

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025

Bc. Kristýna Klimtová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Monitoring stopových hladin cytostatik ve výrobních prostorech pomocí LC-MS  
metodiky

Diplomová práce

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Monitoring of residual levels of cytostatics in production areas using LC-MS  
methodology  
Master thesis

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2024/2025

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Klímová**  
Osobní číslo: **C23248**  
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**  
Téma práce: **Monitoring stopových hladin cytostatik ve výrobních prostorách pomocí LC-MS metodiky**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

- V dostupných zdrojích vyhledejte a rešeršně zpracujte charakteristiku vybraných cytostatik a možnosti jejich analýzy ve stopových množstvích v různých maticích.
- V experimentální části se zaměřte na vývoj metody pro odběr vzorků cytostatik z povrchů výrobních prostorů, optimalizaci přípravy vzorků k analýze a jejich následnou analýzu s využitím LC-MS metodiky.
- (Navrženou metodu validujte) v souladu s pokyny ICH pro validaci analytických postupů dle směrnice ICH Q2(R2).
- Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**  
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Miroslav Pniok**  
Advande Labs s.r.o., Praha

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2025**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Monitoring stopových hladin cytostatik ve výrobních prostorách pomocí LC-MS metodiky jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 07. 05. 2025

Bc. Kristýna Klimtová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Janu Fisherovi, CSc. za spolupráci, konzultace a cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Miroslavu Pniokovi za jeho odborné vedení během experimentální části práce, za konzultace, trpělivý přístup a ochotu věnovat mi svůj čas. Ráda bych poděkovala také společnosti Advande Labs s.r.o. za umožnění realizace diplomové práce a za poskytnutí zázemí pro její vypracování.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zaměřuje na monitoring cytostatik ve výrobních prostorách s využitím metodiky LC-MS. Úvodní část je věnována přehledu jednotlivých skupin cytostatik, jejich mechanismu účinku a toxicitě. Následuje kapitola zabývající se monitoringem prostředí, v níž je popsána strategie odběru vzorků, jejich příprava a následná analýza. Součástí práce je rovněž popis použité instrumentální techniky a proces validace metody. Experimentální část se věnuje vývoji analytické metody pro stanovení vybraných cytostatik z různých typů povrchů a její následné validaci.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

cytostatika, monitoring prostředí, LC-MS, analýza vzorků, příprava vzorku, validace metody, instrumentální technika, analytická metoda, výrobní prostory, povrchová kontaminace

## **TITLE**

Monitoring of residual levels of cytostatics in production areas using LC-MS methodology

## **ANNOTATION**

This master thesis focuses on the monitoring of cytotoxic drugs in production areas using the LC-MS methodology. The introductory part provides an overview of the different groups of cytostatics, their mechanisms of action, and toxicity. The following chapter is dedicated to environmental monitoring where the sampling strategy, sample preparation and subsequent analysis is described. The thesis also includes a description of the instrumental technique used and the method of the validation process. The experimental section deals with the development of an analytical method for the determination of selected cytostatics from various surface types, followed by its validation.

## **KEYWORDS**

cytostatics, environmental monitoring, LC-MS, sample analysis, sample preparation, method validation, instrumental technique, analytical method, production areas, surface contamination

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	12
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	15
1 ÚVOD.....	19
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	20
2.1 Cytostatika.....	20
2.1.1 Rozdělení cytostatik.....	20
2.1.1.1 Alkylační činidla.....	20
2.1.1.2 Antimetaboly.....	22
2.1.1.3 Přírodní produkty a jejich syntetické modifikace.....	24
2.1.1.4 Hormony a příbuzné látky.....	26
2.1.1.5 Imunoterapeutické látky.....	27
2.1.2 Toxicita cytostatik.....	28
2.1.2.1 Karcinogenita.....	29
2.1.2.2 Mutagenita.....	30
2.1.2.3 Teratogenita.....	31
2.1.3 Monitoring cytostatik.....	32
2.1.3.1 Strategie monitoringu.....	33
2.1.3.2 Odběr vzorku.....	34
2.1.3.3 Příprava vzorku.....	36
2.1.3.4 Analýza vzorků.....	36
2.1.4 Dekontaminace.....	37
2.2 LC-MS instrumentace.....	38
2.2.1 Kapalinová chromatografie.....	38
2.2.2 Hmotnostní spektrometrie.....	40
2.2.2.1 Orbitrap™.....	42
2.3 Validace analytických metod.....	43
2.3.1 Specificita/Selektivita.....	43

2.3.2	Rozsah metody.....	43
2.3.3	Správnost .....	44
2.3.4	Přesnost.....	44
2.3.5	Robustnost .....	44
2.3.6	Stanovení mezí detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) .....	44
2.3.7	Stabilita .....	45
2.3.8	Test způsobilosti systému .....	45
2.4	Příklady realizovaného monitoringu cytostatik .....	45
3	MOTIVACE A CÍLE PRÁCE.....	50
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	53
4.1	Materiály a přístrojové vybavení .....	53
4.1.1	Chemikálie .....	53
4.1.2	Pomůcky .....	53
4.1.3	Pomocné zařízení a vybavení .....	54
4.2	Příprava roztoků standardů .....	55
4.2.1	Příprava zásobních roztoků standardů .....	55
4.2.2	Příprava pracovních roztoků standardů pro účely optimalizace .....	56
4.2.3	Příprava kalibračních roztoků .....	56
4.3	Mytí povrchů.....	58
4.4	Příprava vzorků.....	58
4.4.1	Příprava slepého vzorku.....	58
4.4.2	Spikování stěrkových tyčinek .....	59
4.4.3	Příprava spikovaných povrchů.....	59
4.5	UHPLC-UV metoda .....	60
4.6	UHPLC-MS metoda .....	60
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	65
5.1	Optimalizace UHPLC-MS metody.....	65
5.1.1	Testovací analýza.....	65

5.1.2	Optimalizace gradientu, mobilní fáze a celkové doby analýzy .....	67
5.1.3	Optimalizace podmínek MS detekce .....	68
5.2	Optimalizace přípravy vzorku .....	73
5.2.1	Optimalizace extrakčního rozpouštědla .....	73
5.2.2	Optimalizace smáčecího roztoku .....	74
5.2.3	Optimalizace stěru vzorku .....	76
5.3	Validace metody .....	78
5.3.1	Test způsobilosti systému .....	78
5.3.2	Specifita/Selektivita .....	78
5.3.3	Správnost .....	79
5.3.4	Přesnost .....	79
5.3.5	Robustnost .....	79
5.3.6	Stanovení meze detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) .....	80
5.3.7	Linearita .....	80
5.3.8	Stabilita .....	81
5.3.9	Rozsah metody .....	81
5.4	Výsledky stěrů z povrchů materiálů .....	81
6	ZÁVĚR .....	89
7	POUŽITÁ LITERATURA .....	91
	SEZNAM PŘÍLOH .....	100

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Struktury alkylační činidel diskutovaných v textu.....	22
Obrázek 2: Struktury antimetabolitů diskutovaných textu .....	24
Obrázek 3: Struktury hormonů a příbuzných látek diskutovaných textu .....	27
Obrázek 4: Struktura lenalidomidu jako příklad imunoterapeutických látek diskutovaných textu .....	28
Obrázek 5: Mechanismus karcinogeneze, převzato z [20] .....	30
Obrázek 6: Příklady vývojových vad: (A) malformace končetin, převzato z [28] a (B) rozštěp patra, převzato z [29] .....	32
Obrázek 7: Schéma průběhu monitoringu .....	33
Obrázek 8: Příklady vzorkovacích pomůcek: (A) ubrousky/utěrky, (B) filtrační papír a (C) stěrové tyčinky [34-36].....	35
Obrázek 9: Schéma LC instrumentace.....	39
Obrázek 10: Schéma MS instrumentace .....	41
Obrázek 11a: Modelové látky s antineoplastickou aktivitou použité v rámci této studie .....	51
Obrázek 12: Druhy povrchových materiálů, které byly použity v této práci .....	52
Obrázek 13: Ilustrace stírací metody .....	58
Obrázek 14: UHPLC-UV chromatogramy (@215 nm a 250 nm) vybraných analytů při použití metanolu jako organického modifikátoru .....	66
Obrázek 15: UHPLC-UV chromatogramy (@215 nm a 250 nm) vybraných analytů při použití směsi ACN/H <sub>2</sub> O – 95/5 v/v jako složky B gradientu .....	67
Obrázek 16: Graf porovnání extrakční výtěžnosti pro testované extrakční rozpouštědla .....	74
Obrázek 17: Graf porovnání výtěžnosti pro testované smáčecí roztoky pro povrch 316 nerezová ocel.....	75
Obrázek 18: Graf porovnání výtěžnosti pro testované smáčecí roztoky pro povrch PVC .....	75
Obrázek 19: Ilustrace různých stíracích metod testovaných v rámci této práce.....	76
Obrázek 20: Graf porovnání výtěžnosti jednotlivých typů stěrů na povrchu 316 nerezová ocel .....	77
Obrázek 21: Graf porovnání výtěžnosti jednotlivých typů stěrů na povrchu PVC .....	77
Obrázek 22: Heatmapa výtěžnosti pro jednotlivé analyty napříč povrchy .....	83
Obrázek 23: Heatmapa LOD (pg/cm <sup>2</sup> ) pro jednotlivé analyty napříč povrchy .....	84
Obrázek 24: Kalibrační závislost azacytidinu pro koncentrační rozsah (5–600) ng/ml .....	113
Obrázek 25: Kalibrační závislost 5-fluorouracilu pro koncentrační rozsah (2–240) ng/ml ...	113

Obrázek 26: Kalibrační závislost lenalidomidu pro koncentrační rozsah (0,5–60,0) ng/ml ...	114
Obrázek 27: Kalibrační závislost methotrexátu pro koncentrační rozsah (0,1–12) ng/ml .....	114
Obrázek 28: Kalibrační závislost thiotepy pro koncentrační rozsah (1–120) ng/ml .....	115
Obrázek 29: Kalibrační závislost cyklofosfamidu pro koncentrační rozsah (0,5–60,0) ng/ml .....	115
Obrázek 30: Kalibrační závislost kapecitabinu pro koncentrační rozsah (2–240) ng/ml .....	116
Obrázek 31: Kalibrační závislost tamoxifenu pro koncentrační rozsah (0,05 – 6,00) ng/ml .	116
Obrázek 32: Kalibrační závislost testosteronu pro koncentrační rozsah (1–120) ng/ml .....	117
Obrázek 33: Kalibrační závislost chlorambucilu pro koncentrační rozsah (0,05 – 6,00) ng/ml .....	117
Tabulka 1: Přehled detekčních limitů .....	47
Tabulka 2: Přehled vzorkovacího a extrakčního procesu .....	48
Tabulka 3: Standardy a jejich výsledná přesná koncentrace .....	56
Tabulka 4: Příprava kalibračních roztoků .....	57
Tabulka 5: Koncentrace jednotlivých analytů v kalibračních roztocích .....	57
Tabulka 6: Přehled spikování pro jednotlivé úrovně .....	59
Tabulka 7: Přehled spikování pro jednotlivé úrovně .....	60
Tabulka 8: Chromatografické parametry použité pro UHPLC-MS/MS analýzu .....	61
Tabulka 9a: Parametry hmotnostního spektrometru použité pro UHPLC-MS/MS analýzu ....	62
Tabulka 10: Přehled optimalizace gradientu .....	68
Tabulka 11a: Navržené struktury produktových iontů pro studované analyty .....	70
Tabulka 12: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – polyvinylchlorid (PVC) .....	84
Tabulka 13: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – nylon (PA) .....	84
Tabulka 14: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – polyuretan (PU) .....	85
Tabulka 15: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – polykarbonát (PC) .....	85
Tabulka 16: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – plexisklo (PMMA) .....	85
Tabulka 17: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – PETG .....	85
Tabulka 18: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – PEEK .....	85
Tabulka 19: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – PTFE .....	86
Tabulka 20: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – Polyethylen (HDPE) .....	86
Tabulka 21: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – anodisovaný hliník .....	86
Tabulka 22: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – chromovaná ocel .....	86
Tabulka 23: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – 316 nerezová ocel .....	87

