4,8 minutě od smíchání alloxanu s vodou.



Obrázek 17: Srovnání MS spekter alloxanu po kontaktu s vodou (A) po 0,5 – 0,8 min; (B) po 4,5 – 4,8 min.

Z obrázku je vidět různé poměrné zastoupení alloxanu a kyseliny alloxanové (m/z 141 ku m/z 159). Nicméně zároveň je zřejmé, že již po 20 s od kontaktu alloxanu s vodou dochází ke vzniku kyseliny alloxanové. Nižší čas analýzy od kontaktu vody s alloxanem není v současnosti experimentálně dosažitelný z důvodu ručního míchání alloxanu s vodou. Zajímavé je, že poměr alloxanu (m/z 141) a kyseliny alloxanové (m/z 159) se po ustanovení jisté "rovnováhy", cca po 1,5 minutě, už nemění. Zároveň jsou tyto ionty ve stejném poměru

intenzit detekovatelné ve stejném vzorku (alloxan rozpuštěný ve vodě) i po 48 hodinách. Z toho vyplývá, že pravděpodobně je rovnováha tvorby kyseliny alloxanové natolik rychlá, že nebude možné detektovat alloxan samostatně. Nicméně alloxan, resp. kyselina alloxanová jsou ve vodném prostředí stabilní i 48 hodin.

5.3.2.3 Stabilitní studie alloxanu

V dalších experimentech byla testována stabilita alloxanu v dalších prostředích. Nejprve bylo studováno chování alloxanu v prostředí 0,01 mol/l NaOH a 0,01 mol/l HCl. V kyselém prostředí byl alloxan (m/z 141) i kyselina alloxanová (m/z 159 a 115) detekována. Zatímco v zásaditém prostředí byla detekována jen kyselina alloxanová (m/z 159 a 115) a řada dalších iontů odpovídajících pravděpodobně aduktům (včetně sodných aduktů) a hydrolytickým produktům (nebyly dále identifikovány). Tato skutečnost je zásadní z pohledu vývoje metody pro kapilární elektroforézu, kde je optimální použití právě zásaditého prostředí. Zároveň je otázkou, zdali předchozí studium (CE-UV s použitím borátového elektrolytu o pH 8,0) skutečně umožňuje detekci alloxanu.

Z tohoto důvodu bylo provedeno další studium stability pomocí MS – alloxan byl dávkován v prostředí acetátu/NH₄OH pH 8,0, formiátu/NH₄OH pH 8,0 (prostředí vhodná pro CE-MS) a v prostředí borátu/NaOH pH 8,0. V prostředí acetátu byly pozorovány ionty o m/z 115, 141 a 159 (byl detekován alloxan i kyselina alloxanová), nicméně nejvyšší intenzitu měl fragment o m/z 59. Ve formiátu byl pozorován pouze ion o m/z 115 a 159 (kyselina alloxanová), nicméně s velmi malou intenzitou. Z výše uvedeného vyplývá, že obě prostředí, která jsou vhodná pro spojení CE s MS, neposkytují dostatečnou odezvu alloxanu. Pravděpodobně dochází k hydrolytickým procesům, stejně jako v prostředí hydroxidu sodného.

Posledním studovaným prostředím byl borát/NaOH pH 8,0. V tomto prostředí byl alloxan i kyselina alloxanová pozorována (m/z 115, 141, 159). Byla studována koncentrace 1 mM, 5 mM a 20 mM. Se zvyšující se koncentrací sodných iontů dochází k tvorbě aduktů ve spektru a převaze dalších iontů. Nicméně pokud je použitý NH₄OH místo NaOH na přípravu borátového elektrolytu, pak dochází k lepší ionizaci a detekci jak alloxanu, tak kyseliny alloxanové (viz obr. 18) s 5 mM borát/NH₄OH pH 8,0).



Obrázek 18: MS spektrum alloxanu v 5 mM borát/NH₄OH pH 8,0.

Použití borátu pravděpodobně stabilizuje alloxan v zásaditém prostředí a díky tomu je možné jej analyzovat jak pomocí spojení CE-MS, tak i ve spojení CE-UV.

Je otázkou, zda je alloxan, resp. kyselina alloxanová detekovatelná i v jiných prostředích než ve vodě, např. v organických rozpouštědlech. Z toho důvodu byl alloxan rozpuštěn v methanolu, propanolu a acetonitrilu a byl přímo dávkován do MS. Ve všech případech byl pozorován jak signál odpovídající alloxanu (m/z 141) tak signál odpovídající kyselině alloxanové (m/z 115 a 159). Nicméně, intenzity těchto signálů byly rozdílné oproti analýze ve vodě (viz obr. 19). Samozřejmě intenzity signálů se mění nejen různou hydrolýzou alloxanu, ale především různou ionizací v těchto prostředích.



Obrázek 19: Srovnání MS spekter alloxanu v organických rozpouštědlech (A) methanolu, (B) propanolu a za (C) acetonitrilu.

Alloxan byl popsán jakožto relativně málo stabilní sloučenina ve vodném prostředí. Je tedy otázkou, zdali by v případě jeho hypotetického vzniku v mouce nedošlo k rozkladu např. již v průběhu skladování mouky. Z tohoto důvodu byla připravena následující série experimentů, kdy byl odvážen alloxan do vzorků bělené mouky a tyto byly podrobeny různé sérii skladování a úprav (viz tabulka níže). Mouka byla upravena dle postupu uvedeného v Experimentální části práce. Pokud byl pozorován signál o m/z 115, 141 a 159 (o intenzitě alespoň 5 %), vyhodnotila jsem, že vzorek obsahuje alloxan, pokud tyto signály nebyly ve spektrech přítomny, vzorek alloxan neobsahoval. Signály pouze kyseliny alloxanové (m/z 115 a 159) bez signálu alloxanu (m/z 141) nebyly pozorovány. Stejně tak nebyl pozorován samotný signál alloxanu.

Podmínky	Závěr MS	
Mouka bez alloxanu,	Neobsahuje allovan	
5 dnů uskladněná při teplotě laboratoře (23°C)	neoosanuje anoxan	
Mouka s alloxanem,	Alloxan přítomen	
5 dnů uskladněná při teplotě laboratoře (23°C)		
Mouka s alloxanem,	Alloxan přítomen	
5 dnů uskladněná v lednici (8°C)		
Mouka s alloxanem,	Alloxan přítomen	
5 dnů uskladněná při zvýšené teplotě (60°C)		
Mouka bez alloxanu,	Nachashuia allovan	
působení UV záření po dobu 60 minut		
Mouka s alloxanem,	Alloxan přítomen	
působení UV záření po dobu 60 minut		
Mouka bez alloxanu,	Neobsahuje alloxan	
působení teploty 150°C po dobu 60 minut		
Mouka s alloxanem,	Alloxan přítomen	
působení teploty 150°C po dobu 60 minut		

Tabulka VIII: Přehled podmínek úpravy a skladování vzorků a jejích vyhodnocení

Z výše uvedeného vyplývá, že alloxan je stabilní při výše uvedených podmínkách, které simulují jednak uskladnění mouky, jednak proces zpracování mouky (UV dezinfekce,

případně pečení). Je samozřejmě otázkou, jak velkou roli má na přítomnost alloxanu vzdušná vlhkost, která byla v tomto případě na hodnotě přibližně 20 %. Bohužel experimenty s řízenou vlhkostí nebylo možné dosud provést, protože laboratoř nedisponuje tímto vybavením.

5.3.2.4 Studium přítomnosti alloxanu v krvi

Další otázkou je, zdali po injekci alloxanu do krevního řečiště (pro vyvolání diabetu), dojde ke stabilizaci alloxanu nebo nikoliv, resp. jak moc dojde k změně struktury alloxanu na kyselinu alloxanovou, která již diabetes nezpůsobuje. pH krve bývá v rozmezí 7,36 – 7,44, což představuje rozmezí, které by nemělo způsobit ani kyselou ani zásaditou hydrolýzu. Krev samozřejmě obsahuje vodu, tj. zřejmě může dojít k procesu tvorby kyseliny alloxanové. Hypoteticky je i možné, že i přes rychlý rozpad alloxanu může dojít k jeho transportu až do místa účinku, protože srdce je schopno přečerpat celý objem krve do jedné minuty.

Ověření této hypotézy ale není jednoduché, protože přímá analýza přítomnosti alloxanu v krvi není technicky jednoduchá (krev obsahuje mnoho látek a zároveň velké množství NaCl, což znesnadňuje ionizaci). V tomto případě byla nejprve testována možnost detekce alloxanu v prostředí o vysoké koncentraci NaCl (150 mM). MS spektra obsahovala majoritně samozřejmě ionty odpovídající aduktům NaCl (m/z 35, 93, 151, 211, 269, 327 apod.). Nicméně i v těchto podmínkách byly po přídavku alloxanu detekovány ionty o m/z 115, 141 a 159. Alloxan je tedy možné detekovat i v prostředí o vysoké koncentraci NaCl.

Jako poslední krok bylo testováno, zdali by bylo možné detektovat alloxan v deproteinované krvi pomocí přímého nástřiku do MS. Alloxan byl s krví smíchán těsně před nástřikem do MS. MS spektrum vzorku obsahujícího alloxan odpovídalo složité matrici, nicméně alloxan byl i v této matrici detekován (m/z 141), viz obrázek 20. Je zajímavé, že ve stejném vzorku po 10 minutách stání již nebylo možné alloxan detekovat.



Obrázek 20: Příklad MS spektra alloxanu v krvi.

Celé výše uvedené studium je příslibem pro vývoj metody na stanovení alloxanu pomocí spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Je vidět, že stabilita alloxanu hraje důležitou roli ve vývoji metody a zároveň může hrát roli i v případě detekce alloxanu v biologických vzorcích.

6 ZÁVĚR

V této práci jsem se snažila představit možnosti stanovení nízkomolekulárních látek pomocí kapilární elektroforézy prostřednictvím tří aktuálních témat, zejména v oblasti medicíny. V první části mé práce byla vyvinuta a validována metoda simultánního stanovení sedmi relativně nových protinádorových léčiv pomocí CZE. Ve druhé části práce pak byla vyvinuta metoda pro stanovení citrátu uvolňovaného z povrchu zlatých nanočástic rovněž pomocí CZE po přidání MOPS iontů k nanočásticím. Metoda zahrnovala použití obráceného elektroosmotického toku a nepřímé UV detekce. V poslední části práce pak byla vyvinuta metoda pro separaci alloxanu spolu s jeho prekurzory pomocí CZE a následovala stabilitní studie alloxanu v mouce Gold Medal (USA) pomocí přímého nástřiku alloxanu do hmotnostního spektrometru. Lze konstatovat, že kapilární elektroforéza se ukázala být vhodnou technikou pro studium a stanovení všech tří řešených skupin nízkomolekulárních látek. Vyvinuté metody poskytují rychlou, jednoduchou a efektivní analýzu a mohou sloužit ke kontrole kvality v případě léčiv ve farmaceutickém průmyslu a v případě alloxanu v potravinářském průmyslu, kde mohou být obě komplementární k vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC).

7 SEZNAM ZKRATEK

ABL	Nádorový vir Abelson (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog)
ALL	Akutní lymfatická/lymfoblastická leukémie (acute lymphocytic/lymphoblastic
	leukemia)
ATP	Adenosintrifosfát
ARG	gen kódující protein argináza
BCR	"Breakpoint cluster region protein"
BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda (Boron – doped diamond electrode)
BGE	Základní elektrolyt (background electrolyte)
CE	Kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CEC	Kapilární elektrochromatografie (capillary electrochromatography)
CIA	Kapilární iontová analýza
CIE	Kapilární iontová elektroforéza
CIEF	Kapilární izoelektrická fokusace (capillary isoelectric focusing)
CITP	Kapilární izotachoforéza (capillary isotachophoresis)
CGE	Kapilární gelová elektroforéza (capillary gel electrophoresis
CLL	Chronická lymfatická/lymfoblastická leukémie (chronic
	lymphocytic/lymphoblastic leukemia)
CMC	Kritická micelární koncentrace (Critical Micelle Concentration)
CML	Chronická myeloidní leukémie (chronic myeloid leukemia)
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromid
CV	Cyklická voltametrie
DAD	Detektor s diodovým pole
DDAB	Didodecyldimethylammonium bromid
DEA	Diethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPV	Diferenční pulzní voltametrie
ELISA	Enyzmová analýya s imunosorbentem (Enzyme – linked immunosorbent assay)
EGRF	Receptor pro epidermální růstový faktor (the epidermal growth factor receptor)
EOF	Elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
ESI	Ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
FAB	Francouzsko – americko – britská klasifikace
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léči

FIA	Průtoková injekční analýza
FLD	Flourescenční detektor
GIST	Gastrointestinální stromální tumor (gastrointestinal stromal tumor)
GKa	Glukokináza aktivní
GKn	Glukokináza neaktivní
GSH	Glutathion
HMDE	Visící rtuťová kapková elektroda (hanging mercure drop electrode)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid
	chromatography)
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
IC	Iontová chromatografie
KIT	protoonkogen kódující transmembránový receptor tyrosin-kinázy III. Typu (c-
	KIT)
LL	Lymfatická/lymfoblastická leukémie (lymphocytic/lymphoblastic leukemia)
LOD	Limit detekce (limit of detection)
LOQ	Limit stanovitelnosti (limit of quantification)
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie (micellar electrokinetic
	chromatography
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonová kysleina
MRM	Sledování více reakcí (multiple reaction monitoring)
MS	Hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry)
MS/MS	Tandemová hmotnosntní spektrometrie (tandem mass spectrometry)
MRI	Magnetická rezonance (magnetic rezonance imaging)
mRNA	Messenger RNA
NACE	Nevodná kapilární elektroforéza (nonaqueous capillary electrophoresis)
NK	"Přirozený zabíječ" (natural killer cell)
NP	Nanočástice
PAL	Povrchově aktivní látka
PAMAM	Poly(amidoamin) dendrimer
PB	Polybren
PDGRF – R	Receptor pro destičkový růstový faktor (Platelet-derived growth factor
	receptor)
QD	Kvantové tečky (Quantum dot)
RCC	Renální karcinom (renal cell carcinoma)

RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Superoxidové radikály (reactive oxygen species)
RTK	Receptor tyrosinkináz
RT-PCR	Reverzní transkripce s následnou polymerázovou řetězovou reakcí (reverse
	transcription polymerase chain reaction)
SDS	Dodecylsulfát sodný
SMIL	Postupné vícenásobné iontově polymerní vrstvy
SPE	Extrakce na pevné fázi
Src	protoonkogen kódující nereceptorickou tyrosinkinázu
SWV	Square wave voltametrie (voltammetry)
SWAdSV	Square wave adsorpční rozpouštěcí voltametrie (adsorptive stripping
	voltammetry)
TCA	Kyselina trichloroctová
TKI	Inhibitor tyrosinkináz
TMBE	Methyl - <i>terc</i> - butylether
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTAB	Tetradecyltrimethylammonium bormid
UV	Ultrafialová oblast (ultraviolet)
UHPLC	Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra - high performance liquid
	chromatography)
VEGRF	Receptor pro vaskulární endoteliární růstový faktor (vascular endothelial
	growth factor receptor)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

8 POUŽITÁ LITERATURA

[1] P. Jandík, G.Bonn: *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*. Wiley-VCH New York 1993.

[2] J. P. Landers (ed.): *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Techniques*. CRC Press 2008.

[3] J. V. Melo, T. P. Hughes, J. F. Apperley: Chronic Myeloid Leukemia, Hematology 2003 (2003) 132-152.

[4] S. Chiaretti, G. Zini, R. Bassan: *Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemi*, Mediterr J Hematol Infect. Dis. 6 (2014) e2014073.

[5] R. Bassan, G. Gatta, C. Tondini, R. Willemze: *Adult acute lymphoblastic leukaemia*, Critical Reviews in Oncology/Hematology 50 (2004) 223-261.

[6] T.- J. Zhang, J. Lin, J.- D. Zhou, X.- X. Li, W. Zhang, H. Guo, Z.- J.Xu, Yang Yan, J. - Ch. Ma, J. Qian: *High bone marrow miR-19b level predicts poor prognosis and disease recurrence in de novo acute myeloid leukemia*, Gene 640 (2018) 79-85.

