

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Kateřina Hrabáková

**Vývoj HPLC-MS/MS metod pro vybrané,  
biologicky aktivní látky**

Development of HPLC-MS/MS methods for selected,  
biologically active compounds

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.  
Konzultanti: RNDr. Tomáš Hložek, Ph.D., RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Praha 2023

---

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 25. srpna 2023

---

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali a podporovali mě při psaní této diplomové práce. Těžko bych hledala lepší vedoucí mé diplomové práce než prof. RNDr. Zuzanu Bosákovou, CSc., která se mnou měla neustálou trpělivost, poradila mi při řešení jakéhokoli problému a vždy mi vyšla vstříc. Velmi přínosné rady poskytli také moji konzultanti RNDr. Tomáš Hložek, Ph.D. a RNDr. Petr Kozlík, Ph.D. Za výbornou spolupráci na projektu zaměřeném na topotekan děkuji Mgr. Barboře Mudrové.

Poděkování patří mojí rodině a přátelům, především Ing. Dominice Hrabákové, Bc. Kateřině Hrabákové a Bc. Lucii Hřebíkové, za jejich podporu, motivaci, pochopení a modlitby během celého mého studia na Univerzitě Karlově. Děkuji také Bohu, protože díky němu mi to všechno dávalo smysl.

---

## Abstrakt

Tato diplomová práce byla zaměřena na vývoj UHPLC-MS/MS metody pro stanovení laktonové a karboxylátové formy topotekanu ve vodných pufrách (první část) a na vývoj HPLC-MS/MS metody pro sledování účinnosti extrakce 6 organických UV filtrů z vodných matric pomocí hluboce eutektických rozpouštědel a terpenů (druhá část).

Topotekan je důležitým protirakovinným léčivem, které inhibuje topoizomerasu I, farmakologicky aktivní je však pouze jeho laktonová forma. V první části této práce byla studována časová změna poměru laktonové a karboxylátové formy topotekanu v závislosti na pH vzorku a na pH vodné složky mobilní fáze. K tomu byla vyvinuta 19minutová metoda UHPLC-MS/MS s C18 stacionární fází, gradientovou elucí a elektrosprejovou ionizací v pozitivním režimu. Bylo pozorováno, že se vzrůstajícím pH mobilní fáze a se vzrůstajícím pH vzorku docházelo ke zvyšování hmotnostního zlomku karboxylátové formy topotekanu ve vzorku, stejný trend byl pozorován také se vzrůstajícím časem od přípravy vzorku. U vzorku s přidavkem methanolu došlo ke stabilizaci laktonové formy a pomalejšímu přechodu na karboxylátovou formu. Tyto poznatky mohou být dále použity k optimalizaci využití topotekanu v lékařství.

Účinné odstraňování organických UV filtrů z vodných složek životního prostředí a z odpadních vod je velmi důležité, protože i nízké koncentrace těchto látek, považovaných za endokrinní disruptory, jsou nebezpečné pro člověka i volně žijící živočichy. Druhá část této práce byla zaměřena na analýzu vybraných UV filtrů na bázi benzofenonu (BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-8, MOBP) a jejich extrakci z vodných matric. K tomu byla vyvinuta 10minutová metoda HPLC-MS/MS s využitím C18 stacionární fáze, gradientovou elucí a elektrosprejovou ionizací v pozitivním režimu. Bylo připraveno celkem 10 hluboce eutektických rozpouštědel (deep eutectic solvents, DES), která představují šetrnější alternativu k drahým a obtížně recyklovatelným tradičním organickým rozpouštědlům. Jejich účinnost extrakce byla porovnána také s extrakcí vybraných analytů dvěma terpeny – terpineolem a linaloleem. Jako nejefektivnější extrakční činidlo se jevil samotný terpineol, z použitých DESů pak ten o složení menthol:kaprylová kyselina v molárním poměru 1:1, který extrahoval všechny sledované analyty s účinností vyšší než 99,6 %.

---

## Abstract

This thesis is focused on the development of an UHPLC-MS/MS method for the determination of lactone and carboxylate form of topotecan in aqueous buffers (Part 1) and on the development of a HPLC-MS/MS method for monitoring the extraction efficiency of 6 organic UV filters from aqueous matrices using deep eutectic solvents and terpenes (Part 2).

Topotecan is an important anticancer drug that inhibits topoisomerase I, but only its lactone form is pharmacologically active. In the first part of this work, the change in the ratio of lactone and carboxylate form of topotecan in time was studied as a function of sample pH and the pH of the aqueous component of the mobile phase. For this purpose, a 19-minute UHPLC-MS/MS method with a C18 stationary phase, gradient elution and electrospray ionization in positive mode was developed. It was observed that with an increasing pH of the mobile phase and the pH of the sample, the mass fraction of the carboxylate form of topotecan in the sample increased as well. The same trend was also observed with increasing time since sample preparation. If methanol was added to the sample, a stabilization of the lactone form and a slower transition to the carboxylate form was observed. These findings can be further exploited to optimize the use of topotecan in medicine.

The effective removal of organic UV filters from aquatic environmental compartments and wastewater is very important because even low concentrations of these substances, considered endocrine disruptors, are dangerous for humans and wildlife. The second part of this work was focused on the analysis of selected benzophenone-based UV filters (BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-8, MOBP) and their extraction from aqueous matrices. For this purpose, a 10-minute HPLC-MS/MS method with C18 stationary phase, gradient elution and electrospray ionization in positive mode was developed. In total, 10 deep eutectic solvents (DES) were prepared, DESs represent a more environmentally friendly alternative to expensive and difficult to recycle traditional organic solvents. Their extraction efficiency was also compared with the extraction of selected analytes by two terpenes – terpineol and linalool. Terpineol alone was found to be the most efficient extraction reagent, and among the used DESs, the composition with menthol:caprylic acid in molar ratio 1:1 was the most effective, it extracted all the studied analytes with an efficiency higher than 99.6 %.

---

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>11</b>
1.1	Význam topotekanu .....	11
1.2	Význam UV filtrů .....	11
1.3	Cíle práce .....	12
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>13</b>
2.1	Topotekan .....	13
2.1.1	Objev topotekanu .....	13
2.1.2	Mechanismus působení topotekanu .....	14
2.1.3	Farmakologie topotekanu .....	15
2.1.4	Využití topotekanu v lékařství .....	16
2.2	Retinoblastom .....	16
2.2.1	Přístupy k léčbě retinoblastomu .....	17
2.2.2	Koncept dvouvrstvého hydrogelového implantátu .....	18
2.3	UV filtry .....	19
2.3.1	Vybrané organické UV filtry .....	20
2.3.2	Vliv organických UV filtrů na životní prostředí a na člověka .....	23
2.3.3	Farmakologie organických UV filtrů .....	23
2.4	Výskyt a odstraňování UV filtrů z vodných matric .....	24
2.4.1	Výskyt organických UV filtrů ve vodních zdrojích .....	24
2.4.2	Odstraňování UV filtrů v čistírnách odpadních vod .....	25
2.4.3	Hluboce eutektická rozpouštědla .....	27
2.5	Metody analýzy .....	28
2.5.1	Extrakce .....	28
2.5.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	30
2.5.3	Plynová chromatografie .....	33
2.5.4	Imunochemické metody .....	33
2.5.5	Analýza topotekanu ve sklivci a krevní plazmě .....	33

---

<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>34</b>
3.1	Použité chemikálie	34
3.2	Instrumentace	35
3.3	Příprava a uchování vzorků pro HPLC analýzy	36
3.3.1	Příprava standardních roztoků TPT	36
3.3.2	Příprava roztoků pro kalibraci TPT	37
3.3.3	Příprava standardních roztoků UV filtrů	37
3.3.4	Příprava roztoků pro kalibraci UV filtrů	38
3.3.5	Příprava roztoků UV filtrů pro testování extrakce	38
3.3.6	Uchovávání standardních roztoků a reálných vzorků	38
3.4	Provedení extrakce UV filtrů	39
3.4.1	Příprava extrakčních činidel	39
3.4.2	Postup extrakce UV filtrů a úpravy vzorku před analýzou	39
3.5	Příprava mobilních fází pro HPLC analýzy	40
3.5.1	Mobilní fáze využívané při analýze TPT	40
3.5.2	Mobilní fáze využívané při analýze UV filtrů	40
3.6	Kvalitativní hodnocení analýz	40
3.7	Kvantitativní hodnocení analýz	40
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse</b>	<b>42</b>
4.1	Optimalizace tandemové hmotnostní detekce TPT	42
4.2	Výběr chromatografického systému pro analýzu TPT	43
4.2.1	Eluce laktonové formy TPT v závislosti na složení MF	43
4.2.2	Eluce karboxylátové formy TPT v závislosti na složení MF	44
4.2.3	Navržení gradientové eluce pro analýzu TPT	46
4.3	Změny v poměru laktonové a karboxylátové formy TPT v závislosti na pH	47
4.4	Stanovení obsahu laktonové a karboxylátové formy TPT ve vzorku	51
4.4.1	Problém carry-overu TPT	51
4.4.2	Kalibrace laktonové a karboxylátové formy TPT	51

---

4.5	Optimalizace tandemové hmotnostní detekce UV filtrů .....	55
4.6	Výběr chromatografického systému pro analýzu UV filtrů .....	56
4.6.1	Navržení gradientové eluce pro analýzu 13 UV filtrů .....	57
4.6.2	Navržení gradientové eluce pro analýzu 6 UV filtrů .....	60
4.7	Stanovení obsahu 6 vybraných UV filtrů .....	61
4.7.1	Problém carry-overu UV filtrů .....	61
4.7.2	Kalibrace UV filtrů.....	61
4.8	Testování vzorků vody na přítomnost 6 vybraných UV filtrů.....	64
4.9	Extrakce 6 UV filtrů z vodných matric.....	64
4.9.1	Zvolená extrakční činidla .....	64
4.9.2	Extrakční účinnost DESů v experimentech s deionizovanou vodou.....	65
4.9.3	Vlivy na extrakci T a M:C8 (1:1) v experimentech s deionizovanou vodou .....	67
4.9.4	Extrakční účinnost T a M:C8 (1:1) v experimentech s reálnými vzorky vody ....	68
4.9.5	Opakované použití M:C8 (1:1) k extrakci UV filtrů.....	69
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>71</b>
	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>73</b>



---

## Seznam použitých zkratk a symbolů

<i>A</i>	plocha píku [AU min]
AU	relativní měrná jednotka (arbitrary unit)
<i>b</i>	směrnice kalibrační závislosti <i>h</i> na <i>c<sub>m</sub></i> [AU l g <sup>-1</sup> ]
BDM	4- <i>terc</i> -butyl-4'-methoxydibenzoylmethan, avobenzon
BP	benzofenon
BP-1	2,4-dihydroxybenzofenon, benzofenon-1
BP-2	2,2',4,4'-tetrahydroxybenzofenon, benzofenon-2
BP-3	2-hydroxy-4-methoxybenzofenon, benzofenon-3
BP-4	5-benzoyl-4-hydroxy-2-methoxybenzenesulfonová kyselina, benzofenon-4
BP-5	5-benzoyl-4-hydroxy-2-methoxybenzensulfonát sodný, benzofenon-5
BP-8	2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzofenon, benzofenon-8
BP-12	2-hydroxy-4-(oktyloxy)benzofenon, benzofenon-12
<i>c</i>	molární koncentrace [mol l <sup>-1</sup> ]
<i>c<sub>m</sub></i>	hmotnostní koncentrace [g l <sup>-1</sup> ]
C8	kaprylová kyselina
C10	dekanová kyselina
C12	laurová kyselina
C14	myristová kyselina
C18	oktadecylová skupina
ČOV	čistírna odpadních vod
DAD	detektor s diodovým polem (diode array detector)
DES	hluboce eutektické rozpouštědlo (deep eutectic solvent)
ELISA	metoda enzymové imunoanalýzy (enzyme-linked immunosorbent assay)
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
<i>h</i>	výška píku [AU]
HMS	3,3,5-trimethylcyklohexylsalicylát, homosalát

---

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
IMC	isopentyl-4-methoxycinnamát, amiloxát
IS	vnitřní standard (internal standard)
L	linalool
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LD <sub>50</sub>	letální dávka neboli dávka látky, která je smrtelná pro 50 % testovaných organismů
LLE	extrakce kapalina–kapalina (liquid–liquid extraction)
LLME	mikroextrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid microextraction)
LOD	limit detekce (limit of detection)
log $K_{ow}$	rozdělovací koeficient oktanol/voda uváděný v logaritmické formě
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantification)
M	menthol
MBC	3-(4-methylbenzyliden)kafr, enzakamen
MF	mobilní fáze
MOBP	4-methakryloxy-2-hydroxybenzofenon
MRM	multiple reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
$m/z$	poměr hmotnosti a náboje iontu
$n$	počet měření
NHANES	Národní průzkum zkoušek zdraví a výživy (National Health and Nutrition Examination Survey)
OCT	2-ethylhexyl-(2-kyano-3,3-difenyl)akrylát, oktokrylen
psi	anglosaská jednotka tlaku (pounds per square inch)
q	hmotnostní přechod používaný k potvrzení detekce analytu, kvalifikátor
Q	hmotnostní přechod používaný ke kvantifikaci, kvantifikátor
$Q_k$	kritická hodnota Deanova-Dixonova testu
$Q_n$	kritérium Deanova-Dixonova testu
$R^2$	koeficient determinace
Rb	retinoblastom

---

RP-HPLC	HPLC s reverzními fázemi (reversed phase HPLC)
$s$	směrodatná odchylka (standard deviation)
SF	stacionární fáze
SIM	sledování jediného iontu (single ion monitoring)
SPE	extrakce pevnou fází (solid phase extraction)
SPF	faktor ochrany proti slunci (sun protection factor)
SPME	mikroextrakce pevnou fází (solid phase microextraction)
SRM	sledování rozpadu iontu (selected reaction monitoring)
TPT	topotekan
T	terpineol
$t_r$	retenční čas [min]
$T_t$	teplota tání [°C]
UHPLC	ultra-účinná kapalinová chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography)
UV/VIS	ultrafialovo-viditelné světlo (ultraviolet–visible light)
$v/v$	poměr objemů
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
$w/w$	poměr hmotností
$\bar{x}$	aritmetický průměr
$x_c$	hmotnostní zlomek TPT karboxylátu
$x_l$	hmotnostní zlomek TPT laktonu
$x_{\max}$	maximální hodnota statistického souboru
$x_{\min}$	minimální hodnota statistického souboru
$x_n$	$n$ -tý člen statistického souboru

# 1 Úvod

## 1.1 Význam topotekanu

Rakovina je celosvětově jednou z nejčastějších příčin úmrtí, v roce 2020 na ni podle Světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) zemřelo téměř 10 milionů lidí<sup>1</sup>. Chemoterapie je dominantní léčebnou metodou pro onkologické pacienty, ale její účinnost nemusí být dostačující. Mezi nejčastější problémy spojené s klinickým použitím chemoterapeutik patří obtížný průnik léčiva do nádorové tkáně, vysoká toxicita, poškození zdravých tkání a chemorezistence<sup>2,3</sup>.

Topotekan je cytostatikum působící jako inhibitor topoizomerasy I, stabilizuje přechodný štěpitelný komplex topoizomerasy I s DNA. Topotekan je účinný proti různým typům karcinomů, mezi něž patří malobuněčný karcinom plic, karcinom děložního hrdla, karcinom prsu, karcinom vaječníků a také retinoblastom. Hlavními nevýhodami při terapii s využitím topotekanu jsou rychlá přeměna na jeho neaktivní formu v biologických systémech, nežádoucí vedlejší účinky a zkrížená rezistence nádorových buněk vůči širší skupině protinádorových léčiv<sup>2,4</sup>.

V případě topotekanu by lokalizovaná léčba mohla zvýšit terapeutickou účinnost a minimalizovat nežádoucí vedlejší účinky chemoterapie. Ve snaze optimalizovat léčbu retinoblastomu pomocí cytostatik topotekanu a vinkristinu Cocarta et al.<sup>4</sup> zahájili výzkum zaměřený na využití hydrogelových implantátů pro transsklerální podávání těchto léčiv. Tento výzkum vyžaduje spolehlivou metodu umožňující stanovení účinné formy topotekanu v různých maticích. Ve spolupráci s Mgr. Barborou Mudrovou a RNDr. Jakubem Šircem, Ph.D., kteří jsou součástí zmíněného výzkumu, byla v první části této diplomové práce vyvíjena metoda ultra-účinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS) pro stanovení obou forem topotekanu, tedy jeho farmakologicky účinné laktonové formy i neúčinné karboxylátové formy.

## 1.2 Význam UV filtrů

UV-A záření (vlnová délka 315–400 nm) a UV-B záření (vlnová délka 280–315 nm) jsou částmi slunečního záření, které může pronikat na povrch Země. Kromě benefitů spojených s expozicí slunečnímu záření má UV-A a UV-B záření také negativní účinky na zdraví

člověka, mezi ně patří předčasné stárnutí kůže, zvýšené riziko vzniku kožního maligního melanomu a erytematogenní působení. Je proto doporučeno používat přípravky chránící kůži před nežádoucími účinky UV záření<sup>5</sup>.

Organické UV filtry jsou látky obsažené v ochranných prostředcích proti UV záření, které mají schopnost absorbovat UV záření o určitém rozsahu vlnových délek. Rozsáhlá výroba a používání přípravků obsahujících organické UV filtry vede k jejich uvolňování do životního prostředí, především do vodných složek. Kontaminace životního prostředí těmito látkami je problematická zejména z důvodu jejich genotoxicity, neurotoxicity, potenciálu působit jako endokrinní disruptory a schopnosti bioakumulovat se v tukových tkáních živých organismů<sup>6,7</sup>.

Tato diplomová práce se blíže zabývá benzofenonovými UV filtry. Konvenční způsoby čištění odpadních vod často neumožňují úplné odstranění těchto látek. Bylo zjištěno, že v některých čistírnách odpadních vod je účinnost odstranění benzofenonu-2, benzofenonu-3 a benzofenonu-8 nižší než 50 % (cit. <sup>8</sup>). Je proto vhodné studovat alternativní způsoby odstraňování benzofenonů z vodných matric. Druhá část této diplomové práce se soustředila na sledování účinnosti extrakce 6 benzofenonových UV filtrů z vodných matric pomocí hluboce eutektických rozpouštědel a terpenů.

### 1.3 Cíle práce

Cílem první části této diplomové práce bylo vyvinout metodu UHPLC-MS/MS pro stanovení laktonové a karboxylátové formy topotekanu ve vodných pufrách. Tato metoda měla být využita ke studiu přechodu mezi laktonovou a karboxylátovou formou topotekanu v závislosti na pH vzorku, pH vodné složky mobilní fáze a doby uplynulé od přípravy vzorku. Dalším cílem bylo sledovat vliv přídavku methanolu na pozorovanou rovnováhu mezi oběma formami topotekanu.

Cílem druhé části této diplomové práce bylo vyvinout metodu HPLC-MS/MS k simultánnímu stanovení vybraných organických UV filtrů ve vodě. Dále bylo cílem připravit 10 hydrofobních hluboce eutektických rozpouštědel a otestovat jejich schopnost extrahovat vybrané UV filtry z vodných matric. Jejich extrakční účinnost pak měla být porovnána se dvěma terpeny.

## 2 Teoretická část

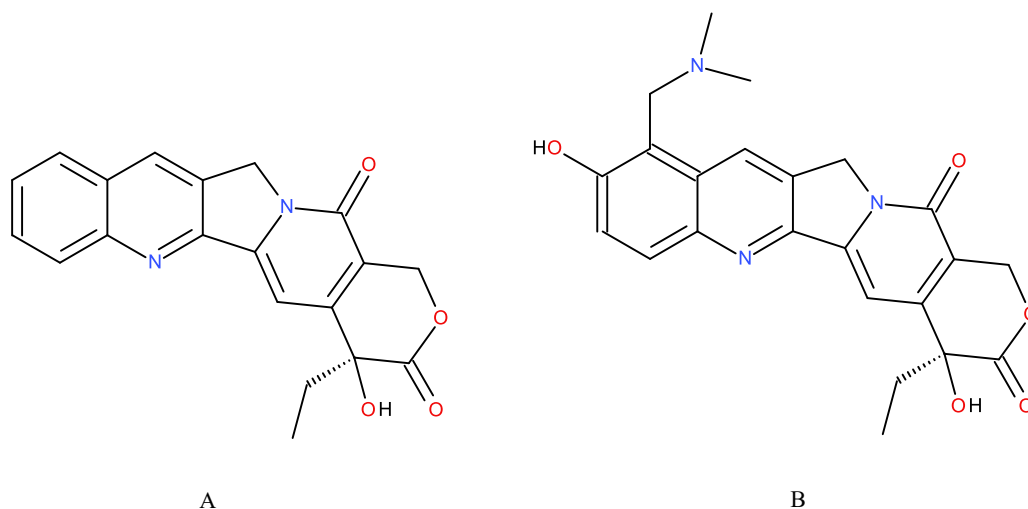
### 2.1 Topotekan

#### 2.1.1 Objev topotekanu

Topotekan (TPT) je semi-syntetický derivát camptothecinu. Camptothecin patří do skupiny pentacyklických alkaloidů, poprvé byl izolován z rostliny *Camptotheca acuminata*, vyskytující se na jihu Číny, jeho přítomnost však byla zjištěna i v několika dalších druzích rostlin, jako je například *Ervatamia heyeno*, *Nothapodytes foetida* nebo *Merrilliodendron megacarpum*. V experimentálních studiích byl objeven protinádorový účinek camptothecinu a látka byla dále zkoumána a upravována za účelem optimalizace jejího použití v lékařství. Camptotheciny se považují za jedny z nejslibnějších protinádorových léčiv 21. století<sup>9</sup>.

Hlavním cílem strukturální modifikace camptothecinu bylo syntetizovat látku lépe rozpustnou ve vodě s více stabilním laktonovým analogem. Bylo zjištěno, že za fyziologického pH totiž camptothecin přechází z laktonové do karboxylátové formy, která je biologicky inaktivní, váže se na lidský sérový albumin a snižuje tak účinnou koncentraci léčiva v krvi. Labilní charakter laktonové formy camptothecinu je připisován hydroxylové skupině tvořící intramolekulární vodíkové můstky. Nicméně modely vztahů mezi strukturou a aktivitou camptothecinu ukázaly, že  $\alpha$ -hydroxy- $\delta$ -laktonový kruh musí být v léčivu přítomen pro zachování *in vivo* protinádorové aktivity<sup>9</sup>.

Kingsbury et al.<sup>10</sup> poprvé syntetizovali 9-[(dimethylamino)methyl]-10-hydroxy-camptothecin neboli topotekan, jehož hydrochloridová sůl má 400krát vyšší rozpustnost ve vodě než camptothecin. Topotekan byl v téže studii vyhodnocen jako nejvíce aktivní protinádorový analog camptothecinu rozpustný ve vodě. Výhodou topotekanu je nižší toxicita oproti camptothecinu. Struktura camptothecinu a topotekanu je uvedena na obrázku 1 (cit. <sup>11</sup>).



Obrázek 1: Struktura camptothecinu (A) a topotekanu (B), obrázek byl vytvořen v programu Biovia Draw (Dassault Systèmes)

### 2.1.2 Mechanismus působení topotekanu

Topotekan slouží jako inhibitor topoizomerasy I. Topoizomerasa I je enzym, který přechodně štěpí jedno vlákno DNA během replikace, rozštěpené vlákno se tak může otáčet kolem druhého intaktního vlákna, čímž se uvolní torzní napětí DNA v oblasti replikační vidlice. Topoizomerasa I následně znovu spojí přerušovaný řetězec, aby se obnovila integrita dvouřetězcové DNA. Topoizomerasa byla objevena v 70. letech 20. století, v 80. letech bylo zjištěno, že topoizomerasa I je jediným molekulárním cílem camptothecinu<sup>9, 11, 12</sup>.

Inhibitor topoizomerasy I se reverzibilně váže na štěpitelný kovalentní komplex topoizomerasy I s DNA, stabilizuje ho a tím snižuje kapacitu k replikaci. Tvorba tohoto komplexu je reverzibilní, nicméně při posunu replikační vidličky do daného místa nastává letální štěpení dvoušroubovicové DNA a následně buněčná smrt. Cytotoxická aktivita topotekanu je závislá na fázi buněčného cyklu, je nejúčinnější během S-fáze<sup>9, 11, 13</sup>.