Tabulka 24: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – silikon .....	87
Tabulka 25: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – sklo.....	87
Tabulka 26: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – fenolická pryskyřice.....	87
Tabulka 27: Výsledky stěrů z povrchového materiálu – leštěná žula.....	88
Tabulka 28: Přehled laděných MS podmínek – AZA, TMZ, LND, MTX, THT, CYC, CAP, TES .....	101
Tabulka 29: Přehled laděných MS podmínek - 5-FU, CHL, TAM .....	102
Tabulka 30: Výsledky validačních parametrů pro azacytidin .....	103
Tabulka 31: Výsledky validačních parametrů pro 5-fluorouracil.....	104
Tabulka 32: Výsledky validačních parametrů pro lenalidomid.....	105
Tabulka 33: Výsledky validačních parametrů pro 5-fluorouracil.....	106
Tabulka 34: Výsledky validačních parametrů pro thiotepu.....	107
Tabulka 35: Výsledky validačních parametrů pro cyklofosfamid.....	108
Tabulka 36: Výsledky validačních parametrů pro kapecitabin .....	109
Tabulka 37: Výsledky validačních parametrů pro tamoxifen.....	110
Tabulka 38: Výsledky validačních parametrů pro testosteron.....	111
Tabulka 39: Výsledky validačních parametrů pro chlorambucil.....	112

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACN	Acetonitril
ALARA	As Low As Reasonably Achievable
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie (Acute Lymphoblastic Leukemia)
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
ATC	Anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace (Anatomical Therapeutic Chemical classification)
AZA	Azacytidin
CAP	Kapcitabin
CHL	Chlorambucil
CML	Chronická myelogenní leukémie (Chronic Myelogenous Leukemia)
CYC	Cyklofosfamid
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)
DHFA	Kyselina dihydrofolistová (Dihydrofolic acid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOC	Docetaxel
DOX	Doxorubicin
ELD	Elektrochemický detektor (Electrochemical Detector)
ELSD	Detektor se světelným rozptylem po odpaření (Evaporative Light Scattering detector)
EPI	Epirubicin
ES	Extrakční rozpouštědlo
ESI	Elektrosprejová ionizace (Electrospray Ionization)
ETO	Etoposid
EtOH	Etanol
FLD	Fluorescenční detektor (Fluorescence Detector)
FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)
5-FU	5-fluorouracil
FWHM	Šířka na polovině maximální výšky (Full Width at Half Maximum)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)

GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Gas Chromatography – Mass Spectrometry)
GEM	Gemcitabin
HCD	Disociace srážkou při vyšší energii (Higher-energy Collisional Dissociation)
HESI	Vyhřívaná elektrosprejová ionizace (Heated Electrospray Ionization)
HGPRT	Hypoxanthin guanine fosforibosyl transferáza
HILIC	Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HPV	Lidský papilomavirus (Human papillomavirus)
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (High Resolution Mass Spectrometry)
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICH Q2 (R2)	Mezinárodní směrnice pro harmonizaci technických požadavků na farmaceutické výrobky pro lidskou spotřebu, Q2 (R2) – Validace analytických metod (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, Q2 (R2) – Validation of Analytical Procedures)
IFO	Ifosfamid
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry)
IPC	Iontově-párová chromatografie (Ion Pair Chromatography)
IRI	Irinotekan
IRM	Kolizní cela (Ion Routing Multipole)
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)
LC-UV	Kapalinová chromatografie s UV detekcí (Liquid Chromatography – Ultraviolet detection)
LND	Lenalidomid
LOD	Limit detekce (Limit of Detection)

LOQ	Limit kvantifikace (Limit of Quantification)
LRMS	Hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením (Low-Resolution Mass Spectrometry)
MDL	Minimální detekovatelná koncentrace (Method Detection Limit)
MeOH	Metanol
MTX	Methotrexát
MIT	Mitomycin
6-MP	6-merkaptopurin
MRM	Vícenásobný záznam iontových reakcí (Multiple Reaction Monitoring)
NP	Systém s normálními fázemi (Normal Phase)
PAC	Paclitaxel
PCB	Polychlorované bifenyly
PDA	Detektor s diodovým polem (Photodiode Array Detector)
PETG	glykolmodifikovaný polyethylentereftalát (Polyethylene Terephthalate Glycol)
PEEK	Polyetheretherketon
PMMA	Polymethylmetakrylát (Plexisklo)
PRM	Paralelní záznam iontových reakcí (Parallel Reaction Monitoring)
PVC	Polyvinylchlorid
PTFE	Polytetrafluorethylen
QqQ	Trojité kvadrupólový hmotnostní spektrometr
RNA	Ribonukleová kyselina
RP	Systém s reverzními fázemi (Reverse Phase)
RSD	Relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)
SD	Směrodatná odchylka (Standard Deviation)
SIM	Selektivní záznam iontu (Selected Ion Monitoring)
SPE	Extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction)
SR	Smáčecí roztok
SRM	Selektivní záznam iontových reakcí (Selected Reaction Monitoring)
SST	Test způsobilosti systému (System Suitability Test)
TAM	Tamoxifen
TES	Testosteron
6-TG	6-Thioguanin
THT	Thiotepa

TMZ	Temozolomid
TOF	Hmotnostní analyzátor doby letu (Time-of-Flight)
TOP	Topotekan
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
UV	Ultrafialová spektroskopie (Ultraviolet Spectroscopy)
UV-VIS	Ultrafialová a viditelná spektroskopie (Ultraviolet-Visible Spectroscopy)

# 1 ÚVOD

Cytostatika představují významnou skupinu léčiv, která se využívají především v onkologii k léčbě zhoubných nádorových onemocnění. Jejich mechanismus účinku je založen na inhibici buněčného dělení, což je klíčové pro potlačení růstu maligních buněk. Zároveň však tyto látky vykazují vysokou toxicitu nejen vůči nádorovým buňkám, ale i vůči zdravým tkáním, a představují tak riziko jak pro samotné pacienty, tak i pro zdravotnický personál a pracovníky ve farmaceutickém průmyslu, kteří s nimi přicházejí do kontaktu.

Vzhledem k této toxicitě je nezbytné věnovat zvýšenou pozornost bezpečnosti při manipulaci s cytostatiky, a to jak během jejich výroby, tak při jejich skladování, přípravě a aplikaci. V posledních letech roste důraz na implementaci monitorovacích systémů, které umožňují sledování přítomnosti zbytkových množství těchto látek v pracovním prostředí a tím přispívají k ochraně zdraví zaměstnanců a zajištění vysoké úrovně jakosti vyráběných léčiv.

Efektivní monitoring cytostatik je postaven na použití citlivých a selektivních analytických metod, které umožňují jejich detekci a kvantifikaci i ve stopových koncentracích. V této souvislosti se jako preferovaná analytická technika uplatňuje kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS), která nabízí vynikající analytické vlastnosti pro sledování širokého spektra sloučenin v různých typech matric.

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a validovat analytickou metodu umožňující simultánní stanovení jedenácti vybraných cytostatik. Navržená metoda byla koncipována s ohledem na požadavky rutinní kontroly ve farmaceutických provozech nebo analytických laboratořích.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Cytostatika

Cytostatika, známá také jako antineoplastika, jsou léčiva používaná k léčbě nádorových onemocnění. Hlavním mechanismem účinku je narušení procesu buněčného dělení, což vede buď k úplnému zastavení růstu rakovinných buněk nebo alespoň k jeho výraznému zpomalení. Tato léčiva nacházejí uplatnění zejména v rámci chemoterapie, kde se často kombinují s dalšími terapeutickými přístupy, jako je radioterapie, imunoterapie nebo chirurgická léčba. Cílem této kombinované léčby je dosáhnout co nejvyšší účinnosti a zároveň minimalizovat riziko vzniku rezistence nádorových buněk [1, 2].

Ideální cytostatikum by mělo selektivně ničit pouze nádorové buňky, přičemž zdravé buňky by měly zůstat nepoškozené. Tento princip vychází z konceptu „magické kulky“ (německy Zauberkugel, anglicky magic bullet), který byl formulován německým imunologem Paulem Ehrlichem začátkem 20. století. Paul Ehrlich usiloval o vývoj léčiv schopných cíleně ničit patogeny nebo nádorové buňky, aniž by poškozovaly zdravé tkáně. První úspěšnou aplikací tohoto konceptu bylo objevení léku Salvarsanu. Tento lék byl účinný proti syfilis a položil základy pro chemoterapii a cílenou léčbu. Dnes se tento princip využívá především v onkologii, kde např. konjugáty monoklonálních protilátek s cytostatiky umožňují cílený zásah do nádorových buněk s minimálním poškozením zdravých tkání. Ehrlichova vize tak zásadně ovlivnila vývoj moderních cytostatik a cílené terapie rakoviny [3].

Většina cytostatik používaných v současnosti se spoléhá na princip, při kterém je selektivita účinku řízena pouze kineticky. Princip spočívá v tom, že nádorové buňky se dělí a rostou rychleji než normální buňky [1]. Tento rozdíl je činí citlivějšími vůči působení cytostatik. Přesto však léčba často zasahuje zdravé buňky, což může vést k nežádoucím vedlejším účinkům [1, 2].

#### 2.1.1 Rozdělení cytostatik

Cytostatika lze klasifikovat podle různých hledisek, jako je chemická struktura, mechanismus účinku, původ nebo podle Anatomicko-Terapeuticko-Chemické (ATC) klasifikace. V tomto textu jsou cytostatika rozdělena primárně podle mechanismu účinku.