[7] S. G. Musharraf, A. J. Siddiqui, T. Shamsi, A. Naz: Serum metabolomics of acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia for probing biomarker molecules, Hematol Oncol. 35 (2017) 769-777.

[8] T. Zíma a kol.: Laboratorní diagnostika. Galén Karolinum Praha 2007.

[9] C. Rozman, E. Montsserat: *Chronic lymphocytic leukemia*, N. Engl. J. Med. 19 (1995) 1052-1057.

[10] C. M. Wendtner, M. Gregor: *Current perspectives on the role of chemotherapy in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia & Lymphoma 59 (2018) 300-310.

[11] K. R. Rai, B. L. Peterson, F. R. Appelbaum, J. Kolitz, L. Elias, L. Shepherd, J. Hines, G. A. Threatte, R. A. Larson, B. D. Cheson, Ch. A. Schiffer: *Fludarabine Compared with Chlorambucil as Primary Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia*. N. Engl. J. Med. 343. (2000) 1750-1757.

[12] M. Hallek, N. Pflug: *Chronic lymphocytic leukemia*, Annals of Oncology 21 (2010)154-164.

13] B. J. Druker: *Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML*, Blood 112 (2008) 4808-4817.

[14] N. Lydon: Attacking cancer at its foundation, Nat. Med. 15 (2009) 1153-1157.

[15] M. J. Jiang, J. J. Dai, D. N. Gu, Q. Huang, L. Tian: *MicroRNA-7 inhibits cell proliferation of chronic myeloid leukemia and sensitizes it to imatinib in vitro*Biochem. Biophys. Research Communic. 494 (2017) 372-378.

[16] A. A. Kiani, F. Shahsavar, M. Gorji, K. Ahmadi, V. H. Nazarabad, B. Bahmani: *Prevalence of Abelson murine leukemia viral oncogene homolog-breakpoint cluster region fusions and correlation with peripheral blood parameters in chronic myelogenous leukemia patients in Lorestan Province, Iran, Int. J. Appl. Basic. Med. Res. 6 (2016) 271-275.*

[17] P. Klener, P. Klener jr: *Principy systémové protinádorové léčby*, Grada Publishing Praha2010.

[18] N. C.P. Cross, L. Feng, A. Chase, J. Bungey, T. P. Hughes, J. M. Goldman: *Competitive Polymerase Chain Reaction to Estimate the Number of BCR-ABL Transcripts in Chronic Myeloid Leukemia Patients After Bone Marrow Transplantation*, Blood 82 (1993)1929-1936.

[19] G.V.Denis: *Imatinib Mesylate (Gleevec) and the Emergence of Chemotherapeutic Drug resistant-Mutations,* v knize H. L. Kaufman, S. Wadler, K. H. Antman (eds.): Cancer drug discovery and development: Specific Drugs for Molecular Targeting in Oncology, Humana Press Totowa NJ (2007).

[20] M. Tyagi, V. Govindhari, R. R. Pappuru, V. Ambiya: *Bilateral Hypopyon Uveitis in Chronic Myeloid Leukemia*, Ocul. Oncol. Pathol. 4 (2018)12-15.

[21] D.G.Savage, K.H.Antman: *Imatinib Mesylate - A New Oral Targeted Therapy*, N. Engl.J. Med. 346 (2002) 683-693.

[22] B. Asadi-Azarbaijani, R. R. Santos, K. Jahnukainen, S. Braber, M. B.M. van Duursen, J. Toppari, O. D. Saugstad, M. Nurmio, I. C. Oskam: *Developmental effects of imatinib mesylate on follicle assembly and early activation of primordial follicle pool in postnatal rat ovary*, Reproduct. Biol. 17 (2017) 25–33.

[23] H. J. Khoury, J. E. Cortes, H. M. Kantarjian, C. Gambacorti-Passerini, M. Baccarani, D.-W. Kim, A. Zaritskey, A. Countouriotis, N. Besson, E. Leip, V. Kelly, T. H. Brümmendorf: *Bosutinib is active in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib and dasatinib and/or nilotinib therapy failure,* Blood 119 (2012) 3403-3412.

[24] K. Futosi, T. Nemeth, R. Pick, T. Vántus, B. Walzog, A. Mócsai: *Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils*, Blood 119 (2012) 4981-4991.

[25] R. S. Finn, J. Dering, C. Ginther, C. A. Wilson, P. Glaspy, N .Tchekmedyian, D. J. Slamon: *Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro*, Breast Cancer Res. Treat. 105 (2007) 319-326.

[26] K. A. Lyseng-Williamson: *Erlotinib: a pharmacoeconomic review of its use in advanced non-small cell lung cancer*, Pharmacoeconomics 28 (2010) 75-92.

[27] A. M. Pick, K.K. Nystrom: *Pazopanib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma*, Clin. Therapeutics 34 (2012) 511-520.

[28] H. Joensuu, F. De Braud, G. Grignagni, T. De Pas, G. Spitalieri, P. Coco, C. Spreafico, S. Boselli, F. Toffalorio, P. Bono, T. Jalava, C. Kappeler, M. Aglietta, D. Laurent, P. G. Casali: *Brit. Vatalanib for metastatic gastrointestinal stromal tumour (gist) resistant to imatinib: final results of a phase II study*, Brit. J. Cancer 104 (2011) 1686-1690.

[29] M. H. Cohen, G. Williams, J.R. Johnson, J. Duan, J. Gobburu, A. Rahman, K. Benson, J. Leighton J, S. K. Kim, R. Wood, M. Rothmann, G. Chen, K. M. U, A. M. Staten, R. Pazdur: *Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia*, Clin. Cancer Res. 8 (2002) 935-942.

[30] R. A. Larson, B. J. Druker, F. Guilhot, S. G. O'Brien, G. J. Riviere, T. Krahnke, I. Gathmann, Y. Wang: *Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study*, Blood 111 (2008) 4022-4028.

[31] R. Dagher, M. Cohen, G. Williams, M. Rothmann, J. Gobburu, G. Robbie, A. Rahman, , G. Chen, A. Staten, D. Griebel, R. Pazdur: *Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors.* Clin. Cancer Res. 8 (2002) 3034-3038.

[32] I. Sargin, L. Akyuz, M. Kaya, G. Tanc, T. Ceterd, K. Yildirim, S. Ertosun, G. H. Aydin,
M. Topal: *Controlled release and anti-proliferative effect of imatinib mesylate loaded* sporopollenin microcapsules extracted from pollens of Betula pendula, Internat. J. Biol. Macromolecules 105 (2017) 749-756.

[33] M. Deininger, E. Buchdunger, B. J. Druker: The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia, Blood 105 (2006) 2640-2652.

[34] S. Mumprecht, M. Matter, V. Pavelic, A. F. Ochsenbein: *Imatinib mesylate selectively impairs expansion of memory cytotoxic T cells without affecting the control of primary viral infections*, Blood 108. (2006) 3406-3413.

[35] M.M. El Gendya, A.M. Kandil, M.A. Helal, F.M. Zahou: *The teratogenic effects of imatinib mesylate on rat fetuses*, Toxicology Reports 2 (2015) 654-663.

[36] J. Rodríguez-Flores, J.J. Berzas, G. Castañeda, N. Rodríques: *Direct and fast capillary zone electrophoresic Method for the determination of Gleevec and its main metabolite in human urine*, J. Chromatogr. B 794 (2003) 381-388.

[37] J. Rodríguez-Flores, J. J. Berzas Nevado, A. M. Contento Salcedo, M. B. Cabello Díaz: *Nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of gleevec and its main metabolite in human urine*, J. Chromatogr. A 1068. (2005) 175-182.

[38] T. O. Ajimura, K. B. Borges, A. F. Ferreira, F. A. de Castro, C. M de Gaitani: *Capillary electrophoresis method for plasmatic determination of imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients,* Electrophoresis 32 (2011) 1885-1892.

[39] A. Awidi, I. I. Salem, N. Najib, R. Mefleh, B. Tarawneh: *Determination of imatinib plasma levels in patients with chronic myeloid leukemia by high performance liquid chromatography–ultraviolet detection and liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Methods' comparison*, Leukemia Research 34 (2010) 714-717.

[40] O. Roth, O. Spreux-Varoquaux, S. Bouchet, P. Rousselot, S.Castaigne, S. Rigaudeau, V. Raggueneau, P. Therond, P. Devillier, M. Molimard, B. Maneglier: *Imatinib assay by HPLC with photodiode-array UV detection in plasma from patients with chronic myeloid leukemia: Comparison with LC-MS/MS*, Clin. Chim. Acta 411 (2010) 140-146.
[41] T. Velpandian, R. Mathur, N. K. Agarwal, B. Arora, L. Kumar S. K. Gupta: *Development and validation of a simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of imatinib in biological samples,* J. Chromatogr. B 804 (2004) 431-434.

[42] M. Dziadosz, R. Lessig, H. Bartels: *HPLC–DAD protein kinase inhibitor analysis in human serum*, J. Chromatogr. B. (2012) 77-81.

[43] D. W. Zidan, W. S. Hassan, M. S. Elmasry, A. A. Shalaby: *Imatinib in pure, pharmaceutical preparation, human plasma, and human urine,* Luminescence 33 (2018) 232-242.

[44] K. Titier, S. Picard, D. Ducint, E. Teilhet, N. Moore, P. Berthaud, F.X. Mahon,
M. Molimard: *Quantification of imatinib in human plasma by high- performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Ther. Drug Monit. 27(2005) 634-640.

[45] R. A. Parise, R. K. Ramanathan, M. J. Hayes, M.J. Egorin: *Liquid chromatographicmass spectrometric assay for quantitation of imatinib and its main metabolite (CGP 74588) in plasma, J. Chromatogr. B* 791 (2003) 39-44.

[46] N. Widmer, A. Béguin, B. Rochat, T. Buclin, T. Kovacsovics, M. A. Duchosal, S. Leyvraz, A. Rosselet, J. Biollaz, L. A. Decosterd: *Determination of imatinib (Gleevec®) in human plasma by solid-phase extraction–liquid chromatography–ultraviolet absorbance detection* J. Chromatogr. B 803 (2004) 285-292.

[47] R. Bakhtiar, L. Khemani, M. Hayes, T. Bedman, F. Tse: *Quantification of the antileukemia drug STI571 (Gleevec™) and its metabolite (CGP 74588) in monkey plasma using a semi-automated solid phase extraction procedure and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J. Pharmaceut. Biomed. Analysis 28 (2002) 1183-1194.

[48] R. Bakhtiar, J. Lohne, L. Ramos, L. Khemani, M. Hayes, F. Tse: *High-throughput quantification of the anti-leukemia drug STI571 (Gleevec) and its main metabolite (CGP 74588) in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. B 768 (2002) 325-340.

[49] K. Mičová, D. Friedecký, E. Faber, A. Polýnková, T. Adam: *Flow injection analysis vs. ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of imatinib in human plasma*, Clin. Chim, Acta 411 (2010) 1957-1962.

[50] I. Vrobel, D. Friedecký, E. Faber, L. Najdekr, K. Mičová, R.Karlíková, T.Adam: *Novel sulphur-containing imatinib metabolites found by untargeted LC-HRMS analysis,* Eur. J. Pharm. Sci. 104 (2017) 335-343.

[51] J. Klawitter, Y. L. Zhang, J. Klawitter, N. Anderson Natalie J. Serkova, U. Christians: *Development and validation of a sensitive assay for the quantification of imatinib using LC/LC-MS/MS in human whole blood and cell culture, Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 1251-1258.

[52] E. Schleyer, S. Pursche, C. H. Köhnea, U. Schuler, U. Renner, H. Gschaidmeier, J. Freiberg-Richter, T. Leopold, A. Jenke, M. Bonin, T. Bergemann, P. le Coutre, M. Gruner, M. Bornhäuser, O.G. Ottmann, G. Ehninger: *Liquid chromatographic method for detection and quantitation of STI-571 and its main metabolite N-desmethyl-STI in plasma, urine, cerebrospinal fluid, culture medium and cell preparations, J. Chromatogr. B 799 (2004) 23-36.*

[53] G. Guetens, H. Prenen, G. De Boeck, M. Highly, I. de Wever, A.T. van Oosterom, E.A. de Bruijn: *Imatinib (Gleevec, Glivec) tumour tissue analysis by measurement* of *sediment and by liquid chromatography tandem mass spectrometry*, J. Sep. Sci. 26. (2006) 453-459.

[54] R. L. Oostendorp, J. H. Beijnen, J. H. Schellens, O. van Tellingen: *Determination of imatinib mesylate and its main metabolite (CGP74588) in human plasma and murine specimens by ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography*, Biomed. Chromatogr. 21 (2007) 747-754.

[55] F. Bianchia, E. Caffarri, S. Cavalli, C. Lagrasta, M. Musci, F. Quaini, M. Savi: *Development and validation of an high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of imatinib in rat tissues*, J. Pharm. Biomed. Analysis 73 (2013) 103-107.

[56] J. Rodriguez, J.J. Berzas, G. Castañeda, N. Rodriguez: *Voltammetric determina-. tion of Imatinib (Gleevec) and its main metabolite using square-wave and ad-. sorptive stripping square-wave techniques in urine samples,* Talanta 66 (2005) 202-209.

[57] E. Hammam, H. S. El-Desoky, A. Tawfik, M. M. Ghoneim: *Voltammetric behavior and quantification of the anti-leukemia drug imatinib in bulk form, pharmaceutical formulation, and human serum at a mercury electrode,* Canadian J. Chem. 82. (2018) 1203-1209.

[58] V. C. Diculescu, M. Vivan, A. M. O. Brett: *Voltammetric Behavior of Antileukemia Drug Glivec. Part II – Redox Processes of Glivec Electrochemical Metabolite*, Electroanalysis 18 (2006) 1808-1814.

[59] M. Brycht, K. Kaczmarska, B. Uslu, S. A. Ozkan S. Skrzypek: *Sensitive determination of anticancer drug imatinib in spiked human urine samples by differential pulse voltammetry on anodically pretreated boron-doped diamond electrode*, Diamond Related Materials 68 (2016) 13-22.

[60] O.Turkay, S. Barisci, E. Ulusoy, M. G. Seker, A. Dimoglo: Anodic oxidation of anticancer drug Imatinib on different electrodes: Kinetics, transformation by-products and toxicity assessment, Electrochimica Acta 263 (2018) 400 - 408.

[61] B. Hatamluyi, Z. Es'haghi: *A layer-by-layer sensing architecture based on dendrimer and ionic liquid supported reduced graphene oxide for simultaneous hollow-fiber solid phase microextraction and electrochemical determination of anti-cancer drug imatinib in biological samples, J. Electroanal. Chemistry 801 (2017) 439-449.*

[62] Z. Yan, Z. Zhang, J. Chen: *Biomass-based carbon dots: Synthesis and application in imatinib determination*, Sensors and Actuators B: Chemical 225 (2016) 469-473.

[63] T. Saita, Y. Yamamoto, K. Hosoya Y. Yamamoto. S. Kimura, Y. Narisawa, M. Shin: *An ultra-specific and sensitive sandwich ELISA for imatinib using two anti-imatinib antibodies,* Anal. Chim. Acta 969 (2017) 72-78.

[64] Y. Xu, X. Huang, S. Dai, Y. Xiao, M. Zhou: *A simple method for the determination of bosutinib in rat plasma by UPLC-MS/MS*, J. Chromatogr B 1004 (2015) 93-97.

[65] C. S.H.Jesus, V. C.Diculescu: *Redox mechanism, spectrophotometrical characterisation and voltammetric determination in serum samples of kinases inhibitor and anticancer drug dasatinib,* J. Electroanalytical Chemistry 752 (2015) 47-53.

[66] M. G. Kassem, E. Ezzeldin, H. M.Korashy, G. A. E. Mostafa: *High-performance liquid chromatographic method for the determination of dasatinib in rabbit plasma using fluorescence detection and its application to a pharmacokinetic study*, J. Chromatogr. B 939. (2013) 73-79.