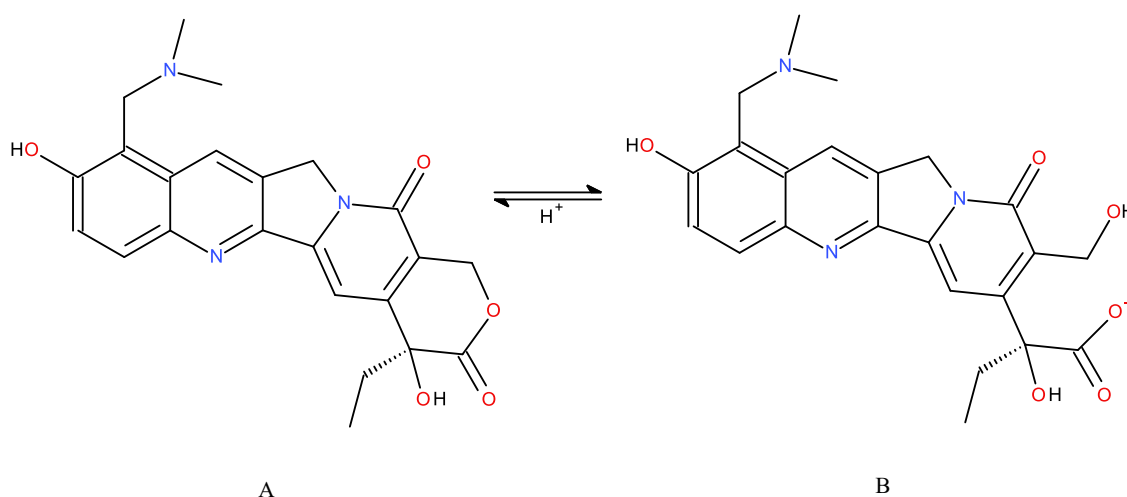
### 2.1.3 Farmakologie topotekanu

Topotekan existuje ve vodném roztoku v laktonové a karboxylátové formě, jejich poměr je závislý na pH roztoku. Pouze laktonová forma topotekanu umožňuje pasivní difúzi do buňky a navázání topotekanu na štěpitelný komplex topoizomerasy I s DNA. Rovnováha mezi oběma formami topotekanu je znázorněna na obrázku 2 (cit. <sup>12, 13</sup>).

Mezi nejvíce ovlivněné části organismu při podávání topotekanu patří hematopoetický systém, lymfatická tkáň, gastrointestinální trakt, vlasové cibulky, varlata a vaječníky. Topotekan snadno penetruje přes hematoencefalickou bariéru, což je důležité u pacientů s invazí retinoblastomu do centrální nervové soustavy<sup>13, 14, 15</sup>.

Častými toxickými účinky jsou myelosuprese a anémie, nicméně několik studií prokázalo, že hematologická toxicita topotekanu je závislá na dávce a může být omezena snížením počáteční dávky léku nebo využitím hematopoetických stimulačních faktorů. Léčba topotekaniem může také způsobovat intersticiální plicní onemocnění, gastrointestinální poruchy jako je nauzea, zvracení a průjem, aleopecii a další komplikace. Letální dávka LD<sub>50</sub> topotekanu pro myš bílou je 5–50 mg/kg (cit. <sup>13, 15, 16</sup>).

Eliminace topotekanu z těla probíhá především renální cestou po hydrolyze laktonové formy na formu karboxylátovou. Biologický poločas eliminace činí asi 2,2 hodin (cit. <sup>13</sup>).



Obrázek 2: Rovnováha mezi laktonovou (A) a karboxylátovou (B) formou topotekanu závislá na pH, obrázek byl vytvořen v programu Biovia Draw (Dassault Systèmes)



### 2.1.4 Využití topotekanu v lékařství

Topotekan patří v České republice do anatomicko-terapeuticko-chemické skupiny L01CE01, tedy cytostatika a imunomodulační léčiva, inhibitory topoizomerasy I. Registrované léčivé přípravky v České republice obsahující topotekan hydrochlorid jsou: Hycamtin, Potactasol, Topotecan Accord, Topotecan Hospira a Topotecan Pharmagen. Léčivé přípravky obsahující topotekan se v současné době používají především v monoterapii k léčbě karcinomu ovaríí a k léčbě malobuněčného plicního karcinomu v případě nevyhovujících léků první volby, nebo v kombinaci s cisplatinou k léčbě karcinomu děložního hrdla<sup>15, 17</sup>.

Bylo zkoumáno také využití topotekanu u pediatrické populace k léčbě rekurentních nebo progresivních solidních nádorů, jako například Ewingův sarkom, neuroblastom, osteoblastom, rabdomyosarkom nebo retinoblastom<sup>15, 18</sup>.

## 2.2 Retinoblastom

Retinoblastom (Rb) je nejčastější intraokulární nádor dětského věku vznikající v sítnici oka (latinsky retina). Celosvětově nejvíce případů se objevuje v Asii (53 %), oproti tomu v Evropě se vyskytuje přibližně 6 % všech případů retinoblastomu. Celkem je evidováno ve světě asi 8 000 nových případů retinoblastomu každý rok. Objevuje se nejvíce u dětí do 4 let, v České republice je retinoblastom diagnostikován každoročně v průměru u 6 až 7 dětí<sup>4, 18, 19, 20</sup>.

Asi ve 40 % případů se jedná o hereditární retinoblastom, který vzniká zárodečnou mutací retinoblastomového (Rb1) genu a většinou postihuje obě oči. V 60 % případů je retinoblastom nehereditární, postihující obvykle jen jedno oko, v takovém případě je Rb1 gen mutován pouze v nádorové tkáni<sup>18, 19</sup>.

Celková pravděpodobnost přežití při onemocnění retinoblastomem ve vyspělých zemích je 97 %, nicméně signifikantní procento pacientů ztrácí nebo má omezené zrakové funkce po zbytek života. Ve Fakultní nemocnici v Motole v Praze se podařilo vyléčit bez nutnosti enukleace pouze 56,4 % postižených očí v období let 1999–2014 (cit. <sup>18, 19</sup>).

### 2.2.1 Přístupy k léčbě retinoblastomu

Léčba retinoblastomu je přizpůsobena každému jedinci na základě velikosti a umístění nádoru, hrozby vzniku metastáz, systémového stavu, laterality onemocnění a odhadované zrakové prognózy<sup>21</sup>.

Cílem léčby retinoblastomu je především dlouhodobé přežití pacienta, snížení pozdějších následků a snaha o zachování co nejlepších zrakových funkcí postiženého oka. Mezi možné přístupy k léčbě retinoblastomu patří chemoterapie, zevní radioterapie, brachyterapie, kryoterapie, transpupilární termoterapie, chirurgický zásah a enukleace<sup>18, 20</sup>.

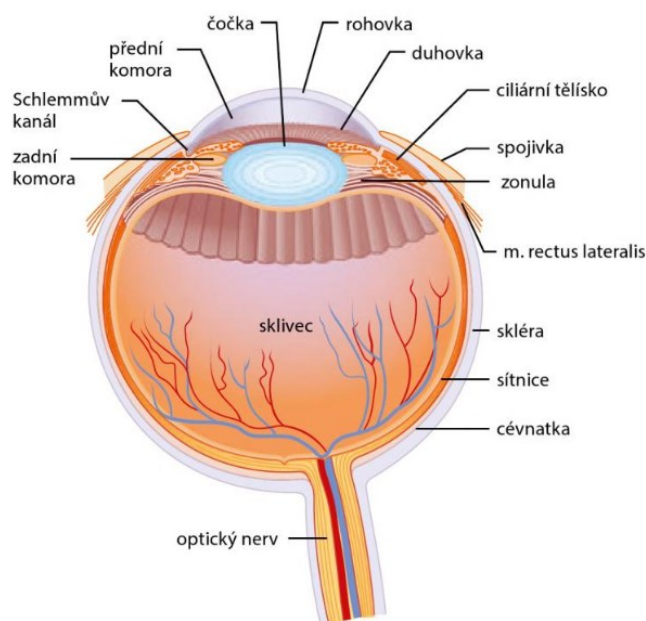
V 70. letech 20. století byl k chemoterapii retinoblastomu využíván především vinkristin, cyklofosfamid, cisplatina a doxorubicin. Od 90. let pak vzrostlo využití karboplatiny. Na počátku 21. století byly mezi chemoterapeutika proti retinoblastomu začleněny látky etoposid, topotekan, melfalan a další<sup>22</sup>.

Pro systémovou chemoterapii retinoblastomu metodou chemoredukce se z uvedených léčiv nejčastěji využívá karboplatina, etoposid a vinkristin, které se používají kombinovaně<sup>14, 18, 21</sup>.

Použití topotekanu proti retinoblastomu bylo publikováno už v roce 1998, Nitschke et al.<sup>23</sup> ve své studii testovali chemoterapii topotekanem u dětí s pevnými nádory rezistentními ke standardní terapii. Mezi nimi byl i jeden pacient s retinoblastomem, který vykázal částečnou remisi po léčbě topotekanem. Chantada et al.<sup>14</sup> publikovali v roce 2004 studii aktivity topotekanu proti retinoblastomu u 9 pacientů, v ní byly potvrzeny protinádorové účinky topotekanu proti extraokulárnímu a relabujícímu/refrakternímu nitroočnímu retinoblastomu.

Od počátku 21. století se strategie podávání chemoterapie postupně odklání od systémové chemoterapie k pokročilým technikám selektivnějšího podávání léčiv přímo do oka, aby se zvýšila expozice nádoru, maximalizovala se účinnost a minimalizoval se výskyt nežádoucích účinků<sup>22</sup>.

Chemoterapii používanou k léčbě retinoblastomu dělíme podle způsobu podání na intravenózní, intraarteriální, intravitreální (do sklivce), periokulární (okolo oka) a intrakamerální (do oční komory)<sup>18, 20, 24</sup>. Pro lepší ilustraci je na obrázku 3 znázorněna anatomie oka.



Obrázek 3: Anatomie oka, převzato z Barash, P. G., Cullen, B. F., Stoelting, R. K. & kolektiv. Klinická anesteziologie: Překlad 6. vydání. (Grada Publishing a.s., 2015)

### 2.2.2 Koncept dvouvrstvého hydrogelového implantátu

Cocarta et al.<sup>4</sup> se ve své studii věnovali vývoji hydrogelového implantátu, který by umožnil podávání aktivní chemoterapeutické látky lokálně, aby se zabránilo retinální a systémové toxicitě chemoterapie retinoblastomu. Navržený hydrogelový implantát se aplikuje periokulárně a chemoterapeutikum projde do zadního očního segmentu transsklerální difúzí.

Navržený hydrogelový implantát se skládá ze dvou vrstev, vnitřní hydrofilní vrstvy naplněné chemoterapeutickými látkami a vnější hydrofobní vrstvy chránící okolní vaskularizovanou tkáň před cytotoxicitou chemoterapeutických látek. Experimenty na zvířecích modelech prokázaly, že obě testovaná chemoterapeutika topotekan i vinkristin mohou difundovat skrze sklěru a dostat se do sklivce, kde se nachází retinoblastom. Hydrogelový implantát poskytuje nižší celkovou expozici chemoterapeutika, prodloužený účinek léku, absorpci bez průchodu krevním řečištěm a menší riziko cytotoxicity nebo nekrózy díky kontrolované koncentraci léčiva v místě aplikace v porovnání se systémovou aplikací<sup>4</sup>.

Během experimentů bylo také pozorováno, že stabilita topotekanu je silně ovlivněna koncentrací léčiva, teplotou a typem média. Byl pozorován rozklad topotekanu ve vodném roztoku už při 4 °C (cit. <sup>4</sup>).

## 2.3 UV filtry

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.2, expozice UV záření může ohrožovat zdraví člověka. UV-A záření zapříčiňuje předčasné stárnutí kůže a zvyšuje riziko vzniku rakoviny kůže, proniká i do hlubších vrstev kůže. UV-B záření je erytematogenní (zodpovědné za spálení od slunce) a karcinogenní, proniká jen na povrch kůže. Je odhadováno, že u populace se světlou kůží je podíl rizika kožního maligního melanomu způsobeného expozicí UV záření od 60 % do 96 % (cit. <sup>5, 25, 26</sup>).

Přirozenou ochranou lidského organismu proti UV záření je pigment melanin, nicméně tato ochrana nemusí být dostatečná pro zabránění škodlivým účinkům, a je proto doporučeno používat přípravky s UV filtry, látkami chránícími proti UV-A a UV-B záření. UV filtry dělíme na organické (chemické) absorbéry a anorganické (fyzikální) blokátory <sup>5, 25</sup>.

Organické UV filtry absorbují UV záření o určitém rozsahu vlnových délek, čímž přecházejí do excitovaného stavu. To umožňují především konjugované systémy dvojných vazeb přítomné v jejich struktuře. Přebytečná energie je následně uvolněna emisí záření vyšších vlnových délek nebo relaxací fotochemickými procesy, jako je například izomerizace a uvolňování tepla. Každý organický UV filtr má omezené pásmo absorpce UV záření, ve většině ochranných prostředků proti UV záření je proto obsažena kombinace několika různých UV filtrů. Mezi organické UV filtry patří benzofenony, para-aminobenzoáty, kafry, triazoly, triaziny, salicyláty, deriváty kyseliny skořicové a další<sup>5, 6, 7</sup>.

Anorganické UV filtry, jako je oxid titaničitý a oxid zinečnatý, chrání pokožku tím, že odrážejí a rozptylují UV záření<sup>5, 6</sup>.

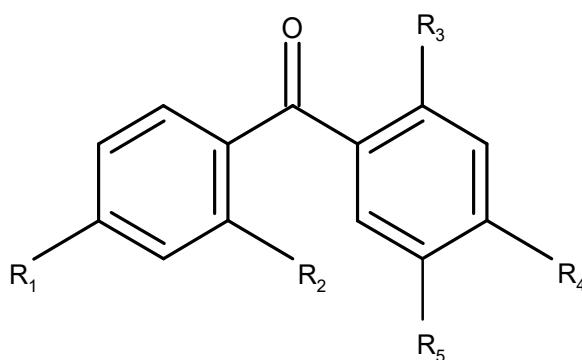
V současné době je v Evropské unii povoleno pro použití v kosmetice 48 UV filtrů, z nichž 40 je organických a 8 anorganických. Kromě kosmetických produktů mohou být UV filtry přidávány také do některých industriálních produktů, jako jsou plasty, lepidla, barvy a laky nebo textilní produkty, za účelem ochrany produktů proti fotodegradaci a prodloužení jejich životnosti<sup>5, 7, 27</sup>.

### 2.3.1 Vybrané organické UV filtry

Tato diplomová práce se blíže zabývá UV filtry odvozenými od benzofenonu, jehož struktura je znázorněna na obrázku 4, přehled těchto UV filtrů je uveden v tabulce 1. Mezi další významné UV filtry použité v experimentální části této diplomové práce patří avobenzon (BDM, 4-*terc*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethan), enzakamen (MBC, 3-(4-methylbenzyliden)kafr), amiloxát (IMC, isopentyl-4-methoxycinnamát), homosalát (HMS, 3,3,5-trimethylcyklohexylsalicylát) a oktokrylen (OCT, 2-ethylhexyl-(2-kyano-3,3-difenyl)akrylát), jejich přehled je uveden v tabulce 2 (cit. <sup>5</sup>).

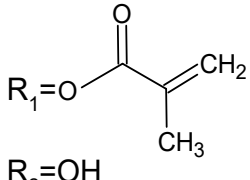
Rozdělovací koeficient oktanol/voda uváděný v logaritmické formě  $\log K_{ow}$  (někdy označován  $\log P$ ) udává, jakým způsobem se sloučenina rozdělí mezi oktanolovou a vodnou fází ve dvoufázovém systému oktanol-voda a vypovídá o hydrofilitě nebo lipofilitě analytu. Hodnoty  $\log K_{ow}$  typicky nabývají hodnot od  $-3$  (velmi hydrofilní charakter) do  $+10$  (extrémně hydrofobní charakter)<sup>28, 29</sup>.

Benzofenon a jeho deriváty se přirozeně vyskytují v kvetoucích rostlinách, jako je mango a vinná réva muškát, ale pro komerční použití jsou syntetizovány. BP-3 je v současnosti pravděpodobně nejčastěji využívaným UV filtrem v opalovacích krémech a kosmetice. BP-3 byl poprvé syntetizován v roce 1906 a americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) schválil jeho použití v opalovacích přípravcích v 80. letech 20. století<sup>30</sup>.

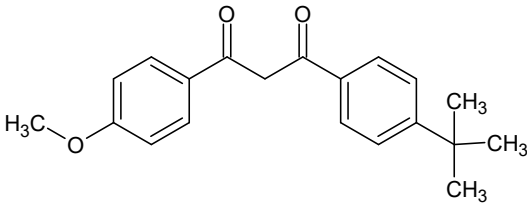
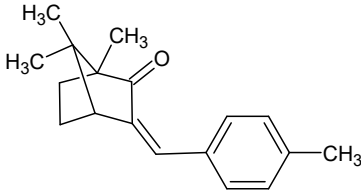
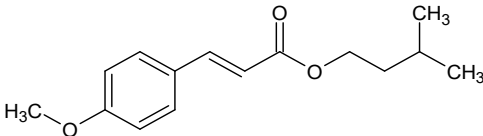
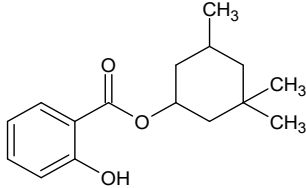
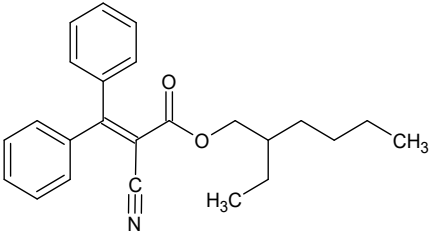


Obrázek 4: Struktura benzofenonu s naznačenými postranními řetězci, obrázek byl vytvořen v programu ACD/ChemSketch (ACD/Labs)

Tabulka 1: Přehled vybraných, studovaných UV filtrů odvozených od benzofenonu, jejich názvy, zkratky názvů, postranní řetězce a hodnoty  $\log K_{ow}$  (cit. <sup>31, 32</sup>). Znázorněné postranní řetězce byly vytvořeny v programu ACD/ChemSketch (ACD/Labs), označení R<sub>1</sub> až R<sub>5</sub> odpovídá těm na obrázku 4

Analyt	Zkratka	Postranní řetězce	$\log K_{ow}$
benzofenon	BP	R <sub>1</sub> =H R <sub>2</sub> =H R <sub>3</sub> =H R <sub>4</sub> =H R <sub>5</sub> =H	3,18
2,4-dihydroxybenzofenon	BP-1	R <sub>1</sub> =OH R <sub>2</sub> =OH R <sub>3</sub> =H R <sub>4</sub> =H R <sub>5</sub> =H	2,96
2,2',4,4'-tetrahydroxybenzofenon	BP-2	R <sub>1</sub> =OH R <sub>2</sub> =OH R <sub>3</sub> =OH R <sub>4</sub> =OH R <sub>5</sub> =H	2,78
2-hydroxy-4-methoxybenzofenon	BP-3	R <sub>1</sub> =O-CH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> =OH R <sub>3</sub> =H R <sub>4</sub> =H R <sub>5</sub> =H	3,79
5-benzoyl-4-hydroxy-2-methoxybenzensulfonát sodný	BP-5	R <sub>1</sub> =H R <sub>2</sub> =H R <sub>3</sub> =OH R <sub>4</sub> =O-CH <sub>3</sub> R <sub>5</sub> =SO <sub>3</sub> Na	-1,42
2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzofenon	BP-8	R <sub>1</sub> =O-CH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> =OH R <sub>3</sub> =OH R <sub>4</sub> =H R <sub>5</sub> =H	3,82
2-hydroxy-4-(oktyloxy)benzofenon	BP-12	R <sub>1</sub> =O(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub> R <sub>2</sub> =OH R <sub>3</sub> =H R <sub>4</sub> =H R <sub>5</sub> =H	6,96
4-methakryloxy-2-hydroxybenzofenon	MOBP	R <sub>1</sub> =O R <sub>2</sub> =OH  R <sub>3</sub> =H R <sub>4</sub> =H R <sub>5</sub> =H	4,20

Tabulka 2: Přehled dalších vybraných UV filtrů, jejich názvy, zkratky názvů, struktura a hodnoty  $\log K_{ow}$  (cit. <sup>33,34</sup>), znázorněné struktury byly vytvořeny v programu ACD/ChemSketch (ACD/Labs)

Analyt	Zkratka	Struktura	$\log K_{ow}$
avobenzon	BDM		4,30
enzakamen	MBC		5,58
amiloxát	IMC		3,64
homosalát	HMS		4,14
oktokrylen	OCT		6,88

### 2.3.2 Vliv organických UV filtrů na životní prostředí a na člověka

Široké používání opalovacích krémů a dalších ochranných prostředků proti UV záření nevyhnutelně znamená, že se UV filtry dostávají do životního prostředí, a to především skrze vodní složky. Pro zabezpečení co nejvyšší hodnoty SPF („sun protection factor“, faktor ochrany proti slunci) jsou používány různé kombinace organických i anorganických UV filtrů, a proto je i v životním prostředí diverzita UV filtrů je poměrně vysoká<sup>5, 7</sup>.

Organické UV filtry mají lipofilní charakter, což přispívá k jejich persistenci v životním prostředí, jsou ekotoxické a nebezpečné pro vodní prostředí. Lipofilita UV filtrů také zvyšuje jejich potenciál pro bioakumulaci, UV filtry byly nalezeny v mnoha druzích živých organismů, což naznačuje rozšířenou expozici<sup>5, 7</sup>.

Nejzávažnější problém představují estrogenní účinky některých UV filtrů na biotu a člověka, které mohou být spojené s negativním ovlivněním reprodukce. Látky ovlivňující hormonální systém organismů jsou označovány jako endokrinní disruptory. Některé organické UV filtry působí jako antagonisté na androgenních a progesteronových receptorech a agonisté na estrogenních receptorech<sup>5, 7, 35</sup>. Specifické organické UV filtry, jako je benzofenon-3 neboli oxybenzon, mohou zvýšit expresi estrogenu a vyvolat tím genotoxické účinky. Estrogen stimuluje buněčnou proliferaci a motilitu, indukuje poškození DNA a je hlavním rizikovým faktorem v etiologii rakoviny prsu. Majhi et al.<sup>36</sup> popsali zvýšené poškození DNA vlivem BP-3.

Kromě toho byla zjištěna také neurotoxicita některých organických UV filtrů, opět zejména BP-3, který nepříznivě ovlivňuje životaschopnost nervových buněk posílením procesu apoptózy. V souvislosti s těmito poznatky by UV filtry měly být uvažovány jako možné faktory v patogenezi neurodegenerativních onemocnění<sup>7</sup>.

### 2.3.3 Farmakologie organických UV filtrů

Byly popsány tři hlavní způsoby expozice člověka vůči organickým UV filtrům: dermální, perorální a inhalační. Při dermální expozici je kritickým parametrem kožní permeace, americký FDA potvrdil, že některé aktivní složky opalovacích krémů, včetně BP-3, jsou absorbovány skrze kůži do krevního oběhu. Významná je také expozice orálním požitím kontaminované vody, několik studií prokázalo kontaminaci pitné vody organickými UV filtry, např. Li et al.<sup>37</sup> v Číně nebo da Silva et al.<sup>38</sup> v Brazílii. Vzduch v uzavřených prostorech je také nezanedbatelným zdrojem vystavení člověka mnoha semi-volatilním organickým



chemikáliím, včetně organických UV filtrů<sup>7, 39</sup>.

Farmakologické vlastnosti jednotlivých UV filtrů se liší v závislosti na jejich struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech. Tato kapitola bude blíže zaměřena na BP-3, který je hojně využíván<sup>30</sup>.

Jung et al.<sup>40</sup> ve své studii určovali toxikokinetické parametry BP-3 u krys. Biologický poločas při transdermální aplikaci činil  $18,3 \pm 5,8$  hodin a významně se lišil od poločasu určeného z intravenózní aplikace, což naznačuje flip-flop kinetiku. Flip-flop efekt je pozorován, když je rychlost absorpce z oblasti dávkování do krve výrazně nižší než rychlost eliminace látky, to má za následek prodlouženou systémovou expozici organismu. Hodnota biologické dostupnosti byla  $6,9 \pm 1,8$  %. Při intravenózní infuzi byl BP-3 distribuován v nejvyšší míře do tlustého střeva, plic a ledvin.

BP-3 může být metabolizován na BP-1 nebo konjugován v játrech s glukuronovou kyselinou, je vylučován především močí v konjugované, ale i nekonjugované formě<sup>30</sup>. Gonzalez et al.<sup>41</sup> provedli studii na 25 dobrovolnících, kteří 5 dní v řadě opakovaně aplikovali opalovací krém, bylo zjištěno, že 1,2–8,7 % (w/w) z celkového dermálně podaného množství BP-3 bylo vyloučeno močí během 10 dnů (sledováno ještě 5 dní po poslední aplikaci), což naznačuje bioakumulaci BP-3.