##### 2.1.1.1 Alkylační činidla

Alkylační činidla jsou chemické látky, které působí přímo na DNA. Dochází k vytváření kovalentních vazeb mezi alkylem a nukleofilními skupinami nukleových bází. Nejčastějším

cílem je dusík v poloze N-7 guaninu. Skupina alkylačních činidel označovaných jako tzv. monoalkylační činidla může reagovat jen s jedním reakčním místem DNA, zatímco tzv. bifunkční alkylační činidla mohou tvořit kovalentní vazby se dvěma různými guaniny. Výsledkem pak mohou být můstky na jednom vlákně DNA, popř. mezi oběma vlákny. Působení obou skupin vede k zamezení replikace DNA, která způsobuje inhibici růstu proliferujících buněk. Nejvíce účinná jsou v S fázi buněčného cyklu. Jedná se o část cyklu, kdy dochází k replikaci DNA a buňka je připravená na dělení. Dochází tak k ovlivnění dělení buněk v rychle se dělících tkáních (kostní dřev, gastrointestinální epitel). Navzdory vedlejším účinkům, alkylační činidla hrají důležitou roli v protinádorové léčbě. Mohou být aplikovatelná na široké spektrum malignit, včetně hematologických nádorů, solidních nádorů a nádorů centrálního nervového systému [1, 2, 4, 5].

Většina protinádorových alkylačních činidel je bifunkčních, to znamená, že mají dvě alkylové skupiny. Mezi bifunkční alkylační činidla patří tzv. dusíkaté yperity, např. cyklofosfamid, chlorambucil, melfalan nebo metchloroetamin. Příkladem monofunkčních alkylačních činidel je temozolomid [2].

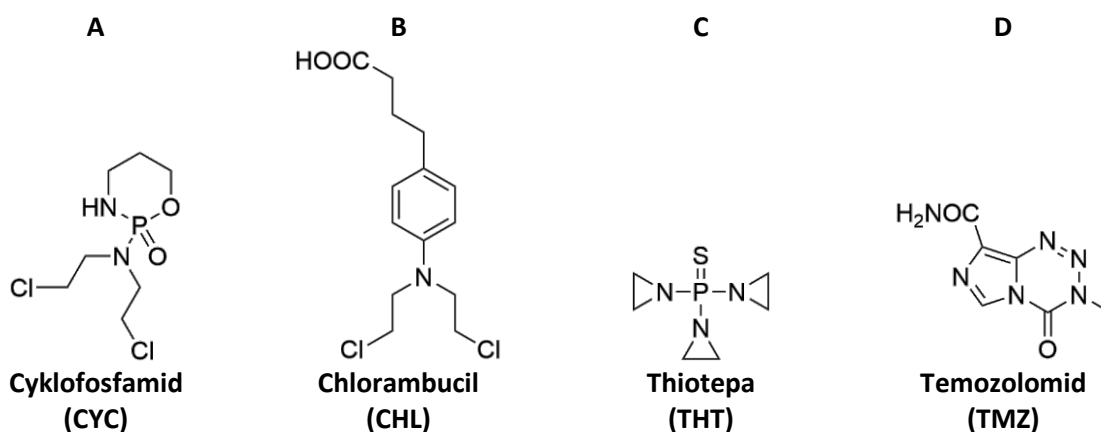
Cyklofosfamid (Obrázek 1-A) je jedno z nejběžněji používaných alkylačních činidel. Cyklofosfamid je sám o sobě neaktivní a k dosažení terapeutického účinku musí být v těle metabolizován na reaktivní metabolit. Metabolická přeměna probíhá prostřednictvím systému cytochromu P450 v játrech. Kromě toho je cyklofosfamid v nízkých dávkách vysoce potentní imunosupresivum [2]. Je využíván k léčbě maligního lymfomu, mnohočetného myelomu, leukémie, rakoviny prsu a vaječnicků, neuroblastomu a retinoblastomu. Cyklofosfamid může být podáván ve formě tablet nebo intravenózně [6]. Mezi hlavní nežádoucí účinky cyklofosfamidů patří alopecie, nauzea, zvracení, myelosuprese a cystitida. Může také docházet k rozvoji leukémie nebo rakoviny močového měchýře [2, 6].

Chlorambucil (Obrázek 1-B) je antineoplastický přípravek používaný k léčbě rakoviny krve a lymfatického systému, jako je Hodgkinova nemoc. Zároveň se jedná o imunosupresivní látku, která se využívá k léčbě různých autoimunitních onemocnění, jako je například revmatoidní artritida [6]. Mezi hlavní nežádoucí účinky patří alopecie, nauzea, zvracení, myelosuprese a také může docházet k rozvoji leukémie [2, 6, 7].

Dalšími skupinami alkylačních činidel jsou nitrosomočoviny, alkylsulfonáty, ethyleniminy, methylhydraziny, komplexy platiny a triazeny [5].

Pravděpodobně nejznámějším zástupcem patřícím do skupiny ethyleniminů neboli aziridinů je thiotepa (Obrázek 1-C). Byla zavedena v roce 1953 a i dnes se používá při léčbě rakoviny, jako je rakovina močového měchýře, vaječníků, prsu, plic, mozku anebo lymfomů. Thiotepa je ve formě injekčních roztoků a může být podávána různými parenterálními cestami např. intravenózně, intramuskulárně, intratekálně nebo intratumorálně. Nežádoucím účinkem spojeným s užíváním thiotepy je možný rozvoj leukémie [5, 8].

Mezi významné zástupce triazenů patří temozolomid (Obrázek 1-D). Temozolomid se využívá zejména při léčbě glioblastomů v kombinaci s radioterapií. K dispozici je ve dvou formách podání. V perorální formě v podobě kapsle nebo ve formě injekčního roztoku. Mezi nejčastější nežádoucí účinky temozolomidu patří alopecie, únava, nauzea, bolesti hlavy a zácpa. V některých případech mohou nastat i závažné nežádoucí účinky, jako jsou alergické reakce, poškození jater, plicní problémy, poruchy krve a zvýšené riziko vzniku nových rakovin [5, 9].



**Obrázek 1:** Struktury alkylační činidel diskutovaných v textu

### 2.1.1.2 Antimetabolity

Antimetabolity jsou syntetické látky, které se strukturně podobají složkám DNA nebo koenzymům podílejících se na syntéze nukleových kyselin. Základním mechanismem účinku této třídy je inhibice syntézy nukleových kyselin. Podle chemické struktury můžeme antimetabolity dělit na antagonisty kyseliny listové, kde hraje klíčovou roli methotrexát (Obrázek 2-A). Tento lék inhibuje enzym dihydrofolát reduktázu, čímž blokuje přeměnu kyseliny dihydrolistové (DHFA) na kyselinu tetrahydrolistovou (THFA), která je nezbytným koenzymem při syntéze aminokyselin a nukleových kyselin. Pro maximalizaci účinku, snížení toxicity methotrexátu a ochranu zdravých buněk, se po vysoké dávce methotrexátu podává dávka kyseliny tetrahydrolistové ve formě kyseliny folinové [2, 5]. Methotrexát se používá k léčbě dětské akutní lymfoblastické leukémie, meningeální rakoviny a lymfonu, těžké

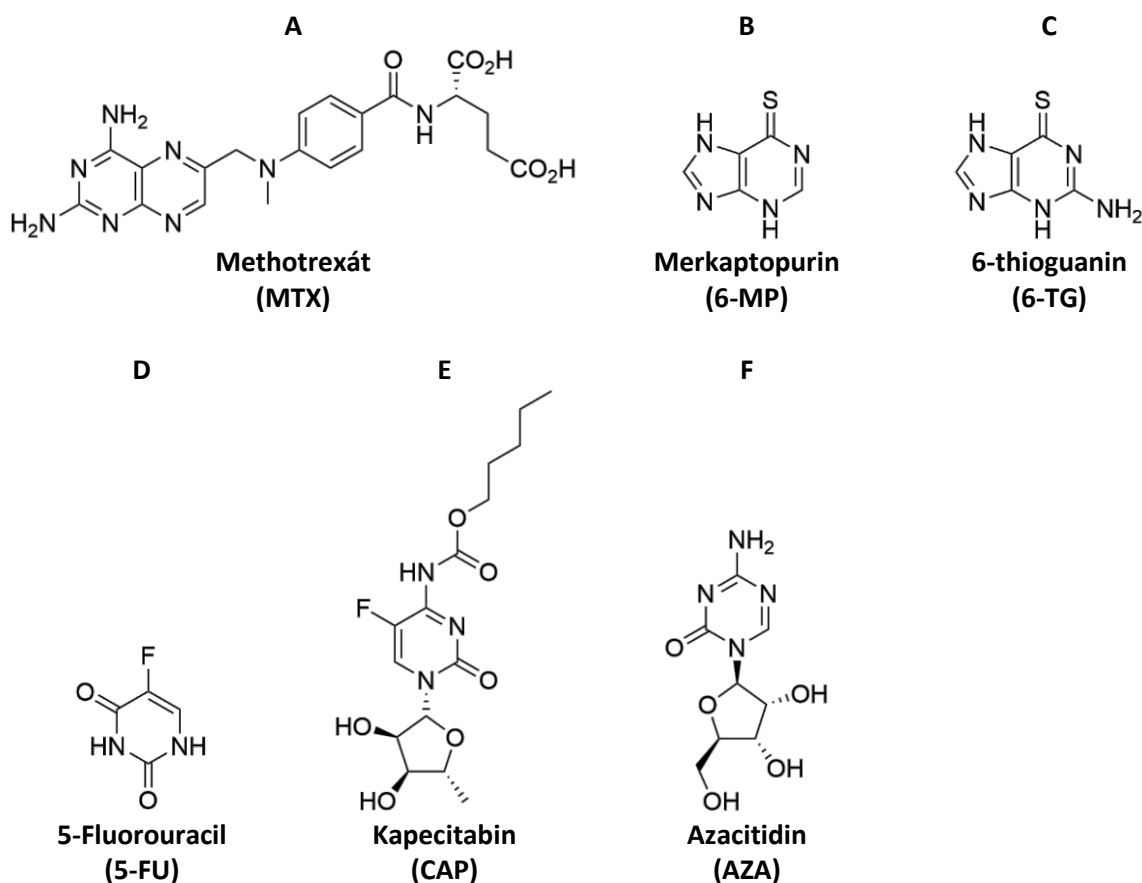
psoriázy, revmatoidní artritidy a také je vhodný pro léčbu Crohnovy choroby. Aplikuje se perorálně ve formě tablet nebo ve formě injekčního roztoku [10, 11]. Neprochází hematoencefalickou bariérou a vylučuje se močí v nezměněné podobě [2]. Mezi jeho hlavní nežádoucí účinky patří myelosuprese, poškození epitelu trávicího traktu a možnost zánětu plic [2, 5, 11].

Další významnou skupinou jsou antagonisté purinových bází, jako je merkaptopurin a thioguanin (Obrázek 2-B, C). Jedná se o vysoce účinné protinádorové látky, které se používají zejména při léčbě hematologických malignit, jako je akutní lymfoblastická leukémie (ALL) [5] nebo chronická myelogenní leukémie (CML) [2]. Tyto látky jsou strukturně podobné přirozeným purinovým bázím, tj. adeninu a guaninu, a fungují jako antimetabolity. Po metabolické aktivaci enzymem hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázou (HGPRT) narušují syntézu DNA a RNA v nádorových buňkách nebo se inkorporují do jejich genetického materiálu, což vede k chybám při replikaci a následně k apoptóze. Mezi jejich hlavní nežádoucí účinky patří myelosuprese, hepatotoxicita, anorexie, nauzea a zvracení [2, 5].