[67] N. A. G. Lankheet, E.E. Schaake, H. Rosing, J. A. Burgers, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, A. D. R. Huitema: *Quantitative determination of erlotinib and O-desmethyl erlotinib in human EDTA plasma and lung tumor tissue*, Bioanalysis 4 (2012) 2563-77.

[68] M. Minocha, V. Khurana, A. K.Mitra: *Determination of pazopanib (GW-786034) in mouse plasma and brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS–MS)*, J. Chromatogr. B 901 (2012) 85-92.

[69] A. G. Lankheet, M. J. X. Hillebrand, M. H. G.Langenberg, H.Rosing, A. D. R.Huitema, E. E. Voest, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen: *A validated assay for the quantitative analysis of vatalanib in human EDTA plasma by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. B 877 (2009) 3625-3630.

[70] M. Dziadosz, R. Lessig, H. Bartels: *HPLC–DAD Protein kinase inhibitoanalysis in human serum*, J. Chromatogr. B 893-894 (2012) 77-81.

[71] S De Francia, A. D'Avolio, F. De Martino, E. Pirro, L. Baietto, M. Siccardi, M. Simiele, S. Racca, G. Saglio, F. Di Carlo, G. Di Perri: *New HPLC–MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib, and nilotinib in human plasma, J.* Chromatogr. B 877 (2009) 1721-1726.

[72] A. D'Avolio, M. Simiele, S. De Francia, A. Ariaudo, L. Baietto, J. Cusato, C. Fava, Gi. Saglio, F. Di Carlo, G. Di Perri: *HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib and nilotinib in human peripheral blood mononuclear cell (PBMC)*, J. Pharmaceut. Biomed. Analysis 59 (2012) 109-116.

[73] R. Honeywell, K. Yarzadah, E. Giovannetti, N. Losekoot, E.F. Smit, M. Walraven, J.S.W. Lind, C. Tibaldi, H.M. Verheul, G.J. Peters: *Simple and selective method for the determination of various tyrosine kinase inhibitors used in the clinical setting by liquid chromatography tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. B, 878 (2010) 1059-1068.

[74] S. A. R. Alavi-Tabari, M. A. Khalilzadeh, H. Karimi-Maleh: *Simultaneous determination* of doxorubicin and dasatinib as two breast anticancer drugs uses an amplified sensor with ionic liquid and ZnO nanoparticle, J. Electroanal. Chem. 811 (2018) 84-88.

[75] A. Haouala, B. Zanolari, B. Rochat, M. Montemurro, K. Zaman, M.A. Duchosal, H.B. Ris, S. Leyvraz, N.Widmer, L.A. Decosterd: *Therapeutic Drug Monitoring of the new*

targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by *LC tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. B 877 (2009) 1982-1996.

[76] L. Götze, A. Hegele, S. K. Metzelder, H. Renz, W. A. Nockher: *Development and clinical application of a LC-MS/MS method for simultaneous determination of various tyrosine kinase inhibitors in human plasma*, Clin. Chim. Acta 413 2012) 143-149.

[77] N. P. van ERP, D. de WIT, H. - J. Guchelaar, H. Gelderblom, T. J. Hessing, J. den Hartigh: *A validated assay for the simultaneous quantification of six tyrosine kinase inhibitors and two active metabolites in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. B 937 (2013) 33-43.

[78] C. Merienne, M. Rousset, D. Ducint, N. Castaing, K. Titier, M. Molimard, S. Bouchet: *High throughput routine determination of 17 tyrosine kinaseinhibitors by LC–MS/MS*, J Pharmaceut. Biomed. Analysis 150 (2018) 112-120.

[79] J. Zeng, H. Cai, Z. Jiang, Q. Wang, Y. Zhu, P. Xu, X. Zhao: A validated UPLC–MS/MS method for simultaneous determination of imatinib, dasatinib and nilotinib in human plasma, J. Pharmaceutic. Analysis 7 (2017) 374-380.

[80] S. Bouchet, E. Chauzit, D. Ducint, N. Castaing, M. Canal-Raffin, N. Moore, K. Titier, M Molimard: *Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultra performance LC/MS-MS*, Clin. Chim. Acta 412 (2011) 1060-1067.

[81] O. V. Salata: *Aplications of nanoparticles in biology and medicine,* J. Nanobiotechnol. 2 (2004) 1-6.

[82] P. R. Maddigpu, B. Sawant, S. Wanjari, M. D. Goel, D. Vione, R. S. Dhodapkar, S. Rayalu: *Carbon nanoparticles for solar desinfection of water*, J Hazard. Mat. 343 (2018) 157-165.

[83] B. Bahrami, M. Hojjat-Farsangi, H. Mohammadi, E. Anvari, G. Ghalamfarsa, M.Yousefi,
F. Jadidi-Niaragh: *Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy*. Immunol. Let.
190 (2017) 64-83.

[84] J. H. Ryu, S. Lee, S.Son, S. H. Kim, J. F. Leary, K. Choi, I. C. Kwon: *Theranostic nanoparticles for future personalized medicine*, J. Control. Release 190 (2014) 477-484.

[85] A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kovář, R. Večeřová, N. Pizúrová, V. K. Sharma, T. Nevěčná, R. Zbořil: Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity, J. Phys. Chem. B 110 (2006) 16248-16253.

[86] S. N. Sethu, S. Namashivayam, S. Devendran, S. Nagarajan, W. B.Tsai, S. Narashiman, M.Ramachandran, M. Ambiqapathi: *Nanoceramics on osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering*, Int. J. Biol. Macromolec. 98 (2017) 67-74.

[87] K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz KH, A. Z. Wilczewska, H. Car. *Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine*, Adv. Med. Sci. 57 (2012) 196-207.

[88] X.-Z. Chen, M. Hoop, F. Mushtaq, E. Siringil, Ch. Hu, B. J. Nelson, S. Pané. *Recent developments in magnetically driven micro-and nanorobots*. Applied Materials Today 9. (2017) 37-48.

[89] P. Jandik, W. R. Jones: *Optimization of detection sensitivity in the capillary eelctrophoresis in inorganic anions*, J. Chromatogr. 546 (1991) 431-443.

[90] http://www.waters.com; staženo dne 10. 12. 2017

[91] J. Pazourek: Moderní elektroforetické analytické metody: Přednášky pro magisterské studium. Brno 2003.

[92] P. E. Jackson, P.R. Haddad: Optimization of injection technique in capillary ion electrophoresis for the determination of trace level anions in environmental samples, J. Chromatogr. A 640 (1993) 481-487.

[93] R. Naidu Z. L. Chen: Application of co-electroosmotic capillary electrophoresis for the determination of inorganic anions and carboxylic acids in soil and plant extract with direct uv detection, Chromatographia 54 (2001) 495-500.

[94] T. Wang, R. A. Hartwick: *Binary buffers for indirect absorption detection in capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr A 589 (1992) 307-313.

[95] C. Johns, M. Macka, P. R. Haddad: *Enhancement of detection sensitivity for indirect photometric detection of anions and cations in capillary electrophoresis*, Electrophoresis 24 (2003) 2150-2167.

[96] J. M. Riviello, M. P. Harrold: *Capillary electrophoresis of inorganic cations and low molecular-mass amines using a copper-based electrolyte with indirect UV detection*, J. Chromatogr. A 652 (1993) 385-392.

[97] P. Doble, a. R. Haddad: Use of electrolytes cantainig multipne co-ions in the analysis of anions by capillary electrophoresis using indirect absorbance detection, Anal. Chem. 71 1999 15-22.

[98] H. Salimi-Moosavi, R. M. Cassidy: *Capillary electrophoresis of inorganic anions in nonaqueous media with electrochemical and indirect UV detection*, Anal. Chem. 67 (1995) 1067-1073.

[99] A. G. Diress, C. A. Lucy: *Study of the selectivity of inorganic anions in hydro-organic solvents using indirect capillary electrophoresis.* J. Chromatogr. A 1085 (2005) 155-163.

[100] Y. Yang, F. Liu , J. Kang , Q. Ou: Improved selectivity of anions with methanol as additive: Determination of Cl-, NO3- and SO42- in river water by capillary electrophoresis, J. Chromatogr. A 834 (1999) 393-399.

[101] P. Doble, M. Macka, P. Andersson, P. R. Haddad: Use of Electrolytes Containing Multiple Co-Anions in the Analysis of Anions by Capillary Electrophoresis Using Indirect Absorbance Detection, Analytical Communications 134 (1997) 351-353.

[102] G. Raber, H. Greschonig: New preconditioning strategy for the determination of inorganic anions with capillary zone electrophoresis using indirect UV detection, J. Chromatogr. A 890 (2000) 355-361.

[103] E. Dabek-Zlotorzynska, J. F. Dlouhy: *Application of capillary electrophoresis in atmospheric aerosols analysis: determination of inorganic and organic anions*, J. Chromatogr. A 671 (1994) 389-395.

[104] S. A. Shamsi, N. D. Danielson: *Naphthalenesulfonates as electrolytes for CE of inorganic anions, organic acids,* and *surfactants with indirect photometric detection,* Anal. Chem. 66 (1994) 3757-3764.

[105] X. Xu, P. C. A. M. De Bruyn, J. A. De Koeijer, H. Logtenberg: *Low-molecular-mass* anion screening for forensic environmental analyses by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection, J. Chromatogr 830 (1999) 439-451.

[106] C.A. Lucy, R.S. Underhill: *Characterization of the cationic surfactant induced reversal of electroosmotic flow in capillary electrophoresis,* Anal. Chem. 68 (1996) 300-305.

[107] M. Wang, F. Qu, X. Q. Shan, J. M. Lin: *Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection*, J Chromatogr A 989 (2003) 285-292.

[108] T. Ehmann, K. Bachmann, L. Fabry, H. R Rüfer, M. Serwe, G. Ross, S. Pahlke, L. Kotz: *Capillary Preconditioning for Analysis of Anions Using Indirect UV Detection in Capillary Zone Electrophoresis Systematic Investigation of Alkaline and Acid Prerinsing Techniques by Designed Experiments*, J. Chromatogr. A (1998) 816 261-275.

[109] P. Kubáň, P. Kubáň, V. Kubáň: *Capillary electrophoretic determination of inorganic anions in the drainage and surface water samples, J. Chromatogr. A* 848 (1999) 545-555.

[110] J. P. Romano, J. Krol.: *Capillary ion electrophoresis, an environmental method for the determination of anions in water,* J. Chromatogr. 640 (1993) 403-412.

[111] Jones, W. R. J. *Method development approaches for capillary ion electrophoresis,* Chromatogr. 640 (1993) 387-395.

[112] P. R. Haddad, A. H. Harakuwe, W. Buchberger: Separation of inorganic and organic anionic components of Bayer liquor by capillary zone electrophoresis I. Optimisation of resolution with electrolyte-containing surfactant mixtures, J. Chromatogr. 706 (1995) 571-578.

[113] A. H. Harakuwe, P. R. Haddad, P. E. Jackson. *Quantitative determination of oxalate in Bayer liquor by capillary zone electrophoresis A validative study* J. Chromatogr. 739 1996 399-403.

[114] C. Sarazin, N. Delaunayb, A. Varenneb, J. Vialb, Ch. Costanzaa, V. Eudesa, J.- J. Mineta, P. Gareil: *Identification and determination of inorganic anions in real extracts from pre- and post-blast residues by capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A (2010) 6971-6978.

[115] L. Geiser, E.I Varesio, J.- L. Veuthey: *Simultaneous analysis of metabisulfite and sulfate by CE with indirect UV detection. Application to and validation for a pharmaceutical formulation*, J. Pharmaceutic. Biomedic. Anal. 31 (2003) 1059-1064.

[116] M. Jaworska, P. Cygan, M. Wilk, E. Anuszewska. *Capillary electrophoresis with indirect UV detection for the determination of stabilizers and citrates present in human albumin solutions*, J. Pharm. Biomed. Anal. (2009) 90-95.

[117] S. Lenzen: *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes,* Diabetologia 51 (2008) 216-226.

[118] T. Szkudelski: *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*, Physiol. Res. 50 (2001) 537-546.

[119] F. Wöhler, J. Liebig: Untersuchungen über die Natur der Harnsäure, Ann. Pharm. 26 (1838) 241-340.

[120] J. S. Dunn, H. L. Sheehan, N. G. B. McLetchie: *Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally*, Lancet 244 (1943) 484-487.

[121] J. S. Dunn, N. G. B. McLetchie: *Experimental alloxan diabetes in the rat*, Lancet 245 (1943) 384-387.

[122] M.G. Goldner, G. Gomori: *Studies on the mechanism of alloxan diabetes,* Endocrinology 35 (1944) 241-248.

[123] A. B. Cruz, D. S. Amatuzio, F. Grande, L. J. Hay: *Effect of intra-arterial insulin on tissue cholesterol and fatty acids in alloxan-diabetic dogs*, Circ. Res. 9 (1961) 39-43.

[125] I. F. Federiuk, H. M. Casey, M. J. Quinn, M. D. Wood, K. W. Ward: *Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: Route of administration, pitfalls, and insulin treatment,* Comparative Medicine 54 (2004) 252-257.

[126] P. A. Gruppuso, J. M. Boylan, B. I. Posner, R. Faure, D. L. Brautigan: *Hepatic protein phosphotyrosine phosphatase*. *Dephosphorylation of insulin and epidermal growth factor receptors in normal and alloxan diabetic rats*, J. Clin. Invest. 85 (1990) 1754-1760.

[127] K. Katsumata, K. Katsumata k jr., Y. Katsumata, Ozawa T: *Acute and chronic effect of ethanol on the occurrence of alloxan diabetes in rats,* Horm. Metab. Res. 24 (1992) 508-510.

[128] O. M. Ighodaro. A. M. Adeosun, O. A. Akinloye: *Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies,* Medicina 53 (2017) 365-374.

[129] T. Szkudelski, K. Kandulska, M. Okulicz: *Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells,* Physiol. Res. 47 (1998) 343-346.

[130] D. L. Eizirik, D. G. Pipeleers, Z. Ling, N. Welsh, C. Hellerstrom, A. Andersson: *Major* species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic-beta cell injury, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 9253-9256.

[131] S. Lenzen, U. Panten: *Alloxan: history and mechanism of action*, Diabetologia 31. (1988) 337 - 342.

[132] N. Suganuma, F. Kikkawa, H. Seo, N. Matsui, Y. Tomoda: *Poly (adenosine diphosphate-ribose) synthesis in the anterior pituitary of the female rat throughout the estrous cycle: study of possible relation to cell proliferation and prolactin gene expression.* J. Endocrinol. Invest. 16 (1993) 475-480.

[133] A. Mrozikiewicz, D. Kiełczewska-Mrozikiewicz, Z. Łowicki, E. Chmara, K. Korzeniowska, P. M. Mrozikiewicz. *Blood levels of alloxan in children with insulindependent diabetes mellitus*, Acta Diabetol. 31 (1994) 236-237.

[134] Bolton, W. The crystal structure of alloxan. Acta Crystallogr. 17. 1964, 147-152.

[135] J. W. Patterson, A. Lazarow, S. Levey, F. J. Lemm: *Alloxan and dialuric acid: their stabilities and ultraviolet absorption spectra*, J. Biol. Chem. 177 (1949) 187-196.

[136] G. M. Richardson, R. K. Cannan: *The dialuric acid-alloxan equilibrium*, J. Biochem. 23 (1929) 68-77.

[137] S. Lenzen, R. Munday: *Thiol-group reactivity, hydro-philicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin,* Biochem. Pharmacol. 42 (1991) 1385-1391.

[138] R. M. Archibald: *Methods for the determination of alloxan, together with observations of certain properties of alloxan, J. Biol. Chem.* 158 (1945) 347-373.

[139] S. Baluja, D. Lava, A. Hirpara, K. Bhesaniya: *Thermodynamics model for Alloxan solubility in various solvents at different temperatures. Review.*, J. Molecular Liquids 241 (2017) 992-995.

[140] F. K. Gorus, W. J. Malaisse, D. G. Pipeleers. *Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells*, J. Biochem. 208 (1982) 513-515.

[141] R. Gunnarsson, C. Hellerström: *Acute effects of alloxan on the metabolism and insulin secretion of the pancreatic B-cell*, Horm. Metab. Res. 5 (1973) 404-409.