Od roku 2017 byl povolený obsah BP-3 v Evropské unii snížen z 10 hm. % výrobku na maximálně 6 hm. % v opalovacích krémech a maximálně 0,5 hm. % v ostatních kosmetických přípravcích. Podobné regulace platí např. v USA, Japonsku a Koreji<sup>30, 40</sup>. Součástí Národního průzkumu zkoušek zdraví a výživy (National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES) provedeného v USA v roce 2003–2004 bylo sledování koncentrace BP-3 v moči u obyvatel USA starších 6 let, přítomnost BP-3 byla detekována u 96,8 % z 2 517 testovaných jedinců<sup>42</sup>.

## 2.4 Výskyt a odstraňování UV filtrů z vodných matric

### 2.4.1 Výskyt organických UV filtrů ve vodních zdrojích

Říční voda je matricí, která vykazuje různé typy UV filtrů a je proměnlivá v závislosti na lokaci. Maximální hladina BP-3 zjištěná v říční vodě byla  $114 \text{ ng l}^{-1}$  a byla nalezena ve Slovinsku<sup>5, 38</sup>. Ma et al.<sup>43</sup> našli v řece Yangtze v Číně v roce 2015 koncentrace 0,15–44,7  $\text{ng l}^{-1}$  BP-1 a n.d.(nedetekováno)–45,1  $\text{ng l}^{-1}$  BP-3. Da Silva et al.<sup>38</sup> našli

v jihovýchodní Brazílii v říční vodě v letech 2012–2014 maximální koncentraci BP-3  $44 \text{ ng l}^{-1}$ . Kameda et al.<sup>44</sup> našli v řekách v Japonsku v roce 2008 rozmezí koncentrací 31–82  $\text{ng l}^{-1}$  BP a 16–41  $\text{ng l}^{-1}$  BP-3. Wick et al.<sup>45</sup> stanovili koncentraci  $0,9 \pm 0,3 \text{ ng l}^{-1}$  BP-1 v řece Rýn v Německu v letech 2008 a 2009, BP-2 a BP-3 nebyly detekovány.

Bazény jsou v létě široce využívány pro rekreační aktivity, což umožňuje přímý vstup UV filtrů do vody<sup>5</sup>. Ye et al.<sup>46</sup> analyzovali UV filtry benzofenonového typu ve vzorku bazénové vody z Číny (Wuhan) a detekovali koncentrace až 18 800  $\text{ng l}^{-1}$  BP, 8700  $\text{ng l}^{-1}$  BP-1 a 4500  $\text{ng l}^{-1}$  BP-3.

Koncentrace UV filtrů ve vodních zdrojích v ČR byla předmětem studie Grabicové et al.<sup>47</sup>, kteří se zabývali měřením koncentrace tří organických UV filtrů v podpovrchových vodách v Jižních Čechách v červenci 2011. Koncentrace BP-3 ve venkovních plaveckých bazénech se pohybovala v rozmezí 26–620  $\text{ng l}^{-1}$ , v rekreačních rybnících 21–550  $\text{ng l}^{-1}$  a v říčních lokalitách pod zdrojem znečištění 12–67  $\text{ng l}^{-1}$ .

#### 2.4.2 Odstraňování UV filtrů v čistírnách odpadních vod

Účinnost odstraňování UV filtrů z odpadních vod závisí na použitých technologiích ošetření vody v různých čistírnách odpadních vod (ČOV). Primární ošetření vody zahrnuje především sedimentaci, koagulaci a flokulaci, odstraňování UV-filtrů v tomto kroku není příliš účinné a je založeno především na sorpci lipofilních látek na kal. Sekundární ošetření vody, někdy také označováno jako biologické, využívá mikroorganismy k degradaci organických látek. Do této kategorie se řadí technologie aktivovaného kalu, modifikovaný Ludzack-Ettingerův proces nebo použití sekvenčních dávkových reaktorů. V tomto kroku není vždy jasné, jestli skutečně došlo k degradaci organických UV filtrů, anebo se jednalo opět o odstranění sorpcí na aktivovaný kal. Terciární ošetření vody je využíváno jen v minoritním množství ČOV, zde jsou využívány více sofistikované metody úpravy vody<sup>48, 49</sup>.

Mezi metody terciárního ošetření vody patří chlorace a oxidace pomocí UV záření, kombinací UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV/persulfát, foto-Fenton a UV/fotokatalýza. Hlavní nevýhodou těchto procesů jsou vznikající degradační produkty, které mohou mít toxické účinky na živé organismy. Dále je to reverzní osmóza, která se v současné době jeví jako neúčinnější způsob odstraňování UV filtrů v ČOV, nicméně ta není kvůli cenové náročnosti široce využívána<sup>31, 48</sup>.

Golovko et al.<sup>50</sup> sledovali sezónní účinnost odstraňování 16 léčiv a přípravků osobní hygieny, včetně BP-1, BP-3 a BP-4 (5-benzoyl-4-hydroxy-2-methoxybenzenesulfonová

kyselina), v ČOV v Českých Budějovicích od března 2011 do února 2012. V této ČOV je využívána technologie biologicky aktivovaného kalu s částečnou nitrifikací a termofilní anaerobní stabilizací kalu. BP-1 vykazoval účinnost odstraňování od 73 do 100 % v průběhu roku. BP-3 vykazoval v jarním období nízkou účinnost odstraňování, od května do srpna se poté účinnost zvýšila z 10 na 65 % a zůstala přibližně konstantní až do února. Účinnost odstraňování BP-4 se pohybovala mezi 13 a 70 %.

Chiriac et al.<sup>8</sup> se ve své studii věnovali distribuci, účinnosti odstraňování a hodnocení environmentálních rizik benzofenonových a salicylátových UV filtrů v ČOV a povrchových vodách v Rumunsku v roce 2019. Na základě průměrné nalezené koncentrace UV filtrů v přítoku a odtoku 5 ČOV byla vypočítána účinnost jejich odstraňování. Průměrná hodnota účinnosti odstraňování napříč 5 ČOV byla 95 % pro BP-1, 53 % pro BP-2, 74 % pro BP-3, 66 % pro BP-8 a 72 % pro HMS. Nicméně v některých ČOV byla účinnost odstranění BP-2, BP-3, BP-8 nebo HMS nižší než 50 %.

Tsui et al.<sup>48</sup> se zaměřili na sezónní výskyt, účinnost odstraňování a hodnocení rizik několika tříd organických UV filtrů v ČOV v Číně v roce 2012. V největší ze sledovaných ČOV (Stonecutters Island) obsluhující oblast pro 3 500 000 obyvatel, která zpracovává asi 1 400 000 m<sup>3</sup> vody denně, byly na základě publikovaných hodnot koncentrace UV filtrů v přítoku a odtoku vypočítány účinnosti odstraňování. Pro BDM se účinnost odstraňování pohybovala okolo 80 %, pro BP-1 účinnost postupně vzrostla z 16 % v únoru na 40 % v listopadu, pro BP-3 se hodnoty pohybovaly okolo 65 %, pro BP-4 a BP-8 mezi 31 a 54 %, pro HMS účinnost vzrostla z 41 % v únoru na 67 % v listopadu, pro IMC se účinnost odstraňování pohybovala mezi 15 a 49 % a pro MBC mezi 37 a 50 %. Tato ČOV používá úpravu vody pomocí flokulace, sedimentace s chloridem železitým a s polymery a pomocí chlorace. Je zřejmé, že účinnost odstranění UV filtrů je často nižší než 50 %.

Ramos et al.<sup>49</sup> porovnávali různé studie zabývající se výskytem a způsobem odstraňování UV filtrů v různých ČOV po celém světě v letech 2000 až 2015. Došli k závěru, že deriváty benzofenonu BP-1, BP-2, BP-3 a BP-4 vynikaly mezi ostatními skupinami UV filtrů vysokými koncentracemi jak v přítoku, tak v odtoku ČOV, což poukazuje na jejich nevyhovující účinnost odstraňování v ČOV.

### 2.4.3 Hluboce eutektická rozpouštědla

Hluboce eutektická rozpouštědla (deep eutectic solvents, DES) jsou moderní extrakční činidla, která byla vyvinuta jako šetrnější alternativa k drahým a obtížně recyklovatelným tradičním organickým rozpouštědlům a iontovým kapalinám. DESy se svými vlastnostmi podobají iontovým kapalinám, nicméně nemusí být tvořeny pouze ionty, ale i nenabitými molekulami. Většina DESů je netoxická, biokompatibilní a biologicky odbouratelná<sup>51, 52</sup>.

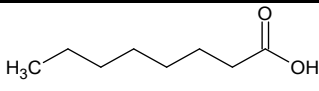
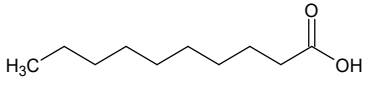
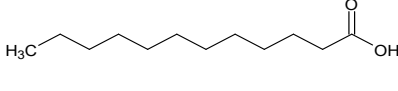
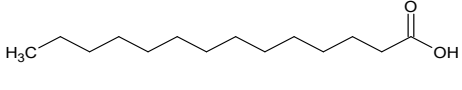
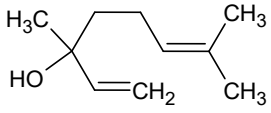
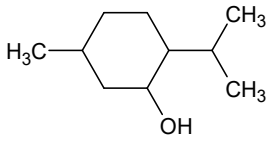
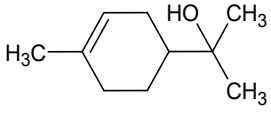
DESy se obecně skládají ze dvou nebo více složek, které spolu interagují prostřednictvím vodíkových vazeb, a jejich směs má nižší teplotu tání než individuální složky. Vlastnosti DESu lze upravit změnou molekulární struktury a poměru jednotlivých složek, takto lze docílit buď hydrofobního, nebo hydrofilního charakteru rozpouštědla<sup>51</sup>. DESy jsem blíže popisovala ve své bakalářské práci „HPLC-MS/MS analýza toxinů z *Psilocybe semilanceata*“ v kapitole 2.3.1 (cit. <sup>53</sup>).

V této diplomové práci byla studována schopnost DESů odstraňovat organické UV filtry, považované za polutanty životního prostředí, z vodných matric – deionizované vody, říční vody, stojaté vody a vody z koupaliště. Pro porovnání také byla provedena extrakce sledovaných analytů pomocí terpenů terpineolu a linaloolu. Extrakce zde nesloužila k prekoncentraci analytů před samotnou analýzou.

Jelikož sledované analyty měly hydrofobní charakter, což ukazují hodnoty  $\log K_{ow}$  uvedené v tabulce 1 a tabulce 2, také extrakční činidla musela být hydrofobní. Hydrofobní DESy jsou založeny na použití hydrofobních sloučenin jako je tetrabutylamoniumbromid, menthol, thymol a mastné kyseliny sloužící jako akceptory vodíkových vazeb, které jsou používány v kombinaci s alkoholy a karboxylovými kyselinami s dlouhým alkylovým řetězcem sloužícími jako donory vodíkových vazeb<sup>54, 55</sup>.

Tabulka 3 uvádí strukturu a některé fyzikálně-chemické vlastnosti složek DESů a terpenů použitých v této diplomové práci. Menthol sloužil při tvorbě DESů jako akceptor vodíkové vazby a karboxylové kyseliny (C8, C10, C12 a C14) jako donory nebo akceptory vodíkové vazby. Všechny látky uvedené v tabulce 3 jsou běžně se vyskytující přírodní látky. Karboxylové kyseliny (C8, C10, C12 a C14) se vyskytují v kokosovém oleji, palmovém oleji a másle. Terpeny se nachází v esenciálních olejích různých rostlin, linalool je obsažen v koriandru, menthol v mátě, terpineol v borovici, myrtovitých rostlinách a v pomerančovníku<sup>56, 57</sup>.

Tabulka 3: Přehled, struktura, teploty tání a hodnoty  $\log K_{ow}$  (cit. <sup>28, 58, 59, 60</sup>) složek DESů a terpenů, znázorněné struktury byly vytvořeny v programu ACD/ChemSketch (ACD/Labs)

Analyt	Zkratka	Struktura	$T_f$ [°C]	$\log K_{ow}$
kaprylová kyselina	C8		16,5	3,05
dekanová kyselina	C10		31,4	4,09
laurová kyselina	C12		43,8	4,60
myristová kyselina	C14		54,2	6,10
linalool	L		< -100 °C	2,84
menthol	M		34–36	3,40
terpineol	T		15–35	2,60

## 2.5 Metody analýzy

Tato kapitola je zaměřena na metody v současnosti využívané k analýze topotekanu a/nebo organických UV filtrů. Principy kapalinové chromatografie, UV/VIS detekce a hmotnostní spektrometrie jsou detailněji popsány v mé bakalářské práci<sup>53</sup>.

### 2.5.1 Extrakce

Extrakční techniky slouží k předúpravě vzorku, primárně k izolaci a prekoncentraci analytů<sup>61, 62</sup>. Pro extrakci topotekanu a/nebo organických UV filtrů jsou významné následující techniky:

*Extrakce pevnou fází (solid phase extraction, SPE)*

SPE je jednoduchá, často využívaná a snadno proveditelná extrakční technika. Během procesu SPE kapalný vzorek prochází skrze imobilizovanou fází, kde je požadovaná složka zachycena a poté extrahována vhodným, nejčastěji organickým rozpouštědlem. Nevýhodou SPE je spotřeba velkého objemu vzorku (0,3–1 l) a nutnost využití organických rozpouštědel pro desorpci analytů (10–15 ml). Pro SPE se běžně používají C18 pevné fáze, protože zadržují velké množství organických analytů<sup>61, 62, 63</sup>.

Online SPE-LC-MS/MS metoda byla využita v práci Belay et al.<sup>64</sup> při analýze 10 léčiv včetně topotekanu, eluce z SPE kolony byla provedena gradientem vodné fáze s 0,1 obj. % mravenčí kyseliny a methanolem, výtěžnost činila 92–96,6 %.

Ve studii Tashiro et al.<sup>65</sup> byla při SPE 18 UV filtrů pozorována výtěžnost v rozmezí 80–113 %, jednalo se o extrakci směsi obsahující mimo jiné BP, BP-3, HMS, MBC a OCT eluovaných pomocí dichlormethanu.

*Mikroextrakce pevnou fází (solid phase microextraction, SPME)*

SPME umožňuje snížení objemu vzorku a množství organických rozpouštědel potřebných k extrakci a produkuje menší množství odpadu než SPE. Dalšími výhodami této techniky jsou snížení matricového efektu a vyšší rychlost oproti konvenční SPE<sup>61, 63</sup>.

Metoda SPME pro předúpravu vzorků topotekanu není v odborné literatuře častá.

Dobré výtěžnosti (80–106 %) byly získány pro extrakci skupiny 14 organických UV filtrů včetně BP-1, BP-3, BP-4, BP-8, HMS, IMC, MBC a OCT pomocí SPME ve studii Vila et al.<sup>63</sup>

*Extrakce kapalina–kapalina (liquid–liquid extraction, LLE)*

LLE je založena na rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné kapalně fáze, typicky vodu a organické rozpouštědlo. LLE je tradiční technika používaná mimo jiné k extrakci různých kontaminantů ze vzorků životního prostředí. Dochází ke spotřebě poměrně velkého množství vzorku (obvykle 200–500 ml), srovnatelného s SPE, a k použití organických rozpouštědel. Po extrakci většinou následuje filtrace extraktu nebo odpařování rozpouštědla<sup>61, 62</sup>.

Extrakci topotekanu pomocí LLE popsali např. Arellano et al.<sup>66</sup>, kteří provedli extrakci pomocí dichlormethanu při pH 7,0–7,5 s výtěžností 85 %.

LLE byla použita například ve studii Kung et al.<sup>67</sup> k extrakci 5 organických UV filtrů (BP, BP-1, BP-3, BP-8 a MBC) pomocí *n*-oktanolu s výtěžností 77–116 %.

K LLE lze místo tradičních organických rozpouštědel použít DESy<sup>55</sup>.

#### *Mikroextrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid microextraction, LLME)*

Mikroextrakce kapalina-kapalina umožňuje minimalizaci použitých rozpouštědel a je široce využívaná k extrakci UV filtrů ze vzorků vody<sup>51</sup>.

Metoda LLME pro předúpravu vzorků topotekanu není v odborné literatuře častá.

Ve studii Wang et al.<sup>51</sup> byla využita disperzní LLME za pomoci ultrazvuku k extrakci UV filtrů BP, BP-1 a BP-3. Při této technice je do vzorku vody vstříknuta směs extrakčního rozpouštědla (nemísitelného s vodou) a disperzního rozpouštědla (mísitelného s vodou). Velká kontaktní plocha mezi vytvořenými jemnými kapičkami extrakčního činidla a vzorkem usnadňuje přenos hmoty analytů do extrakčního činidla. K extrakci byl použit DES složený z trioktylmethylamoniumchloridu a kyseliny dekanové (C10), metoda poskytla dobré výtěžnosti extrakce v rozmezí 90,2–103,5 %. Metoda LLME pomocí DESu byla dále využita k extrakci UV filtrů např. ve studii Zhang et al.<sup>68</sup>

### **2.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC) je separační metoda založená na distribuci analytů mezi kapalnou mobilní fází (MF) a pevnou nebo kapalnou stacionární fází (SF), kde mobilní fáze je čerpána přes chromatografickou kolonu pod vysokým tlakem. Pokud je velikost částic SF menší než 2 μm a tlak může dosáhnout až 1 000 bar, hovoříme o ultra-účinné kapalinové chromatografii (ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC)<sup>69, 70</sup>.

Metody HPLC a UHPLC jsou pravděpodobně nejčastějšími metodami analýzy jak topotekanu, tak organických UV filtrů. V obou případech se používá především chromatografie s reverzními fázemi (reversed phase, RP) na oktadecylové (C18) SF, která je nepolární a nejsilněji zadržuje nepolární analyty<sup>69</sup>.

### *Detekce UV/VIS*

Principem detekce UV/VIS je měření absorbance, která vyjadřuje míru absorpce UV/VIS záření analytem. Detektory s diodovým polem (diode array detector, DAD) dokáží simultánně detekovat intenzitu záření všech vlnových délek ve zvoleném rozmezí a dokáží tak zaznamenat celé UV/VIS absorpční spektrum<sup>71</sup>.

Celkový topotekan byl společně s paklitaxelem stanovován metodou HPLC-UV ve studii Jain et al.<sup>72</sup> při vlnové délce 227 nm s limitem kvantifikace 70 ng ml<sup>-1</sup>.

Metoda HPLC-UV byla využita pro analýzu UV filtrů například ve studii Wang et al.<sup>51</sup>, BP-1 a BP-3 byly detekovány při vlnové délce 290 nm a BP při 254 nm. Limity detekce se pohybovaly v rozmezí 0,15–0,30 ng ml<sup>-1</sup>.

### *Fluorescenční detekce*

Sloučeniny, které vykazují fluorescenci nebo jsou fluorescenčně značeny, lze detekovat fluorescenčním detektorem s vysokou citlivostí a specificitou. Na detekční celu dopadá primární elektromagnetické záření o vhodné vlnové délce, to je absorbováno analytem a vyvolá emisi fluorescenčního záření, které je detekováno. Citlivost může být až 1000krát vyšší než u UV detekce<sup>69</sup>.

Fluorescenční detekce se často využívá pro analýzu topotekanu. Ve studii Bai et al.<sup>73</sup> byl detekován topotekan a jeho metabolit *N*-desmethyltopotekan v laktonové formě a celkovém množství. Excitace byla provedena zářením o vlnové délce 530 nm, emise byla detekována při 376 nm. Limity kvantifikace byly v rozmezí 0,10–0,25 ng ml<sup>-1</sup>.

Pro analýzu organických UV filtrů není fluorescenční detekce typická.

### *Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie*

Principem hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry, MS) je generovat ionty analyzované látky a separovat je podle poměru jejich hmotnosti a náboje (*m/z*), slouží ke kvalitativní i kvantitativní analýze. Ionizace elektrosprejem (electrospray ionization, ESI) využívá tvorbu spreje vysoce nabitých kapiček aplikací silného elektrického pole na kapalinu vstupující do hmotnostního spektrometru a je kompatibilní pro spojení s HPLC. ESI je vhodnou metodou ionizace pro topotekan lakton a karboxylát i pro organické UV filtry<sup>74</sup>.

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) spočívá ve výběru iontů pomocí MS (ty se označují jako prekurzorové ionty), které následně podléhají strukturální změně, vzniklé ionty



jsou podrobeny další MS analýze a jsou detekovány (ty se označují jako produktové ionty)<sup>74</sup>.

Široce rozšířeným uspořádáním MS/MS je trojitý kvadrupól, kde prekurzorové ionty vybrané prvním kvadrupólem vstupují do kolizní cely druhého kvadrupólu, jsou fragmentovány srážkami s atomy kolizního plynu a vzniklé produktové ionty jsou analyzovány v třetím kvadrupólu<sup>74</sup>.

Trojitý kvadrupól může pracovat v několika režimech, volba vhodného režimu závisí na tom, jakou informaci z analýzy chceme získat. Režim sledování rozpadu iontu (selected reaction monitoring, SRM) slouží ke sledování specifického hmotnostního přechodu z prekurzorového iontu na produktový, SRM je velmi selektivní a citlivý mód, který je vhodný ke kvalitativní i kvantitativní analýze. Pokud chceme selektivitu SRM módu ještě zvýšit, je možné simultánně sledovat pro jeden analyt více hmotnostních přechodů. Přechod poskytující nejintenzivnější signál se typicky používá pro kvantifikaci (kvantifikátor, Q), další přechod (případně více přechodů) pak může být použit k potvrzení detekce analytu (kvalifikátor, q) a k zajištění spolehlivého kvantitativního stanovení. Sledování více SRM přechodů pro jeden analyt nebo sledování přechodů mnoha analytů v jedné analýze je někdy označováno jako MRM (multiple reaction monitoring)<sup>74, 75, 76</sup>.

Metodu UHPLC–MS/MS pro analýzu TPT laktonu a karboxylátu použili např. Li et al.<sup>77</sup>, kteří sledovali mimo jiné přechod mezi oběma formami TPT v závislosti na pH. Ve svém článku uvedli, že topotekan byl stabilní v laktonové formě při nízkém pH ( $\text{pH} \leq 4$ ), při pH 8–9 obě formy koexistovaly a při pH 10 byl pozorován pouze pík karboxylátu. Limity kvantifikace byly  $0,5 \text{ ng ml}^{-1}$  pro celkový topotekan a  $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$  pro topotekan v laktonové formě. LC-MS metoda byla využita také ve studii Arellano et al.<sup>66</sup>, LC-MS/MS ve studii Shu et al.<sup>78</sup>, Jeong et al.<sup>79</sup>, Khuroo et al.<sup>80</sup> a dalších.

Kung et al.<sup>67</sup> analyzovali 5 organických UV filtrů (BP, BP-1, BP-3, BP-8 a MBC) metodou LC-MS/MS ve vzorcích vody s předúpravou pomocí LLE. Limity detekce se pohybovaly v rozmezí 2,3–24,4  $\text{pg l}^{-1}$ . Ve studii Meng et al.<sup>33</sup> byla využita HPLC-MS/MS metoda k analýze 15 organických UV filtrů (BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-6, BP-8, BP-10, BP-12, HMS, IMC, MBC a dalších) v opalovacích krémech. LC–MS/MS byla dále využita např. ve studii Wick et al.<sup>45</sup> nebo Grabicová et al.<sup>47</sup>

### 2.5.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (gas chromatography, GC) je separační metoda založená na distribuci analytů mezi MF, tvořenou inertním nosným plynem, a kapalnou nebo pevnou SF. Plynová chromatografie je vhodná především pro analyty s molekulovou hmotností do  $500 \text{ g mol}^{-1}$  a bodem varu do  $400 \text{ }^\circ\text{C}$  (cit. <sup>81</sup>).

#### *Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie*

Analýza topotekanu plynovou chromatografií není výhodná z důvodu jeho nízké stability při vysokých teplotách.

GC-MS využili ke stanovení UV filtrů např. Tashiro et al.<sup>65</sup>, kteří provedli předúpravu vzorku pomocí SPE a pro 18 analytů uvedli limity detekce pohybující se v rozmezí 0,1–3,0  $\text{ng l}^{-1}$ . Metoda GC-MS/MS byla využita k analýze 14 UV filtrů v práci Vila et al.<sup>63</sup> s předúpravou pomocí SPME a s limity detekce 0,045–8,2  $\text{ng l}^{-1}$ .

### 2.5.4 Imunochemické metody

Pro stanovení topotekanu mohou být využity imunochemické metody, např. metoda enzymové imunoanalýzy ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), která je založena na principu kompetice mezi enzymem značeným a neznačeným léčivem. Značený a neznačený topotekan soutěží o navázání na imobilizovanou protilátku a vytvoření imunokomplexu. Následně je měřena aktivita markerového enzymu imunokomplexu navázaného na pevnou fázi. Metoda ELISA poskytuje vysokou citlivost a specifitu<sup>82</sup>.

Metodu ELISA využili např. Saita et al.<sup>82</sup> ke stanovení laktonové formy topotekanu, dosáhli limitu detekce  $80 \text{ pg ml}^{-1}$ .