Třetí skupinu tvoří antagonisté pyrimidinových bází, z nichž nejznámější je fluorouracil, ale patří sem také kapecitabin nebo azacytidin (Obrázek 2-D, E, F). Tyto látky jsou strukturně podobné přirozeným pyrimidinovým bázím a fungují jako antimetabolity, které narušují replikaci DNA v nádorových buňkách prostřednictvím své přeměny na analogy nukleotidů. Tímto procesem dochází k poškození DNA a RNA a následně k indukci apoptózy. Fluorouracil je fluoro analog uracilu a je metabolizován na aktivní formu 5-fluoro-2-deoxyuridin monofosfát. Tato forma inhibuje thymidylát syntetázu a dochází k blokaci syntézy DNA. Může se také přeměňovat na 5-fluorouridin fosfát, který je začleněn do RNA a může tak narušovat její funkci [2, 5]. Fluorouracil se používá k léčbě různých typů nádorových onemocnění, včetně rakoviny tlustého střeva, rakoviny žaludku, rakoviny prsu a rakoviny hlavy a krku. Tento lék je podáván ve formě injekčního roztoku intravenózně. Mezi nežádoucí účinky fluorouracilu patří chudokrevnost, snížený počet bílých krvinek, snížený počet krevních destiček, trávicí obtíže, bolesti hlavy, alopecie a alergické reakce [2, 12].

Kapecitabin se používá k léčbě kolorektálního karcinomu, pokročilého karcinomu žaludku a lokálně pokročilého nebo metastatického karcinomu prsu. Lék je podáván ve formě potahovaných tablet. Mezi časté nežádoucí účinky patří průjem, nauzea, zvracení, únava, stomatitida, palmar-plantar syndrom a změny na pokožce [13, 14].

Azacytidin se používá k léčbě akutní myeloblastické leukémie, rakoviny prsu, rakoviny tlustého střeva, melanomu a rakoviny vaječnicků. Lék je podáván formou subkutánních injekcí. Mezi nežádoucí účinky patří zvýšený výskyt lymfonu. Azacitidin může být vyráběn synteticky nebo izolován z bakterie *Streptoverticillium ladakanus* [15].



**Obrázek 2:** Struktury antimetabolitů diskutovaných textu

### 2.1.1.3 Přírodní produkty a jejich syntetické modifikace

Přírodní produkty získávané z rostlin, mikroorganismů a mořské flóry patří také klíčovými zdroji pro výrobu léčiv. Hlavní dělení přírodních protinádorových látek zahrnuje antibiotika, alkaloidy z rostliny barvínku, tzv. vinca alkaloidy, podofylotoxiny, taxoidy, inhibitory topoizomerázy a modifikátory biologické odpovědi [2, 5].

Antibiotika představují důležitou skupinu léků používaných v chemoterapii rakoviny a zahrnují široké spektrum látek s různými mechanismy účinku. Strukturně podobná antracyklinová antibiotika daunorubicin a doxorubicin představují jedny z nejužitečnějších antibiotik v chemoterapii rakoviny. Jedná se o látky s podobnou chemickou strukturou. Daunorubicin se využívá zejména při akutní leukémii [2]. Doxorubicin se aplikuje u karcinomů plic nebo prsu

[2]. Aktinomycin D inhibuje transkripci DNA na RNA a je často součástí kombinované léčby, například Wilмова nádoru [2]. Bleomyciny jsou skupinou glykopeptidových antibiotik, které působí degradaci DNA, zejména prostřednictvím tvorby reaktivních iontů. Jsou účinné zejména u rakoviny varlat a dlaždicových karcinomů, přičemž jejich hlavním rizikem je plicní fibróza [2]. Mitomycin C, který lze klasifikovat také jako alkylační činidlo, je indikován u rezistentních nádorů žaludku, děložního čípku nebo tlustého střeva. Jeho použití však omezuje vysoká toxicita, zahrnující těžkou myelosupresi, poškození ledvin a plicní fibrózu [2]. Plicamycin vykazuje účinky vazbou na DNA prostřednictvím komplexu s kationty ( $Mg^{2+}$  nebo  $Ca^{2+}$ ) a současně snižuje hladinu vápníku v plazmě, což je užitečné při léčbě hyperkalcémie. Použití je indikováno u rezistentní rakoviny varlat, avšak toxicita zahrnuje hematologické komplikace a poškození jater [2]. Navzdory vysoké účinnosti tato antibiotika často způsobují závažné vedlejší účinky, což vyžaduje pečlivý výběr pacientů a optimalizaci léčby [2, 5].

Alkaloidy vinblastin a vinkristin pocházejí z rostliny barvínkovec růžový (*Catharanthus roseus*). Tato léčiva inhibují polymeraci tubulinu, čímž dochází k narušení tvorby mitotického vřeténka a blokují dělení buněk [2, 5]. Vinblastin se používá při Hodgkinově chorobě a karcinomu varlat, zatímco vinkristin je určen pro akutní lymfoblastickou leukémii a lymfomy. Toxicita se liší, vinblastin způsobuje myelosupresi, vinkristin neurotoxicitu [2].

Podofylotoxiny, mezi které patří etoposid a teniposid, jsou polosyntetické deriváty podofylotoxinů, které jsou extrahovány z kořenů noholistu štítnatého (*Podophyllum peltatum*). Působí jako protinádorová léčiva inhibicí enzymu DNA topoizomerázy II, což brání replikaci DNA [2, 5].

Taxany jsou diterpenoidy izolované ze stromu z čeledi Taxaceae (*Taxus brevifolia* a *Taxus baccata*), které stabilizují mikrotubuly a brání jejich depolymerizaci, což narušuje normální funkci mikrotubulů v buňkách [2, 5]. Na rozdíl od vinca alkaloidů, které destabilizují mikrotubuly, taxany indukují jejich polymerizaci a zajišťují stabilitu. Mezi nejznámější zástupce patří paklitaxel, docetaxel a kabazitaxel. Tyto látky jsou klíčové v terapii několika pokročilých nádorových onemocnění, jako je rakovina vaječníků, prsu a plic [5].

Inhibitory topoizomerázy I, jako kamptothecin, topotekan a irinotekan, jsou přírodní protinádorové látky, které narušují replikaci DNA v rakovinných buňkách. Jedná se o deriváty kamptothecinu izolované z rostliny kamptoteka ostrolistá (*Camptotheca accuminata*) a druhy rostlin z rodu *Nothapodytes* [5].

Modifikátory biologické odpovědi, například interferony a interleukin-2, zlepšují imunitní reakci proti nádorům, a to zejména u melanomu, sarkomu a renálního karcinomu [2, 5].

#### **2.1.1.4 Hormony a příbuzné látky**

Hormonální protinádorové léky jsou určeny především k léčbě nádorů, které jsou závislé na hormonech. Jedná se o rakoviny prsu, prostaty nebo dělohy. Tyto nádory jsou závislé na hormonech, které podporují jejich růst, a proto změna hormonální hladiny nebo blokáce jejich účinku může výrazně ovlivnit průběh onemocnění. Hormonální látky nepůsobí přímo cytotoxicky, to znamená, že nepoškozují přímo nádorové buňky, ale dochází k tomu, že mění hormonální hladinu v těle nebo blokují účinek hormonů na cílové buňky. Tímto procesem dochází ke zpomalení růstu nádoru nebo k jeho úplnému zastavení. I když tato léčba většinou není schopná nemoc zcela vyléčit, hraje klíčovou roli v paliativní péči, kde se zaměřuje na zmírnění příznaků a zlepšení kvality života pacientů.

Androgeny, estrogeny a antiestrogeny jsou tři důležité skupiny hormonálních protinádorových léků. Každá z těchto skupin ovlivňuje specifické hormonální dráhy a receptory v těle a může zpomalit nebo zastavit růst nádorových buněk [2, 5].

Androgeny konkrétně testosteron (Obrázek 3-A) a dihydrotestosteron jsou hormony, které úzce souvisí s rakovinou prostaty, protože stimulují proliferaci normálních i nádorových buněk prostaty. Androgeny se mohou použít také k léčbě rakoviny prsu, protože se mohou vázat na androgenní receptory v rakovinných buňkách nebo působit jako prekurzory estrogenu [5].

Testosteron je k dispozici v různých formách, včetně perorálních tablet, intramuskulárních injekcí, subkutánních implantátů, transdermálních náplastí, gelů a bukálních tablet. Mezi hlavní závažné nežádoucí účinky testosteronu patří zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění, jako je srdeční infarkt a mrtvice, jaterní toxicita, agresivní chování, výkyvy nálad, riziko rozvoje benigní hyperplazie prostaty nebo rakoviny prostaty a poruchy spánku, včetně zhoršení spánkové apnoe [16, 17].

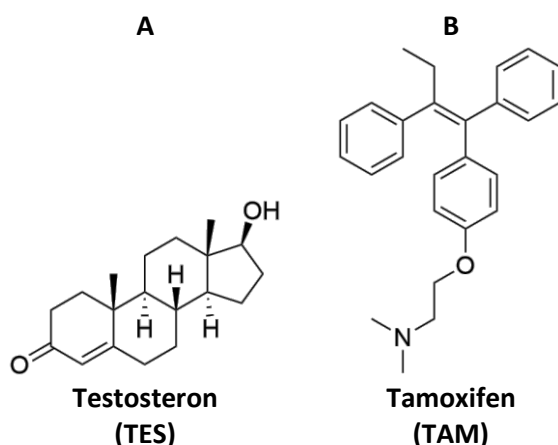
Antiandrogeny, jako flutamid, bicalutamid nebo cyproteronacetát, se používají k léčbě benigní hyperplazie prostaty. Agonisté androgenů, jako testosteron propionát nebo methyltestosteron, byly dlouhodobě využívány k léčbě metastatického karcinomu prsu [2, 5].

Estrogeny jsou ženské hormony, které ovlivňují širokou škálu biologických procesů v těle. Hrají klíčovou roli ve vývoji a regulaci reprodukčního systému. Jsou také spojovány s patogenezí nádorových onemocnění, zejména karcinomu prsu, endometria, vaječníků

a prostaty, kde mohou stimulovat proliferaci nádorových buněk. Jejich účinek však není jednoznačný, neboť za určitých okolností mohou podporovat nádorový růst, zatímco v jiných mohou působit protektivně a bránit vzniku maligních procesů [5].

Diethylstilbestrol, chlorotrianisen a ethinylestradiol se používají vzácně k léčbě rakoviny prostaty a prsu u postmenopauzálních žen. Jejich použití je omezeno kvůli riziku vzniku rakoviny dělohy nebo vagíny. Diethylstilbestrol je preferován při léčbě metastatické rakoviny prostaty [2, 5].

Antiestrogeny, jako tamoxifen (Obrázek 3-B), působí tím, že blokují estrogenové receptory a inhibují účinky estrogenu na nádorové buňky. Tamoxifen je dlouhodobě používaný lék pro hormonální léčbu rakoviny prsu u pre- a postmenopauzálních žen [2, 5]. Tamoxifen se užívá ve formě perorálních tablet. Nežádoucím účinkem je možný rozvoj endometria [8].