[142. S. Lenzen, U. Panten: *Signal recognition by pancreatic B-cells*, Biochem. Pharmacol. 37 (1988) 371-378.

[143] G. Cohen, R. E. Heikkila: *The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents*, J. Biol. Chem. 249 (1974) 2447-2452.

[144] S. Lenzen, R. Munday: *Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin,* Biochem. Pharmacol. 42 (1991) 1385-1391.

[145] S. Lenzen, M. Mirzsaie-Petri: *Inhibition of glucokinase and hexokinase from pancreatic B-cells and liver by alloxan, alloxantin, dialuric acid, and t-butylhydroperoxide*, Biomed. Res. 12 (1991) 297-307.

[146] D. C. Weaver, M. L. McDaniel, S. P. Naber, C. D. Barry, P. E. Lacy: *Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat islets of Langerhans*, Diabetes. 27 (1978) 1205-1214.

[147] W. J. Malaisse: *Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell*, Biochem. Pharmacol. 31 (1982) 3527-3534.

[148] M. Tiedge, S. Lortz , J. Drinkgern, S. Lensen: *Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells*, Diabetes. 46. (1997) 1733-1742.

[149] R. Munday: Dialuric acid autoxidation Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of 'active oxygen' species, Biochem. Pharmacol. 37 (1988) 409-413.

[150] C. C. Winterbourn, W. B. Cowden, H. C. Sutton: *Autooxidation of dialuric acid, divicine and isouramil. Superoxide dependent and independent mechanisms, Biochem Pharmacol* 38 (1989) 611–618.

[151] B. Park, H. Rho, J. Park, C. Cho, J. Kim, H. Chung, A. H. Kim: *Protective Mechanism of Glucose Against Alloxan-Induced Pancreatic β-Cell Damage*, Biochem. Biophys. Res. Communic. 210 (1995) 1-6.

[152] H. Holtkamp, Ch. G. Hartinger: *Capillary electrophoresis in metallodrug development*. *Drug Discovery Today*, Technologies 16 (2015) 16-22.

[153] E. Ban, Y. S.Yoo, E. J. Song: *Analysis and applications of nanoparticles in capillary electrophoresis,* Talanta 141 (2015) 15-20.

[154] J. Petr, V. Maier: Analysis of microorganisms by capillary electrophoresis, Trac-Trend.Anal. Chem. 31 (2012) 9-22.

[155] V. Dolnik: DNA sequencing by capillary electrophoresis. Review., J. Biochem. Bioph.Meth. 41 (1999) 103-119.

[156] A. Amini: *Recent developments in chiral capillary electrophoresis and applications of this technique to pharmaceutical and biomedical analysis.* Review., Electrophoresis 22. (2001) 3107-3130.

[157] T. Watanabe, S. Terabe: *Analysis of natural food pigments by capillary electrophoresis,*J. Chromatogr. A 880 (2000) 311-322.

[158] E. Dabek-Zlotorzynska, V. Celo: *Recent advances in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of pollutants*, Electrophoresis 27 (2006) 304-322.

[159] M. Zarei, M. Zarei, M. Ghasemabadi: *Nanoparticle improved separations: From capillary to slab gel*, Trends Anal. Chem. 86 (2017) 56-74.

[160] D. R. Baler: Capillary electrophoresis. Wiley-VCH New York 1995.

[161] B. Buszewski, E. Dziabakiewicz, M.Szumski: *Electromigration Techniques Theora nad Practice*. Springer Poland 2013.

[162] M. G. Khaledi (ed.). *High Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*. Wiley Interscience 1998.

[163] J. l. Felhofer, L. Blanes, C. D. Garcia: *Recent developments in instrumentation for capillary electrophoresis and microchip-capillary electrophoresis*, Electrophoresis 31 (2010) 2469-2486.

[164] A. Sze, D. Erickson, L. Ren, D. Li: Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow,
J. Colloid and Interface Science 261 (2003) 402-410.

[165] https://www.comsol.com/blogs/modeling-electroosmotic-flow-electrical-double-layer/; staženo dne 12.1. 2018

[166] L. A. Holland, N. P. Chetwyn, M. D. Perkins, S. M. Lunte: *Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis. Review.*, Pharmaceut. Research 14 (1997) 372-387.

[167] H. H. Lauer, G. P. Rozing. *High Performance Capillary Electrophoresis: A primer*. Agilent Technologies 2009.

[168] C. A. Lucy, K. I. Roy: *Influence of methanol as a buffer additive on the mobolities of organic cations in capillary electrophoresis*, Electrophoresis 24 (2003) 370-379.

[169] J. Znaleziona, J. Petr, R. Knob, V. Maier, J. Ševčík: *Dynamic Coating Agents in CE*. Chromatogr. Supplement 67 (2008) S5-S12.

[170] H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa: *Stable Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers*, Anal. Chem. 70 (1998) 2254-2260.

[171] W.G. Kuhr: Capillary electrophoresis, Anal. Chem. 62 (1990) 403-414.

172] L. E. Bennett, W. N. Charman, D. B. Williams, S. A. Charman: *Analysis of bovine immuniglobulin G by capillary gel electrophoresis*, J. Pharm. Biomed. Anal. 12 (1994) 1103-1108.

[173] P. Sázelová, V. Kašička, V. Šolinová, D. Koval: *Determination of purity degree and counter-ion content in lecirelin by capillary zone electrophoresis and capillary isotachophoresis*, J. Chromatogr. B 841 (2006) 145-151.

[174] Ph. Schmitt, A. W. Garrison, D. Freitag, A. Kettrup: *Capillary isoelectric focusing* (*CIEF*) for the characterization of humic substnaces, War. Res. 31 (1997) 2037-2049.

[175] M. A. Mirza, M.Y. Khuhawar, R. Arain, M. Ch. Aziz: *Micellar electrokinetic chromatographic analysis of thorium, uranium, copper, nickel, cobalt and iron in ore and fish samples,* Arab. J. Chemistry 11 (2018) 305-312.

[176] https://chemaxon.com/products/marvin; staženo dne 1.3. 2018

[177] U. Pyell, A. H. Jalil, C. Pfeiffer, B. Pelaz and W. J. Parak: *Characterization of hydrophilic coated gold nanoparticles via capillary electrophoresis and Taylor dispersion analysis. Part I: determination of the zeta potential employing a modified analytic approximation*, J. Colloid. Interfac. Sci. 457 (2015) 131-140.

[178] J. W. Park, J. S. Shumaker-Parry: Strong resistance of citrate anions on metal nanoparticles to desorption under thiol functionalization, ACS Nano. 9 (2015) 1665-1682.

[179] M. Y. Fukayama, H.Tan, W. B. Wheeler, C. I. Wei: *Reactions of aqueous chlorine and chlorine dioxide with model food compounds*, Environ. Health Perspect 69 (1986) 267-274.

[180] I. J. Joye, B. Lagrain, J. A. Delcour: Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking. Review, J. Cereal Sci. 50 (2009), 11-21.

[181] M. B. Shakila, P. Sasikala: *Alloxan in refined flour*, a Diabetic concern. Int. J. Adv. Innov. Res. 1 (2012) 204-209.

[182] O. R. Fennema: *Food Additives*. Marcel Dekker Inc NY 1985.

[183] S. Chittrakorn, D. Earls, F. MacRitchie: *Ozonation as an alternative to chlorination for soft wheat flours, J. Cereal Sci.* 60 (2014) 217-221.

[184] C.A. Thomasson, S.U. Kansas, R. A. Miller, R. C. Hoseney: *Replacement of chlorine treatment for cake flour,* Cereal Chem. USA 72 (1995) 616-620.

[185] M. Y. Fukayama, H. Tan, W. B. Wheeler, C. I. Wei: *Reactions of aqueous chlorine and chlorine dioxide with model food compounds environmental health perspectives,* Health Perspect 69 (1986) 267-274.

[186] V. Giaccone, G. Cammilleri, V. Di Stefano, R. Pitonzo, A. Vella, A. Pulvirenti, G. M. Lo Dico, V. Ferrantelli, A. Macaluso: *First report on the presence of Alloxan in bleached flour by LC-MS/MS*, J. Cereal. Sci. 77 (2017)120-125.

9 PŘÍLOHY

P1-P10: Youdenův test robustnosti stanovení antileukemik pomocí CZE

Analytický parametr	Kombinace faktorů							
	1	2	3	4	5	6	7	8
pH elektrolytu	A	А	А	А	a	a	а	а
Koncentrace elektrolytu	В	В	b	b	В	В	b	b
Teplota	C	с	C	с	C	с	C	с
Napětí	D	D	d	d	d	d	D	D
Doba dávkování	Е	e	Е	e	e	Е	e	Е
Tlak dávkování	F	f	f	F	F	f	f	F
Vlnová délka	G	g	g	G	g	G	G	g
Výsledky	S	t	u	v	W	X	У	Z

Tabulka P1: Kombinace faktorů

A /a, pH elektrolytu; B /b, Koncentrace elektrolytu; C /c,Teplota; D /d, Napětí; E /e, Doba dávkování; F /f, Tlak dávkování; G /g, Vlnová délka

Vyhodnocení kontrastů V_i testu robustnosti

$$\begin{split} V_A &= \frac{1}{4} (s + t + u + v) - \frac{1}{4} (w + x + y + z) \\ V_B &= \frac{1}{4} (s + t + w + x) - \frac{1}{4} (u + v + y + z) \\ V_C &= \frac{1}{4} (s + u + w + y) - \frac{1}{4} (t + v + x + z) \\ V_D &= \frac{1}{4} (s + t + y + z) - \frac{1}{4} (u + v + w + x) \\ V_E &= \frac{1}{4} (s + u + x + z) - \frac{1}{4} (t + v + w + y) \\ V_F &= \frac{1}{4} (s + v + w + z) - \frac{1}{4} (t + u + x + y) \\ V_G &= \frac{1}{4} (s + v + x + y) - \frac{1}{4} (t + u + w + z) \end{split}$$

Výpočet intervalů spolehlivosti kontrastů:

$$L_{1,2} = V_i \pm t_{\left(1 - \frac{\alpha}{2}; 7\right)} \frac{s_m}{\sqrt{2}}$$

t je parametr Studentova rozdělení pravděpodobnosti; s_m je směrodatná odchylka parametrů, s" – "z" (migrační čas nebo plocha píků)

Průměr migračních časů								
	1	2	3	4	5	6	7	8
vatalanib	4,82	4,53	5,48	5,21	5,46	5,23	4,75	4,55
imatinib	5,31	4,98	6,04	5,74	5,96	5,68	5,17	4,94
bosutinib	5,51	5,16	6,25	5,94	6,22	5,93	5,38	5,15
canertinib	6,07	5,70	6,89	6,55	6,90	6,58	5,98	5,70
dasatinib	7,00	6,55	7,98	7,56	7,86	7,48	6,80	6,47
pazopanib	7,45	6,91	8,50	8,05	8,36	7,90	7,23	6,87
erlotinib	8,59	8,10	9,75	9,28	9,87	9,37	8,58	8,08

Tabulka P2: Migrační časy analytů

Tabulka P3: Plochy analytů

Průměr ploch								
	1	2	3	4	5	6	7	8
vatalanib	56,40	32,54	49,62	47,10	40,63	50,94	31,06	41,40
imatinib	77,56	58,18	90,50	64,82	73,85	69,34	41,46	74,20
bosutinib	30,70	24,98	36,96	24,78	31,25	26,66	15,90	30,98
canertinib	26,22	18,23	28,00	21,58	23,25	23,22	13,90	23,16
dasatinib	33,92	22,90	36,24	27,84	29,78	29,72	17,90	29,16
pazopanib	14,30	9,95	12,70	9,70	10,18	9,93	5,98	9,82
erlotinib	67,12	43,70	66,86	56,34	55,48	61,48	36,62	55,88

Tabulka P4: Výsledky kontrastů V_A

	Interval spolehlivosti	Interval spolehlivosti
	kontrastů migračních časů	kontrastů ploch píků
vatalanib	(-8,63; 8,38)	(-67,69; 78,51)
imatinib	(-9,08; 9,24)	(-106,90; 123,00)
bosutinib	(-9,48; 9,56)	(-43,29; 49,61)
carnetinib	(-10,52; 10,55)	(-34,49; 39,76)
dasatinib	(-11,94; 12,18)	(-43,96; 51,13)
pazopanib	(-12,67; 12,95)	(-14,57; 19,86)
erlotinib	(-14,99; 14,93)	(-86,56; 98,84)

Tabulka P5: Výsledky kontrastů V_B

	Interval spolehlivosti kontrastů migračních časů	Interval spolehlivosti kontrastů ploch píků
vatalanib	(-8,35; 8,38)	(-70,27; 75,93)
imatinib	(-9,15; 9,17)	(-11296; 116,94)
bosutinib	(-9,49; 9,54)	(-45,21; 47,69)
carnetinib	(-10,50; 10,57)	(-36,05; 38,20)
dasatinib	(-12,04; 12,08)	(-46,25; 48,84)
pazopanib	(-12,82; 12,80)	(-15,72; 18,71)
erlotinib	(-14,89; 15,03)	(-89,68; 95,72)

	Interval spolehlivosti	Interval spolehlivosti
	kontrastů migračních časů	kontrastů ploch píků
vatalanib	(-8,12; 8,61)	(-71,67; 74,53)
imatinib	(-8,87; 9,44)	(-110,74; 119,16)
bosutinib	(-9,22; 9,81)	(-44,60; 48,30)
carnetinib	(-10,20; 10,86)	(-35,84; 38,41)
dasatinib	(-11,67; 12,46)	(-45,49; 49,60)
pazopanib	(-12,35; 13,26)	(-16,32; 18,11)
erlotinib	(-14,49; 15,44)	(-90,53; 94,87)

Tabulka P6: Výsledky kontrastů V_C

Tabulka P7: Výsledky kontrastů V_D

	Interval spolehlivosti	Interval spolehlivosti
	kontrastů migračních časů	kontrastů ploch píků
vatalanib	(-9,05; 7,69)	(-79,82; 66.38)
imatinib	(-9,91; 8,40)	(-126,73; 103,17)
bosutinib	(-10,30; 8,73)	(-50,72; 42,18)
carnetinib	(-11,40; 9,66)	(-40,75; 33,50)
dasatinib	(-13,07; 11,05)	(-52,47; 42,62)
pazopanib	(-13,90; 11,72)	(-17,88; 16,56)
erlotinib	(-16,20; 13,72)	(-101,91; 83,49)

Tabulka P8: Výsledky kontrastů V_E

	Interval spolehlivosti	Interval spolehlivosti
	kontrastů migračních časů	kontrastů ploch píků
vatalanib	(-8,33; 8,40)	(-61,34; 84,86)
imatinib	(-9,12; 9,19)	(-96,63; 133,27)
bosutinib	(-9,49; 9,55)	(-39,35; 53,55)
carnetinib	(-10,51; 10,56)	(-31,22; 43,03)
dasatinib	(-12,02; 12,10)	(-39,89; 55,20)
pazopanib	(-12,77; 12,85)	(-14,53; 19,91)
erlotinib	(-14,96; 14,96)	(-77,90; 107,50)

Tabulka P9: Výsledky kontrastů V_F

	Interval spolehlivosti	Interval spolehlivosti
	kontrastů migračních časů	kontrastů ploch píků
vatalanib	(-8,35; 8,38)	(-67,76; 78,43)
imatinib	(-9,14; 9,18)	(-107,21; 122,69)
bosutinib	(-9,49; 9,54)	(-43,15; 49,75)
carnetinib	(-10,51; 10,55)	(-34,42; 39,83)
dasatinib	(-12,04; 12,08)	(-44,06; 51,03)
pazopanib	(-12,76; 12,86)	(-15,90; 18,54)
erlotinib	(-14,94; 14,98)	(-86,16; 99,24)

	Interval spolehlivosti	Interval spolehlivosti
	kontrastů migračních časů	kontrastů ploch píků
vatalanib	(-8,37; 8.36)	(-67,77; 78.43)
imatinib	(-9,16; 9,15)	(-125,84; 104,06)
bosutinib	(-9,52; 9,51)	(-52,98; 39,92)
carnetinib	(-10,54; 10,53)	(-39,06; 35,19)
dasatinib	(-12,07; 12,06)	(-49,72; 45,37)
pazopanib	(-12,81; 12,81)	(-17,95; 16,49)
erlotinib	(-14,97; 14,95)	(-92,79; 92,61)

Tabulka P10: Výsledky kontrastů V_G

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta Katedra analytické chemie

STANOVENÍ NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

Autoreferát disertační práce

Autor práce:

Studijní obor:

Školitel:

Mgr. Jana Horská

Analytická chemie

doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

OLOMOUC 2018

SOUHRN

Předkládaná disertační práce se dotýká problematiky stanovení nízkomolekulárních látek pomocí kapilární elektroforézy (CE). První pasáž teoretické části se zabývá "novou" řadou protinádorových léčiv na léčbu leukémie (antileukemik) v čele s průlomovým preparátem imatinib. Seznamuje čtenáře s etiologií leukémie a mechanismem její léčby pomocí medikamentů této skupiny a podává detailní přehled stanovení antileukemik v biologických vzorcích pomocí různých analytických technik. Následuje krátká exkurze do světa nanočástic a jejich využití v medicíně. Další kapitoly popisují princip nepřímé UV detekce a způsoby ovlivnění selektivity separace pomocí této techniky. V následujících kapitolách je věnována pozornost alloxanu - látce používané k experimentálnímu vyvolání diabetu u laboratorních zvířat a v současné době šířeji diskutované kvůli jejímu možnému výskytu v mouce, kde může vznikat při jejím bělení a stát se tak potenciální hrozbou i pro člověka. Kapitoly zde popisují chemický a biologický pohled na alloxan. Teoretickou část uzavírá zmínka o kapilární elektroforéze jako analytické separační technice, pomocí které byly všechny látky studovány.