### 2.5.5 Analýza topotekanu ve sklivci a krevní plazmě

Pro lékařské využití topotekanu jsou často prováděny analýzy sklivce a krevní plazmy po podání topotekanu. Pro takové analýzy je nutné provést nejprve precipitaci bílkovin, obvykle pomocí nadbytku methanolu, a centrifugaci. Methanol zároveň stabilizuje poměr laktonové a karboxylátové formy topotekanu<sup>77, 83</sup>.

Ve studii Buitrago et al.<sup>83</sup> byl detekován topotekan lakton i karboxylát, vzorky sklivce a krevní plazmy byly smíchány v poměru 1:3 (v/v) s methanolem. Kalibrace byla provedena při pH 3 pro topotekan lakton a při pH 10 pro topotekan karboxylát.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

K přípravě mobilních fází pro chromatografické analýzy byl použit methanol ( $\geq 99,9\%$ , LC-MS Chromasolv, Honeywell Riedel-de Haën, Německo), mravenčí kyselina ( $\sim 98\%$  p.a., Lach-Ner, Česká republika), octová kyselina ( $99\%$  p.a., Penta, Česká republika), amoniak ( $25\%$ , Sigma-Aldrich, Česká republika), octan amonný ( $\geq 98,5\%$  p.a., Penta, Česká republika) a deionizovaná voda.

K přípravě standardních roztoků topotekanu byl použit topotekan hydrochlorid (U. S. Pharmacopeia, USA) a jako interní standard byl použit topotekan- $d_6$  (Toronto Research Chemicals, Kanada). Standardy byly skladovány při teplotě  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , k jejich rozpuštění a ředění byla použita kyselina chlorovodíková ( $35\%$  p.a., Lach-Ner, Česká republika) a tytéž chemikálie jako k přípravě mobilních fází.

K přípravě standardních roztoků UV filtrů byl použit benzofenon (BP,  $99\%$ , ReagentPlus, Sigma-Aldrich, Čína), 2,4-dihydroxybenzofenon (BP-1,  $99\%$ , Sigma-Aldrich, Čína), 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzofenon (BP-2,  $97\%$ , Sigma-Aldrich, USA), 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon (BP-3,  $98\%$ , Sigma-Aldrich, Čína), 5-benzoyl-4-hydroxy-2-methoxybenzensulfonát sodný (BP-5, Sigma-Aldrich, USA), 2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzofenon (BP-8,  $98\%$ , Sigma-Aldrich, USA), 2-hydroxy-4-(oktyloxy)benzofenon (BP-12,  $98\%$ , Sigma-Aldrich, Čína), 4-methakryloxy-2-hydroxybenzofenon (MOBP,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, USA), amiloxát (IMC, Sigma-Aldrich, Kanada), avobenzon (BDM, Sigma-Aldrich, USA), enzakamen (MBC,  $\geq 98,0\%$ , Sigma-Aldrich, Čína), homosalát (HMS, Sigma-Aldrich, Čína), oktokrylen (OCT, Sigma-Aldrich, USA) a jako interní standard sloužil diazepam- $d_5$  ( $> 98,5\%$ , Lipomed, Švýcarsko). Standardy byly skladovány při teplotě  $5\text{ }^\circ\text{C}$  nebo při laboratorní teplotě podle pokynů pro doporučené skladování, k jejich rozpuštění a ředění byly použity tytéž chemikálie jako k přípravě mobilních fází.

K přípravě extrakčních činidel byl využit menthol (M,  $99\%$ , Sigma-Aldrich, USA), kaprylová kyselina (C8,  $\geq 98\%$ , Fluka, Malajsie), dekanová kyselina (C10,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich, Německo), laurová kyselina (C12, p.a., Sigma-Aldrich, Malajsie), myristová kyselina (C14, p.a., Merck, Malajsie) a terpineol (T, směs izomerů, Sigma-Aldrich, Francie), linalool (L,  $97\%$ , Sigma-Aldrich, Čína).

K řešení problémů carry-overu byl použit methanol ( $\geq 99,9\%$ , LC-MS Chromasolv,

Honeywell Riedel-de Haën, Německo), acetonitril ( $\geq 99,9\%$ , LC-MS Chromasolv, Honeywell Riedel-de Haën, Německo) a 2-propanol ( $\geq 99,9\%$ , LC-MS Chromasolv, Fluka, Německo).

### 3.2 Instrumentace

Předvážky Highland HCB 123 (Adam Equipment, Velká Británie) byly využity k navážce octanu amonného, používaného k přípravě pufru. Pro odvážení standardů topotekanu a standardů UV filtrů byly použity analytické váhy APX-100 (Denver Instrument, Německo).

Měření pH vodných složek mobilních fází bylo provedeno pomocí pH metru 3540 Combined pH & Conductivity (Jenway, Velká Británie). Ke kalibraci byl použit roztok pufru o pH 4,0 obsahující citronovou kyselinu, hydroxid sodný a chlorid sodný (Honeywell Fluka, Německo) a roztok pufru o pH 7,0 obsahující hydrogenfosforečnan sodný a dihydrogenfosforečnan draselný (Honeywell Fluka, Německo).

Centrifugace byla prováděna pomocí minicentrifugy Gusto (Carl Roth, Německo). Třepání vzorků bylo provedeno pomocí Multi Speed Vortex (Biosan, Lotyšsko). Zahřívání extrakčních činidel bylo provedeno pomocí Arex Digital Heating Magnetic Stirrer (Velp Scientifica, Itálie).

Chromatografické analýzy byly provedeny pomocí ultra-vysokoúčinného kapalinového chromatografu Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) složeného z vysokotlaké pumpy (Agilent 1290 Infinity), termostatovaného automatického dávkovače (Agilent 1290 Infinity), kolonového termostatu (Agilent 1290 Infinity) a detektoru diodového pole (1290 Infinity).

K detekci byl využit hmotnostní spektrometr Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS System (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s ionizací elektrosprejem.

Chromatografické analýzy topotekanu byly provedeny na koloně Acquity UPLC BEH C18 ( $100 \times 2,1$  mm,  $1,7 \mu\text{m}$ , Waters, Irsko) a analýzy UV filtrů na koloně Kinetex EVO C18 ( $100 \times 3$  mm,  $2,6 \mu\text{m}$ , Phenomenex, USA).

Naměřená data byla vyhodnocena v počítačovém programu Agilent MassHunter Workstation Software (Agilent Technologies) a v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation).

### 3.3 Příprava a uchování vzorků pro HPLC analýzy

#### 3.3.1 Příprava standardních roztoků TPT

Pro experimenty zaměřené na optimalizaci parametrů fragmentace byl použit standardní roztok TPT o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  připravený rozpuštěním 1 mg TPT hydrochloridu v podobě žlutého prášku v 1 ml deionizované vody upravené mravenčí kyselinou na pH 3,4, který byl ponechán 30 minut při pokojové teplotě, aby bylo dosaženo konverze na laktonovou formu. Takto připravený roztok byl zředěn na koncentraci  $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  ve směsi methanol:voda v poměru 1:1 (v/v) s přidavkem 0,1 obj. % mravenčí kyseliny.

Pro experimenty zaměřené na výběr chromatografického systému byl při analýze laktonové formy použit okyselený roztok TPT o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , jehož příprava je popsána výše, zředěný na koncentraci 1 a  $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  ve směsi methanol:voda v poměru 1:1 (v/v) s přidavkem 0,1 obj. % mravenčí kyseliny. Při analýze karboxylátové formy byl použit zásaditý roztok TPT o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  připravený rozpuštěním 1 mg TPT hydrochloridu v 1 ml deionizované vody upravené vodným roztokem 25 obj. % amoniaku na pH 8,3, který byl ponechán 30 minut při pokojové teplotě, aby bylo dosaženo konverze na karboxylátovou formu. Takto připravený roztok byl zředěn na koncentraci 1 a  $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  ve směsi methanol:voda v poměru 1:1 (v/v) s přidavkem  $7,5 \cdot 10^{-4}$  obj. % amoniaku.

Roztok interního standardu o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 1 mg topotekanu- $d_6$  v 1 ml deionizované vody s 0,07 obj. % chlorovodíkové kyseliny usnadňující jeho rozpuštění. Zásobní roztok byl poté zředěn methanolem na koncentraci 0,5; 5; 12,5 a  $500 \text{ ng ml}^{-1}$ .

Pro časovou studii změny poměru laktonové a karboxylátové formy TPT v závislosti na pH byl použit vodný standardní roztok TPT o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , který byl zředěn na koncentraci  $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  ve vodném roztoku octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ ), jehož pH bylo upraveno přidáním octové kyseliny nebo vodným roztokem 25 obj. % amoniaku. Byly připraveny roztoky o pH 4,5; 5,5; 6,6; 7,4; 8,0 a 10,0. Dále byl připraven standardní roztok TPT o koncentraci  $50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  ve směsi vodného roztoku octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ , pH = 10,0) a methanolu v poměru 1:1 (v/v) pro sledování vlivu methanolu na stabilizaci přechodu mezi laktonovou a karboxylátovou formou.

### 3.3.2 Příprava roztoků pro kalibraci TPT

Nezávisle na sobě byly připraveny dvě kalibrační řady, jedna v kyselém prostředí pro kalibraci TPT laktonu a jedna v zásaditém prostředí pro kalibraci TPT karboxylátu. Roztoky pro kalibraci byly připraveny ředěním vodného standardního roztoku TPT o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  pomocí vodného pufru octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) o pH 3 nebo 10. Výsledné roztoky dále obsahovaly 50 obj. % methanolu (vychlazeného na  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), 40 obj. % deionizované vody a interní standard topotekan- $\text{d}_6$  o koncentraci  $12,5 \text{ ng ml}^{-1}$ .

Kalibrační řada TPT laktonu byla připravena v pufru o pH 3 a obsahovala roztoky o koncentraci 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 a  $100 \text{ ng ml}^{-1}$ . Kalibrační řada TPT karboxylátu byla připravena v pufru o pH 10 a obsahovala roztoky o koncentraci 1; 5; 10; 25; 50 a  $100 \text{ ng ml}^{-1}$ . Následně byla stejným způsobem připravena řada roztoků v pufru o pH 7,4 obsahující obě formy TPT, která sloužila k ověření funkčnosti metody při fyziologickém pH a obsahovala roztoky o koncentraci 1; 5; 10; 25; 50 a  $100 \text{ ng ml}^{-1}$ .

Všechny roztoky pro kalibraci a její ověření byly připraveny v duplikátech a byly ponechány stát přes noc (asi 15–20 hodin) při teplotě  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby bylo dosaženo rovnováhy konverze mezi oběma formami TPT. Analýza proběhla pomocí metody UHPLC-MS/MS popsané v kapitole 4.2.

### 3.3.3 Příprava standardních roztoků UV filtrů

Pro experimenty zaměřené na optimalizaci parametrů fragmentace a na výběr chromatografického systému byly použity standardní roztoky BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-5, BP-8, BP-12 (rozpuštění při laboratorní teplotě přes noc), MOBP, BDM a MBC o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  rozpuštěné v methanolu, každý roztok analytu byl připraven samostatně. V případě analytů HMS, IMC a OCT, které jsou kapalné za laboratorní teploty, bylo požadované množství odpipetováno a zváženo, následně pak zředěno methanolem na koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Pro optimalizaci fragmentace byly použity standardní roztoky zředěné methanolem na koncentraci 1 a  $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Pro experimenty zaměřené na výběr chromatografického systému byl použit směsný roztok všech standardů, nebo roztoky vybraných kombinací standardů o koncentraci všech analytů 10, 100 a  $1\,000 \text{ ng ml}^{-1}$ . Tyto roztoky byly připraveny z výše popsaných standardních roztoků jednotlivých UV filtrů ředěním pomocí methanolu, směsi methanol:voda v poměru 1:1 (v/v) s přídatkem 0,1 obj. % mravenčí kyseliny nebo deionizované vody. Takto připravené roztoky

UV filtrů v deionizované vodě obsahovaly pouze zanedbatelné množství methanolu, proto jsou v pozdějších kapitolách označeny zjednodušeně jako roztoky UV filtrů v deionizované vodě.

### 3.3.4 Příprava roztoků pro kalibraci UV filtrů

Kalibrace byla připravena pouze pro směs standardů BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-8 a MOBP, ostatní UV filtry nebyly v rámci této diplomové práce kvantifikovány. Roztoky pro kalibraci byly připraveny ředěním směsného roztoku výše zmíněných standardů připraveného ve směsi methanol:deionizovaná voda v poměru 1:2 (v/v) o koncentraci všech analytů  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  a  $100 \text{ ng ml}^{-1}$ . Výsledné roztoky obsahovaly 33 obj. % methanolu, 66 obj. % deionizované vody a interní standard diazepam- $d_5$  o koncentraci  $50 \text{ ng ml}^{-1}$ .

Kalibrační řada obsahovala roztoky o koncentraci 1; 5; 10; 20; 50; 100; 500 a  $1000 \text{ ng ml}^{-1}$ . Každý kalibrační roztok byl analyzován třikrát. Analýza proběhla pomocí metody HPLC-MS/MS popsané v kapitole 4.6.

### 3.3.5 Příprava roztoků UV filtrů pro testování extrakce

Pro přípravu roztoků UV filtrů určených k testování extrakce byl použit směsný roztok standardů BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-8 a MOBP v methanolu o koncentraci všech analytů  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Tento zásobní roztok byl zředěn na koncentraci 5; 10 a  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  pomocí: deionizované vody, říční vody (Vltava, odebráno 1.3.2023 v lokalitě Park Cihelná, Praha 1), stojaté vody (Albertov, odebráno 2.3.2023 v lokalitě Studničkova, Praha 2) nebo vody z koupaliště (Petynka, odebráno 20.6.2023 v lokalitě Otevřená 1072/4, Praha 6).

### 3.3.6 Uchovávání standardních roztoků a reálných vzorků

Vodné roztoky standardů TPT jsou nestabilní a termolabilní, a to i vůči opakovanému zmrazení a rozmrazení, proto byly analyzovány co nejdříve po jejich přípravě, případně byly uchovávány při teplotě  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Methanolicke roztoky byly skladovány při teplotě  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Veškeré roztoky standardů UV filtrů i vzorků vody byly uchovávány při teplotě  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 3.4 Provedení extrakce UV filtrů

### 3.4.1 Příprava extrakčních činidel

Byly připraveny následující DESy:

- a) menthol s kaprylovou kyselinou v molárním poměru 1:1 (M:C8 1:1)
- b) menthol s dekanovou kyselinou v molárním poměru 1:1 (M:C10 1:1)
- c) menthol s dekanovou kyselinou v molárním poměru 1:2 (M:C10 1:2)
- d) menthol s dekanovou kyselinou v molárním poměru 2:1 (M:C10 2:1)
- e) menthol s laurovou kyselinou v molárním poměru 2:1 (M:C12 2:1)
- f) terpineol s kaprylovou kyselinou v molárním poměru 1:1 (T:C8 1:1)
- g) kaprylová kyselina s dekanovou kyselinou v molárním poměru 1:1 (C8:C10 1:1)
- h) kaprylová kyselina s dekanovou kyselinou v molárním poměru 2:1 (C8:C10 2:1)
- i) kaprylová kyselina s dekanovou kyselinou v molárním poměru 1:2 (C8:C10 1:2)
- j) kaprylová kyselina s laurovou kyselinou v molárním poměru 2:1 (C8:C12 2:1)

Dále byl k extrakci použit terpineol a linalool.

Směs T:C8 1:1 byla připravena prostým smícháním obou složek v požadovaném molárním poměru bez nutnosti zahřívání, ostatní DESy byly připraveny následovně: Obě složky připravovaného DESu byly vždy smíchány v požadovaném molárním poměru a následně byly za stálého míchání zahřívány na 85 °C po dobu 15 minut od jejich zkapalnění.

### 3.4.2 Postup extrakce UV filtrů a úpravy vzorku před analýzou

Extrakce byly provedeny při laboratorní teplotě. 500 µl směsného vzorku standardů BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-8 a MOBP o koncentraci analytů 5, 10 a 20 µg ml<sup>-1</sup> ve vodné matrici bylo třepáno 15 minut při 1 500 rpm s 50, 250 nebo 500 µl testovaného DESu nebo terpenu. Při testování vlivů na extrakci byla upravena doba třepání nebo rychlost třepání, tyto experimenty jsou blíže popsány v kapitole 4.9.3. Ve všech případech následovala centrifugace po dobu 5 minut při 2 500 rpm.

Vodná fáze po extrakci byla zředěna methanolem v obj. poměru 2:1 a byl k ní přidán vnitřní standard diazepam-d<sub>5</sub> ( $c = 50 \text{ ng ml}^{-1}$ ). Následně byla provedena HPLC-MS/MS analýza popsaná v kapitole 4.6. Každá extrakce byla provedena duplicitně a každý duplikát byl analyzován dvakrát.



## 3.5 Příprava mobilních fází pro HPLC analýzy

### 3.5.1 Mobilní fáze využívané při analýze TPT

Jako mobilní fáze při analýze TPT byla využívána deionizovaná voda s 0,1 obj. % mravenčí kyseliny, vodný roztok octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) o pH 4,5; 5,5; 6,6 a 7,4, kde pH bylo upraveno přidavkem octové kyseliny nebo vodného roztoku 25 obj. % amoniaku. Jako organická složka mobilní fáze byl použit methanol bez úpravy nebo s přidavkem 0,1 obj. % mravenčí kyseliny.

### 3.5.2 Mobilní fáze využívané při analýze UV filtrů

Jako mobilní fáze při analýze UV filtrů byla využívána deionizovaná voda s 0,1 obj. % mravenčí kyseliny nebo s 0,1 obj. % octové kyseliny, případně vodný roztok mravenčanu amonného ( $c = 10 \text{ mmol l}^{-1}$ ) o pH 3,5, kde pH bylo upraveno přidavkem mravenčí kyseliny. Organickou složkou byl methanol bez úpravy nebo s přidavkem 0,1 obj. % mravenčí kyseliny.

## 3.6 Kvalitativní hodnocení analýz

Kvalitativní analýza byla provedena na základě experimentů se standardy. Identifikace látek nebo vyloučení jejich přítomnosti bylo provedeno srovnáním retenčních časů analytů s retenčními časy standardů a sledováním specifických hmotnostních přechodů analytů prostřednictvím tandemové hmotnostní spektrometrie v režimu MRM. Podmínky fragmentace včetně vhodných prekurzorových a produktových iontů byly optimalizovány, optimalizace je popsána v kapitolách 4.1 a 4.5.

## 3.7 Kvantitativní hodnocení analýz

Kvantitativní analýza byla provedena metodou vnitřního standardu (internal standard, IS) s izotopicky značeným standardem topotekanem- $d_6$  pro analýzu TPT laktonu a karboxylátu a diazepamem- $d_5$  pro analýzu UV-filtrů. Použití IS umožňuje minimalizovat chyby kvantifikace způsobené např. náhodnými chybami ionizace v hmotnostní detekci.

Izotopicky značený standard byl ve stejném množství přidán do všech vzorků určených ke kvantifikaci, včetně roztoků kalibrace. Následně byla provedena (U)HPLC-MS/MS analýza v režimu MRM. Pro každý kvantifikovaný analyt byla sestrojena kalibrační závislost poměru

plochy píku analytu  $A$  a interního standardu  $A_{IS}$  na hmotnostní koncentraci analytu  $c_m$ . Při výpočtu koncentrace bylo započítáno ředění vzorku.

Limit detekce (limit of detection, LOD) a limit kvantifikace (limit of quantification, LOQ) byl určen výpočtem za využití směrnice  $b$  kalibrační závislosti poměru výšky píku analytu  $h$  a interního standardu  $h_{IS}$  na hmotnostní koncentraci analytu  $c_m$ . Limit detekce byl určen jako koncentrace, jejíž výška píku odpovídá trojnásobku hodnoty šumu základní linie chromatogramu, limit kvantifikace pak jako její desetinásobek<sup>84</sup>. Vztahy pro výpočet LOD a LOQ jsou uvedeny v rovnici (1) a (2).

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot \text{šum}}{b} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \text{šum}}{b} \quad (2)$$

V případě  $n$  počtu opakovaných měření byly výsledky statisticky zpracovány na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Odlehlé výsledky byly vyloučeny na základě Deanova-Dixonova testu, pokud kritérium  $Q_n$  vypočítané podle rovnice (3) bylo větší než tabelovaná kritická hodnota  $Q_k$ . V rovnici (3)  $x_n$  značí  $n$ -tý člen statistického souboru,  $x_{\max}$  maximální hodnotu a  $x_{\min}$  minimální hodnotu. Výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr  $\bar{x}$  doprovázený směrodatnou odchylkou  $s$  (standard deviation)<sup>85</sup>. Vztah pro výpočet směrodatné odchylky je uveden v rovnici (4).

$$Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_{\max} - x_{\min}} \quad (3)$$

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad (4)$$

## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 Optimalizace tandemové hmotnostní detekce TPT

Hmotnostní analyzátor pracoval v režimu pozitivních iontů (ESI+ mód), jeho nastavení bylo následující: čas přechodu (dwell time) 200 ms, napětí na sprejovací kapiláře +4 000 V, teplota desolvatačního plynu (dusíku) 300 °C, průtok desolvatačního plynu 10 l min<sup>-1</sup>, tlak nebulizéru 55 psi.

Při prvotních experimentech byl použit standardní roztok TPT o koncentraci 1 µg ml<sup>-1</sup> ve směsi methanol:voda v poměru 1:1 (v/v) s přidavkem 0,1 obj. % mravenčí kyseliny. V kyselém pH (zde zásobní roztok o pH 3,4) je TPT přítomen pouze v laktonové formě. Dávkováno bylo 10 µl. Mobilní fáze byla složena z vody a methanolu v poměru 50:50 (v/v), kde obě složky mobilní fáze obsahovaly 0,1 obj. % mravenčí kyseliny pro zvýhodnění laktonové formy TPT.

Ve skenovacím režimu hmotnostního analyzátoru bylo proměřeno rozmezí hmot  $m/z$  100 až 500, v získaném hmotnostním spektru byl nalezen ion s nejintenzivnějším signálem s  $m/z$  422,1. Tento ion sloužil dále jako prekurzorový ion fragmentace laktonové formy TPT, vznikl přijetím protonu H<sup>+</sup> analytem.

Následně bylo u prekurzorového iontu optimalizováno napětí na fragmentoru v režimu SIM (single ion monitoring), aby bylo dosaženo co nejvyšší intenzity signálu. Bylo testováno napětí na fragmentoru 95, 105, 115, 125 a 135 V. Prekurzorový ion měl nejvyšší intenzitu při napětí 135 V.

Dále byla v režimu „product ion“ sledována fragmentace prekurzorového iontu, v rozmezí hmot  $m/z$  100 až 500 byl nalezen nejintenzivnější produktový ion s hodnotou  $m/z$  377,0. Z prekurzorového iontu pravděpodobně vznikl odštěpením dimethylaminové skupiny -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Za účelem dosažení co nejintenzivnějšího signálu zvoleného produktového iontu byla optimalizována kolizní energie laktonové formy TPT. Během těchto experimentů byla hodnota kolizní energie zvyšována, dokud se snižovala intenzita příslušného prekurzorového iontu. Z testovaných hodnot kolizní energie 5, 10, 15, 20 a 25 V se ukázala jako optimální hodnota 15 V.

Pro TPT karboxylát a interní standard TPT-d<sub>6</sub> byly zvolené prekurzorové a produktové ionty určeny na základě experimentu popsaného v kapitole 4.2.2 a odborné literatury<sup>77, 78, 80</sup>, ostatní zvolené parametry fragmentace byly totožné jako pro TPT lakton a jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Optimalizované podmínky MS/MS detekce TPT laktonu, karboxylátu a IS TPT-d<sub>6</sub> (byla sledována jeho laktonová forma)

<b>Analyt</b>	<b>Prekurzorový ion</b> <b>[m/z]</b>	<b>Produktový ion</b> <b>[m/z]</b>	<b>Napětí na fragmentoru</b> <b>[V]</b>	<b>Kolizní energie</b> <b>[V]</b>
TPT karboxylát	440,1	330,9	135	15
TPT lakton	422,1	377,0	135	15
TPT-d <sub>6</sub> lakton	428,0	377,0	135	15

## 4.2 Výběr chromatografického systému pro analýzu TPT

Na základě odborné literatury citované v kapitole 2.5.2 teoretické části této diplomové práce byla pro separaci laktonové a karboxylátové formy TPT zvolena kolona Waters Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm), kde separace probíhá na oktadecylové stacionární fázi obsahující ethylenové můstky, které zajišťují vysokou chemickou stabilitu kolony. Teplota kolony byla během všech experimentů termostatem udržována na 15 °C, teplota autosampleru byla nastavena na 8 °C. Dávkováno bylo vždy 10 μl vzorku.