**Obrázek 3:** Struktury hormonů a příbuzných látek diskutovaných textu

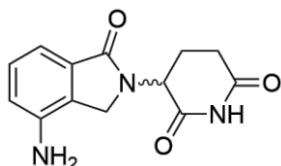
### 2.1.1.5 Imunoterapeutické látky

Imunoterapie je léčebný přístup, který využívá schopnosti imunitního systému rozpoznat a ničit rakovinné buňky. Mezi hlavní typy patří monoklonální protilátky, rakovinové vakcíny a nespecifické imunoterapie [2, 5].

Monoklonální protilátky jsou laboratorně vytvořené protilátky, které specificky cílí na antigeny na povrchu rakovinných buněk. Mohou blokovat receptory nebo signální dráhy, které buňky využívají k růstu, nebo vyvolat apoptózu. Inovativní biofarmaceutické produkty využívají tzv. konjugáty monoklonálních protilátek buď s chemoterapeutiky nebo radioaktivně značenými sloučeninami. Na rozdíl od výše diskutovaných málo selektivních chemoterapeutik, jsou tyto produkty určeny pro cílenou terapii. Mezi schválené protilátky pro léčbu rakoviny patří rituximab, trastuzumab a bevacizumab [5].

Rakovinové vakcíny představují další typ imunoterapie, který může být buď preventivní, nebo terapeutický. Preventivní vakcíny chrání proti virům, jako je lidský papilomavirus často označovaný zkratkou HPV. Tento virus je spojený s rakovinou děložního čípku. Na druhé straně je terapeutická vakcína, která stimuluje imunitní systém k boji proti rakovinným buňkám u pacientů s pokročilým rakovinným onemocněním prostaty [5].

Nespecifické imunoterapie zahrnují cytokiny jako interferony a interleukiny, které podporují imunitní odpověď proti rakovině. Lenalidomid (Obrázek 4), imunitní modulátor, zlepšuje aktivitu T-buněk a dalších imunitních komponent, což pomáhá tělu ničit rakovinné buňky. Používá se k léčbě mnohočetného myelomu [5]. Lenalidomid se podává perorálně, nejčastěji ve formě kapslí. Mezi nežádoucí účinky patří únava, infekce, snížený počet bílých krvinek, tromboembolické příhody, kožní vyrážky a zvýšené riziko rozvoje nádorových onemocnění. Lenalidomid je upřednostňován před thalidomidem díky lepší účinnosti, nižšímu riziku nežádoucích účinků a lepší toleranci, přičemž thalidomid zvyšuje riziko periferní neuropatie [18]. Další možností jsou inhibitory imunitních kontrolních bodů, jako nivolumab a pembrolizumab, které zlepšují schopnost imunitního systému ničit rakovinné buňky. Imunoterapie je slibná a v kombinaci s tradičními léčbami může přinést lepší výsledky [5].



**Lenalidomid  
(LND)**

**Obrázek 4:** Struktura lenalidomidu jako příklad imunoterapeutických látek diskutovaných textu

### 2.1.2 Toxicita cytostatik

Cytostatika mohou představovat pro člověka potenciální riziko, neboť některé z nich jsou považovány za karcinogenní, mutagenní nebo teratogenní. Některá cytostatika jsou podle klasifikace International Agency for Research on Cancer (IARC) zařazena mezi karcinogenní látky (skupina 1), pravděpodobně karcinogenní látky (skupina 2A) nebo možná karcinogenní látky (skupina 2B). Důležité je ale zmínit, že u mnoha cytostatik dosud chybí dostatek toxikologických údajů a nejsou proto klasifikována [2, 19].

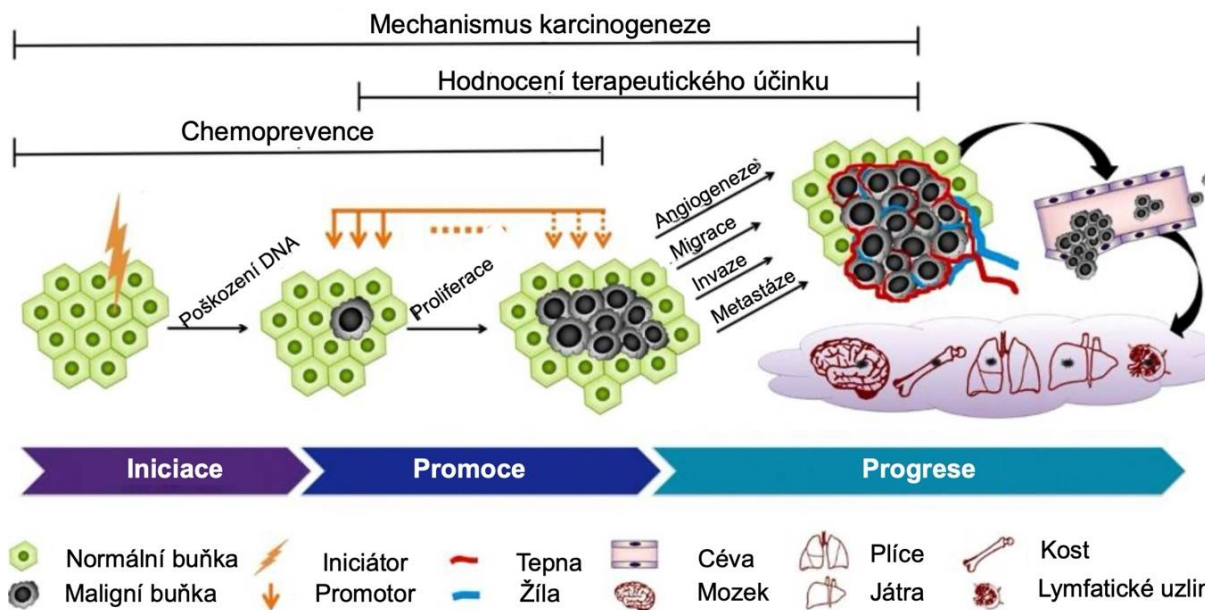
### 2.1.2.1 Karcinogenita

Karcinogenita popisuje schopnost látky, záření nebo jiného faktoru, obecně označovaného jako karcinogen, vyvolat rakovinu. Karcinogeny způsobují genetické změny v DNA buňky, které mohou vést k nekontrolovatelnému dělení buněk a vzniku nádorů. Karcinogeny mohou být chemického původu, fyzikálního (UV záření) nebo biologického (viry, bakterie). V případě cytostatik nás zajímá chemická karcinogeneze. Ta obvykle zahrnuje tři kroky – iniciaci, promoci a progresi (Obrázek 5).

Iniciace je první krok rakovinného vývoje, při kterém chemické sloučeniny (iniciátory) způsobují mutace v DNA buňky. Tyto změny jsou nevratné a vedou k náchylnosti buňky k dalším genetickým změnám. Čím vyšší je expozice iniciátoru, tím větší je riziko vzniku rakoviny.

Během promoce promotory podporují proliferaci zmutovaných buněk, což vede k růstu nádorové tkáně. Promotory působí pouze po předchozí expozici iniciátory a neovlivňují přímo DNA. Místo toho ovlivňují intracelulární dráhy zvyšující buněčnou proliferaci. Jejich účinnost závisí na dávce a může vést k malignitě, ale samy o sobě nezpůsobují rakovinu.

Progrese je posledním krokem rakovinného vývoje, kdy benigní nádor postupně přechází na maligní formu. Tento proces je spojen se změnami karyotypu, jako je aneuploidie, což vede k rychlejšímu růstu, invazivitě, metastázám a genetické nestabilitě. Jakmile progrese začne, je již nevratná [19, 20].



**Obrázek 5:** Mechanismus karcinogeneze, převzato z [20]

### 2.1.2.2 Mutagenita

Mutagenita, někdy označovaná také jako genotoxicita, označuje schopnost mutagenu vyvolat trvalé změny v DNA. Tyto změny, označované jako mutace, mohou vznikat přirozeně nebo být vyvolány vnějšími faktory, mezi které patří fyzikální, chemické a biologické vlivy. Fyzikální mutageny zahrnují ionizující záření, jako rentgenové a gama paprsky, a neionizující UV záření, které poškozuje DNA. Chemické mutageny, jako jsou např. aflatoxiny, nitrosaminy nebo polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), mění složení či strukturu DNA. Biologické mutageny zahrnují například viry, jako lidský papilomavirus (HPV), které zasahují do genetického materiálu buňky. Mechanismy mutageneze jsou rozmanité a zahrnují procesy, jako je alkylace bází DNA, tvorba aduktů DNA, chybné párování bází, zlomy DNA řetězců nebo vznik pyrimidinových dimerů. Tyto mechanismy mohou narušit proces replikace DNA, což vede ke vzniku bodových mutací, delecí, inverzí nebo rozsáhlých chromozomálních změn. Buňky disponují reparačními mechanismy, které chrání DNA před mutacemi, například excizní oprava, nukleotidová excizní oprava nebo rekombinační oprava. Tyto procesy odstraňují poškozené části DNA a brání vzniku trvalých mutací. Pokud však DNA není opravena před dělením buňky, může se mutace upevnit a přenést na další generace buněk. Mutace mohou mít různé důsledky, od pozitivních evolučních adaptací až po negativní efekty, jako genetické poruchy nebo vznik rakoviny. Studium mutageneze je klíčové pro pochopení karcinogeneze, genetických onemocnění a evoluce. Má také důležitý význam v toxikologii, při hodnocení

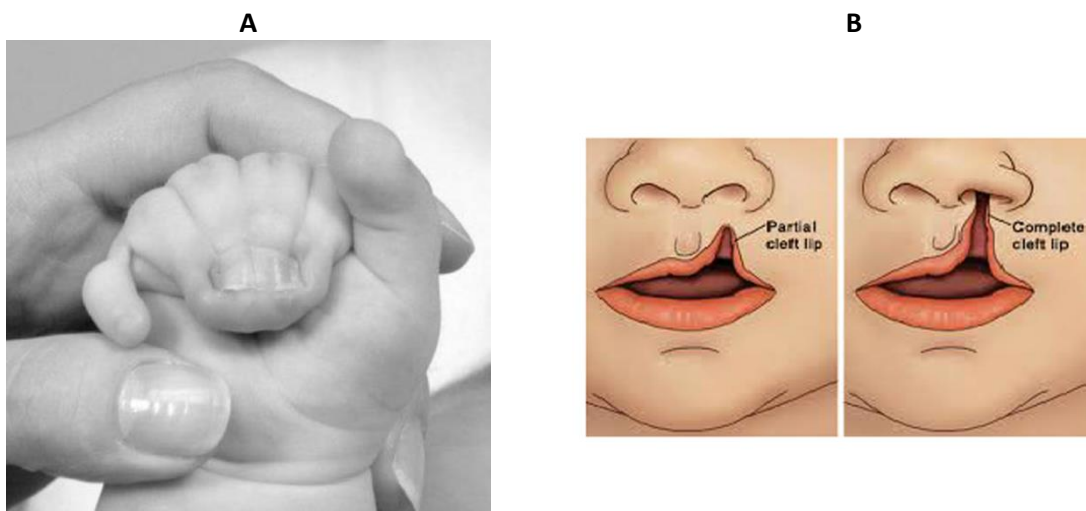
bezpečnosti chemických látek a vývoji léčiv zaměřených na opravu DNA nebo ochranu před mutagenními vlivy [19, 21–23].