V rámci řešení experimentální části byly vyvíjeny metody pro stanovení výše zmíněných nízkomolekulárních látek. První z nich byla metoda pro simultánní stanovení vybraných antileukemik pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE), která může sloužit při kontrole kvality léčiv ve farmaceutickém průmyslu. Následně byla vyvíjena metoda pro stanovení kyseliny citrónové užitím CZE s nepřímou UV detekcí. Jako modelový vzorek byly poté vybrány zlaté nanočástice, které na svém povrchu obsahují citrát jako stabilizační činidlo bránící jejich agregaci. Pomocí běžně užívaných elektrolytů v CE lze citrát vytěsnit z povrchu nanočástic s buňkami. Závěrem byla vyvinuta metoda pro separaci alloxanu spolu s jeho prekurzory pomocí kapilární zónové elektroforézy. Vyvinutá metoda může nalézt uplatnění při kontrole kvality surovin v potravinářském průmyslu. Stabilitní studie alloxanu, která se ukázala jako naprosto zásadní, byla realizována simulací skladování mouky za různých podmínek a následným vyhodnocením přítomnosti alloxanu a jeho rozkladných produktů ve vzorcích pomocí přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru.

SUMMARY

This thesis provides the introduction into the problematics of determination of low molecular weight compounds using capillary electrophoresis. The theoretical part is devoted to the "new" series of anti-tumor drugs for the treatment of leukemia (antileukemics) with the breakthrough preparation imatinib. The etiology of leukemia and the mechanism of treatment with these drugs are briefly discussed. The detailed overview of the determination of antileukemics in different biological samples using different analytical techniques is delivered. A short excursion into the world of nanoparticles and their use in medicine follows. Other chapters describe the principle of capillary zone electrophoresis method with indirect UV detection and influencing selectivity of analysis by the parameters of analysis. Attention is paid also to alloxan – substance used for the experimental induction of diabetes in laboratory animals. A lot of discussions and controversies arose currently due to its possible occurrence in bleached flour, where it can be a significant issue and a potential threat for consumers. In this chapter, one can find the view of chemistry and/or biology on alloxan studies. The theoretical part is summarized with the description of capillary electrophoresis as an analytical separation technique used for the study of all the substances mentioned.

In the experimental part, methods for the determination of the above-mentioned low molecular weight molecules were developed. Firstly, a method for the simultaneous determination of antileukemics by capillary zone electrophoresis has been developed. This method can be used for the quality control in the pharmaceutical industry. Secondly, a method for the determination of citrate using capillary zone electrophoresis with indirect UV detection was developed. Gold nanoparticles, which contain citrate as a stabilizing agent to prevent their aggregation, were as a real sample. Citrate molecules can be released from the surface using electrolytes which are common in capillary electrophoresis which can be helpful in clarification of the nanoparticles' surface chemistry. This can be consequently employed in further studies, e.g. on the interaction of nanoparticles with cells. In the last part, on developing the method for the separation of alloxan with its precursors by capillary zone electrophoresis as a quality control method in the food industry was developed. Alloxan and its decomposition products in flour samples after their simulated storage under various conditions had been studied by the direct injection mass spectrometry.

1 ÚVOD

Nízkomolekulární látky tvoří široké spektrum sloučenin, kterými jsme v lidském životě obklopeni. Jejich zajímavé vlastnosti odrážejí spousty užitečných aplikací. Stanovení těchto látek je neméně významné a poslouží nám k tomu různé techniky analytické chemie, pomocí nichž lze stanovovat i stopová množství v různých matricích a usuzovat tak na přítomnosti či nepřítomnosti hledané látky.

V této práci jsem se zaměřila na tři aktuální témata současné vědy, zejména s přesahem do medicíny. Jmenovitě na skupinu "nových" léčiv na léčbu leukémie, stanovení citrátu uvolňovaného z povrchu nanočástic a alloxan, látku diskutovanou ve spojitosti s diabetem závislým na podávání inzulinu. Vývojem metody na separaci sedmi "nových" antileukemik v běhu jedné analýzy, odpadá nutnost vývoje metod pro každé léčivo zvlášť. Stanovení citrátu uvolňovaného z povrchu zlatých nanočástic nás přiblíží pochopení interakcí probíhajících na povrchu nanočástic. Vyvinutí metody na stanovení alloxanu ve vzorcích mouky pomocí kapilární zónové elektroforézy poskytne metodu ke kontrole kvality mouky v potravinářském průmyslu. V rámci této problematiky byla navázána spolupráce s Fakultní nemocnicí v Ostravě a společně bylo řešeno studium výskytu alloxanu nejen v různých typech mouk z různých zemí (USA, Bělorusko, Rakousko, ČR), ale i v lidské krvi.

2 PŘEHLED AKTUÁLNÍHO STAVU PROBLEMATIKY

2.1.1 Inhibitory tyrosin kináz (TKI)

Tyrosinkinázy jsou enzymy přenášející fosfátové skupiny z makroenergetických molekul např. adenosintrifosfátu (ATP) na aminokyseliny tyrozinových zbytků v proteinech jednotlivých signálních drah na povrchu jejich buněčných receptorů. Fosforylace v proteinech aktivuje buněčné procesy od proliferace přes diferenciaci až po jejich apoptózu. Z popsaného je patrné, že v případě deregulované aktivity tyrosinkinázy hrozí transformace v onkogenní fenotyp buňky. Inhibitor RTK interakcí s bílkovinou Bcl-Abr zablokuje místo pro ATP, což přeruší přenos aktivního fosfátu na tyrosin bílkovin patřících k substrátům leukemcké tyrosinové kinázy. Následně inhibicí fosforylace tyrosinových zbytků proteinů se zastaví aktivace signálních drah, podílejících se na vzniku leukemického fenotypu buňky [1].

V současné chvíli existuje široká škála relativně nových antileukemik a rozšiřuje se i spektrum jejich indikací u dalších forem rakoviny. Impuls pro vývoj dalších nových antileukemik vzešel z rostoucí rezistence či intolerance u pacientů s CML léčených imatinibem jako lékem první volby. Do druhé linie antileukemik řadíme např. bosutinib (inhibice *Abl* a *Src* proteinu) [2], dasatinib [3], poskytující pozitivní výsledky kromě terapie CML i v preklinických testech u rakoviny prsu (inhibice *Src* proteinu) [4], erlotinib (inhibice *EGRF)* pro léčbu nemalobuněčného karcinomu plic [5], pazopanib pro léčbu renálního karcinomu (RCC) [6] a vatalanib (inhibice *KIT*, *PDGFR* a *VEGFR-1*, *VEGFR-2* a *VEGFR-3)* pro léčbu maligních gastrointestinálních stromálních nádorů (GIST) [7]. Jelikož předmětem mé disertace je stanovení nízkomolekulárních látek, budu se v následující kapitole zabývat stanovením TKI v různých tělesných tekutinách.

2.1.1.1 Stanovení imatinibu v reálném vzorku

Je nasnadě, že od doby objevení imatinibu, už vyšlo nespočetné množství studií zabývajících se kromě detailního popisu mechanismu účinku léku, jeho vlivu na lidský organismus, rezistencí a intolerancí lidského organismu na jeho terapeutické nasazení, rovněž jeho stanovením v biologických vzorcích. V literatuře lze nalézt různé techniky stanovení imatinibu. Stanovení imatinibu spolu s jeho hlavním metabolitem pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) v lidské moči popsali Rodriguez a kol [8].). Stejní autoři publikovali výsledky stanovení imatinibu v moči i pomocí kapilární elektroforézy v bezvodém prostředí

(NACE) [9]. Imatinib byl stanoven pomocí CE i v krevní plazmě. [10]. V drtivě většině studií byl imatinib stanoven v biologických vzorcích zejména pomocí technik separačních. Z nichž lze uvést např: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s UV detekcí [10 – 12], s detekcí diodového pole (DAD) [13], fluorescenční detekcí [14] či hmotnostní detekcí obvykle v tandemovém uspořádání (HPLC-MS/MS) [15, 16]. Mičová a kol. provedli srovnání průtokové injekční analýzy a HPLC-MS/MS na koloně naplněné částečkami v řádech μm, dovolující díky svému velkému povrchu rychlou separaci při vysoké účinnosti. Jimi vyvinutou FIA metodou byla dosažena vysoká rychlost analýz (až 80 analýz/hod) [17]. Stejní autoři osvětlují stanovení metabolitů u vzorků pacientů léčených imatinibem pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-HRMS), kdy detekovali 24 nových strukturálně neočekávaných metabolitů [18].

2.1.2 Stanovení (malých) anorganických iontů pomocí CE

Stanovujeme-li anorganické ionty pomocí CE, musíme brát v potaz otázku nepřímé UV detekce a modifikace elektroosmotického toku (EOF). Klíčovým pro získání nejlepších výsledků separace je zvážení znaménka a elektroforetické mobility absorbujících iontů [19, 20]. Druhou otázkou v případě stanovení anorganických aniontů je ovlivnění EOF, kdy je nutno pro stanovení aniontů obrácení EOF. Toho lze docílit modifikací stěny kapiláry tzv. dynamickým pokrytím pomocí modifikátorů EOF přidávaných do elektrolytu. Jako modifikátory pro nepřímou UV detekci aniontů jsou obvykle užívány dlouhé alkylové řetězce povrchově aktivních látek, např. hexadecyltrimethylammonium bromid (CTAB), tetradecyltrimethylammonium bromid (TTAB) apod. [21, 22]

2.2 Alloxan

První informace o souvislosti mezi alloxanem a vyvoláním stavu diabetu sahají do roku 1818, kdy tato organická látka byla prvně izolována Brugnatellim, ale jméno alloxan jí bylo přiděleno až o dvacet let později [23]. Od 40. let minulého století je popsán a znám experimentální stav *diabetes mellitus* u zvířat nazývaný "alloxanový diabetes" [24]. Následné studie poukázaly, že tento diabetes lze vyvolat kromě králíků i u dalších zvířat (myši, krysy, opice, kočky či psa).

CÍLE PRÁCE

Cíle této práce lze shrnout do tří bodů:

- Vývoj rychlé a účinné metody simultánní separace sedmi nových antileukemik pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) s UV detekcí a micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC) zejména pro rychlou farmaceutickou kontrolu. Validace metody. Test robustnosti.
- Vývoj rychlé a jednoduché metody při stanovení kyseliny citrónové pomocí CZE s nepřímou UV detekcí. Analýza uvolněného množství kyseliny citronové ze vzorků zlatých nanočástic po jejich umístění do jiných pufrů. Validace metody.
- 3. Vývoj metody pro separaci alloxanu a jeho prekurzorů pomocí CZE s UV detekcí. Stabilitní studie alloxanu a jeho produktů simulací skladování mouky v různých prostředích pomocí přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Komponenty základních elektrolytů: kyselina fosforečná, kyselina boritá, kyselina ftalová, hydroxid sodný, hydroxid amonný, kyselina octová, TRIS, DMSO, SDS, CTAB, DDAB, PB, MOPS, kyselina trichloroctová, chlorid sodný, 1-propanol, acetonitril byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Standardy: bosutinib, dusičnan amonný, molybdenan amonný, kyselina citronová, alloxan, kyselina barbiturová, kyselina močová byly též zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Standardy: imatinib, dasatinib, pazopanib, erlotinib, canertinib a vatalanib byly zakoupeny od firmy LC Laboratories (Woburn, USA). Zlaté nanočástice (20 nm) stabilizované citrátem byly taktéž zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Všechny použité chemikálie byly čistoty p. a.

3.2 Instrumentace

Analýzy byly prováděny na instrumentu kapilární elektroforézy HP ^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) s detektorem s diodovým polem (DAD). Pro analýzy byly použity nepokryté křemenné kapiláry (MicroSolv Technology Corporation, NJ, USA) o vnitřním průměru 50 µm s celkovou délkou 33,0 cm a efektivní délkou 24,5 cm v případě stanovení antileukemik nebo s celkovou délkou 48,5 cm a efektivní délkou 40,0 cm v případě stanovení citrátu ve vzorcích nanočástic a stanovení alloxanu. Prostor kapiláry během všech analýz byl termostatován na 25 °C. V případě stanovení léčiv a alloxanu, byla každý den před prvním experimentem kapilára promývána 10 min 0,1 M NaOH, 20 min deionizovanou vodou a 10 min příslušným elektrolytem. V případě stanovení citrátu, byla každý den před prvním experimentem kapilára promývána 10 min 0,1 M NaOH, 20 min deionizovanou vodou, 30 min polybrenem a 10 min příslušným elektrolytem. Mezi jednotlivými experimenty byla kapilára promývána 2 min 0,1 M NaOH, 3 min deionizovanou vodou a 5 min příslušným elektrolytem. Pouze v případě alloxanu bylo promývání sníženo na 1 min 0,1 M NaOH, 1 min deionizovanou vodou a 3 min příslušným elektrolytem. Veškeré promývání bylo automatické, tlakem 925 mbar.

Elektrolyty byly připravovány rozpuštěním vypočteného množství kyseliny v deionizované vodě (18 MΩcm, Millipore, USA), následně bylo pH byl upraveno titrací příslušnou bází (např. 50 % (w/w) NaOH). Pro CE-MS byly elektrolyty připravovány ve vodě zakoupené od firmy Merck (LC-MS kvalita). V případě použití aditiv byla aditiva přidávána až k finálnímu roztoku po titraci pH. Všechna měření byla prováděna 5 x, není-li uvedeno v textu jinak.

3.3 Příprava vzorků

Zásobní roztoky šesti léčiv – antileukemik byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml v methanolu, pazopanib byl rozpuštěn v DMSO. Roztoky byly poté ředěny v deionizované vodě na přípravu pracovních roztoků na požadované koncentrace. Všechny roztoky byly uchovávány v podmínkách pod -20 °C bez přístupu světla. Zásobní roztoky modelové směsi (chlorid sodný, molybdenan amonný, dusičnan amonný a kyselina citronová) pro separaci aniontů (chloridový, molybdenanový, dusičnanový a citrátový) byly připraveny v koncentraci 1 mg/ml v deionizované vodě a poté ředěny deionizovanou vodou na přípravu pracovních roztoků. Zásobní roztoky alloxanu spolu s kyselinou barbiturovou a močovou byly připraveny v koncentraci 1 mg/ml v deionizované vodě a poté ředěny deionizovanou vodou na přípravu pracovních roztoků.