Separace byly zpočátku prováděny s různými druhy mobilních fází a různými obsahy organických modifikátorů v mobilní fázi za použití izokratické eluce. Následně byla separace optimalizována navržením gradientové eluce.

### 4.2.1 Eluce laktonové formy TPT v závislosti na složení MF

Byla sledována eluce laktonové formy TPT v závislosti na obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi v MRM režimu hmotnostního spektrometru podle optimalizovaných podmínek a pomocí UV/VIS detekce při 227, 258 a 390 nm s referenční vlnovou délkou 500 nm. Kyselé pH vzorku i MF zajistilo přítomnost TPT pouze v laktonové formě. Dávkován byl standardní roztok TPT o koncentraci 1 μg ml<sup>-1</sup> ve směsi methanol:voda

v poměru 1:1 (v/v) s přídatkem 0,1 obj. % mravenčí kyseliny, takto upravená vodná složka měla pH 2,6. Mobilní fáze byla tvořena 0,1 obj. % vodným roztokem mravenčí kyseliny (složka A) a methanolem s 0,1 obj. % mravenčí kyseliny (složka B), byly testovány MF s poměry A:B 20:80, 30:70, 40:60, 60:40, 65:35, 70:30 a 80:20 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 0,15 ml min<sup>-1</sup>. Měření byla provedena ve třech opakováních.

Retenční čas laktonové formy TPT se postupně zvyšoval od hodnoty 1,94 min. při testování MF s 80% obsahem methanolu až k hodnotě 7,30 min. s 30% obsahem methanolu v MF. Při 20% obsahu methanolu v MF došlo k velmi silnému zachycení TPT na stacionární fázi, kdy analyt nebyl ani po 30 minutách eluován z kolony, jeho eluce byla vyvolána zvýšením obsahu methanolu v MF na 40 %. Tento poznatek byl později využit při návrhu gradientové eluce k lepšímu oddělení laktonové a karboxylátové formy TPT.

Při UV/VIS detekci byla v chromatogramu kromě eluční křivky laktonové formy TPT, potvrzené hmotnostní detekcí, zaznamenána ještě další eluční křivka v mrtvém čase kolony 1,5–1,6 min., která při měření s vysokým obsahem methanolu v mobilní fázi splývala s eluční křivkou analytu. Původ této eluční křivky byl podrobněji zkoumán a analyzován ve skenovacím režimu hmotnostního spektrometru, eluční křivka byla zaznamenána také v chromatogramu slepého vzorku, mohlo se tedy jednat o nečistotu z rozpouštědla nebo o nečistotu uvolněnou z chromatografické kolony během analýzy.

#### 4.2.2 Eluce karboxylátové formy TPT v závislosti na složení MF

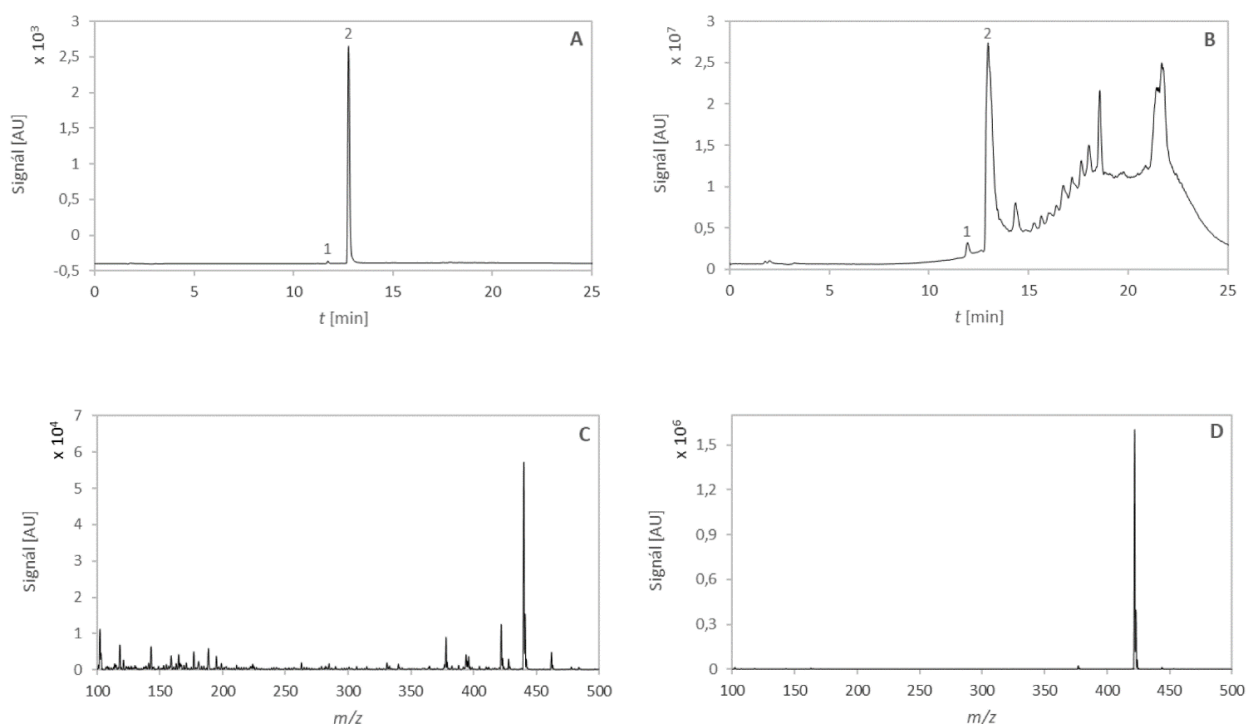
Byl připraven zásaditý standardní roztok TPT, v němž se očekávala přítomnost karboxylátové formy TPT, o koncentraci 1 µg ml<sup>-1</sup> ve směsi methanol:voda v poměru 1:1 (v/v) s přídatkem  $7,5 \cdot 10^{-4}$  obj. % amoniaku, takto upravená vodná složka měla pH 8,3. Pro analýzu byla použita kyselá mobilní fáze stejná jako v kapitole 4.2.1 v poměru A:B 60:40 (v/v) o průtoku 0,15 ml min<sup>-1</sup>. Detekce byla provedena ve skenovacím režimu hmotnostního spektrometru v rozmezí hmot  $m/z$  100 až 500 a pomocí UV/VIS detekce při 227, 258 a 390 nm s referenční vlnovou délkou 500 nm.

V hmotnostní detekci i UV/VIS detekci se objevila eluční křivka laktonové formy TPT, o stejné intenzitě jako v experimentech popsanych v kapitole 4.2.1, i eluční křivka nečistoty, nicméně nebyla nalezena karboxylátová forma TPT.

Aby bylo možné vyloučit potenciální koeluci karboxylátové formy TPT s eluční křivkou nečistoty, byl analyzován vzorek o vyšší koncentraci TPT a byla navržena gradientová eluce. S použitím stejné mobilní fáze byla aplikována gradientová eluce A, jejíž průběh je popsán v kapitole 4.2.3. Dávkován byl standardní roztok TPT o koncentraci  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  ve směsi methanol:voda v poměru 1:1 (v/v) s přídavkem  $7,5 \cdot 10^{-4}$  obj. % amoniaku. Opět byla zaznamenána laktonová forma TPT i eluční křivka neznámé nečistoty. Ani v tomto experimentu nebylo možné identifikovat karboxylátovou formu TPT. Lze předpokládat, že z důvodu kyselé mobilní fáze během analýzy topotekan přešel z karboxylátové formy do laktonové formy.

Aby bylo možné karboxylátovou formu detekovat, bylo nutné upravit pH mobilní fáze. Pro další experiment byla použita MF složená z vodného roztoku octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ , pH = 6,6, složka A) a methanolu (složka B) s gradientovou elucí A. Použit byl tentýž vzorek TPT jako v předchozím experimentu. Ve skenovacím režimu hmotnostního spektrometru byla zaznamenána eluční křivka s nejintenzivnějším  $m/z$  ve spektru 440,1, což odpovídá  $[\text{M}+\text{H}]^+$  iontu karboxylátové formy TPT.

Karboxylátová forma byla nicméně zastoupena mnohonásobně méně než laktonová forma TPT, jak lze vidět v chromatogramech uvedených v grafu 1. Důvodem mohla kromě hodnot pH vzorku a mobilní fáze být i nedostatečná doba ustavení rovnováhy mezi laktonovou a karboxylátovou formou ve vzorku před měřením. Vliv času a pH na rovnováhu mezi laktonovou a karboxylátovou formou TPT je podrobněji popisován v kapitole 4.3.



Graf 1: Chromatogramy standardního roztoku TPT ( $c = 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ve směsi methanol:voda 1:1 (v/v) s přidavkem  $7,5 \cdot 10^{-4}$  obj. % amoniaku při UV/VIS detekci při 227 nm (A) a hmotnostní detekci ve skenovacím režimu (B), eluční křivka TPT karboxylátu (1) a TPT laktonu (2), hmotnostní spektrum TPT karboxylátu (C) a TPT laktonu (D). MF byla tvořena vodným roztokem octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ , pH = 6,6) a methanolem, analýza byla provedena gradientovou elucí A

### 4.2.3 Navržení gradientové eluce pro analýzu TPT

Separace laktonové a karboxylátové formy TPT byla provedena s využitím gradientové eluce, aby se zamezilo koeluci s eluční křivkou nečistoty, aby se prodloužila retence analytů a aby se optimalizovala separace. Gradientová eluce začínala nízkým obsahem methanolu (složka B) v mobilní fázi, poté byl postupně obsah methanolu zvyšován, přičemž se zvyšovala také eluční síla mobilní fáze, nakonec byla provedena ekvilibrace na počáteční podmínky. Testováno bylo celkem 8 programů gradientové eluce, průběh 3 nejvýznamnějších z nich je uveden v tabulce 5. Průtok mobilní fáze byl ve všech případech  $0,15 \text{ ml min}^{-1}$ . Jako nejvhodnější byl zvolen gradient C.

Gradient A byl prvním navrženým gradientem. Následující gradienty byly navrženy za účelem zkrácení doby separace, upravení strmosti gradientu a optimalizace počátečního a koncového složení mobilní fáze v gradientu.

Tabulka 5: Průběh gradientové eluce A, B a C analýzy TPT laktonu a karboxylátu. Složení mobilní fáze je uvedeno v obj. %

Gradient A			Gradient B			Gradient C		
<i>t</i> [min]	složení MF [%]		<i>t</i> [min]	složení MF [%]		<i>t</i> [min]	složení MF [%]	
	A	B		A	B		A	B
0	95	5	0	80	20	0	80	20
3	95	5	2	80	20	2	80	20
13	10	90	8	10	90	6	30	70
18	10	90	11	10	90	9	30	70
28	95	5	17	80	20	14	80	20
35	95	5	24	80	20	19	80	20

### 4.3 Změny v poměru laktonové a karboxylátové formy TPT v závislosti na pH

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.1, medicínsky významná je pouze laktonová forma TPT. Právě z tohoto důvodu je pro výzkum TPT a jeho využití pro hydrogelové implantáty nutné při analýze rozlišovat mezi farmakologicky účinnou laktonovou a neúčinnou karboxylátovou formou TPT. Aby bylo možné více porozumět rovnováze mezi těmito dvěma formami TPT, byla provedena časová studie změny poměru laktonové a karboxylátové formy TPT v závislosti na pH vzorku a na pH vodné složky mobilní fáze.

Detekce byla provedena pouze v MRM režimu hmotnostního spektrometru, UV/VIS detekce již nebyla využívána, jelikož vlivem použitého gradientu se zvýšil limit UV/VIS detekce a v porovnání se MRM hmotnostní detekcí dosahovala výrazně nižší citlivosti. Dávkován byl standardní roztok TPT o koncentraci 50 µg ml<sup>-1</sup> ve vodném roztoku octanu amonného (*c* = 5 mmol l<sup>-1</sup>) o různém pH. Mobilní fáze byla tvořena vodným roztokem octanu amonného (*c* = 5 mmol l<sup>-1</sup>) o různém pH a methanolem, analýzy byly provedeny gradientovou elucí B, jejíž průběh je uveden v tabulce 5. Způsob přípravy vzorků a mobilních fází je uveden v kapitole 3.3.1 a 3.5.1. Během experimentu byly opakovaně používány vzorky



uchovány při teplotě 5 °C. Výsledky provedených experimentů jsou uvedeny v tabulce 6.

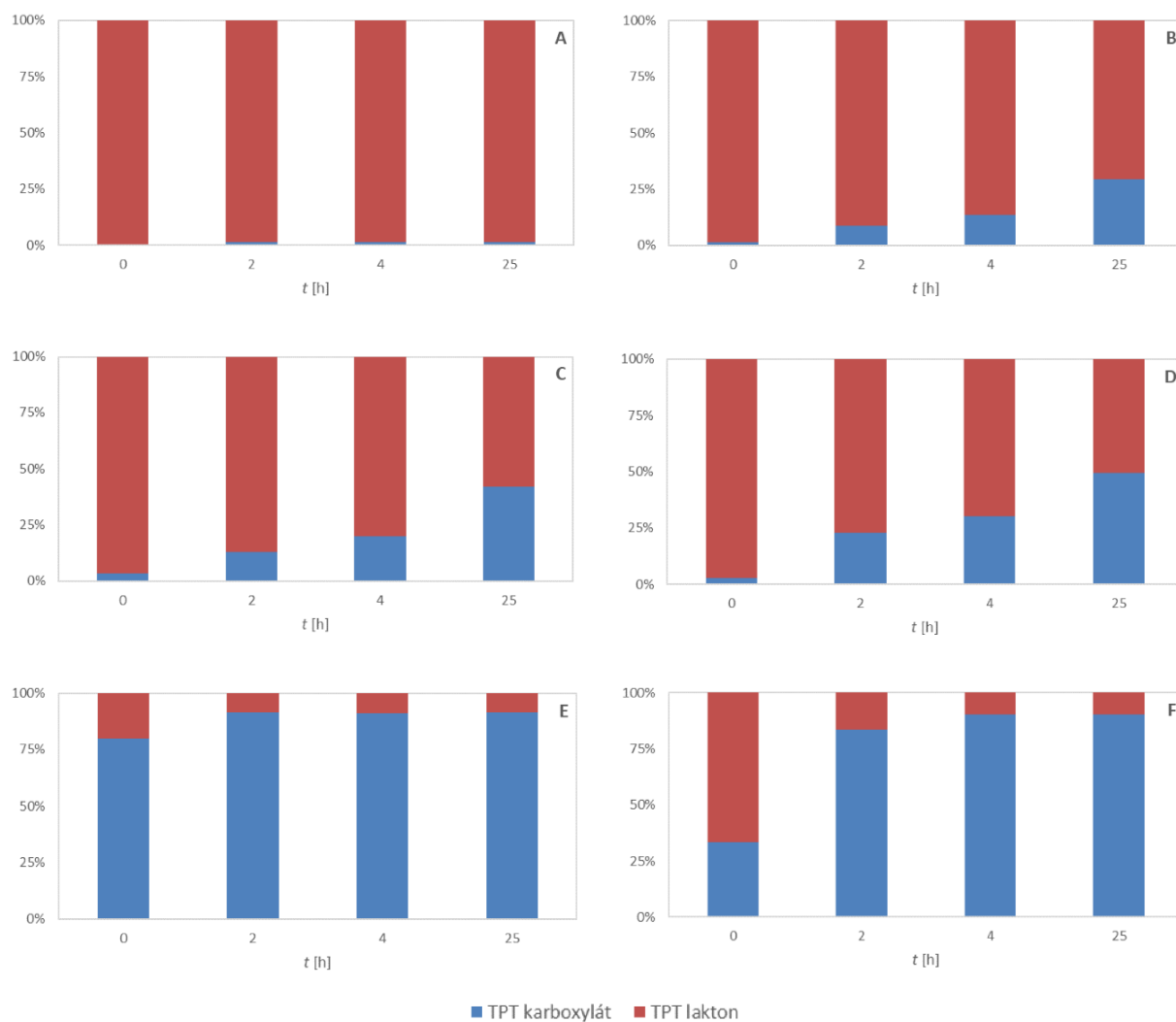
Z výsledků v tabulce 6 je patrné, že se vzrůstajícím časem od přípravy vzorku dochází ke zvyšování hmotnostního zlomku karboxylátové formy TPT ve vzorku, dále se vzrůstajícím pH mobilní fáze nebo se vzrůstajícím pH vzorku dochází ke zvyšování hmotnostního zlomku karboxylátové formy TPT. Výjimku tvoří vzorek s přidavkem methanolu, kde je možné pozorovat stabilizaci laktonové formy a pomalejší přechod na karboxylátovou formu. Další drobné odchylky od výše zmíněných trendů mohou být dány náhodnou chybou měření. Grafická ilustrace těchto trendů je znázorněna v grafu 2.

V průběhu měření bylo pozorováno, že se v hmotnostní detekci v MRM přechodu laktonové formy TPT objevuje druhá eluční křivka v retenčním čase karboxylátové formy TPT. S každým bodem časové studie je tato druhá eluční křivka výraznější, stejně tak je výraznější při vyšších pH rozpouštědla vzorku. Z toho lze vyvodit, že tato druhá eluční křivka v MRM přechodu laktonové formy TPT roste se zvyšujícím se obsahem karboxylátové formy TPT ve vzorku. Může být způsobena tím, že karboxylátová forma TPT také poskytuje přechod  $m/z$  422,1  $\rightarrow$  377,0, toto tvrzení nebylo možné experimentálně dokázat, jelikož nebylo možné upravit podmínky separace tak, aby nebyl při měření přítomen žádný obsah laktonové formy TPT. Nicméně plocha této druhé eluční křivky v MRM přechodu laktonové formy TPT nebyla při kvantitativní analýze brána v potaz. Tento trend je možné pozorovat také v grafu 3 (B).

Tabulka 6: Časová studie změny poměru TPT laktону a TPT karboxylátu v závislosti na pH, kde  $x_c$  je hmotnostní zlomek TPT karboxylátu a  $x_l$  je hmotnostní zlomek TPT laktónu. Data byla získána analýzou standardních roztoků TPT ( $c = 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) připravených ve vodném roztoku octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) o pH 4,5; 5,5; 6,6; 7,4; 8,0; 10,0 nebo ve směsi vodného roztoku octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ , pH = 10,0) a methanolu v poměru 1:1 (v/v). MF byla tvořena vodným roztokem octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol/l}$ ) o pH 4,5; 5,5; 6,6 nebo 7,4 a methanolem, analýzy byly provedeny gradientovou elucí B

pH vzorku	$t$ [h]	pH mobilní fáze							
		4,5		5,5		6,6		7,4	
		$x_c$	$x_l$	$x_c$	$x_l$	$x_c$	$x_l$	$x_c$	$x_l$
[%]									
4,5	0	0,1	99,9	-	-	-	-	1,9	98,1
	2	1,3	98,7	-	-	-	-	3,3	96,7
	4	1,4	98,6	-	-	-	-	4,3	95,7
	25	1,5	98,5	-	-	-	-	6,0	94,0
	5,5	0	-	-	0,6	99,4	-	-	-
2	-	-	4,5	95,5	-	-	-	-	-
4	-	-	7,3	92,7	-	-	-	-	-
25	-	-	17,1	82,9	-	-	-	-	-
6,6	0	1,3	98,7	1,9	98,1	3,4	96,6	2,2	97,8
	2	14,9	85,1	16,7	83,3	13,0	87,0	16,7	83,3
	4	23,6	76,4	22,2	77,8	19,9	80,1	21,4	78,6
	25	50,5	49,5	44,0	56,0	42,0	58,0	42,3	57,7
	7,4	0	-	-	-	-	-	-	2,9
2	-	-	-	-	-	-	-	22,8	77,2
4	-	-	-	-	-	-	-	30,0	70,0
25	-	-	-	-	-	-	-	49,5	50,5
8,0	0	1,7	98,3	3,1	96,9	8,2	91,8	-	-
	2	25,3	74,7	23,9	76,1	35,7	64,3	-	-
	4	37,5	62,5	33,6	66,4	47,6	52,4	-	-
	25	67,0	33,0	61,2	38,8	63,1	36,9	-	-
	10,0	0	79,3	20,7	81,3	18,7	85,1	14,9	79,7
2	87,8	12,2	93,0	7,0	91,3	8,7	91,5	8,5	
4	87,5	12,5	92,3	7,7	91,2	8,8	91,1	8,9	
25	87,9	12,1	93,0	7,0	92,2	7,8	91,3	8,7	
10,0 MeOH	0	33,7	66,3	27,7	72,3	35,4	64,6	33,5	66,5
	2	80,8	19,2	81,9	18,1	77,2	22,8	83,6	16,4
	4	87,0	13,0	89,1	10,9	88,0	12,0	90,1	9,9
	25	86,7	13,3	91,3	8,7	89,9	10,1	90,4	9,6

- nebylo analyzováno



Graf 2: Sloupcové grafy časové změny poměru TPT laktone a karboxylátu při různých pH vzorku a MF, získané analýzou standardních roztoků TPT ( $c = 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) připravených ve vodném roztoku octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) o pH 4,5 (A); 5,5 (B); 6,6 (C); 7,4 (D); 10,0 (E) nebo ve směsi vodného roztoku octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ , pH = 10,0) a methanolu v poměru 1:1 (v/v) (F). MF byla tvořena vodným roztokem octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) o pH 4,5 (A); 5,5 (B); 6,6 (C) nebo 7,4 (D, E, F) a methanolem, analýzy byly provedeny gradientovou elucí B. Data použitá k sestavení grafů jsou uvedena v tabulce 6

## 4.4 Stanovení obsahu laktonové a kraboxylátové formy TPT ve vzorku

### 4.4.1 Problém carry-overu TPT

Pravděpodobně v důsledku provádění mnoha analýz se vzorky o vysoké koncentraci TPT ( $c = 50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) byl zjištěn problém carry-overu. V kontextu HPLC pojem carry-over (česky přenos) označuje jeden typ systematické chyby, která vzniká z předchozího vzorku a je přenesena do dalšího vzorku. Protože carry-over způsobuje chybu při kvantifikaci následujícího vzorku, je třeba jej vzít v úvahu při vývoji metody a je nutné jej co nejvíce omezit. Omezení carry-overu může být dosaženo např. použitím vhodných činidel k promývání autosampleru a promýváním systému pomocí vhodné mobilní fáze za účelem čištění kolony a LC systému<sup>86</sup>.

Carry-over se projevoval přítomností elučních křivek laktonu a karboxylátu ve slepých vzorcích a v poskytování falešně vyšších výsledků naměřených koncentrací TPT při následných analýzách, a to především u TPT laktonu. V případě všech experimentů bylo využito vnějšího oplachu dávkovací jehly autosampleru před každou analýzou, a to pomocí methanolu po dobu 10 s. Po zjištění problému carry-overu bylo zařazeno pravidelné promývání autosampleru dávkováním čistých rozpouštědel – methanolu, acetonitrilu a isopropanolu, a sledováním přítomnosti carry-overu. Problém carry-overu byl nakonec vyřešen promýváním systému roztokem amoniaku s methanolem, jeho bližší popis je uveden v diplomové práci Mgr. Barbory Mudrové „Vývoj LC-MS metody pro studium topotekanu“ v kapitole 4.4 (cit. <sup>87</sup>).