### **2.1.2.3 Teratogenita**

Teratogenita je schopnost látek způsobovat vývojové vady plodu v prenatálním období těhotenství. Teratogeny, které jsou schopné vyvolat deformace, jsou ve většině případů pro matku netoxické a při nižších koncentracích nemusejí mít na plod žádný vliv. Expozice teratogeny je nejvíce riziková pro plod v prvním trimestru, protože v tomto období dochází k nejintenzivnějším vývojovým procesům. Působením teratogenních látek dochází k poruchám vývoje dítěte a vedou k možnému vzniku vývojových vad, jako je malformace končetin nebo rozštěp patra (Obrázek 6). Mezi teratogeny patří různé chemické, fyzikální nebo biologické faktory.

Chemické teratogeny zahrnují látky používané v průmyslu a zemědělství, jako jsou různá rozpouštědla, těžké kovy, polychlorované bifenyly, ale i alkohol a drogy. Mezi teratogeny patří také některá léčiva, například cytostatika, antibiotika a antiepileptika. Významným fyzikálním faktorem je zejména ionizující záření, konkrétně gama záření, dále zde patří vysoká teplota a mechanické částice. Mezi biologické teratogenní patogeny patří infekční činitelé, například virus zarděnek nebo bakterie způsobující syfilis.

Výzkum teratogenity je klíčový pro hodnocení bezpečnosti léčiv a chemických látek, které mohou být užívány těhotnými ženami, nebo pro kontrolu expozice těhotných žen v pracovním prostředí nebo každodenním životě [19, 24–27].



**Obrázek 6:** Příklady vývojových vad: (A) malformace končetin, převzato z [28] a (B) rozštěp patra, převzato z [29]

### 2.1.3 Monitoring cytostatik

Cytostatika představují riziko nejen pro pacienty podstupující léčbu, ale i pro zdravotnický personál, lékárníky a další pracovníky zapojené do jejich celkového oběhu. To zahrnuje osoby pracující ve výrobě, přepravě, skladování, přípravě, podávání, likvidaci těchto léčiv a také pracovníky odpovědné za sanitaci. Navzdory zavedeným bezpečnostním opatřením, jako je používání osobních ochranných prostředků, práce v laminárních boxech nebo rukavicových boxech, stále dochází ke kontaminaci pracovního prostředí cytostatiky. V době sepsání této práce nebyly pro cytostatika určeny žádné bezpečné expoziční limity, protože i minimální kontakt s těmito látkami může představovat významné riziko. Prevence se proto zaměřuje na důsledné dodržování bezpečnostních opatření a využívá obecného principu ALARA = As Low As Reasonably Achievable, tedy doslovně přeloženo „co nejnižší rozumně dosažitelné“ expozice. Klíčovou rolí v ochraně pracovníků hraje pravidelný monitoring pracovního prostředí. Tento monitoring umožňuje identifikovat a snížit kontaminaci, čímž pomáhá minimalizovat rizika spojená s expozicí cytostatiky a zajišťuje bezpečnější pracovní podmínky [19].

Cílem monitoringu pracovního prostředí je určit hladinu cytostatik a ověřit účinnost čistících postupů. K tomuto účelu se často využívá metoda stírání vzorků z povrchů. Celý proces monitoringu probíhá v několika fázích. Nejprve je nutné naplánovat strategii monitorování, poté následuje odběr vzorku, příprava vzorku, analýza vzorku a nakonec interpretace výsledků (Obrázek 7). Důležitou součástí je také proces dekontaminace. Pravidelné monitorování pomáhá identifikovat riziko expozice, zavádět preventivní opatření a ověřovat účinnost

dekontaminačních postupů. Spolehlivost výsledků závisí na jasně definovaných cílech a použití standardizovaných metod odběru i analýzy vzorků [19].



**Obrázek 7:** Schéma průběhu monitoringu

### 2.1.3.1 Strategie monitoringu

Strategie monitoringu v pracovním prostředí je klíčová pro hodnocení expozice pracovníků a účinnosti dekontaminačních opatření. Je vhodné, aby monitoring probíhal v pravidelných intervalech. Pravidelná kontrola umožňuje včas identifikovat problematická místa a sledovat dlouhodobý vývoj expozice [19, 30].

Pro monitoring je důležité určit konkrétní cytostatika, která se budou sledovat. Výběr cytostatik se zaměřuje zejména na nejčastěji používané látky s vysokou toxicitou. Kromě toho je nutné stanovit detekční limity a bezpečné koncentrace, aby bylo možné přesně vyhodnotit míru kontaminace [31].

Vzorky se obvykle odebírají stíráním z kritických míst, jako jsou podlahy nebo pracovní plochy. V případě ověření účinnosti čistících postupů, se monitoring provádí ve dvou fázích: před čištěním a po dekontaminaci [19, 30].

Vyhodnocení naměřených hodnot umožňuje optimalizovat pracovní postupy, zlepšit ochranu personálu a zajistit bezpečné pracovní prostředí [19]. Důsledná a systematická strategie monitoringu je proto nezbytná pro minimalizaci zdravotních rizik a efektivní kontrolu kontaminace cytostatiky v pracovním prostředí.

### **2.1.3.2 Odběr vzorku**

Odběr vzorku při monitoringu cytostatik v prostředí je ovlivněn několika faktory. Významným faktorem je druh a stav povrchu materiálu. Mezi další faktory patří velikost plochy, zařízení pro odběr vzorku, roztok pro zvlhčení odběrového zařízení nebo metoda stírání [19, 31].

Druh povrchu hraje klíčovou roli při výtěžnosti. Neporézní povrchy, jako je nerezová ocel, vykazují obecně vyšší výtěžnost než povrchy porézní. Příkladem porézního povrchu může být deska z polyvinylchloridu (PVC), která se nejčastěji používá jako vinylová podlaha v laboratorních a zdravotnických zařízeních. Stav povrchu má rovněž vliv na výtěžnost. S rostoucím opotřebením a drsností povrchu zpravidla dochází ke snížení výtěžnosti [19]. Pokud výtěžnost není kvantitativní, je možné aplikovat korekční faktor na získaný výsledek [30].

Pro přesné stanovení koncentrace je zásadní znát velikost plochy, ze které je vzorek odebírán. Tato plocha se může pohybovat v rozmezí (100–2000) cm<sup>2</sup>, ale nejčastěji se setkáme s plochou o velikosti 100 cm<sup>2</sup> [19, 30, 31]. U rovinných povrchů, jako jsou například podlahy nebo stěny, se výsledek kontaminace uvádí jako hmotnost na plochu (μg/cm<sup>2</sup>, ng/cm<sup>2</sup> nebo pg/cm<sup>2</sup>). V případě nerovinných povrchů, jako je například klika, se výsledek uvádí jako absolutní množství na celý předmět [19].

Pro odběr cytostatik z povrchu existuje několik možností vzorkovacích pomůcek (Obrázek 8). Můžeme využít ubrousky/utěrky [32], celulózové filtrační papíry [19, 32] nebo stěrové tyčinky [19, 31]. Ubrousky a utěrky se mohou lišit rozměry i materiálem, přičemž mohou být vyrobeny z papíru, celulózy nebo textilie. Stěrové tyčinky se skládají z nosné části (tyčinky) a pracovní části (hlavice). Tyčinka je zpravidla vyrobena z chemicky inertních materiálů, jako je polypropylen nebo hliník, aby nedocházelo k interakcím s analyty. Hlavice je tvořena savým

materiálem, například pleteninou z bavlny, viskózy nebo polyesteru, a slouží k efektivnímu sběru kontaminantů z povrchu [19, 31, 33].



**Obrázek 8:** Příklady vzorkovacích pomůcek: (A) ubrousky/utěrky, (B) filtrační papír a (C) stěrové tyčinky [34-36].

Nedílnou součástí efektivního odběru vzorku je použití vhodného smáčecího roztoku, který usnadňuje přenos analytu z povrchu do vzorkovací pomůcky. Smáčecí roztok musí být kompatibilní jak s polárními, tak i nepolárními sloučeninami, nesmí narušovat strukturu povrchu a musí splňovat požadavky na zdravotní nezávadnost. Nejčastěji se používají isopropanol, etanol, voda nebo jejich směsi; méně často se využívá metanol či acetonitril. V literatuře lze také najít příklady roztoků s přídavkem kyseliny mravenčí [19, 31]. Důležitý je i objem roztoku – příliš velké množství může zhoršit manipulaci s odběrovým materiálem a snížit účinnost stěru. Proto je nutné optimalizovat složení i množství smáčecího roztoku [19].

Pro úspěšný odběr vzorku je také důležitá stírací metoda. Obvykle se používají vlhčené stírací materiály, protože suché mají nižší schopnost zachytit látku. Někdy může být použit závěrečný suchý krok k odstranění zbytků rozpouštědla. Důležitým aspektem je také správná aplikace vlhčícího roztoku, který by měl být nanášen přímo na vzorkovací pomůcku, nikoli na povrch, zejména pokud je nerovný. Stírání povrchu by mělo být vždy prováděno ve dvou nebo tří směrech. Kvalita odběru vzorku může být ovlivněna i zkušeností pracovníků, což zdůrazňuje potřebu školení a zavedení jednotného postupu [19, 31].

Pro zachování chemické stability cytostatik jsou důležité také podmínky skladování nebo přepravy [19]. Studie ukazují, že krátkodobé skladování (24–48 hodin) v chlazených podmínkách vede k minimální degradaci, zatímco delší skladování může ovlivnit stabilitu některých léčiv [37].

### 2.1.3.3 Příprava vzorku

Odebraný vzorek pomocí odběrových zařízení je nutné převést do podoby vhodné pro analýzu. Nejvhodnějším způsobem převedení vzorku do roztoku je extrakce rozpouštědlem [19, 31, 32]. Klíčovým faktorem pro dosažení uspokojivých výsledků je povaha rozpouštědla použitého při extrakci. Rozpouštědlo by také mělo být kompatibilní s metodou pro analýzu. Mezi běžně používaná rozpouštědla patří isopropanol, etanol, voda nebo jejich směsi. Méně často se využívá metanol či acetonitril. K těmto rozpouštědlům mohou být přidána aditiva jako je například kyselina mravenčí, kyselina octová anebo dimethylsulfoxid [19, 31].

Pro maximalizaci výtěžnosti extrakce je nezbytná optimalizace jednotlivých fází extrakčního procesu. Mezi klíčové optimalizované parametry patří například doba extrakce, která může ovlivnit výtěžnost v závislosti na její délce. Dále může použitá extrakční technika ovlivnit efektivitu uvolnění analytu. Nejčastěji používané postupy zahrnují třepání na lineárních nebo orbitálních třepáčkách, intenzivní třepání na vortexu nebo sonikace. Optimalizace těchto faktorů vede k vyšší účinnosti extrakce, lepší reprodukovatelnosti výsledků a minimalizaci ztrát analytu [19, 31].