Vzorky zlatých nanočástic (5 nm, 10 nm, 20 nm a 50 nm) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Použité nanočástice byly skladovány v lednici při teplotě 4°C.

Pro analýzu mouky byl vybrán vzorek bělené mouky z USA, Gold Medal, zakoupený v běžném obchodním řetězci (Walmart). Mouka byla poskytnuta spolupracujícím pracovištěm FN Ostrava (MUDr. Václav Procházka, Ph.D.). K naváženému cca 1 g mouky byl přidán standard alloxanu (2 mg), popřípadě 0 mg (blank – slepý pokus). Vzorky mouky byly extrahovány kyselým výluhem. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml 0,01 M HCl a vzorek byl sonifikován po dobu 10 minut v ultrazvukové lázni. Po dekantaci byl supernatant odebrán, přefiltrován přes stříkačkový filtr (0,45 μm, PTFE, Membrane Solutions) a dávkován přímo do hmotnostního spektrometru.

Pro analýzu alloxanu ve vzorcích krve byla použita krev zdravého dobrovolníka. Krev byla ihned po odběru zamražena na -80 °C a takto uchována až do analýzy. Vzorky krve byly před analýzou upraveny. Bylo provedeno rychlé rozmražení vzorku a následná deproteinace

kyselinou trichloroctovou (TCA). 350 μ l vzorku bylo smícháno se 650 μ l 1 mol/l TCA a směs byla promíchána na vortexu po dobu 5 s. Posléze byla sonifikována v ultrazvuku po dobu 30 s a následně centrifugována po dobu 1 minuty při 5000 otáčkách/min. Supernatant byl zfiltrován přes stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,45 μ m a rekonstituován methanolem. Ke vzorku krve byl přidáván standard alloxanu (finální koncentrace 1 x 10⁻⁴ mol/l) v různých fázích procesu jejího zpracování následujícím způsobem: a) do plné krve, b) do deproteinované krve, c) do filtrované krve.

Se všemi vzorky krve bylo nakládáno jako s potenciálně infekčním materiálem. Byly použity základní ochranné pomůcky pro práci s infekčním materiálem a odpad byl ukládán do zvláštních kontejnerů a následně zlikvidován předepsaným způsobem.

3.4 Validace metod

Identifikace píků analytů byla prováděna porovnáváním UV spekter a metodou standardních přídavků ("spajkování") jednotlivých analytů. K validaci bylo použito vyhodnocení pomocí statistického programu QC Expert 2.5 (TriloByte Statistical Software, Pardubice, Česká republika). Přesnost v rámci jednoho dne byla vyhodnocena z kalibračních závislostí na příslušných koncentračních hladinách vztažením ke koncentraci interního standardu. Jednotlivé kalibrace byly měřeny po určené dny s tím, že byla spočtena průměrná hodnota relativní směrodatné odchylky. Přesnost v rámci více dnů byla poté určena jako relativní směrodatné odchylka všech měření v určených dnech. Meze detekce (LOD) a meze kvantifikace (LOQ) byly odhadnuty v použitém softwaru jako hodnoty 3S/N a 10S/N. Výtěžnost byla spočítána jako podíl mezi známým přidaným množstvím analytu a vzorku bez přídavku analytu.

3.5 Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií (CE-MS)

Pro analýzy hmotnostní spektrometrií s přímým nástřikem byl využit hmotnostní spektrometr Agilent 6460 (Agilent, Waldbronn, Německo) s trojitým kvadrupólovým analyzátorem. Stříkačková mikropumpa (New Era Pump System, Farmingdale, NY, USA) byla využita pro dopravu vzorku do elektrospreje. Průtok byl nastaven na hodnotu 3 μl/min. Software MassHunter, verze B.06.00, byl použit pro ovládání přístroje i sběr signálu. Data byla sbírána po stabilizaci signálu nejméně 3 minuty a pak bylo analyzováno průměrné spektrum.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Separace nových léčiv pro léčbu leukémie pomocí kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí

Jak je patrné ze struktury všechny analyty (imatinib, bosutinib, canertinib, dasatinib, erlotinib, pazopanib a erlotinib, viz. obr. 1) budou kladně nabité v kyselé oblasti pH a proto bylo zvolené nízké pH pro experimenty v módu kapilární zónové elektroforézy (CZE) a vysoké pH pro experimenty v módu micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC), kde naopak budou všechny analyty neutrální.



Obrázek 1: Struktury analytů protinádorových léčiv.

4.1.1 Vývoj metody

V rámci hledání optimálních CZE podmínek byl zvolen jako startovací pufr fosfátový pufr o koncentraci 100 mM a kyselá oblast 2,0 – 3,0. Nejprve byl studován vliv pH na separaci všech sedmi analytů během jedné analýzy. Jako protiionty v pufru byly použité sodíkové ionty. Efekt pH byl studován při pH 2,0; 2,25; 2,5; 2,75 a 3,0. Úplnou separaci, tj. separaci všech sedmi analytů poskytlo pH 2,75, a proto byla tato hodnota vybrána pro další experimenty. Ostatní hodnoty pH poskytly pouze částečnou separaci.

Dalším studovaným parametrem byl vliv protiiontů. Protiionty jsou dalším důležitým parametrem, který může ovlivnit separaci prostřednictvím jejich interakce s analyty. Rovněž je možná jejich interakce se silanovými skupinami na stěně kapiláry a tím změna zeta potenciálu potažmo EOF. Za tímto účelem byl fosfátový pufr o koncentraci 100 mM titrován pomocí TRIS na pH 2,75; ovšem nebyl zaznamenán žádný signifikantní vliv v efektivních mobilitách analytů oproti použitým sodným iontům.

Posledním studovaným parametrem byla koncentrace elektrolytu. Je obecně známo, že iontová síla má vliv jak na elektroosmotický tok, tak na vlastní separaci látek, neboť ovlivňuje disociaci. Zvýšení koncentrace elektrolytu vede ke snížení EOF. Byly studovány tři koncentrace fosfátového elektrolytu: 50 mM, 75 mM a 100 mM. Nižší koncentrace elektrolytu opět neposkytly separaci všech sedmi analytů. Nejlepší separace byla získána při koncentraci 100 mM. Vyšší koncentrace nebyla zkoušena z důvodu generování relativně velkého elektrického proudu (při použití této koncentrace byl generován proud 60 μ A při +15 kV). Vyšší koncentrace by tak pravděpodobně vedly ke generování Jouleova tepla a tím k horší opakovatelnosti analýz.

Pod optimalizovanými podmínkami proběhla analýza všech sedmi analytů do osmi minut v následujícím migračním pořadí: vatalanib; imatinib; bosutinib; canertinib; dasatinib; pazopanib; erlotinib (obrázek 2A).

Jako další otázka v rámci vývoje metody na separaci všech sedmi léčiv byl řešen mód MEKC. Pro tyto experimenty, jak již bylo výše zmíněno, byla použita zásaditá oblast a byly studovány dva elektrolyty. Jako startovací elektrolyt byl zvolen borát/NaOH o koncentraci 100 mM a pH 9,5.

Významným parametrem v MEKC je přídavek tenzidu (např. SDS) a tvorba micel. Přídavek SDS ovlivní separací tím, že ovlivňuje retenční faktory analytů. Byly studovány následující koncentrace SDS: 50 mM, 75 mM, 100 mM a 150 mM. Žádná z těchto koncentrací nevedla k separaci všech analytů. Jako druhý studovaný elektrolyt byl 50 mM fosfát/NaOH pH 8,0 s přídavkem SDS o koncentracích 10 mM, 25 mM a 50 mM. V tomto případě byla získána opět pouze částečná separace analytů (4 píky) a navíc analýza trvala okolo 30 min (obrázek 2A). Proto pro další kroky byla vybrána CZE separace v optimalizovaných podmínkách (100 mM fosfát NaOH pH 2,75).



Obrázek 2: CZE a MEKC elektroferogram protinádorových léčiv;

(A) CZE: BGE: 100 mM fosfát/NaOH pH 2,75; separační napětí 25 kV, teplota 25 °C, hydrodynamické dávkování 5 s tlakem 50 mbar, koncentrace analytů: vatalanib, imatinib, canertinib and dasatinib 10 μ g/ml; bosutinib 100 μ g/ml; pazopanib 33 μ g/ml; erlotinib 25 μ g/ml; (B) MEKC: BGE: 50 mM fosfát/NaOH pH 8,00; separační napětí 25 kV, teplota 25 °C, hydrodynamické dávkování 5 s tlakem 50 mbar, koncentrace všech analytů: 10 μ g/ml.

Doposud byla všechna léčiva stanovena odděleně jednotlivými analýzami. Vyvinutá metoda umožňuje stanovit všech sedm léčiv během jediné analýzy. Další výhodou je její rychlost (analýza je hotova do 8 minut) a jednoduchost. Vyvinutá metoda může být použita pro kontrolu kvality léčiv ve farmaceutickém průmyslu

4.1.1 Validace metody

U vyvinuté metody za použití následujících optimálních podmínek byly validovány základní parametry metody, viz tabulka I. Relativní směrodatné odchylky migračních časů (RSD t_m) analytů nepřesáhly 0,9 % a RSD ploch (area) byly nižší než 6,6 % vyjma pazopanibu (12,4 %). V tomto případě lze usuzovat degradaci pazopanibu během analýz. Je zřejmé, že vyvinutá metoda poskytuje dobré výsledky umožňující její použití pro farmaceutickou analýzu (koeficienty determinace pro všechny analyty byly vyšší než 0,96).

Léčivo	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	
Přesnost korigovaných migračních časů								
RSD (%) jednodenní ^a	0,2	0,4	0,2	0,3	0,4	0,4	0,3	
RSD (%) mezidenní ^a	0,5	0,8	0,6	0,5	0,9	0,8	0,6	
	Pì	fesnost ko	rigovanýc	h ploch pí	k ů	1	1	
RSD (%) jednodenní ^a	2,2	2,7	3,7	3,9	4,7	8,5	2,1	
RSD (%) mezidenní ^a	5,5	4,4	5,5	4,1	6,4	12,4	6,6	
	,	Výtěžnost	(recovery)), kalibrac	e			
Výtěžnost (%) ^b	95,33	i.s.	96,26	100,41	83,6	95,52	85,58	
Linearita (µg/ml)	5 - 100	5 - 100	5 - 100	5 - 100	5 - 100	5 - 100	5 - 100	
Koeficient determinace	0,9989	i. s.	0,9992	0,9990	0,9634	0,9993	0,9999	
Limity detekce a kvantifikace								
LOD ^c (µg/ml)	0,5	0,9	2,0	1,5	0,5	0,5	0,75	
LOD ^c (µg/ml)	1,7	3,0	6,7	5,0	1,7	1,7	2,5	

Tabulka I: Parametry validace vyvinuté metody

(a) vatalanib, (b) imatinib, (c) bosutinib, (d) canertinib, (e) dasatinib, (f) pazopanib, (g) erlotinib

^a Přesnost jednodenní ("intraday") byla počítána z kalibrací z poměru plochy píku a plochy píku interního standardu (imatinib 100 μ g/mL) jako průměr z kalibračních závislostí (kalibrace 5 μ g/mL až 100 μ g/mL, 6 bodů, n = 5) měřených v jednom dni, přesnost mezidenní ("interday") byla vypočtena jako průměr z kalibračních závislostí (kalibrace 5 μ g/mL až 100 μ g/mL, 6 bodů, n = 5) měřených po 3 po sobě jdoucích dnech.

 $^{\rm b}$ LOD a LOQ hodnoty byly vypočteny softwarem QC Expert (Pardubice) jako hodnoty $3\sigma a$ 10 $\sigma.$

^c Výtěžnost byla vypočtena z přídavku 10 μg/ml standardů jednotlivých léčiv do směsi standardů 7 léčiv.

4.1.2 Stanovení citrátu ve vzorcích zlatých nanočástic pomocí CZE s nepřímou UV detekcí

Jak již bylo popsáno, dáme-li nanočástice zlata, původně stabilizované kyselinou citrónovou, do prostředí např. MOPS pufru, dojde ke změně jejich náboje, což se projeví např. jejich různým elektroforetickým chováním. Pravděpodobně dochází k výměně iontů mezi povrchem nanočástic a elektrolytem. Pro studium tohoto modelového případu, tj. uvolnění kyseliny citrónové z povrchu nanočástic v prostředí MOPS pufru, je nutné dobře zvolit pracovní elektrolyt. Pokud dávkujeme vzorek nanočástic s uvolněným citrátem v MOPS pufru, je MOPS přítomen ve velkém nadbytku. Pokud by MOPS migroval rychleji než citrát, byl by pravděpodobně pík kyseliny citrónové nedetekovatelný. Nicméně podle softwaru Peakmaster má citrát pohyblivost -53,0 x 10^{-9} m² V⁻¹ s⁻¹, zatímco ionty MOPS mají nižší pohyblivost (MOPS -4,6 x 10^{-9} m² V⁻¹ s⁻¹), takže zvolený systém (pH 6,5) je vhodný pro toto stanovení.

Komerčně prodávané zlaté nanočástice (20 nm), které jsou na svém povrchu stabilizovány citrátem, byly použity jako modelový vzorek. Tyto NPs mají odlišný zeta potenciál v různých elektrolytech běžné používaných v CE (např.: $-11 \pm 1 \text{ mV v} 50 \text{ mM}$ acetátu pH 4,5; $-28 \pm 2 \text{ mV v} 50 \text{ mM}$ MOPS pH 7,5 nebo $-77 \pm 3 \text{ mV v} 50 \text{ mM}$ borátu pH 9,5 (všechny údaje byly měřeny pomocí přístroje Malvern Zetasizer). Se změnou zeta potenciálu souvisí i migrace těchto NPs v elektrolytech. Změny v zeta potenciálu popsané výše jsou pravděpodobně způsobeny ligandem/iontovou výměnnou rovnováhu, kde jsou citrátové ionty vyměněné jinými ionty z roztoku, jak je poznamenáno také v nedávné publikaci [25]. Pro studium tohoto efektu byla přidána různá množství MOPS do vzorků NPs a po 30 minutách kvantifikováno množství uvolněného citrátu z povrchu NPS pomocí výše popsané vyvinuté metody. Za výše popsaných optimálních podmínek byla provedena CZE analýza nanočástic (obr. 3) a to se stejnými výsledky, jaké předpovídal program Peakmaster. Je zřejmé, že metoda může být použita pro studium množství citrátu uvolňovaného ze vzorku nanočástic.



Obrázek 3: CZE elektroferogram citrátu ve vzorku Au NPs; BGE: 5 mM ftalát/NaOH pH 6,5; separační napětí - 15 kV, teplota 25 °C, hydrodynamické dávkování 5 s tlakem 50 mbar, koncentrace analytů: 50 µg/ml.

Závislost plochy píku citrátu na koncentraci MOPS je nelineární (obr. 4). Plocha píku citrátu byla konstantní do přídavku 5 mmol/l MOPS, poté křivka lineárně rostla až do přídavku 0,3 mol/l MOPS, kde pravděpodobně došlo k vysycení povrchu nanočástic, resp. ustanovení rovnováhy mezi citrátovými a MOPS ionty na povrchu nanočástice. Je patrné, že přídavek elektrolytu mění iontové chování NPs. Tento účinek taktéž odráží, že NPs nejsou stabilizovány kovalentně. Závěrem lze konstatovat, že tato práce potvrzuje, že chování nanočástic může být např. v přítomnosti biologických struktur (proteiny, buňky, DNA) odlišné od jejich chování ve vodném prostředí. Tato informace může být naprosto zásadní pro studium NPS v živých organismech, kde mají sloužit jako potenciální "nanopřenašeči" léčiv v živých systémech a kde vyvstává otázka, zda tato cílená terapie může být úspěšnou, když celulární prostředí *de facto* mění chování NPs.



Obrázek 4: Příklad závislosti plochy citrátu na koncentraci přídavku MOPS.
4.1.2.1 Validace metody

Dalším krokem byla validace metody pro stanovení kyseliny citrónové. Základní analytické parametry metody jsou uvedeny v tabulce II. Kalibrační závislosti byly lineární v oblasti mezi 10 μ mol/l a 100 μ mol/l (5 bodů; n = 5), s koeficientem determinace 0,998.