### 4.4.2 Kalibrace laktonové a kraboxylátové formy TPT

Kalibrace byla provedena zvlášť v kyselém prostředí vzorku pro TPT lakton a v zásaditém prostředí pro TPT karboxylát. Příprava roztoků pro kalibraci je popsána v kapitole 3.3.2. Mobilní fáze byla tvořena vodným roztokem octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) o pH 7,4 a methanolem. Byly analyzovány roztoky IS o různých koncentracích pro nalezení optimální koncentrace IS, která poskytuje adekvátní odezvu a která následně byla využita jako finální koncentrace v roztocích kalibrace. Všechny analýzy byly provedeny pomocí gradientu C popsaného v tabulce 5. Získané retenční časy, regresní rovnice kalibračních závislostí spolu

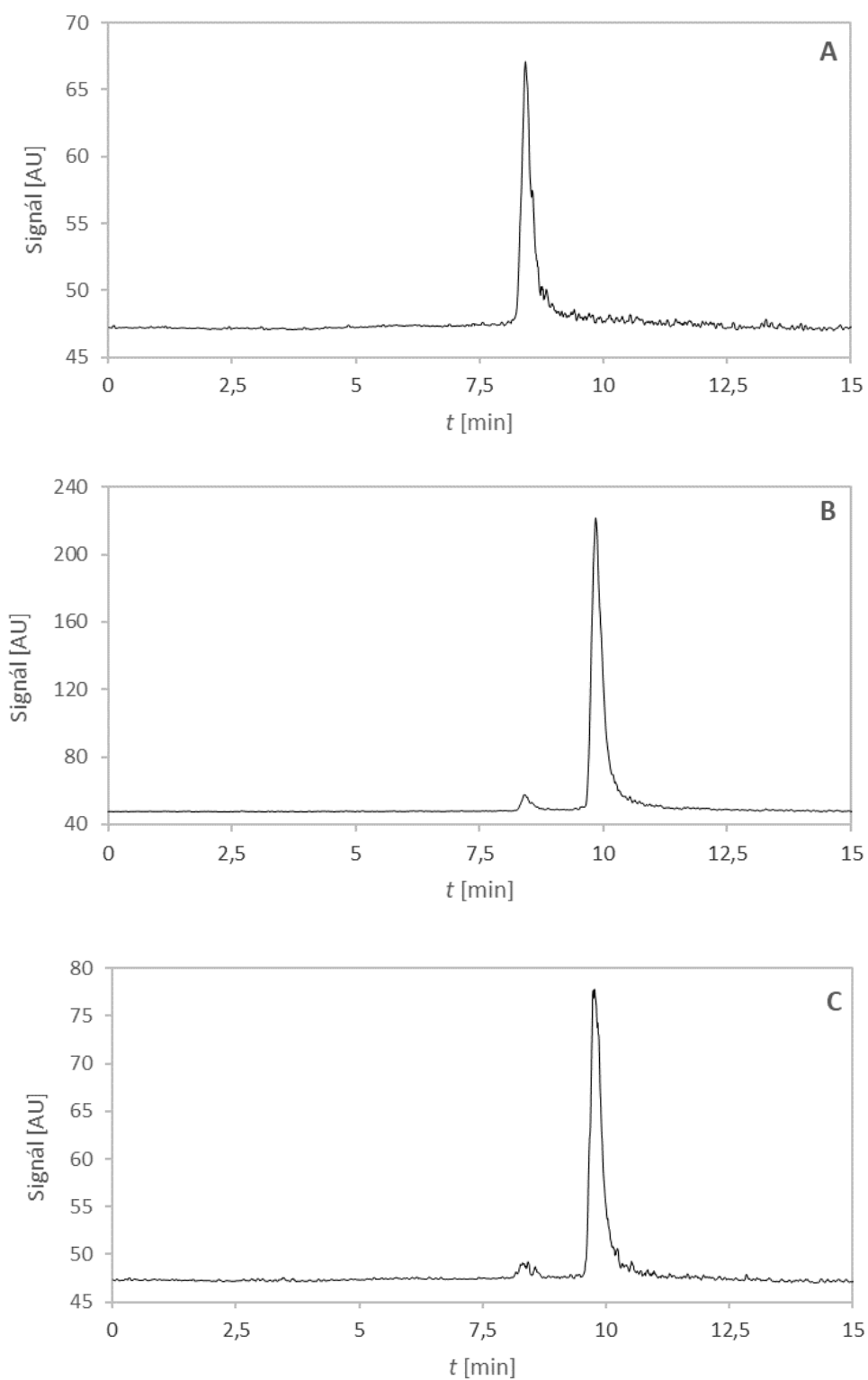
s koeficientem determinace, LOD, LOQ a lineárním dynamickým rozsahem jsou uvedeny v tabulce 7. Retenční čas IS činil 9,8 min. Hodnoty LOD a LOQ byly vypočítané pomocí rovnic (1) a (2).

Tabulka 7: Retenční čas, regresní rovnice kalibrace, koeficient determinace ( $R^2$ ), LOD, LOQ a lineární dynamický rozsah pro TPT karboxylát a TPT lakton

Analyt	$t_r$ [min]	Regresní rovnice kalibrace	$R^2$	LOD [ng ml <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng ml <sup>-1</sup> ]	Lineární dynamický rozsah [ng ml <sup>-1</sup> ]
TPT karboxylát	8,4	$y = 0,030 x$	0,9998	0,3	0,8	1–100
TPT lakton	9,8	$y = 0,188 x - 0,080$	0,9995	0,1	0,5	0,5–100

Následně byla pomocí analýzy řady roztoků TPT připravených v pufru octanu amonného o pH 7,4 ověřena funkčnost kalibrace. Bylo zvoleno pH 7,4, jelikož napodobuje fyziologické pH krve. Výsledky těchto analýz včetně zastoupení TPT laktonu a karboxylátu při pH 7,4, součtu obou forem a relativní chyby měření (vypočítána jako poměr absolutní chyby celkové koncentrace TPT k teoretické hodnotě) jsou uvedeny v tabulce 8. Chromatogramy analýzy roztoku TPT o koncentraci 50 ng ml<sup>-1</sup> při pH 7,4 jsou uvedeny v grafu 3.

Z tabulky 8 je patrné, že ačkoliv by měl poměr zastoupení laktonové a karboxylátové formy být stabilní, vidíme nárůst zastoupení karboxylátové formy se vzrůstající teoretickou koncentrací TPT. Přestože roztoky byly ponechány přes noc (15–20 hod.) stát při teplotě 5 °C pro ustavení rovnováhy, můžeme vidět, že nedošlo k úplnému ustavení rovnováhy, ale vzrůstá zastoupení TPT karboxylátu u roztoků od nejnižší koncentrace po nejvyšší, což odpovídá pořadí, v jakém byly měřeny. Nicméně cílem experimentu bylo určit relativní chybu měření a ověřit tak, jestli provedená kalibrace je spolehlivá. Největší relativní chyba měření 24,2 % byla nalezena u roztoku o koncentraci 1 ng ml<sup>-1</sup>, u ostatních roztoků byla nalezena přijatelná relativní chyba měření, a tedy prezentovaná kalibrace je použitelná pro kvantifikaci TPT laktonu a karboxylátu.



Graf 3: MRM chromatogramy TPT karboxylátu (**A**), laktonu (**B**) a TPT-d<sub>6</sub> (**C**) získané analýzou roztoku TPT o koncentraci 50 ng ml<sup>-1</sup> v pufru octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) o pH = 7,4. MF se skládala z téhož pufru octanu amonného a methanolu. Analýzy byly provedeny gradientovou elucí C

Tabulka 8: Průměrné naměřené koncentrace ( $n = 2$ ) TPT laktonu a karboxylátu, uvedené se směrodatnou odchylkou, získané analýzou roztoku TPT v pufru octanu amonného ( $c = 5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) o  $\text{pH} = 7,4$ . MF se skládala z téhož pufru octanu amonného a methanolu. Výsledky jsou uvedeny včetně relativní chyby měření

<b>c(TPT, teoretická) [ng ml<sup>-1</sup>]</b>	<b>c(TPT karboxylát) [ng ml<sup>-1</sup>]</b>	<b>c(TPT lakton) [ng ml<sup>-1</sup>]</b>	<b>c(TPT, celková) [ng ml<sup>-1</sup>]</b>	<b>Relativní chyba měření [%]</b>
1	0,11 ± 0,05	1,13 ± 0,00	1,24 ± 0,05	24,2
5	1,71 ± 0,11	3,66 ± 0,08	5,37 ± 0,19	7,4
10	3,74 ± 0,12	6,27 ± 0,06	10,01 ± 0,19	0,1
25	10,14 ± 0,32	15,63 ± 0,51	25,77 ± 0,83	3,1
50	21,41 ± 1,34	28,64 ± 0,13	50,05 ± 1,47	0,1
100	64,93 ± 0,29	39,42 ± 0,42	104,35 ± 0,71	4,4

Všechna zjištěná data byla využita pro další experimenty provedené v prasečí krevní plasmě a sklivci, kterým se věnovala Mgr. Barbora Mudrová ve své diplomové práci<sup>87</sup>. Moje spolupráce na experimentech s topotekanem byla ukončena, jelikož jsem v rámci magisterského studia odjela do zahraničí na dobu 5 měsíců na projekt Erasmus+. Po návratu do ČR jsem se věnovala novému projektu zaměřenému na vývoj metody HPLC-MS/MS k simultánnímu stanovení vybraných organických UV filtrů ve vodě a k testování schopnosti 10 DESů a 2 terpenů extrahovat vybrané UV filtry z vodných matric.

## 4.5 Optimalizace tandemové hmotnostní detekce UV filtrů

Hmotnostní analyzátor pracoval v režimu pozitivních iontů (ESI+ mód), jeho nastavení bylo stejné, jako je uvedeno v prvním odstavci kapitoly 4.1.

Jako první byla provedena optimalizace tandemové hmotnostní detekce benzofenonu. Ve skenovacím režimu hmotnostního analyzátoru bylo nastaveno rozmezí hmot  $m/z$  100 až 400, v získaném hmotnostním spektru byl nalezen ion s nejintenzivnějším signálem s  $m/z$  183,0, což odpovídá iontu  $[M + H^+]$ . Tento ion sloužil dále jako prekuzorový ion fragmentace BP. U prekuzorového iontu bylo optimalizováno napětí na fragmentoru v režimu SIM, pro BP byly vyzkoušeny následující hodnoty napětí na fragmentoru: 95, 105, 115, 125, 135 a 145 V, optimální byla hodnota 135 V.

Při analýze BP (i ostatních analytů) byly sledovány dva hmotnostní přechody, ale pouze jeden byl použit pro kvantifikaci (označen Q), druhý sloužil jako kvalifikátor (označen q). V režimu „product ion“ byla sledována fragmentace prekuzorového iontu BP, v rozmezí hmot  $m/z$  50 až 300 byl nalezen nejintenzivnější iont s hodnotou  $m/z$  105,0 (Q, odpovídá ztrátě fenylu), druhý nejintenzivnější pak byl ion s  $m/z$  77,0 (q, odpovídá ztrátě benzyloxyskupiny). Za účelem dosažení co nejintenzivnějšího signálu zvolených produktových iontů byla optimalizována kolizní energie. Pro benzofenon byly vyzkoušeny následující hodnoty kolizních energií: 5, 10, 15, 20, 30 a 40 V. Ion s  $m/z$  105,0 měl nejvyšší intenzitu při kolizní energii 10 V, ion s  $m/z$  77,0 při 30 V.

Analogický postup byl aplikován i u 12 dalších organických UV filtrů, které byly předmětem analýzy. V případě potřeby byla přidána nebo odebrána nějaká testovaná hodnota napětí na fragmentoru nebo kolizní energie. U IS diazepamu- $d_5$  byl převzat hmotnostní přechod již optimalizovaný RNDr. Tomášem Hložkem, Ph.D. a byl sledován pouze kvantifikační produktový ion. Podmínky detekce diazepamu- $d_5$  byly následující: prekuzor  $m/z$  291,1, napětí na fragmentoru 116 V, produkt  $m/z$  199,1, kolizní energie 43 V. Pro přehlednost jsou všechny optimální prekuzorové ionty, produktové ionty, hodnoty napětí na fragmentoru a kolizní energie pro všech 13 UV filtrů uvedeny v tabulce 9.

Prekuzorový ion obvykle odpovídá protonované molekule analytu  $[M + H^+]$ , výjimku tvoří BP-5, kde došlo ke ztrátě  $Na^+$  a k protonaci.



Tabulka 9: Optimalizované podmínky MS/MS detekce 13 sledovaných organických UV filtrů.  
Q označuje kvantifikátor, q kvalifikátor

Analyt	Prekurzorový ion [ $m/z$ ]	Napětí na fragmentoru [V]	Produktový ion Q [ $m/z$ ]	Kolizní energie Q [V]	Produktový ion q [ $m/z$ ]	Kolizní energie q [V]
BP	183,0	135	105,0	10	77,0	30
BP-1	214,9	125	136,9	15	81,0	40
BP-2	246,9	125	136,9	40	81,0	15
BP-3	229,0	145	150,9	15	77,0	40
BP-5	308,9	115	230,8	20	134,8	30
BP-8	245,0	115	120,9	10	150,9	20
BP-12	327,1	115	215,0	20	137,0	30
MOBP	283,0	135	205,0	10	104,9	10
BDM	311,0	95	161,0	20	135,0	20
HMS	263,0	95	138,9	5	120,9	15
IMC	249,0	115	161,0	10	133,0	20
MBC	255,0	105	171,0	10	157,0	10
OCT	362,1	115	250,1	5	232,0	20

#### 4.6 Výběr chromatografického systému pro analýzu UV filtrů

Cílem prvotních experimentů bylo nalézt vhodné chromatografické podmínky pro separaci 13 sledovaných UV filtrů. Volba MF i SF vycházela zejména z odborné literatury citované v kapitole 2.5.2. Byla zvolena kolona Kinetex EVO C18 (100 × 3 mm, 2,6 μm) s technologií core-shell, kde částice mají nepropustné jádro a porézní povrch, technologie core-shell umožňuje vyšší účinnost separace díky rychlejšímu přenosu hmoty do pórů SF<sup>88</sup>. Separace probíhala na oktadecylové stacionární fázi obsahující ethylenové můstky, které zajišťují vysokou chemickou stabilitu kolony. Teplota kolony byla během všech experimentů termostatem udržována na 25 °C, teplota autosampleru byla nastavena na 20 °C. Dávkováno bylo vždy 10 μl vzorku.

Pro separaci byly nejprve vyzkoušeny různé mobilní fáze s využitím izokratické eluce. Jako vodná složka A byla vyzkoušena deionizovaná voda s 0,1 obj. % mravenčí kyseliny nebo s 0,1 obj. % octové kyseliny a vodný roztok mravenčanu amonného ( $c = 10 \text{ mmol/l}$ ) o pH 3,5. Jako organický modifikátor B byl využit methanol bez úpravy nebo s 0,1 obj. % mravenčí kyseliny. Nejintenzivnější signály a nejlepší tvary píků poskytovala analýza s MF složenou z deionizované vody s 0,1 obj. % mravenčí kyseliny (A) a methanolem s 0,1 obj. % mravenčí kyseliny (B). Průtok MF byl  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ .

Při objemovém poměru obou výsledných složek MF A:B 20:80 byl retenční čas nejvíce zadržovaného analytu BP-12 18,8 min. a nejméně zadržovaný analyt BP-2 byl eluován s mrtvým časem kolony při 0,9 min. Při použití izokratické eluce docházelo k překryvu elučních křivek 9 analytů během prvních 4 minut separace. Izokratickou elucí nebylo možné dosáhnout vyhovující separace analytů v čase do 20 minut, proto byla následně navržena gradientová eluce.

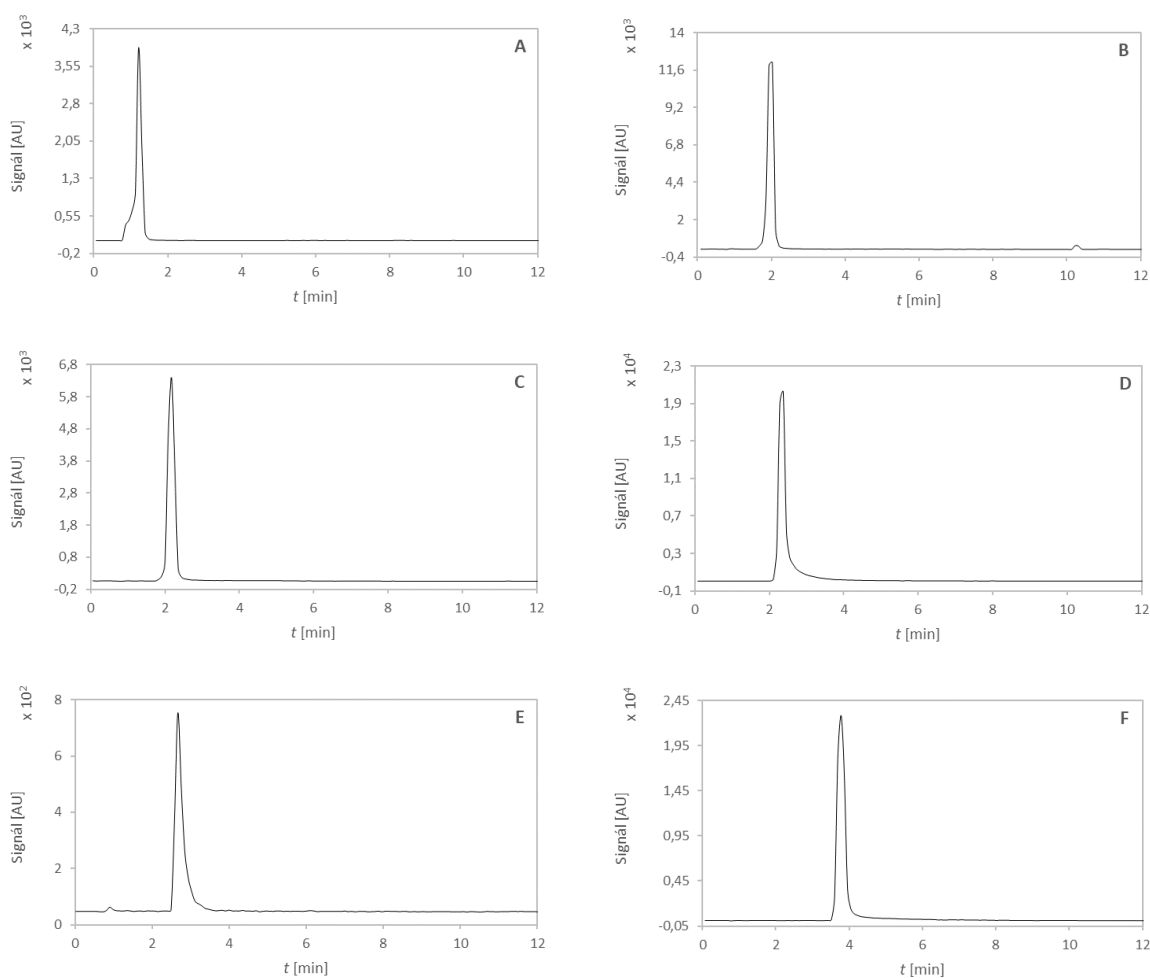
#### 4.6.1 Navržení gradientové eluce pro analýzu 13 UV filtrů

Cílem gradientové eluce bylo dosáhnout přijatelné retence BP-2 a přijatelné separace všech 13 analytů v co nejkratším čase a optimalizovat tvary elučních křivek analytů. Výhodou režimu MRM je možnost sledovat více hmotnostních přechodů ve stejném čase, proto částečný překryv některých analytů nepředstavoval problém, nicméně překryv příliš velkého počtu analytů by mohl omezit citlivost detekce.

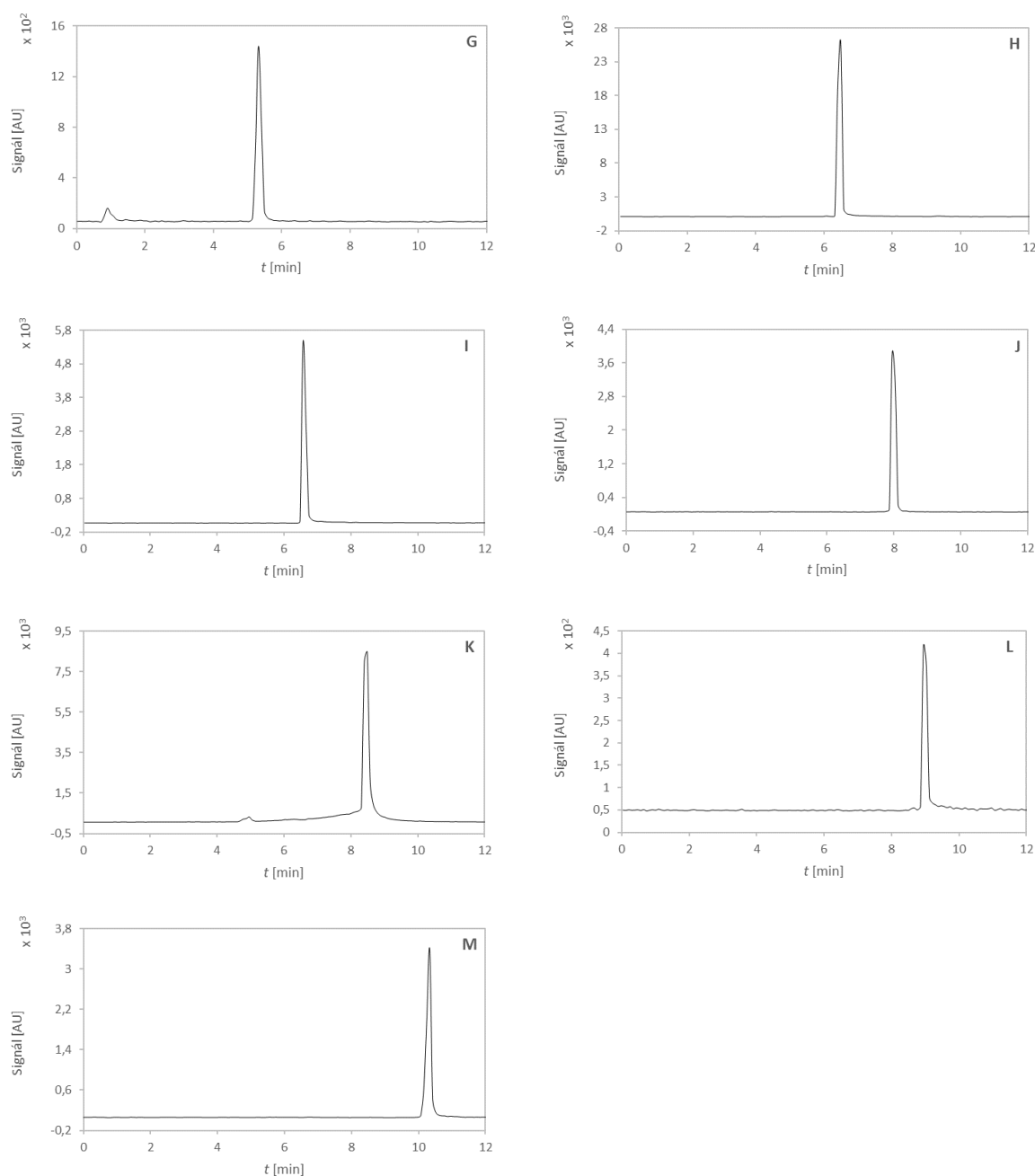
Během programu gradientové eluce byl postupně zvyšován obsah methanolu (složka B) v mobilní fázi a s ním i eluční síla mobilní fáze, následně byla provedena ekvilibrace na počáteční podmínky. Testováno bylo celkem 14 programů gradientové eluce, průtok mobilní fáze byl ve všech případech  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ . Jako nejvhodnější byl zvolen gradient N, jehož průběh je uveden v tabulce 10. Retenční čas BP-12 činil 10,3 min. a retenční čas BP-2 byl 1,2 min. Chromatogramy analýzy roztoku standardů 13 UV filtrů o koncentraci  $1\ 000 \text{ ng ml}^{-1}$  v methanolu pomocí gradientu N jsou uvedeny v grafu 4.

Tabulka 10: Průběh gradientové eluce N analýzy 13 organických UV filtrů. Složení mobilní fáze je uvedeno v obj. %

Gradient N		
t [min]	složení MF [%]	
	A	B
0	30	70
3	30	70
4	20	80
7	10	90
10	10	90
13	30	70
17	30	70



Graf 4: MRM chromatogramy BP-2 (A), BP-1 (B), BP-8 (C), BP (D), BP-5 (E) a BP-3 (F) získané analýzou směšného roztoku standardů 13 UV filtrů o koncentraci 1 000 ng ml<sup>-1</sup> v methanolu



Graf 4: MRM chromatogramy MOBP (**G**), IMC (**H**), MBC (**I**), OCT (**J**), BDM (**K**), HMS (**L**) a BP-12 (**M**) získané analýzou směšného roztoku standardů 13 UV filtrů o koncentraci 1 000 ng ml<sup>-1</sup> v methanolu

Směs 13 organických UV filtrů byla následně připravena v deionizované vodě (příprava je popsána v kapitole 3.3.3), aby bylo možné sestavit kalibrační závislost. Byly připraveny roztoky o koncentraci 10, 100 a 1 000 ng ml<sup>-1</sup>. Nicméně v roztocích se tvořil bílý zákal a bylo zjištěno, že ve vodné směsi 13 analytů není dosaženo úplného rozpuštění všech analytů,

což znemožňuje kvantifikaci. Při analýze roztoku o koncentraci  $1\ 000\ \text{ng ml}^{-1}$  v methanolu a ve vodě byly ve vodě naměřeny až 10krát nižší plochy píků některých analytů.

Jelikož cílem diplomové práce bylo stanovení organických UV filtrů ve vodě a sledování extrakce z vodných matric, bylo nutné kalibraci připravit v roztocích obsahujících většinu vody. To u směsi 13 UV filtrů nebylo možné, proto bylo rozhodnuto snížit počet kvantifikovaných analytů.

Byly připraveny různé kombinace směsí UV filtrů v deionizované vodě o koncentraci 100 a  $1\ 000\ \text{ng ml}^{-1}$ , a posléze byly vyřazeny ty se vznikajícím zákalem. Potenciálně vyhovující směsi byly analyzovány. Z původní směsi 13 analytů byly vyřazeny analyty nejméně rozpustné ve vodě, a to BP-12, OCT, MBC, BDM, IMC. Dále byly vyřazeny analyty poskytující ve zvoleném chromatografickém systému velmi nízkou odezvu oproti ostatním analytům a mající nevyhovující tvar píku – HMS a BP-5. Směs UV filtrů v deionizované vodě určená ke kvantifikaci tedy obsahovala 6 zbývajících analytů: BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-8 a MOBP, všechny z nich obsahují ve své struktuře benzofenon.