Poslední úprava vzorku před analýzou obnáší odstranění suspendovaných částic. Běžnými metodami pro odstranění pevných částic je centrifugace nebo filtrace. I zde je nutné proces optimalizovat. U centrifugace hraje roli odstředivá síla a čas. U filtrace hraje roli volba materiálu filtru a velikost pórů [19, 31].

### 2.1.3.4 Analýza vzorků

Poslední částí je analýza vzorků, ta zahrnuje měření pomocí pokročilých instrumentálních technik a následné vyhodnocení získaných dat s cílem přesně kvantifikovat přítomnost stopových koncentrací cytostatik. Aby bylo možné získat spolehlivé a reprodukovatelné výsledky, je nezbytné provést validaci analytické metody. Tomu však předchází její pečlivá optimalizace, která zajišťuje, že metoda splňuje požadované parametry pro následnou validaci a správnou interpretaci výsledků [19, 31, 32].

Pro kvantifikaci cytostatik je nezbytné využít vysoce citlivou analytickou metodu s nízkou mezí stanovitelnosti. Tato metoda musí být schopna nejen detekovat, ale i přesně kvantifikovat reziduální stopy cytostatických léčiv odebraných z analyzovaných povrchů [31].

Pro stopové stanovení cytostatik lze využít kapalinovou (LC) nebo plynovou chromatografii (GC) ve spojení s vhodnými detekčními systémy, jako jsou UV spektrofotometrie (UV) nebo

hmotnostní spektrometrie (MS). V praxi se nejčastěji setkáváme s kombinacemi LC-UV, GC-MS nebo LC-MS, přičemž nejvyšší citlivost a selektivitu pro analýzu stopových koncentrací cytostatik zpravidla poskytuje spojení LC-MS. Kromě toho také umožňuje současně analyzovat více látek v jednom vzorku. Hmotnostní spektrometrie poskytuje komplexní informace o analyzovaném vzorku. Nevýhodou je však složitost vybavení a vysoké pořizovací a provozní náklady [19, 31, 32].

Pro monitoring cytostatik v prostředí se nejčastěji využívá spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), který zajišťuje vysokou selektivitu a citlivost analýzy. V literatuře se nejčastěji setkáme s ionizací elektrosprejem (ESI), která je vhodná pro polární a středně polární sloučeniny [31–33]. Separace probíhá převážně v systému s obrácenými fázemi (Reversed-Phase, RP), kde nepolární stacionární fázi tvoří silikagel modifikovaný uhlíkatými řetězci, např. C18. Mobilní fázi většinou tvoří voda s přídavkem kyseliny mravenčí a organickým modifikátorem jako je acetonitril nebo metanol [19, 31–33].

V případě cytostatik obsahujících platinu je možné pro jejich stopovou analýzu využít buď hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) nebo elektrochemickou techniku, jako je voltametrie [19]. ICP-MS nabízí vynikající citlivost a selektivitu pro stanovení platinových sloučenin, zatímco voltametrie může poskytnout cenově výhodnější alternativu s jednodušší instrumentací.

#### **2.1.4 Dekontaminace**

Cílem dekontaminace je odstranění co největšího množství cytostatik z různých povrchů. Neexistuje však standardizovaná metoda, která by byla stejně účinná pro všechna cytostatika. Proto je při tvorbě dekontaminačního postupu nutné zohlednit několik klíčových faktorů:

- počet kontaminantů a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti
- povaha dekontaminačních činidel s ohledem na polaritu cytostatik (lipofilní vs. hydrofilní)
- časový interval provádění dekontaminace
- charakteristika povrchu z hlediska schopnosti zadržovat nečistoty
- odolnost povrchu vůči dekontaminačním prostředkům – některé prostředky mohou poškodit povrchy, např. chlornan sodný může degradovat nerezovou ocel a isopropanol plastové povrchy.

- doba působení dekontaminačního prostředku na povrch a objem použitého rozpouštědla
- volba bezpečného rozpouštědla – nevhodně zvolené rozpouštědlo může při procesu dekontaminace generovat nebezpečné produkty [30]

Vzhledem k řadě uvedených faktorů je stanovení dekontaminačního postupu složité. Je proto nezbytné, aby tento postup splňoval několik klíčových podmínek:

- musí efektivně odstraňovat cytostatika
- musí být bezpečný a jednoduchý pro obsluhu
- volit takové dekontaminační činidlo, které nebude generovat nebezpečné produkty [30]

Proces dekontaminace může probíhat různými způsoby. Povrch může být stírán pohybem shora dolů nebo opakovaným intenzivním stíráním po dobu několika sekund. Stěr se může provádět pomocí ubrousků určených pro úklid prostor. Stěr se obvykle provádí pomocí ubrousků určených pro úklidové účely, které jsou před použitím navlhčeny definovaným množstvím dekontaminačního činidla [38]. Mezi běžně používaná dekontaminační činidla patří roztoky isopropanolu, etanolu, peroxidu vodíku, dodecylsulfátu sodného a chlornanu sodného, které se obvykle aplikují ve formě vodných směsí v různých koncentracích [30, 38]. Pro dekontaminaci lze rovněž použít komerčně dostupné přípravky, jako například SAVO, MAXX Magic 2, Brial Action Plus, Ecolab Into Action, Plus, Jar, CIF a další [39].

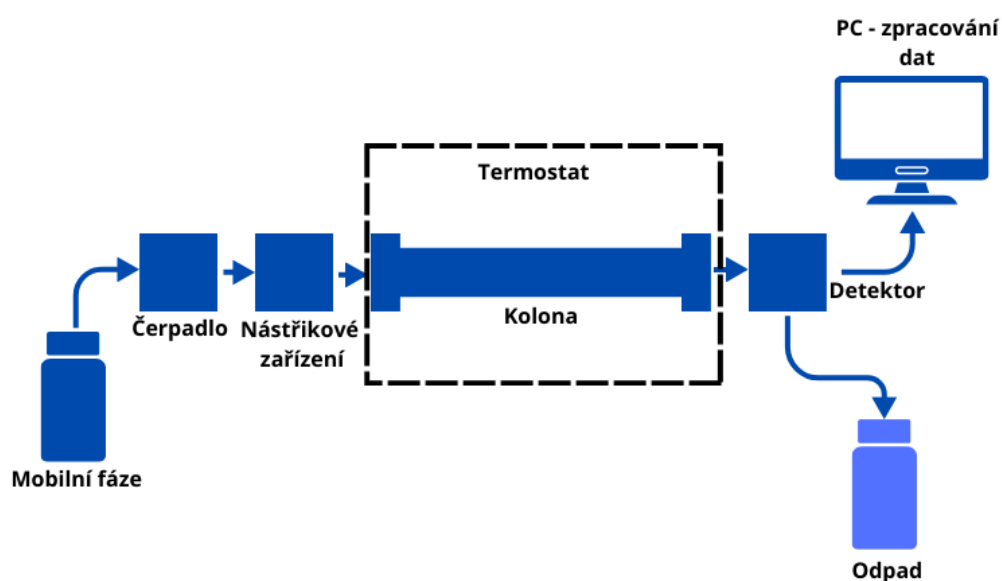
## **2.2 LC-MS instrumentace**

Jedná se o spojení kapalinové chromatografie a detekce pomocí hmotnostního spektrometru, což umožňuje vysoce citlivou a selektivní analýzu široké škály analytů od malých molekul až po složité biomolekuly. Výhodou této instrumentace je separace složité matrice pomocí kapalinové chromatografie s různým módem separace, následná detekce a případná identifikace jednotlivých separovaných látek. Toto spojení umožňuje v některých případech identifikovat a kvantifikovat i látky, které nejsou chromatograficky zcela oddělené.

### **2.2.1 Kapalinová chromatografie**

Kapalinová chromatografie (LC) je vysoce efektivní separační technika, která umožňuje rozdělení složek analytické směsi na základě jejich rozdílné afinity ke dvěma fázím – mobilní fázi a stacionární fázi. Tento princip je základem kapalinové chromatografie, která využívá vysokotlaké čerpadlo k čerpání mobilní fáze chromatografickou kolonou naplněnou stacionární

fází. Separace analytů probíhá na základě fyzikálně-chemických interakcí. Instrumentace se skládá z jednoho nebo více rezervoárů složek mobilní fáze, jednoho nebo více vysokotlakých čerpadel, nástřikového systému, chromatografické kolony umístěné v termostatu, detektoru a počítače pro sběr a zpracování dat (Obrázek 9). Kapalinové chromatografy využívané pro LC-MS analýzy jsou stejné jako pro jiné techniky kapalinové chromatografie. Můžeme je rozdělit zejména na základě provozního tlaků separace, na HPLC (high performance liquid chromatography), s maximálními tlaky do cca 700 bar a UHPLC (ultra high performance liquid chromatography) s maximálními tlaky do cca 1200 bar.



**Obrázek 9:** Schéma LC instrumentace

V závislosti na složení analyzované směsi lze volit mezi isokratickou a gradientovou elucí. Isokratická eluce udržuje konstantní složení mobilní fáze po celou dobu analýzy a je vhodná pro jednoduché separace. Při separaci komplexních směsí je často nezbytné použití gradientové eluce, která umožňuje postupnou změnu složení mobilní fáze (zvyšování eluční síly), což zlepšuje separaci složitějších směsí a zkracuje dobu analýzy. Z pohledu míchání gradientu lze kapalinové chromatografy rozdělit na vysokotlaké binární systémy a nízkotlaké gradientové systémy. Vysokotlaké binární systémy míchají složky mobilní fáze až za pumpou a jejich hlavním benefitem je malý systémový objem, což vede k přesnějším gradientům a užším chromatografickým píkům. Nevýhoda těchto systémů je omezení na míchání pouze dvousložkových gradientů. V případě nízkotlakých gradientových systémů dochází k míchání

složek mobilní fáze před pumpou. Hlavní výhodou je možnost míchání až čtyř různých složek mobilní fáze. To umožňuje přípravu mobilní fáze s komplexním složením. Při použití nízkotlakého gradientového systému musí uživatel počítat s větším systémovým objemem, který se při gradientových elucích projeví zpožděním gradientu.

Při LC-MS analýze se používá několik separačních technik, které závisí na vlastnostech analyzovaných látek – zejména na jejich polaritě, náboji, molekulové hmotnosti a chemické struktuře. Nejčastěji se používá chromatografie na reverzní fázi (RP), kde nepolární stacionární fázi tvoří silikagel modifikovaný uhlíkatými řetězci, např. C18, C8 nebo C4. Při použití fenylových nebo perfluorfenylových fází se kromě hydrofobní interakce analytu a stacionární fáze mohou uplatňovat i jiné mechanismy. Pro velmi polární analyty se s výhodou používá chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC). Polární stacionární fáze je tvořena silikagelem nebo silikagelem modifikovaným polárními skupinami. Pro separace iontových látek lze využít iontově-párovou chromatografii (IPC) nebo iontově-výměnnou chromatografii (IEX). Oproti tomu je chromatografie na normální fázi (NP) výrazně méně kompatibilní s LC-MS než výše zmíněné techniky.