Parametr	Hodnota
Přesnost korigovaných migračních časů ^a	
RSD (%) jednodenní ^a ,	0,6 %
RSD (%) mezidenní ^a	1,5 %
Přesnost korigovaných ploch ^a	
RSD (%) jednodenní ^a	2,8 %
RSD (%) mezidenní ^a	4,5 %
Výtěžnost (recovery), kalibrace	
Výtěžnost (%) ^b	96,4 %
Rovnice regrese	y = 8470 (27) x 12 (5)
Koeficient determinace	0,9978
Limit detekce a kvantifikace	
LOD ^c (µmol/l)	7,0
LOQ ^c (µmol/l)	22

Tabulka II: Parametry validace vyvinuté metody

^aPřesnost jednodenní ("intraday") byla počítána z kalibrací z poměru plochy píku a plochy píku interního standardu (molybdenan amonný 50 mmol/l) měřených po 3 po sobě jdoucích dnech, přesnost "mezidenní" ("interday") byla vypočtena jako průměr z kalibračních závislostí měřených po 3 sobě jdoucích dnech (každý den 3 měření). Koncentrace kyseliny citronové byla 0,1 mmol/l.

^b Výtěžnost byla vypočtena z přídavku 0,5 mmol/l standardu kyseliny citronové ke vzorku Au NPs.

 c LOD a LOQ hodnoty byly vypočteny softwarem QC Expert (Pardubice) jako hodnoty $3\sigma a$ 10 $\sigma.$

4.2 Separace alloxanu a jeho prekurzorů pomocí kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí

Alloxan je v posledních dvou dekádách považován rovněž za kontroverzní látku díky hypotéze jeho vzniku v průběhu procesu bělení mouky. Literatura uvádí, že alloxan vzniká jako vedlejší produkt oxidace proteinů, čímž proces bělení mouky, při němž se mouka stává "čistější" a "bělejší", se vlastně stává toxickým [26]. Mouka sama o sobě podléhá přirozeným procesům stárnutí během svého skladování, kdy probíhá řada oxidačních reakcí zahrnujících reakcí s karotenoidy a sulfhydrylovými skupinami proteinů [27]. Potravinářský průmysl, za účelem tento proces urychlit a získat tak dřív "kvalitnější" mouku, cíleně přidává bělicí prostředky do mouky (benzoylperoxid, plynný chlor, oxid chloričitý, nitrosylchlorid a oxidy dusíku) [28]. Probíhající oxidační procesy mohou modifikovat složky mouky [29] a hypoteticky produkovat toxické látky jako je alloxan. V současné době existuje pouze jedna odborná publikace zabývající se stanovením alloxanu v bělené mouce. Giaccone a kol. analyzovali 175 vzorků ze 3 druhů mouk získaných přímo od výrobce či ze sicilských supermarketů pomocí LC-MS/MS s pre-kolonovou derivatizací alloxanu na alloxazin [30]. Alloxan nalezli pouze ve vzorcích mouky označovaných "cake bleached flour" (42 mouk) s LOD 0,73 mg/kg a výtěžností mezi 94 % až 102 %. Kvůli derivatizaci je metoda LC-MS/MS pracná a časově náročná, z tohoto důvodu jsem se zaměřila na vývoj metody na stanovení alloxanu pomocí CE.

4.2.1 Vývoj metody

Kyselého charakteru alloxanu, kyseliny močové a kyseliny barbiturové bylo využito v CZE experimentech. V zásaditém prostředí se budou tyto sloučeniny chovat jako anionty (obr. 5). Z tohoto důvodu byl jako výchozí elektrolyt pro prvotní experimenty vybrán bazický elektrolyt - borát sodný. Spolu s alloxanem byly při analýze dále separovány kyselina barbiturová a kyselina močová, možné syntetické prekurzory alloxanu, které lze ale i využít v kontrolní fázi potravin jako interní standardy (kyselina barbiturová se v potravinách pravděpodobně vyskytovat nebude).



Obrázek 5: Struktury: (A) alloxan, (B) kyselina barbiturová, (C) kyselina močová.

V rámci optimalizace podmínek byl nejprve testován efekt pH borátu (50 mM) při hodnotách 8,0; 8,25; 8,5; 8,75 a 9,0. Nejlepší separace dle rozlišení a tvaru píků bylo dosaženo při pH 8,0 (úplná separace). Následně byl studován efekt koncentrace elektrolytu. Byly studovány tyto koncentrace borátu: 25 mM, 50 mM, 75 mM a 100 mM. Optimální hodnota byla 50 mM. Nižší koncentrace vedly k širším píkům, zatímco vyšší koncentrace způsobily nestabilitu elektrického proudu při analýzách. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo



při pH 8,0. Tyto podmínky vedly k separaci všech tří analytů do 2 minut. (obr. 6).



BGE: 50 mM borát/NaOH pH 8,0; separační napětí 20 kV; 25°C; hydrodynamické dávkování 5 s tlakem50 mbar, koncentrace analytů 50 μg/mL.

Dalším významným parametrem ovlivňující rychlost analýzy je separační napětí. Ovlivňuje jak migrační čas analytů, tak vznikající Jouleovo teplo. Napětí bylo studováno v rozsahu od 5 kV až po 30 kV v optimálních podmínkách (50 mM borát/NaOH pH 8,0), za hydrodynamického dávkování vzorku tlakem 50 mbar po dobu 5 s. Optimální hodnota byla 10 kV. Při nižších hodnotách napětí dochází k prodloužení migračních časů analytů a tedy i analýzy, naopak v případě vyššího napětí dochází ke zvýšenému generování Jouleova tepla a analýza se stává neopakovatelnou.

Poslední parametr, který je potřeba brát v potaz, je vliv teploty. Stejně jako napětí i teplota ovlivňuje délku analýzy díky ovlivnění viskozity prostředí. Efekt teploty byl studován při 25°C, 40°C a 60°C. Optimální hodnota byla 25°C. Zvýšení teploty urychlí analýzu změnou viskozity prostředí, ale zároveň způsobí nestabilitu signálu, jelikož se bude generovat více Jouleova tepla.

Na základě výše uvedeného je zřejmé, že není potřeba testovat přídavky aditiv, protože separace všech tří analytů je úplná, rychlá a s dostatečným rozlišením.

4.2.2 Stanovení základních parametrů metody

Vyvinutá metoda byla částečně validována. Základní parametry metody jsou uvedeny v tabulce III.

Parametr	Hodnota	
Přesnost korigovaných migračních časů ^a		
RSD (%) jednodenní ^a ,	1,2	
Přesnost korigovaných ploch ^a		
RSD (%) jednodenní ^a	4,7	
Kalibrace		
Linearita (µmol/l)	10 - 100	
Rovnice regrese	y = 217 (12) x 101 (26)	
Koeficient determinace	0,993	
Limit detekce a kvantifikace		
LOD ^b (µmol/l)	8	
LOQ ^b (µmol/l)	27	

Tabulka III: Základní parametry vyvinuté metody

^aPřesnost jednodenní "intraday" byla počítána z kalibrací z poměru plochy píku a plochy píku interního standardu (kyselina barbiturová 50 μ g/ml) měřených po 3 po sobě jdoucích dnech. ^b LOD a LOQ hodnoty byly vypočteny softwarem QC.Expert (Pardubice) jako hodnoty 3 σ a 10 σ .

4.2.2.1 Analýza alloxanu pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)

Před úplnou validací validací metody bylo umožněno, využít přístroje CE-MS pro analýzu alloxanu. Tato možnost je z pohledu analýzy reálných vzorků (z pohledu identifikace) natolik zajímavá, že jsem se rozhodla využít této možnosti.

Nejprve byl analyzován vodný roztok alloxanu o koncentraci 10⁻⁴ mol/l ve skenovacím režimu, aby bylo zjistěno MS spektrum alloxanu. Použité podmínky pro MS detekci jsou v následující tabulce (Tabulka III).

Parametr	Podmínky
Sprejovací napětí	-4000 V
Tlak nebulizačního plynu	15 psi (1 psi = 6894,76 Pa)
Průtok nebulizačního plynu	10 l/min
Teplota plynu	300°C
Napětí na fragmentoru	70 V

Tabulka III: Parametry MS detekce pro pilotní studii alloxanu

V MS spektru alloxanu (obr. 7) je patrný molekulový ion alloxanu $[M-H]^-$ o m/z 141, dále jeho "adukt s vodou" představující kyselinu alloxanovou $[M-H+H_2O]^-$ o m/z 159 a dekarboxylovanou formu kyseliny alloxanové $[M-H+H_2O-CO_2]^-$ o m/z 115 (Δ m/z 44 představuje logickou ztrátu CO₂).



Obrázek 7: Příklad MS spektra alloxanu

4.2.2.1.1 Optimalizace MS parametrů

Dalším krokem byla optimalizace parametrů MS detekce pro dosažení co nejlepšího signálu alloxanu. Bylo měněno sprejovací napětí v rozsahu -4,0 kV, -3,5 kV, -3,0 kV a -2,5 kV, teplota nebulizačního plynu v rozsahu 150°C, 200°C, 250°C a 300°C a napětí na fragmentoru v rozsahu 135 V, 120 V, 100 V, 90 V, 80 V, 70 V a 60 V. Nejlepšího signálu bylo dosaženo při použití sprejovacího napětí -3,0 kV, teploty nebulizačního plynu 200°C a napětí na fragmentoru 70 V. První dva parametry ovlivňovaly stabilitu elektrospreje, zatímco poslední parametr především podobu MS spektra – při použití výrobcem nastaveného napětí 135 V byl detekován pouze produktový ion o m/z 59.

4.2.2.2 Studium hydrolýzy alloxanu

Výše popsaný jev hydrolýzy alloxanu na kyselinu alloxanovou je v literatuře popsaný (viz teoretická část) jako relativně rychlý proces. Pokud by tento proces byl velmi rychlý (rychlejší než je vlastní separace), tak nemusí dojít k odseparování alloxanu a kyseliny alloxanové pomocí kapilární elektroforézy (bylo by možné využít tento jev pro identifikační účely). Na druhou stranu je ale popsáno, že kyselina alloxanová na rozdíl od alloxanu nevyvolává experimentální diabetes, takže *de facto* by bylo daleko zajímavější mít informace o koncentraci alloxanu než o koncentraci obou látek dohromady.

Pro ověření rychlosti hydrolýzy byl proveden pokus, při kterém byl alloxan smíchán s vodou a ihned analyzován pomocí MS. Doba od prvního kontaktu vody s alloxanem do nástřiku do MS byla 20 sekund (poločas rozpadu alloxanu v organismu byl publikován jako 1 minuta). Na následujícím obrázku 8 je vidět srovnání MS spekter průměrovaných z měření po 0,5 - 0,8 minutě a po 4,5 - 4,8 minutě od smíchání alloxanu s vodou.



Obrázek 8: Srovnání MS spekter alloxanu po kontaktu s vodou (A) po 0,5 – 0,8 min; (B) po 4,5 – 4,8 min.

Z obrázku je vidět různé poměrné zastoupení alloxanu a kyseliny alloxanové (m/z 141 ku m/z 159). Nicméně zároveň je zřejmé, že již po 20 s od kontaktu alloxanu s vodou dochází ke vzniku kyseliny alloxanové. Nižší čas analýzy od kontaktu vody s alloxanem není v současnosti experimentálně dosažitelný z důvodu ručního míchání alloxanu s vodou. Zajímavé je, že poměr alloxanu (m/z 141) a kyseliny alloxanové (m/z 159) se po ustanovení jisté "rovnováhy", cca po 1,5 minutě, už nemění. Zároveň jsou tyto ionty ve stejném poměru intenzit detekovatelné ve stejném vzorku (alloxan rozpuštěný ve vodě) i po 48 hodinách. Z toho vyplývá, že pravděpodobně je rovnováha tvorby kyseliny alloxanové natolik rychlá, že nebude možné detektovat alloxan samostatně. Nicméně alloxan, resp. kyselina alloxanová jsou ve vodném prostředí stabilní i 48 hodin.

4.2.2.3 Stabilitní studie alloxanu

V dalších experimentech byla testována stabilita alloxanu v dalších prostředích. Nejprve bylo studováno chování alloxanu v prostředí 0,01 mol/l NaOH a 0,01 mol/l HCl. V kyselém prostředí byl alloxan (m/z 141) i kyselina alloxanová (m/z 159 a 115) detekována. Zatímco v zásaditém prostředí byla detekována jen kyselina alloxanová (m/z 159 a 115) a řada dalších iontů odpovídajících pravděpodobně aduktům (včetně sodných aduktů) a hydrolytickým produktům (nebyly dále identifikovány). Tato skutečnost je zásadní z pohledu vývoje metody pro kapilární elektroforézu, kde je optimální použití právě zásaditého prostředí. Zároveň je otázkou, zdali předchozí studium (CE-UV s použitím borátového elektrolytu o pH 8,0) skutečně umožňuje detekci alloxanu.

Z tohoto důvodu bylo provedeno další studium stability pomocí MS – alloxan byl dávkován v prostředí acetátu/NH₄OH pH 8,0, formiátu/NH₄OH pH 8,0 (prostředí vhodná pro CE-MS) a v prostředí borátu/NaOH pH 8,0. V prostředí acetátu byly pozorovány ionty o m/z 115, 141 a 159 (byl detekován alloxan i kyselina alloxanová), nicméně nejvyšší intenzitu měl fragment o m/z 59. Ve formiátu byl pozorován pouze ion o m/z 115 a 159 (kyselina alloxanová), nicméně s velmi malou intenzitou. Z výše uvedeného vyplývá, že obě prostředí, která jsou vhodná pro spojení CE s MS, neposkytují dostatečnou odezvu alloxanu. Pravděpodobně dochází k hydrolytickým procesům, stejně jako v prostředí hydroxidu sodného.

Posledním studovaným prostředím byl borát/NaOH pH 8,0. V tomto prostředí byl alloxan i kyselina alloxanová pozorována (m/z 115, 141, 159). Byla studována koncentrace 1 mM, 5 mM a 20 mM. Se zvyšující se koncentrací sodných iontů dochází k tvorbě aduktů ve spektru a převaze dalších iontů. Nicméně pokud je použitý NH₄OH místo NaOH na přípravu borátového elektrolytu, pak dochází k lepší ionizaci a detekci jak alloxanu, tak kyseliny alloxanové (viz obr. 9) s 5 mM borát/NH₄OH pH 8,0).



Obrázek 9: MS spektrum alloxanu v 5 mM borát/NH₄OH pH 8,0.

Použití borátu pravděpodobně stabilizuje alloxan v zásaditém prostředí a díky tomu je možné jej analyzovat jak pomocí spojení CE-MS, tak i ve spojení CE-UV.

Je otázkou, zda je alloxan, resp. kyselina alloxanová detekovatelná i v jiných prostředích než ve vodě, např. v organických rozpouštědlech. Z toho důvodu byl alloxan rozpuštěn v methanolu, propanolu a acetonitrilu a byl přímo dávkován do MS. Ve všech případech byl pozorován jak signál odpovídající alloxanu (m/z 141) tak signál odpovídající kyselině alloxanové (m/z 115 a 159). Nicméně, intenzity těchto signálů byly rozdílné oproti

analýze ve vodě (viz obr. 10). Samozřejmě intenzity signálů se mění nejen různou hydrolýzou alloxanu, ale především různou ionizací v těchto prostředích.



Obrázek 10: Srovnání MS spekter alloxanu v organických rozpouštědlech (A) methanolu, (B) propanolu a za (C) acetonitrilu.

4.2.2.1 Studium přítomnosti alloxanu v krvi

Další otázkou je, zdali po injekci alloxanu do krevního řečiště (pro vyvolání diabetu), dojde ke stabilizaci alloxanu nebo nikoliv, resp. jak moc dojde k změně struktury alloxanu na kyselinu alloxanovou, která již diabetes nezpůsobuje. pH krve bývá v rozmezí 7,36 – 7,44, což představuje rozmezí, které by nemělo způsobit ani kyselou ani zásaditou hydrolýzu. Krev samozřejmě obsahuje vodu, tj. zřejmě může dojít k procesu tvorby kyseliny alloxanové. Hypoteticky je i možné, že i přes rychlý rozpad alloxanu může dojít k jeho transportu až do místa účinku, protože srdce je schopno přečerpat celý objem krve do jedné minuty.