#### 4.6.2 Navržení gradientové eluce pro analýzu 6 UV filtrů

Pro skupinu 6 vybraných benzofenonů byly navrženy dva programy gradientové eluce A a B, které jsou uvedeny v tabulce 11. Průtok mobilní fáze byl v obou případech  $0,5\ \text{ml min}^{-1}$ . Při optimalizaci gradientu byly nejprve provedeny analýzy roztoků standardů 6 UV filtrů o koncentraci  $1\ 000\ \text{ng ml}^{-1}$  v methanolu a ve směsi methanol:deionizovaná voda v poměru 1:2 (v/v) pomocí gradientu A. Roztok s vodou obsahoval 33 % methanolu z důvodu lepší rozpustnosti analytů.

Gradient A se při experimentech s deionizovanou vodou jevil jako vyhovující, nicméně když byla deionizovaná voda nahrazena reálnými vzorky vody z životního prostředí (říční voda, stojatá voda), na počátku analýzy eluovaly nečistoty, které by mohly ovlivňovat stanovení BP-2, který měl retenční čas 1,2 min. Z toho důvodu byl navržen gradient B, kde retenční čas BP-2 činil 2,9 min. Gradient B byl použit ke všem pozdějším experimentům. Chromatogramy analýzy roztoku standardů 6 UV filtrů o koncentraci  $50\ \text{ng ml}^{-1}$  ve směsi methanol:deionizovaná voda v poměru 1:2 (v/v) za využití gradientu B jsou uvedeny v grafu 5 (kapitola 4.7.2).

Tabulka 11: Průběh gradientové eluce A a B pro analýzu 6 organických UV filtrů. Složení mobilní fáze je uvedeno v obj. %

Gradient A			Gradient B		
<i>t</i> [min]	složení MF [%]		<i>t</i> [min]	složení MF [%]	
	A	B		A	B
0	30	70	0	50	50
5	20	80	5	20	80
6	30	70	7	50	50
10	30	70	10	50	50

## 4.7 Stanovení obsahu 6 vybraných UV filtrů

### 4.7.1 Problém carry-overu UV filtrů

Během experimentů zaměřených na výběr chromatografického systému byly analyzovány vzorky o vysoké koncentraci UV filtrů  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ , což způsobilo carry-over u BP, BP-1 a BP-3. Carry-over se projevoval přítomností elučnicích křivek BP, BP-1 a BP-3 ve slepých vzorcích a v poskytování falešně vyšších výsledků naměřených koncentrací těchto analytů při následných analýzách.

Byla provedena stejná opatření jako při řešení carry-overu TPT – bylo využíváno vnějšího oplachu dávkovací jehly autosampleru před každou analýzou, autosampler byl pravidelně promýván dávkováním čistých rozpouštědel methanolu, acetonitrilu a isopropanolu, a carry-over byl kontrolován měřením slepých vzorků mezi analýzami. Kolona byla také několikrát promyta a převedena do skladovacího roztoku acetonitril:deionizovaná voda 65:35 (v/v). Problém carry-overu byl tímto způsobem postupně minimalizován na zanedbatelnou úroveň, příležitostně se ale znovu objevil při analýze vzorku o vysoké koncentraci těchto analytů.

### 4.7.2 Kalibrace UV filtrů

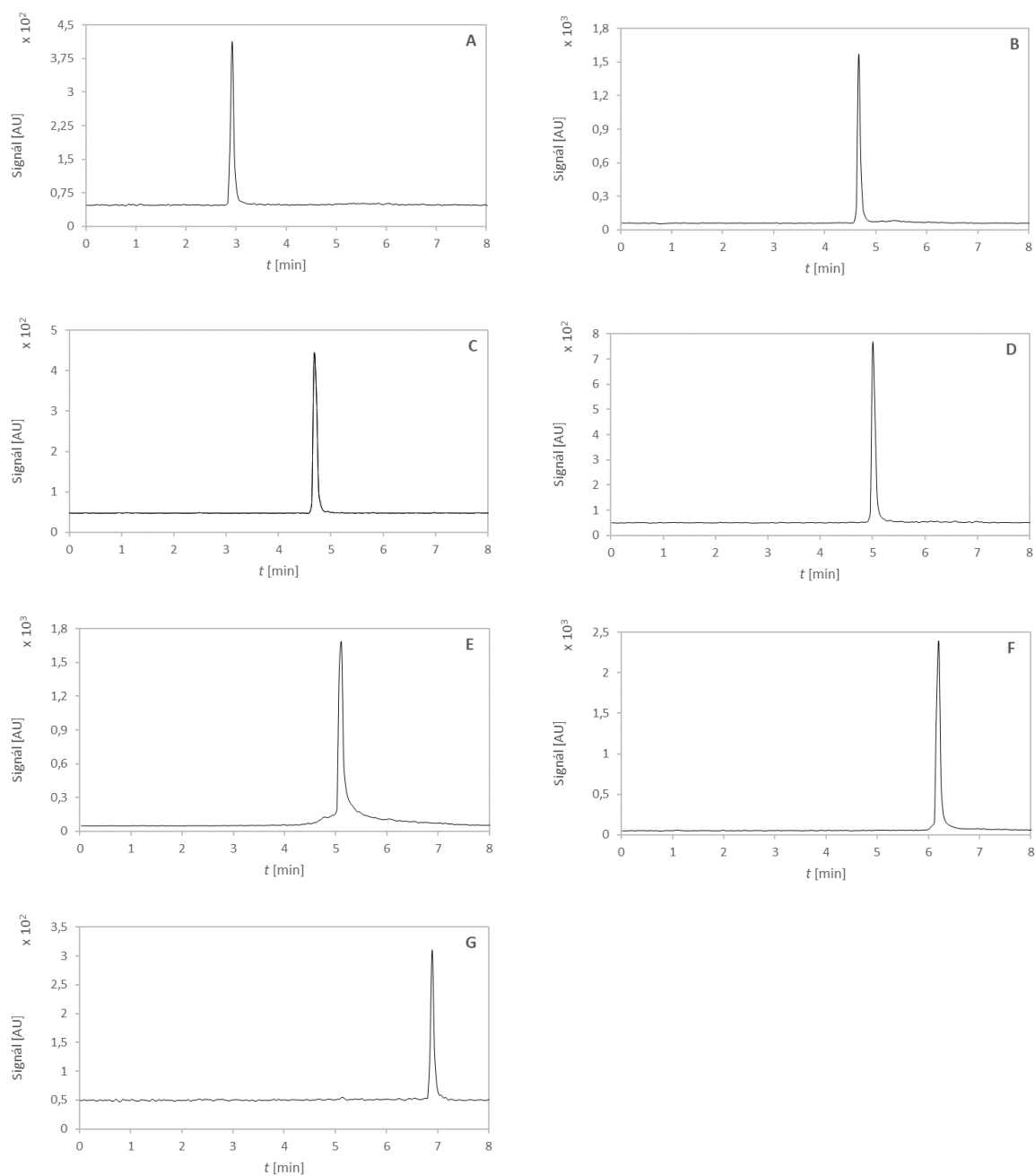
Jelikož směs všech 13 UV filtrů ve vodě vykazovala problémy s rozpustností, byla nakonec provedena kvantifikace pouze u skupiny 6 benzofenonů. Příprava roztoků pro kalibraci je popsána v kapitole 3.3.4. Volba interního standardu byla ovlivněna jeho dostupností na trhu. Jako interní standard připadal v úvahu např. BP-d<sub>10</sub>, BP-1-d<sub>5</sub> nebo BP-3-d<sub>5</sub>, nicméně všechny z nich byly obtížně dostupné. V odborné literatuře jsou

HPLC-MS/MS analýzy UV filtrů často prováděny bez IS, v takovém případě ovšem nelze vyloučit náhodné chyby ionizace, způsobující nepřesné výsledky kvantifikace. Jako IS standard byl nakonec zvolen diazepam-d<sub>5</sub>. Ačkoliv má odlišnou strukturu než sledované analyty, má velmi podobnou hodnotu  $\log K_{ow}$  a podobný retenční čas jako BP-1.

Všechny analýzy byly provedeny pomocí gradientu B popsaného v tabulce 11. Získané regresní rovnice kalibračních závislostí spolu s koeficientem determinace, LOD, LOQ a lineárním dynamickým rozsahem jsou uvedeny v tabulce 12. Hodnoty LOD a LOQ byly vypočítané pomocí rovnic (1) a (2). Retenční čas IS činil 4,7 min. Chromatogramy analýzy roztoku standardů 6 UV filtrů o koncentraci 50 ng ml<sup>-1</sup> ve směsi methanol:deionizovaná voda v poměru 1:2 (v/v), použitého k měření kalibrace, jsou uvedeny v grafu 5.

Tabulka 12: Retenční čas, regresní rovnice kalibrace, koeficient determinace ( $R^2$ ), LOD, LOQ a lineární dynamický rozsah pro 6 vybraných UV filtrů

Analyt	$t_r$ [min]	Regresní rovnice kalibrace	$R^2$	LOD [ng ml <sup>-1</sup> ]	LOQ [ng ml <sup>-1</sup> ]	Lineární dynamický rozsah [ng ml <sup>-1</sup> ]
BP	5,1	$y = 0,118 x + 0,098$	0,9997	1,5	5,0	5–500
BP-1	4,7	$y = 0,045 x + 0,079$	0,9997	0,9	2,9	5–500
BP-2	2,9	$y = 0,018 x + 0,003$	0,9997	0,9	2,9	5–500
BP-3	6,2	$y = 0,117 x - 0,026$	0,9963	0,2	0,7	1–1000
BP-8	5,0	$y = 0,028 x + 0,065$	0,9996	0,4	1,3	1–1000
MOBP	6,9	$y = 0,014 x - 0,041$	0,9984	0,8	2,6	5–1000



Graf 5: MRM chromatogramy BP-2 (A), BP-1 (B), IS diazepamu-d<sub>5</sub> (C), BP-8 (D), BP (E), BP-3 (F) a MOBP (G) získané analýzou směšného roztoku standardů o koncentraci 50 ng ml<sup>-1</sup> ve směsi methanol:deionizovaná voda v poměru 1:2 (v/v)



## 4.8 Testování vzorků vody na přítomnost 6 vybraných UV filtrů

Metoda HPLC-MS/MS vyvinutá v této diplomové práci nebyla určena ke stanovení stopových množství UV filtrů ve vzorcích vody, pro takový účel by bylo nutné využít prekoncentraci vzorku např. pomocí metod extrakce, uvedených v kapitole 2.5.1. Přesto byla u každého vzorku vody (říční voda Vltava, stojatá voda Albertov a voda z koupaliště Petynka) bez jakékoliv předúpravy provedena analýza vyvinutou HPLC-MS/MS metodou.

Ve vzorcích vody z Vltavy a Albertova nebyl nalezen žádný z 6 kvantifikovaných analytů. Ve vzorku vody z koupaliště Petynka byl nalezen benzofenon, nicméně v množství pod mezí kvantifikace.

## 4.9 Extrakce 6 UV filtrů z vodných matric

### 4.9.1 Zvolená extrakční činidla

Základním předpokladem pro výběr extrakčního činidla pro LLE byla jeho nemísitelnost s vodou, proto byly zvoleny hydrofobní DESy. Dále byla pro jednoduchost provedení zvolena extrakční činidla kapalná při laboratorní teplotě. Ve snaze nalézt co nejvhodnější extrakční činidlo pro studovanou směs 6 UV filtrů byly testovány různé kombinace složek DESů uvedených v tabulce 3 v různých molárních poměrech.

Změna složek DESu a změna molárního poměru donoru a akceptoru vodíkové vazby mění fyzikální vlastnosti DESu – je možné tak ovlivnit hydrofobicitu, viskozitu a bod tání, a tím také teplotu, při které lze použít DES jako rozpouštědlo. Z tohoto důvodu nemohly být některé DESy připraveny v molárním poměru 1:1, jelikož byla pozorována krystalizace po vychlazení směsi na laboratorní teplotu. Postup přípravy zvolených DESů a postup extrakce je uveden v kapitole 3.4.

Hodnoty  $\log K_{ow}$  jednotlivých kombinací DESů nejsou tabelovány a nebyly experimentálně stanoveny v rámci této diplomové práce, hydrofobicita připravených DESů tedy byla pouze odhadována na základě hydrofobicity jednotlivých složek.

#### 4.9.2 Extrakční účinnost DESů v experimentech s deionizovanou vodou

Experimenty pro určení extrakční účinnosti DESů byly provedeny ve vzorcích deionizované vody o objemu 500  $\mu\text{l}$  s přidanými standardy 6 sledovaných UV filtrů (BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-8 a MOBP) o koncentraci všech analytů 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Ke vzorku vody bylo přidáno příslušné extrakční činidlo o objemu 500  $\mu\text{l}$ .

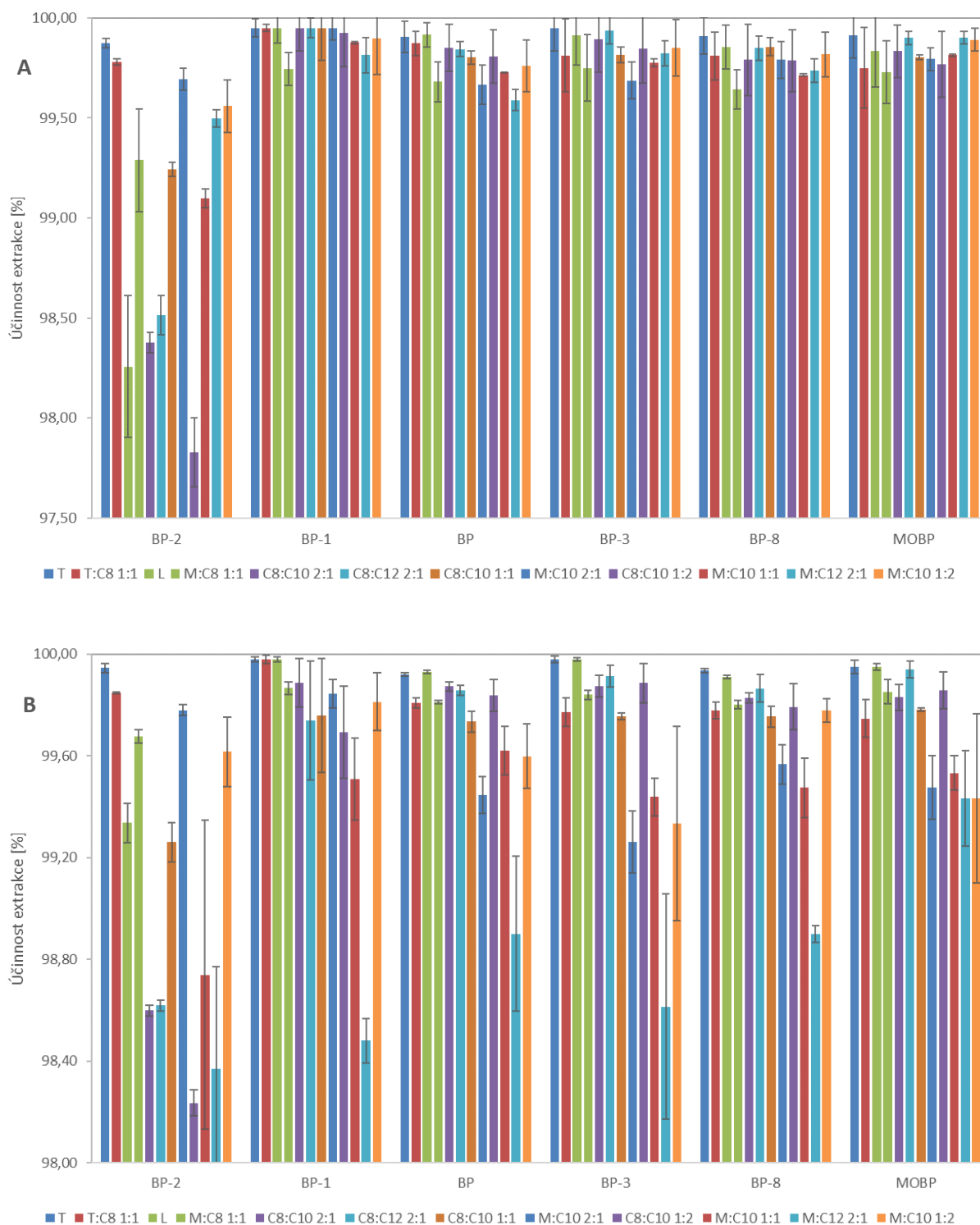
Ve vzorcích o počáteční koncentraci 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  byly u analytů BP-1, BP-3, BP-8 a MOBP po extrakci většinou DESů naměřené zbytkové koncentrace pod limitem jejich kvantifikace, což znamená, že extrakční účinnost byla vyšší než 99,9 % v případě BP-3 a BP-8 a vyšší než 99,8 % v případě BP-1 a MOBP.

Ve vzorcích o počáteční koncentraci 10 a 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  byla prokázána vynikající účinnost extrakce  $\geq 97,8$  % pro všechny testované analyty a DESy. Analyt s celkově nejnižší účinností extrakce napříč všemi extrakčními činidly byl BP-2, což byl nejméně hydrofobní analyt. Z testovaných extrakčních činidel měla nejnižší účinnost napříč všemi analyty směs M:C12 2:1. Naopak celkově nejvyšší účinnost extrakce byla sledována u analytu MOBP a BP-1, z extrakčních činidel u terpineolu, z DESů pak u T:C8 1:1 a M:C8 1:1. Výsledné extrakční účinnosti jsou znázorněny v grafu 6.

U extrakce pomocí M:C12 2:1 při počáteční koncentraci analytů 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  byl pozorován zákal ve vodné fázi po extrakci, což je pravděpodobně příčinou nižších pozorovaných extrakčních účinností u všech analytů v porovnání s počáteční koncentrací 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Problémem u extrakčních činidel obsahujících terpineol a linalool byla přítomnost šumu na pozadí chromatogramů v okolí mrtvého času kolony. Terpineol a linalool měly ze všech extrakčních činidel nejnižší hodnotu  $\log K_{ow}$ , mohlo tedy dojít v malé míře k jejich rozpuštění ve vodné fázi a způsobit tak pozorovaný šum.

Celkově vysoká účinnost extrakce je dána především hydrofobicitou benzofenonů, kterou definuje hodnota  $\log K_{ow}$  pohybující se u stanovovaných analytů v rozmezí 2,78–4,20 (viz tabulka 1), což značí vysokou afinitu analytů k hydrofobní DES fázi. Mezi nejefektivnější extrakční činidla, která byla podrobena dalším experimentům, patřil terpineol a M:C8 1:1.



Graf 6: Srovnání extrakčních účinností 10 DESů (T:C8 1:1, M:C8 1:1, C8:C10 2:1, C8:C12 2:1, C8:C10 1:1, M:C10 2:1, C8:C10 1:2, M:C10 1:1, M:C12 2:1, M:C10 1:2) a 2 terpenů (T a L) pro jednotlivé analyty (BP-2, BP-1, BP, BP-3, BP-8, MOBP) při počáteční koncentraci všech analytů ve vzorku deionizované vody  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  (A) a  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  (B), DESy i analyty jsou seřazeny od nejméně hydrofobních (vlevo) po nejvíce hydrofobní (vpravo)

### 4.9.3 Vlivy na extrakci T a M:C8 (1:1) v experimentech s deionizovanou vodou

Byly testovány různé parametry, které mohou ovlivňovat účinnost extrakce. Mezi ně patřil poměr voda:extrakční činidlo, testovány byly poměry 500:50, 500:250 a 500:500 (v/v), dále rychlost třepání 300, 1500 a 3500 rpm a doba třepání 5, 15 a 20 minut. Experimenty byly provedeny s 500 $\mu$ l vzorky deionizované vody s přidanými standardy 6 UV filtrů o koncentraci 20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>.

Během experimentů byl pozorován pokles extrakční účinnosti se snížením objemu extrakčního činidla. U terpineolu byla při poměru voda:extrakční činidlo 500:50 pozorována účinnost extrakce o 1–2 % nižší než při poměru 500:500, stejný pokles byl pozorován i u extrakčního činidla M:C8 1:1 s výjimkou BP-2, kde byl tento pokles ještě výraznější a zbytková koncentrace BP-2 se nacházela nad lineárním dynamickým rozsahem kalibrace. Tyto poznatky naznačují, že kapacita 50  $\mu$ l extrakčního činidla byla mírně překročena. Při poměru voda:extrakční činidlo 500:250 byl pozorován pokles účinnost extrakce do 1 % oproti poměru 500:500 u obou extrakčních činidel, opět s výjimkou BP-2 při extrakci M:C8 1:1, kde byl pokles 2 %. Pro dosažení maximální extrakční účinnosti je výhodné využít poměru voda:extrakční činidlo 500:500.

Snížení rychlosti třepání z 1 500 rpm na 300 rpm u experimentů s terpineolem způsobilo snížení extrakční účinnosti o 0,2–1,5 %, u experimentů s M:C8 1:1 došlo k ještě výraznějšímu snížení mimo rozsah kalibrace, tedy u některých analytů o více než 7 %. Zvýšení rychlosti třepání z 1 500 rpm na 3 500 rpm nepřineslo u extrakcí pomocí terpineolu ani M:C8 1:1 zvýšení extrakční účinnosti, výsledné extrakční účinnosti byly srovnatelné s těmi získanými při rychlosti třepání 1 500 rpm. Rychlost třepání 1 500 rpm lze tedy považovat za dostatečnou.

Experimenty zaměřené na dobu třepání byly provedeny při poměru voda:extrakční činidlo 500:50, aby bylo možné trend pozorovat výrazněji. U experimentů s terpineolem snížení doby třepání z 15 minut na 5 minut způsobilo pokles extrakční účinnosti o 1,5–4 %, u experimentů s M:C8 1:1 byl u všech analytů pozorován mírnější pokles o 0,4–1,5 % kromě BP-2, jehož zbytková koncentrace se nacházela nad lineárním dynamickým rozsahem kalibrace. Zvýšení doby třepání z 15 minut na 20 minut u extrakcí pomocí terpineolu a M:C8 1:1 poskytlo srovnatelné extrakční účinnosti jako při 15 minutách, dobu třepání 15 minut lze tedy považovat za dostatečnou.

#### 4.9.4 Extrakční účinnost T a M:C8 (1:1) v experimentech s reálnými vzorky vody

Dvě zvolená nejefektivnější extrakční činidla terpineol a směs M:C8 1:1 byla použita k extrakci UV filtrů z reálných vzorků vody obsahujících různé polutanty. Experimenty byly provedeny s 500 $\mu$ l vzorky stojaté vody Albertov, vody z koupaliště Petynka a říční vody Vltava s přidanými standardy 6 UV filtrů o koncentraci 10 a 20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. Účinnosti extrakce pro jednotlivé analyty společně se směrodatnou odchylkou měření jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13: Průměrné účinnosti extrakce 6 UV filtrů (BP-2, BP-1, BP, BP-3, BP-8, MOBP) pomocí T a M:C8 1:1 při počáteční koncentraci všech analytů ve vzorku vody Albertov, Petynka nebo Vltava 20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. Výsledky jsou uvedené se směrodatnou odchylkou ( $n = 4$ )

Analyt	Účinnost extrakce [%]					
	Albertov		Petynka		Vltava	
	M:C8 1:1	T	M:C8 1:1	T	M:C8 1:1	T
BP	99,70 $\pm$ 0,12	99,76 $\pm$ 0,00	99,81 $\pm$ 0,04	99,84 $\pm$ 0,02	99,60 $\pm$ 0,15	99,64 $\pm$ 0,19
BP-1	99,42 $\pm$ 0,22	99,49 $\pm$ 0,21	99,53 $\pm$ 0,08	99,93 $\pm$ 0,01	99,19 $\pm$ 0,04	99,28 $\pm$ 0,26
BP-2	97,98 $\pm$ 0,28	99,49 $\pm$ 0,02	94,14* $\pm$ 1,25	99,92 $\pm$ 0,01	96,77 $\pm$ 0,13	99,65 $\pm$ 0,13
BP-3	99,75 $\pm$ 0,14	99,89 $\pm$ 0,01	99,93 $\pm$ 0,00	99,93 $\pm$ 0,02	99,39 $\pm$ 0,13	99,64 $\pm$ 0,11
BP-8	99,60 $\pm$ 0,18	99,70 $\pm$ 0,01	99,76 $\pm$ 0,05	99,86 $\pm$ 0,03	99,36 $\pm$ 0,06	99,52 $\pm$ 0,14
MOBP	99,87 $\pm$ 0,08	99,95 $\pm$ 0,01	99,95 $\pm$ 0,01	99,94 $\pm$ 0,02	99,69 $\pm$ 0,05	99,88 $\pm$ 0,05

\*odhadovaná hodnota, nad lineárním dynamickým rozsahem kalibrace

U experimentů s reálnými vzorky byly dle očekávání pozorovány nižší hodnoty extrakčních účinností než u experimentů s deionizovanou vodou. To lze vysvětlit přítomností organických polutantů snižujících kapacitu extrakčního činidla pro UV filtry. Nejvíce ovlivněným analytem byl BP-2, u ostatních analytů bylo snížení extrakční účinnosti nevýznamné. Nejmenší pokles účinnosti extrakce oproti deionizované vodě poskytovala voda Petynka, kde s výjimkou BP-2 byla účinnost extrakce srovnatelná s účinností u deionizované vody. Lze tedy předpokládat, že voda v koupališti byla očištěna od většiny organických látek.

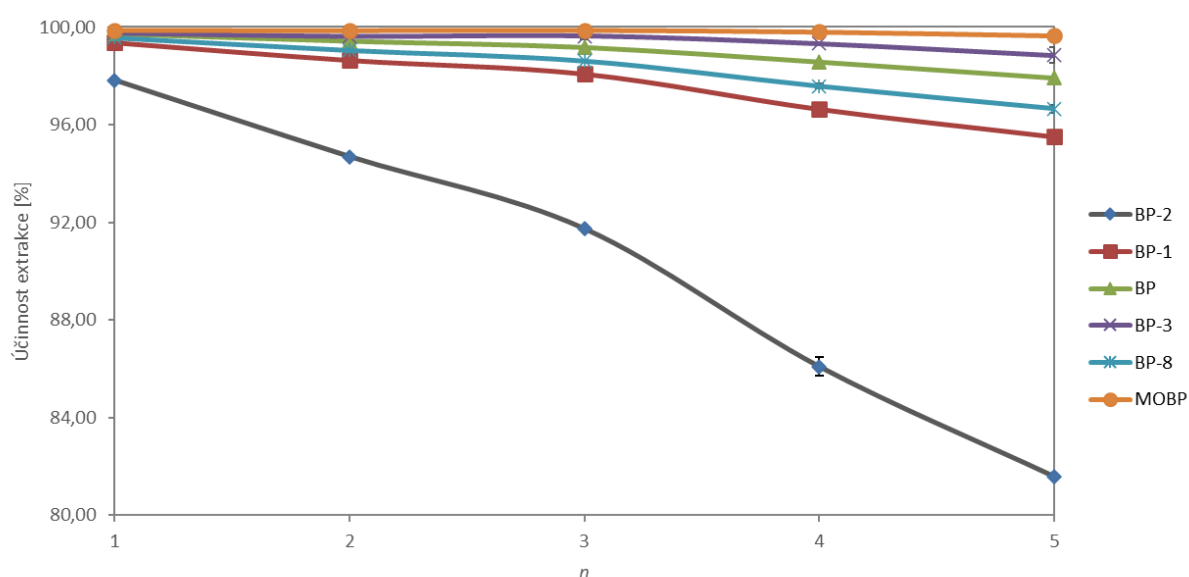
Z výsledků v tabulce 13 je patrné, že extrakční účinnost terpineolu pro sledované analyty je vyšší než extrakční účinnost M:C8 1:1, nicméně jak již bylo zmíněno v kapitole 4.9.2, nevýhodou terpineolu jako extrakčního činidla je zvýšený šum pozadí chromatogramů v okolí

mrtvého času kolony. Největší pozorovaný rozdíl se týkal analytu BP-2, u ostatních analytů byl zpravidla rozdíl mezi oběma extrakčními činidly nevýznamný. Z toho důvodu byla jako optimální extrakční činidlo zvolena směs M:C8 1:1, u níž bylo dále testováno opakované použití.

#### 4.9.5 Opakované použití M:C8 (1:1) k extrakci UV filtrů

Opakované použití extrakčních činidel umožňuje snížit jejich spotřebu a snížit tak náklady na extrakci a vznikající odpad. Byla testována možnost opakovaně využít 500  $\mu\text{l}$  směsi M:C8 1:1 k extrakci 6 vybraných UV filtrů z vody. Experiment byl proveden s 500  $\mu\text{l}$  vzorky deionizované vody a vody Albertov s přidanými standardy 6 UV filtrů o koncentraci 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Po provedení extrakce byla DES fáze odebrána a znovu použita k extrakci dalšího vzorku vody s UV filtry. Tímto způsobem bylo provedeno 5 extrakčních cyklů, výsledné extrakční účinnosti pro jednotlivé analyty při extrakci UV filtrů z vody Albertov jsou znázorněny v grafu 7.

Od druhého extrakčního cyklu došlo u BP-2 k naměření velmi vysokých zbytkových koncentrací po extrakci, které se nacházely nad lineárním dynamickým rozsahem kalibrace. Hodnoty účinností extrakce pro BP-2 uvedené v grafu 7 jsou proto pouze odhadované.



Graf 7: Účinnosti extrakce 6 sledovaných UV filtrů (BP-2, BP-1, BP, BP-3, BP-8, MOBP) pomocí DESu M:C8 1:1 při počáteční koncentraci všech analytů ve vzorku vody Albertov 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , při 5 opakovaných použitích téhož extrakčního činidla,  $n = 2$

V grafu 7 můžeme vidět, že u každého analytu dochází k různě výraznému poklesu extrakční účinnosti při opakovaném použití extrakčního činidla M:C8 1:1. Nejvýraznější pokles extrakční účinnosti byl pozorován u BP-2, což je nejméně hydrofobní analyt, u kterého také byla zaznamenána celkově nejnižší účinnost extrakce napříč všemi extrakčními činidly. U 5 zbývajících analytů byl pokles extrakční účinnosti pozvolný, i po 5 extrakčních cyklech bylo stále dosaženo extrakční účinnosti vyšší než 95 %.

Stejný trend byl pozorován také u experimentu s deionizovanou vodou, ale extrakční účinnosti zde byly celkově u všech analytů mírně vyšší, jelikož voda neobsahovala jiné organické polutanty snižující kapacitu extrakčního činidla.

## 5 Závěr

V první části této diplomové práce byla vyvinuta citlivá metoda UHPLC-MS/MS s gradientovou elucí ke stanovení farmakologicky aktivní laktonové a neaktivní karboxylátové formy topotekanu ve vodných pufrch. Kalibrace byla provedena zvlášť v kyselém prostředí vzorku (pH = 3) pro topotekan lakton a v zásaditém prostředí (pH = 10) pro karboxylát. Funkčnost kalibrace byla ověřena analýzou řady roztoků topotekanu připravených v pufru octanu amonného o pH 7,4. Limit detekce topotekanu laktonu byl  $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$  a karboxylátu  $0,3 \text{ ng ml}^{-1}$ .

Na základě experimentů sledujících změnu v poměru laktonové a karboxylátové formy topotekanu v závislosti na pH bylo zjištěno, že hmotnostní zlomek karboxylátové formy roste se vzrůstajícím pH vzorku, pH mobilní fáze a se vzrůstajícím časem od přípravy vzorku. Při pH vzorku 4,5 a mobilní fáze 7,4 byla po dvou hodinách od přípravy laktonová forma zastoupena z 96,7 hm. %. Při pH vzorku 10 a mobilní fáze 7,4 byla po dvou hodinách od přípravy karboxylátová forma zastoupena z 91,5 hm. %. Přejít mezi oběma formami je možné zpomalit přidáním methanolu, který má stabilizační funkci.

Ve druhé části této diplomové práce byla snaha vyvinout metodu HPLC-MS/MS s gradientovou elucí k simultánnímu stanovení 13 organických UV filtrů ve vodě, které jsou považovány za polutanty životního prostředí. Tato směs ovšem vykazovala problémy s rozpustností ve vodě, proto byla metoda HPLC-MS/MS optimalizována ke stanovení pouze 6 benzofenonových UV filtrů (BP, BP-1, BP-2, BP-3, BP-8, MOBP). Bylo dosaženo limitů detekce  $0,2\text{--}1,5 \text{ ng ml}^{-1}$ .

Bylo připraveno celkem 10 hydrofobních hluboce eutektických rozpouštědel, které byly společně s terpineolem a linaloleem použity k extrakci 6 UV filtrů z vodných matric. Vyvinutá HPLC-MS/MS metoda byla použita k analýze zbytkového obsahu UV filtrů ve vodné matrici po extrakci. Nejefektivnějším z testovaných extrakčních činidel byl terpineol, který poskytl extrakční účinnosti ze vzorků deionizované vody vyšší než 99,9 %, ale způsoboval také výrazný šum základní linie chromatogramu. Z toho důvodu byl jako nejvhodnější extrakční činidlo zvolen DES o složení menthol:kaprylová kyselina (M:C8) v molárním poměru 1:1, který extrahoval všechny sledované analyty s účinností vyšší než 99,6 % a nezpůsobil problém šumu.



Byly optimalizovány parametry ovlivňující účinnost extrakce – poměr voda:extrakční činidlo, rychlost a doba třepání. Terpeneol a směs M:C8 1:1 byly použity k extrakci UV filtrů přidaných do vzorků říční vody Vltava, stojaté vody Albertov a vody z koupaliště Petynka. Nejnižší účinnost extrakce byla pozorována u analytu BP-2, což byl nejméně hydrofobní analyt. Ve vzorku říční vody Vltava účinnost extrakce BP-2 pomocí M:C8 1:1 odpovídala  $96,77 \pm 0,13$  %, u vzorku vody z koupaliště Petynka byla naměřená zbytková koncentrace po extrakci nad lineárním dynamickým rozsahem kalibrace. Zbývajících 5 analytů bylo ze všech zmíněných vzorků vody extrahováno terpeneolem i M:C8 1:1 s vynikající účinností vyšší než 99,1 %. Byla testována také možnost opakovaně využít směs M:C8 1:1 k extrakci 6 vybraných UV filtrů z vody, kromě BP-2 bylo po 5 extrakčních cyklech u všech analytů stále dosaženo extrakční účinnosti vyšší než 95 %.

## Použitá literatura

1. Ferlay, J. *et al.* Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Citováno 2.3.2023. Dostupné z <https://gco.iarc.fr/today> (2020).
2. Alshammari, M. K. *et al.* Nanoplatfrom for the delivery of topotecan in the cancer milieu: An appraisal of its therapeutic efficacy. *Cancers (Basel)*. **15** (2023).
3. Naguib, Y. W. & Cui, Z. Nanomedicine: The promise and challenges in cancer chemotherapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* (2014).
4. Cocarta, A. I. *et al.* Hydrogel implants for transscleral drug delivery for retinoblastoma treatment. *Mater. Sci. Eng. C* **103**, 109799 (2019).
5. Ramos, S., Homem, V., Alves, A. & Santos, L. Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment - A review. *Sci. Total Environ.* **526**, 278–311 (2015).
6. Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M. S. & Barceló, D. An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 2597–2610 (2012).
7. Huang, Y., Law, J. C. F., Lam, T. K. & Leung, K. S. Y. Risks of organic UV filters: a review of environmental and human health concern studies. *Sci. Total Environ.* **755**, 142486 (2021).
8. Chiriac, F. L., Paun, I., Pirvu, F., Iancu, V. & Galaon, T. Distribution, removal efficiencies and environmental risk assessment of benzophenone and salicylate UV filters in WWTPs and surface waters from Romania. *New J. Chem.* **45**, 2478–2487 (2021).
9. Sriram, D., Yogeewari, P. & Bal, T. R. Camptothecin and its analogues: A review on their chemotherapeutic potential. *Nat. Prod. Res.* **19**, 393–412 (2005).
10. Kingsbury, W. D. *et al.* Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogues: Inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. *J. Med. Chem.* **34**, 98–107 (1991).
11. Mancini, G. *et al.* Structural and dynamical effects induced by the anticancer drug topotecan on the human topoisomerase I - DNA Complex. *PLoS One* **5**, (2010).
12. Gokduman, K. Strategies targeting DNA topoisomerase I in cancer chemotherapy: Camptothecins, nanocarriers for camptothecins, organic non-camptothecin compounds and metal complexes. *Curr. Drug Targets* **17**, 1928–1939 (2016).

13. Lorusso, D. *et al.* Review role of topotecan in gynaecological cancers: Current indications and perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **74**, 163–174 (2010).
14. Chantada, G. L. *et al.* Activity of topotecan in retinoblastoma. *Ophthalmic Genet.* **25**, 37–43 (2004).
15. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Hycamtin. *Souhrn údajů o přípravku 0029338*, 1996 (2006).
16. U. S. Pharmacopeia. Topotecan Hydrochloride. *MSDS 1672257*, 2013 (2018).
17. Státní ústav pro kontrolu léčiv. ATC skupina L01CE01. Citováno 10.6.2023, dostupné z [https://prehledy.sukl.cz/prehled\\_leciv.html#/](https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/).
18. Švojgr, K. Retinoblastom. *Onkologie* **10**, 215–217 (2016).
19. Carolina, M. A. *Pediatric: Překlad 6. vydání.* (Grada Publishing a.s., 2014).
20. Ancona-Lezama, D., Dalvin, L. A. & Shields, C. L. Modern treatment of retinoblastoma: A 2020 review. *Indian J. Ophthalmol.* **68**, 2356–65 (2020).
21. Shields, C. L. & Shields, J. A. Basic understanding of current classification and management of retinoblastoma. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **17**, 228–234 (2006).
22. Schaiquevich, P. *et al.* Treatment of retinoblastoma: What is the latest and what is the future. *Front. Oncol.* **12**, 1–15 (2022).
23. Nitschke, R. *et al.* Topotecan in pediatric patients with recurrent and progressive solid tumors. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **20**, 315–318 (1998).
24. Ako-Adounvo, A. M. & Karla, P. K. Transscleral drug delivery to retina and posterior segment disease. *Drug Deliv. Retin. Posterior Segm. Dis.* 215–227 (2018).
25. Martin, R., Martin, S., Elke, S. & Walter, B. *Kapesní atlas dermatologie.* (Grada publishing, 2018).
26. Lucas, R. M. *et al.* Human health in relation to exposure to solar ultraviolet radiation under changing stratospheric ozone and climate. *Photochem. Photobiol. Sci.* **18**, 641–680 (2019).
27. The European Chemicals Agency. Cosmetic Products Regulation, Annex VI - Allowed UV Filters. Citováno 4.4.2023, dostupné z <https://echa.europa.eu/cs/cosmetics-uv-filters> (2022).
28. Lide, D. R. *CRC Handbook of chemistry and physics, internet version 2005.* CRC Press, Boca Raton, FL (2005).

29. Cumming, H. & Rücker, C. Octanol-water partition coefficient measurement by a simple <sup>1</sup>H NMR method. *ACS Omega* **2**, 6244–6249 (2017).
30. Mustieles, V. *et al.* Benzophenone-3: Comprehensive review of the toxicological and human evidence with meta-analysis of human biomonitoring studies. *Environ. Int.* **173**, (2023).
31. Imamović, B. *et al.* Stability and removal of benzophenone-type UV filters from water matrices by advanced oxidation processes. *Molecules* **27**, 1874 (2022).
32. National Library of Medicine. 4-Benzoyl-3-hydroxyphenyl methacrylate. Citováno 10.7.2023, dostupné z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Benzoyl-3-hydroxyphenyl-methacrylate> (2023).
33. Meng, X. *et al.* Simultaneous separation and determination of 15 organic UV filters in sunscreen cosmetics by HPLC–ESI-MS/MS. *Int. J. Cosmet. Sci.* **39**, 386–392 (2017).
34. Stien, D. *et al.* Metabolomics reveal that octocrylene accumulates in *Pocillopora damicornis* tissues as fatty acid conjugates and triggers coral cell mitochondrial dysfunction. *Anal. Chem.* **91**, 990–995 (2019).
35. Schreurs, R. H. M. M., Sonneveld, E., Jansen, J. H. J., Seinen, W. & van der Burg, B. Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicol. Sci.* **83**, 264–272 (2005).
36. Majhi, P. D. *et al.* Effects of benzophenone-3 and propylparaben on estrogen receptor–dependent r-loops and DNA damage in breast epithelial cells and mice. *Environ. Health Perspect.* **128**, 1–15 (2020).
37. Li, N. *et al.* Ultra violet filters in the urine of preschool children and drinking water. *Environ. Int.* **133**, 105246 (2019).
38. da Silva, C. P., Emídio, E. S. & de Marchi, M. R. R. The occurrence of UV filters in natural and drinking water in São Paulo State (Brazil). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 19706–19715 (2015).
39. Matta, M. K. *et al.* Effect of sunscreen application under maximal use conditions on plasma concentration of sunscreen active ingredients: A randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **321**, 2082–2091 (2019).
40. Jung, W. *et al.* Toxicokinetics, percutaneous absorption and tissue distribution of benzophenone-3, an UV filtering agent, in rats. *Toxics* **10**, 672 (2022).

41. Gonzalez, H., Farbrot, A., Larkö, O. & Wennberg, A. M. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. *Br. J. Dermatol.* **154**, 337–340 (2006).
42. Calafat, A. M., Wong, L. Y., Ye, X., Reidy, J. A. & Needham, L. L. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* **116**, 893–897 (2008).
43. Ma, X. *et al.* Occurrence of benzophenones, parabens and triclosan in the Yangtze River of China, and the implications for human exposure. *Chemosphere* **213**, 517–525 (2018).
44. Kameda, Y., Kimura, K. & Miyazaki, M. Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environ. Pollut.* **159**, 1570–1576 (2011).
45. Wick, A., Fink, G. & Ternes, T. A. Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV-filters and benzothiazoles in aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 2088–2103 (2010).
46. Ye, L., Liu, J., Yang, X., Peng, Y. & Xu, L. Orthogonal array design for the optimization of ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction of benzophenone-type UV filters. *J. Sep. Sci.* **34**, 700–706 (2011).
47. Grabicova, K. *et al.* Presence of UV filters in surface water and the effects of phenylbenzimidazole sulfonic acid on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a chronic toxicity test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **96**, 41–47 (2013).
48. Tsui, M. M. P., Leung, H. W., Lam, P. K. S. & Murphy, M. B. Seasonal occurrence, removal efficiencies and preliminary risk assessment of multiple classes of organic UV filters in wastewater treatment plants. *Water Res.* **53**, 58–67 (2014).
49. Ramos, S., Homem, V., Alves, A. & Santos, L. A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants. *Environ. Int.* **86**, 24–44 (2016).

50. Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randak, T. & Grabic, R. Removal and seasonal variability of selected analgesics/anti-inflammatory, anti-hypertensive/cardiovascular pharmaceuticals and UV filters in wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 7578–7585 (2014).
51. Wang, H. *et al.* Deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in water samples. *J. Chromatogr. A* **1516**, 1–8 (2017).
52. Hložek, T., Bosáková, T., Bosáková, Z. & Tůma, P. Hydrophobic eutectic solvents for endocrine disruptors purification from water: Natural and synthetic estrogens study. *Sep. Purif. Technol.* **303**, 122310 (2022).
53. Hrabáková, K. HPLC-MS/MS analýza toxinů z *Psilocybe semilanceata*. (Univerzita Karlova, bakalářská práce, 2021).
54. El Achkar, T., Greige-Gerges, H. & Fourmentin, S. Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environ. Chem. Lett.* **19**, 3397–3408 (2021).
55. Lee, J., Jung, D. & Park, K. Hydrophobic deep eutectic solvents for the extraction of organic and inorganic analytes from aqueous environments. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **118**, 853–868 (2019).
56. Tvrzicka, E., Kremmyda, L. S., Stankova, B. & Zak, A. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. Part 1: Classification, dietary sources and biological functions. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **155**, 117–130 (2011).
57. Banik, B. K., Sahoo, B. M. & Tiwari, A. *Terpenoids: Chemistry, biochemistry, medicinal effects, ethno-pharmacology*. (CRC Press, 2022).
58. Merck Life Science spol. Terpeneol. *SDS* 86480 (2023).
59. Merck Life Science spol. Menthol. *SDS* M2772 (2023).
60. Merck Life Science spol. Linalool. *SDS* L2602 (2022).
61. Cadena-Aizaga, M. I., Montesdeoca-Esponda, S., Torres-Padrón, M. E., Sosa-Ferrera, Z. & Santana-Rodríguez, J. J. Organic UV filters in marine environments: An update of analytical methodologies, occurrence and distribution. *Trends Environ. Anal. Chem.* **25**, e00079 (2020).

62. Buszewski, B. & Szultka, M. Past, present, and future of solid phase extraction: A review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **42**, 198–213 (2012).
63. Vila, M. *et al.* Simultaneous *in-vial* acetylation solid-phase microextraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry for the analysis of multiclass organic UV filters in water. *J. Hazard. Mater.* **323**, 45–55 (2017).
64. Belay, M. H., Precht, U., Mortensen, P., Marengo, E. & Robotti, E. A fully automated online SPE-LC-MS/MS method for the determination of 10 pharmaceuticals in wastewater samples. *Toxics* **10**, 1–18 (2022).
65. Tashiro, Y. & Kameda, Y. Concentration of organic sun-blocking agents in seawater of beaches and coral reefs of Okinawa Island, Japan. *Mar. Pollut. Bull.* **77**, 333–340 (2013).
66. Arellano, C., Gandia, P., Bettuing, L., Woodley, J. & Chatelut, E. Quantification of topotecan by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Application to intestinal transport using rat everted gut sacs. *J. Chromatogr. B* **878**, 645–652 (2010).
67. Kung, T. A., Lee, S. H., Yang, T. C. & Wang, W. H. Survey of selected personal care products in surface water of coral reefs in Kenting National Park, Taiwan. *Sci. Total Environ.* **635**, 1302–1307 (2018).
68. Zhang, K., Li, S., Wang, Y., Fan, J. & Zhu, G. Air-assisted liquid-liquid microextraction based on solidification of floating deep eutectic solvent for the analysis of ultraviolet filters in water samples by high performance liquid chromatography with the aid of response surface methodology. *J. Chromatogr. A* **1618**, 460876 (2020).
69. Meyer, V. R. *Practical high-performance liquid chromatography: 5th edition.* (Wiley, 2010).
70. Xu, Q. A. *Ultra-high performance liquid chromatography and its applications.* (Wiley, 2013).
71. Cazes, J. *Analytical instrumentation handbook: 3rd edition.* (CRC Press, 2004).
72. Jain, A. *et al.* Development and validation of the HPLC method for simultaneous estimation of paclitaxel and topotecan. *J. Chromatogr. Sci.* **52**, 697–703 (2013).
73. Bai, F. *et al.* Determination of plasma topotecan and its metabolite *N*-desmethyl topotecan as both lactone and total form by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* **784**, 225–232 (2003).
74. Gross, J. H. & Roepstorff, P. *Mass spectrometry: A textbook.* (Springer, 2011).

- 
75. Friedecký, D. & Lemr, K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* **20**, 152–157 (2012).
  76. Delatour, T., Mottier, P. & Gremaud, E. Limits of suspicion, recognition and confirmation as concepts that account for the confirmation transitions at the detection limit for quantification by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1169**, 103–110 (2007).
  77. Li, N. *et al.* Absolute bioavailability studies of a new oral topotecan formulation in Chinese patients using UHPLC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **76**, 252–256 (2013).
  78. Shu, P. *et al.* Application of an innovative high-throughput liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of 18 hazardous drugs to rule out accidental acute chemotherapy exposures in health care workers. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **26**, 794–802 (2020).
  79. Jeong, S. H., Jang, J. H. & Lee, Y. B. Pharmacokinetic comparison of three different administration routes for topotecan hydrochloride in rats. *Pharmaceuticals* **13**, 1–16 (2020).
  80. Khuroo, T. *et al.* Topotecan-tamoxifen duple PLGA polymeric nanoparticles: Investigation of in vitro, in vivo and cellular uptake potential. *Int. J. Pharm.* **473**, 384–394 (2014).
  81. Kusch, P. *Gas chromatography: Derivatization, sample preparation, application.* (IntechOpen, 2019).
  82. Saita, T., Fujito, H. & Mori, M. Determination of topotecan by ELISA. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 321–326 (2001).
  83. Buitrago, E. *et al.* Pharmacokinetic analysis of topotecan after intra-vitreous injection. Implications for retinoblastoma treatment. *Exp. Eye Res.* **91**, 9–14 (2010).
  84. Nováková, L. & Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* (Europrint a.s., 2013).
  85. Miller, J. N. & Miller, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry 6th edition.* (Pearson Education Limited, 2010).
  86. Zeng, W., Musson, D. G., Fisher, A. L. & Wang, A. Q. A new approach for evaluating carryover and its influence on quantitation in high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry assay. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 635–640 (2006).



- 
87. Mudrová, B. Vývoj LC-MS metody pro studium topotekanu. (Univerzita Karlova, diplomová práce, 2023).
  88. Hayes, R., Ahmed, A., Edge, T. & Zhang, H. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1357**, 36–52 (2014).