Ověření této hypotézy ale není jednoduché, protože přímá analýza přítomnosti alloxanu v krvi není technicky jednoduchá (krev obsahuje mnoho látek a zároveň velké množství NaCl, což znesnadňuje ionizaci). V tomto případě byla nejprve testována možnost detekce alloxanu v prostředí o vysoké koncentraci NaCl (150 mM). MS spektra obsahovala majoritně samozřejmě ionty odpovídající aduktům NaCl (m/z 35, 93, 151, 211, 269, 327 apod.). Nicméně i v těchto podmínkách byly po přídavku alloxanu detekovány ionty o m/z 115, 141 a 159. Alloxan je tedy možné detekovat i v prostředí o vysoké koncentraci NaCl.

Jako poslední krok bylo testováno, zdali by bylo možné detektovat alloxan v deproteinované krvi pomocí přímého nástřiku do MS. Alloxan byl s krví smíchán těsně před nástřikem do MS. MS spektrum vzorku obsahujícího alloxan odpovídalo složité matrici, nicméně alloxan byl i v této matrici detekován (m/z 141), viz obrázek 11. Je zajímavé, že ve stejném vzorku po 10 minutách stání již nebylo možné alloxan detekovat.



Obrázek 11: Příklad MS spektra alloxanu v krvi.

Celé výše uvedené studium je příslibem pro vývoj metody na stanovení alloxanu pomocí spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Je vidět, že stabilita alloxanu hraje důležitou roli ve vývoji metody a zároveň může hrát roli i v případě detekce alloxanu v biologických vzorcích.

5 ZÁVĚR

V této práci jsem se snažila představit možnosti stanovení nízkomolekulárních látek pomocí kapilární elektroforézy prostřednictvím tří aktuálních témat, zejména v oblasti medicíny. V první části mé práce byla vyvinuta a validována metoda simultánního stanovení sedmi relativně nových protinádorových léčiv pomocí CZE. Ve druhé části práce pak byla vyvinuta metoda pro stanovení citrátu uvolňovaného z povrchu zlatých nanočástic rovněž pomocí CZE po přidání MOPS iontů k nanočásticím. Metoda zahrnovala použití obráceného elektroosmotického toku a nepřímé UV detekce. V poslední části práce pak byla vyvinuta metoda pro separaci alloxanu spolu s jeho prekurzory pomocí CZE a následovala stabilitní studie alloxanu v mouce Gold Medal (USA) pomocí přímého nástřiku alloxanu do hmotnostního spektrometru. Lze konstatovat, že kapilární elektroforéza se ukázala být vhodnou technikou pro studium a stanovení všech tří řešených skupin nízkomolekulárních látek. Vyvinuté metody poskytují rychlou, jednoduchou a efektivní analýzu a mohou sloužit ke kontrole kvality v případě léčiv ve farmaceutickém průmyslu a v případě alloxanu v potravinářském průmyslu, kde mohou být obě komplementární k vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC).

6 POUŽITÁ LITERATURA

[1] D.G.Savage, K.H.Antman: *Imatinib Mesylate - A New Oral Targeted Therapy*, N. Engl. J.
 Med. 346 (2002) 683-693.

[2] H. J. Khoury, J. E. Cortes, H. M. Kantarjian, C. Gambacorti-Passerini, M. Baccarani, D.-W. Kim, A. Zaritskey, A. Countouriotis, N. Besson, E. Leip, V. Kelly, T. H. Brümmendorf: *Bosutinib is active in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib and dasatinib and/or nilotinib therapy failure*, Blood 119 (2012) 3403-3412.

[3] K. Futosi, T. Nemeth, R. Pick, T. Vántus, B. Walzog, A. Mócsai: *Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils*, Blood 119 (2012) 4981-4991.

[4] R. S. Finn, J. Dering, C. Ginther, C. A. Wilson, P. Glaspy, N .Tchekmedyian, D. J. Slamon: *Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro*, Breast Cancer Res. Treat. 105 (2007) 319-326.

[5] K. A. Lyseng-Williamson: *Erlotinib: a pharmacoeconomic review of its use in advanced non-small cell lung cancer*, Pharmacoeconomics 28 (2010) 75-92.

[6] A. M. Pick, K.K. Nystrom: *Pazopanib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma*, Clin. Therapeutics 34 (2012) 511-520.

[7] H. Joensuu, F. De Braud, G. Grignagni, T. De Pas, G. Spitalieri, P. Coco, C. Spreafico, S. Boselli, F. Toffalorio, P. Bono, T. Jalava, C. Kappeler, M. Aglietta, D. Laurent, P. G. Casali: *Brit. Vatalanib for metastatic gastrointestinal stromal tumour (gist) resistant to imatinib: final results of a phase II study*, Brit. J. Cancer 104 (2011) 1686-1690.

[8] J. Rodríguez-Flores, J.J. Berzas, G. Castañeda, N. Rodríques: *Direct and fast capillary zone electrophoresic Method for the determination of Gleevec and its main metabolite in human urine*, J. Chromatogr. B 794 (2003) 381-388.

[9] J. Rodríguez-Flores, J. J. Berzas Nevado, A. M. Contento Salcedo, M. B. Cabello Díaz: *Nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of gleevec and its main metabolite in human urine*, J. Chromatogr. A 1068. (2005) 175-182.

[10] T. O. Ajimura, K. B. Borges, A. F. Ferreira, F. A. de Castro, C. M de Gaitani: *Capillary electrophoresis method for plasmatic determination of imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients*, Electrophoresis 32 (2011) 1885-1892.

[11] A. Awidi, I. I. Salem, N. Najib, R. Mefleh, B. Tarawneh: *Determination of imatinib plasma levels in patients with chronic myeloid leukemia by high performance liquid chromatography–ultraviolet detection and liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Methods' comparison*, Leukemia Research 34 (2010) 714-717.

[12] O. Roth, O. Spreux-Varoquaux, S. Bouchet, P. Rousselot, S.Castaigne, S. Rigaudeau, V. Raggueneau, P. Therond, P. Devillier, M. Molimard, B. Maneglier: *Imatinib assay by HPLC with photodiode-array UV detection in plasma from patients with chronic myeloid leukemia: Comparison with LC-MS/MS*, Clin. Chim. Acta 411 (2010) 140-146.

[13] T. Velpandian, R. Mathur, N. K. Agarwal, B. Arora, L. Kumar S. K. Gupta: *Development and validation of a simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of imatinib in biological samples,* J. Chromatogr. B 804 (2004) 431-434.

[14] M. Dziadosz, R. Lessig, H. Bartels: *HPLC–DAD protein kinase inhibitor analysis in human serum*, J. Chromatogr. B. (2012) 77-81.

[15] D. W. Zidan, W. S. Hassan, M. S. Elmasry, A. A. Shalaby: *Imatinib in pure, pharmaceutical preparation, human plasma, and human urine,* Luminescence 33 (2018) 232-242.

[16] K. Titier, S. Picard, D. Ducint, E. Teilhet, N. Moore, P. Berthaud, F.X. Mahon,
M. Molimard: *Quantification of imatinib in human plasma by high- performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Ther. Drug Monit. 27(2005) 634-640.

[17] K. Mičová, D. Friedecký, E. Faber, A. Polýnková, T. Adam: *Flow injection analysis vs. ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of imatinib in human plasma*, Clin. Chim, Acta 411 (2010) 1957-1962.

[18] I. Vrobel, D. Friedecký, E. Faber, L. Najdekr, K. Mičová, R.Karlíková, T.Adam: *Novel sulphur-containing imatinib metabolites found by untargeted LC-HRMS analysis,* Eur. J. Pharm. Sci. 104 (2017) 335-343.

[19] J. Pazourek: Moderní elektroforetické analytické metody: Přednášky pro magisterské studium. Brno 2003.

[20] P. E. Jackson, P.R. Haddad: Optimization of injection technique in capillary ion electrophoresis for the determination of trace level anions in environmental samples, J. Chromatogr. A 640 (1993) 481-487.

[21] C.A. Lucy, R.S. Underhill: *Characterization of the cationic surfactant induced reversal of electroosmotic flow in capillary electrophoresis,* Anal. Chem. 68 (1996) 300-305.

[22] M. Wang, F. Qu, X. Q. Shan, J. M. Lin: *Development and optimization of a method for the analysis of low-molecular-mass organic acids in plants by capillary electrophoresis with indirect UV detection*, J Chromatogr A 989 (2003) 285-292.

[23] F. Wöhler, J. Liebig: *Untersuchungen über die Natur der Harnsäure*, Ann. Pharm. 26 (1838) 241-340.

[24] J. S. Dunn, H. L. Sheehan, N. G. B. McLetchie: *Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally*, Lancet 244 (1943) 484-487.

[25] J. W. Park, J. S. Shumaker-Parry: Strong resistance of citrate anions on metal nanoparticles to desorption under thiol functionalization, ACS Nano. 9 (2015) 1665-1682.

[26] M. B. Shakila, P. Sasikala: *Alloxan in refined flour*, a Diabetic concern. Int. J. Adv. Innov. Res. 1 (2012) 204-209.

[27] O. R. Fennema: Food Additives. Marcel Dekker Inc NY 1985.

[28] S. Chittrakorn, D. Earls, F. MacRitchie: *Ozonation as an alternative to chlorination for soft wheat flours, J. Cereal Sci. 60* (2014) 217-221.

[29] C.A. Thomasson, S.U. Kansas, R. A. Miller, R. C. Hoseney: *Replacement of chlorine treatment for cake flour*, Cereal Chem. USA 72 (1995) 616-620.

[30] V. Giaccone, G. Cammilleri, V. Di Stefano, R. Pitonzo, A. Vella, A. Pulvirenti, G. M. Lo Dico, V. Ferrantelli, A. Macaluso: *First report on the presence of Alloxan in bleached flour by LC-MS/MS*, J. Cereal. Sci. 77 (2017)120-125.

Curriculum vitae

Mgr. Jana Horská

Datum a místo narození: 20. 08. 1986 ve Vysokém Mýtě, ČR Bydliště: Pražská 259/I, Vysoké Mýto, 56601, ČR E-mail: janahorska9@gmail.com

Vzdělání:

2013 – nyní	doktorské studium – PřF UP Olomouc, obor "analytická chemie"
2011 - 2013	Mgr. – PřF UP Olomouc, obor "chemie – geologie pro víceoborové studium"
2008 - 2011	Bc. – PřF UP Olomouc, obor "chemie – geologie pro víceoborové studium"
Zaměstnání:	
06/2014 - 08/2014	projektový manažer, projekt OP VK CZ.1.07/2.4.00/31.0006 "Rozvoj

	vzdělávání a výzkumu v oblasti chemie a medicíny popáleninových
	stavů", Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
05/2015 - 02/ 2017	vědecký pracovník, projekt MZ ČR – RVO - FNOs/ 2015, Fakultní
	nemocnice Ostrava

Jazykové znalosti

Anglický jazyk - středně pokročilý

Odborné stáže a studijní pobyty:

03/2012	učitelská praxe, Základní škola Javornického, Vysoké Mýto
10/2013	učitelská praxe, Gymnázium Otmara Vaňorného, Vysoké Mýto
03/2017 - 06/2017	Latvian Institute of Organic Synthesis, Laboratory of Membrane Active
	Compounds, Riga, Latvia, Supervizor: Dr. Karlis Pajuste

Odborné vědecké zaměření:

Analytická chemie, klinická biochemie, analýza biologických vzorků, charakterizace nanočástic

Pedagogická činnost:

Přednášky (klinická analytická chemie, chemie životního prostředí), cvičení (základní analytická chemie), vedoucí 1 bakalářské práce, vedoucí 1 práce středoškolská odborná činnost, popularizace vědy, (spoluorganizátorka Veletrh vědy a výzkumu PřF UP, Noc vědců a Badatel)

Publikační činnost:

J. Horská, J. Ševčík, J. Petr: Determination of citrate released from stabilized gold nanoparticles by capillary zone electrophoresis, Chemical Papers 72, 419-424 (2018).

J. Horská, P. Ginterová, J. Ševčík, J. Petr: CZE separation of new drugs for treatment of leukemia, Chromatographia 77, 1413-1574 (2014).

J. Horská, P. Ginterová, J. Ševčík, J. Petr: A pilot study on separation of new drugs for treatment of leukemia by capillary zone electrophoresis, Chem. Listy 107, 373-375 (2013).

Konference s uvedením přednáškových příspěvků:

J. Horská, K. Vítková, J. Jurčíková, V. Procházka, J. Petr: Perspektivy využití kapilární elektroforézy v medicíně, 68. sjezd chemiků, 4. 9. – 7. 9. 2016, Praha

Konference s uvedením plátkových příspěvků:

J. Horská, P. Ginterová, J. Ševčík, J. Petr: A pilot study on separation of new drugs for treatment of leukemia by capillary zone electrophoresis, CECE 2013, 12. 11. – 13. 11. 2013, Brno

J. Horská, J. Ševčík, J. Petr: A pilot study on determination of citrate as the stabilization agent of nanoparticles using by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection, CECE 2014, 20. 10. – 22. 10. 2014, Brno

D. Baron, **J. Horská**, J. Petr: Layer-by-layer capillary coating for modification of electroosmotic flow in capillary electrophoresis, (spoluautorka), CECE 2014, 20. 10. – 22. 10. 2014, Brno

J. Horská, P. Ginterová, J. Ševčík, J. Petr: Comparison of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatogryphy for separation of new drugs for treatment of leukemia, 10. 2. – 14. 2. 2014, Chiranal 2014, Olomouc

J. Horská, J. Ševčík, P. Ginterová, J. Petr: Determination of citrate as the stabilization agent of nanoparticles using by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection, ISSS 2014, 30. 8. – 2. 9. 2014, Praha

J. Horská, D. Baron, P. Chodorowska, C. del Cacho, J. Petr: Study of interactions between magnetite – core/poly (acrylic acid) – shell nanoparticles and biologically active compounds as cellular proteins and DNA, BioNanoMed 2014, 26. 3. 2014 – 28. 3. 2014, Krems, Rakousko

J. Horská, K. Vítková, J. Jurčíková, V. Procházka, A. Šebestová, J. Petr: Analysis of alloxan and its precursors by capillary electrophoresis, CECE 2015, 21. 3. – 23. 9. 2015, Brno

J. Horská, K. Vítková, J. Jurčíková, V. Procházka, A. Šebestová, J. Petr: Analýza alloxanu kapilární zónovou elektroforézou, (spoluautorka), 67. zjazd chemikov, 7. 9. – 11. 9. 2015, Vysoké Tatry

K. Holušová, D. Riman, J. Rozsypal, **J. Horská**: Analysis of antioxidants in chocolate by capillary electrophoresis with online electrokinetic preconcentration, Chiranal 2016, 6. 6. – 9. 6. 2016, Olomouc

K. Vítková, **J. Horská**, J. Jurčíková, R. Papoušek, P. Barták, V. Procházka, J. Petr: Studium chemické stability alloxanu pomocí kapilární zónové elektroforézy, (spoluautorka), 68. sjezd chemiků, 4. 9. – 7. 9. 2016, Praha

Řešené projekty

IGA 2014: Matricový efekt a jeho vliv na výtěžnost analytického postupu, IGA_PrF_2014_031, členka řešitelského týmu

FRUP 2014: Inovace předmětu Aplikace elektromigračních technik vytvořením úloh pro laboratorní cvičení, FRUP_2014_2_093, členka řešitelského týmu

IGA 2015: Matricový efekt a jeho potlačení při analýze vzorků, IGA_PrF_2015_020, členka řešitelského týmu

IGA 2016: Bianalýza a analýza potravin, IGA_PrF_2016_016 členka řešitelského týmu

IGA 2017: Matricový efekt a mez detekce, IGA_PrF_2017_020, členka řešitelského týmu

Členství:

Česká společnost chemická (od roku 2016)