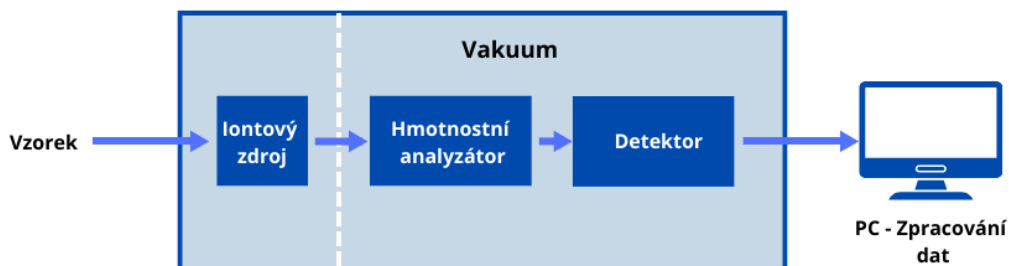
Na stacionární fázi používanou při LC-MS se kladou určité specifické požadavky, které vycházejí z potřeb hmotnostní detekce i z typických podmínek při analýze. Stabilita stacionární fáze je v tomto kontextu zásadní pro spolehlivost, opakovatelnost a životnost kolony. Mezi hlavní požadavky patří chemická stabilita vůči aditivům v mobilní fázi a širokému rozsahu pH. Důležitá je také její mechanická stabilita, protože LC-MS analýzy často využívají UHPLC systémy. V neposlední řadě je důležité nízké „krvácení“ fáze (bleeding), aby nedocházelo k uvolňování částic, siloxanů nebo selektorů do mobilní fáze.

Pro detekci eluovaných složek se používá několik typů detekce, v závislosti na povaze analyzovaných látek a požadované citlivosti a selektivitě. Mezi nejčastější druhy detektorů patří detektor s nastavitelnou vlnovou délkou (UV-Vis), detektor s diodovým polem (DAD / PDA), fluorescenční (FLD), elektrochemický (ECD), refraktometrický (RID), detektor rozptylem světla (ELSD) a hmotnostní spektrometr (MS), který poskytuje nejvyšší selektivitu a citlivost.

## **2.2.2 Hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie (MS) je vysoce citlivá analytická technika, která umožňuje identifikaci a kvantifikaci chemických sloučenin na základě interpretace jejich hmotnostního spektra, které zobrazuje intenzitu iontů v závislosti na jejich poměru hmotnosti k náboji  $m/z$ . Typicky probíhá ve třech hlavních krocích: ionizace analyzovaných látek, separace vzniklých

iontů v hmotnostním analyzátoru a jejich následná detekce (Obrázek 10). Ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-MS) se jedná o výkonnou metodu využívanou v různých oblastech analytické chemie, včetně farmacie, biochemie a environmentální analýzy [40, 41].



**Obrázek 10:** Schéma MS instrumentace

Pro ionizaci analytů v LC-MS se nejčastěji využívají měkké ionizační techniky, které minimalizují fragmentaci a umožňují přesnou identifikaci molekul. Elektrosprejová ionizace (ESI) nebo vyhřívaná elektrosprejová ionizace (HESI) je ideální pro ionizaci středně a vysoce polárních sloučenin, zatímco chemická ionizace při atmosférickém tlaku (APCI) je vhodná pro méně polární látky. Ačkoliv existují i další ionizační techniky, jejich použití je v analýze tzv. malých molekul (<2000 Da) spíše okrajové.

Separace iontů na základě jejich poměru  $m/z$  probíhá v hmotnostním analyzátoru, jehož výběr ovlivňuje selektivitu, rozlišení a rychlost analýzy. Hmotnostní spektrometry lze dělit na analyzátor s nízkým rozlišením (LRMS) a vysokým rozlišením (HRMS) hmotnostního spektra. Rozlišovací schopnost, rozlišení, je jedním ze základních parametrů hmotnostních analyzátorů může být nedefinováno jako plná šířka v polovině maxima (FWHM). Hmotnostní spektrometry, které dosahují rozlišení minimálně 20000, lze označovat jako HRMS. Toto rozdělení vychází z přesnosti měření, se kterou analyzátor změří poměr  $m/z$  pro daný ion. Hmotnostní analyzátor lze dále dělit na základě způsobu dělení iontů na (i) skenující (kvadrupólový analyzátor, sektorový magnetický analyzátor), (ii) iontové pasti (iontová past, Orbitrap™, FT-ICR) a (iii) průletové (TOF).

Pro účely kvantitativní analýzy a v závislosti na použitém hmotnostním spektrometru lze použít tyto typy skenů:

- záznam kompletního hmotnostního spektra (Full MS scan) – zaznamenává celé spektrum iontů v určitém rozmezí  $m/z$  a je vhodný pro screening neznámých látek
- selektivní záznam iontu (SIM) – zaměřuje na detekci konkrétního iontu a zvyšuje citlivost analýzy
- selektivní záznam iontových reakcí (SRM) – využíváný v tandemové hmotnostní spektrometrii, monitoruje přechody mezi prekurzorovým a produktovým iontem a zajišťuje maximální selektivitu a citlivost
- vícenásobný záznam iontových reakcí (MRM) – více SRM přechodů v rámci jedné analýzy
- paralelní záznam iontových reakcí (PRM) – vysokorozlišovací obdoba MRM pro Orbitrap™

### 2.2.2.1 Orbitrap™

Vzhledem k zaměření této práce bude níže podrobněji popsán moderní typ hmotnostního analyzátoru – Orbitrap™, který vyniká vysokým rozlišením a přesností určení  $m/z$ . Tento analyzátor byl poprvé uveden do praxe ruským vědcem Alexandrem Makarovem a komerčně zaveden společností Thermo Fisher Scientific [42, 43]. Z technického hlediska se jedná o vysoce výkonný přístroj, který využívá elektrostatickou iontovou past k zachycení iontů a měření jejich axiálních oscilací podél centrální elektrody. Na rozdíl od FT-ICR spektrometru nevyžaduje Orbitrap™ přítomnost magnetického pole ani vysokofrekvenčního napětí, což výrazně zjednodušuje jeho konstrukci, provoz i údržbu. Díky výhodným vlastnostem dosahuje vysokého rozlišení – až 1 000 000 (FWHM) – a výjimečné přesnosti určení  $m/z$  (chyba méně než 1 ppm) a to při relativně nižších pořizovacích nákladech oproti jiným vysoce výkonným analyzátorům. Orbitrap™ umožňuje analýzu širokého spektra molekul, od malých metabolitů až po intaktní proteiny, a je hojně využíván v oblastech jako jsou proteomika, metabolomika, farmacie, toxikologie či environmentální analýza. Díky své kombinaci vysoké citlivosti, přesnosti a konstrukční robustnosti se jedná o ideální nástroj jak pro rutinní laboratorní měření, tak pro vědecký výzkum.

Ionty generované v ionizačním zdroji jsou následně směřovány iontově-optickým systémem do kvadrupólového analyzátoru, který funguje jako hmotnostní filtr. Kvadrupól selektivně propouští ionty s požadovaným  $m/z$  a tyto vybrané ionty jsou pak směřovány do kolizní cely (IRM), kde jsou ionty krátkodobě zadrženy, dokud nedojde k jejich energetickému vyrovnání

nebo fragmentaci. Po tomto procesu jsou ionty dávkovány do vlastní orbitální iontové pasti, což je hlavní detekční část přístroje.

Hlavním principem detekce v Orbitrapu™ je oscilace iontů kolem centrální elektrody. Ionty vkládané do Orbitrapu™ vykonávají jak radiální, tak axiální oscilaci. Axiální oscilace, která je orientována podél osy  $z$ , je nepřímo úměrná odmocnině  $m/z$ . Frekvence této oscilace závisí na poměru  $m/z$ , čím vyšší je  $m/z$ , tím nižší je frekvence oscilace a naopak. Tento pohyb iontů indukuje elektrický signál na vnějších elektrodách Orbitrapu™. Tento signál je zesílen, dochází k analogově-digitalní konverzi a pomocí Fourierovy transformace převeden na hmotnostní spektrum.

## **2.3 Validace analytických metod**

Validace analytických metod dle směrnice ICH Q2(R2) je zásadním krokem při zajišťování spolehlivosti a přesnosti analytických postupů používaných při kontrole kvality léčiv. Proces validace slouží k prokázání, že analytická metoda je vhodná pro zamýšlené použití a zahrnuje několik klíčových parametrů, které musí být systematicky ověřeny a zdokumentovány [44]. Níže budou blíže popsány jednotlivé validační testy.

### **2.3.1 Specificita/Selektivita**

Specificita metody znamená schopnost jednoznačně identifikovat a kvantifikovat požadovaný analyt bez interference od jiných složek matrice, nečistot nebo degradačních produktů. Prokazuje se například chromatografickým rozlišením píku analytu od jiných složek, použitím ortogonálních metod (např. porovnání výsledků HPLC a LC-MS) nebo spektrálními technikami, které umožňují přesné odlišení analytu na základě jeho unikátních fyzikálně-chemických vlastností.

### **2.3.2 Rozsah metody**

Rozsah měření definuje interval mezi nejnižší a nejvyšší koncentrací analytu, ve kterém metoda poskytuje výsledky s přijatelnou úrovní přesnosti, správnosti a odezvy. Ověření rozsahu obvykle zahrnuje testování linearitu odezvy nebo validaci vhodného kalibračního modelu, např. pro nelineární odezvy, jako jsou enzymatické nebo imunochemické testy. Rozsah metody definuje, v jakém koncentračním intervalu je analytická metoda validně použitelná.

### 2.3.3 Správnost

Správnost vyjadřuje míru shody mezi naměřenou hodnotou a skutečným nebo referenčním obsahem analytu ve vzorku. Testování správnosti může probíhat porovnáním s referenčním materiálem známé čistoty, spikingem (přídavkem známého množství analytu do vzorku a následným měřením jeho výtěžnosti) nebo porovnáním výsledků s ortogonální metodou. Správnost je klíčová pro kvantitativní metody stanovení obsahu léčivých látek, nečistot apod.

### 2.3.4 Přesnost

Přesnost analytické metody vyjadřuje míru variability výsledků při opakovaném měření stejného vzorku za stejných nebo podobných podmínek. Tento parametr lze rozdělit na opakovatelnost a mezilehlá preciznost. Opakovatelnost se posuzuje v rámci jedné laboratoře, kde je měření prováděno stejným analytikem na stejném přístroji a během krátkého časového období. Naproti tomu mezilehlá preciznost zahrnuje variabilitu způsobenou rozdíly mezi analytiky, použitými přístroji, dny měření či jinými podmínkami prostředí. Přesnost metody se obvykle vyjadřuje pomocí statistických ukazatelů, jako je směrodatná odchylka (SD), relativní směrodatná odchylka (RSD) nebo interval spolehlivosti, které umožňují kvantifikovat její spolehlivost a reprodukovatelnost.

### 2.3.5 Robustnost

Robustnost metody popisuje její odolnost vůči malým, avšak nevyhnutelným změnám experimentálních podmínek, jako jsou změny pH mobilní fáze, složení rozpouštědel, teploty kolony nebo průtoku mobilní fáze. Hodnocení robustnosti je součástí vývoje analytické metody a pomáhá identifikovat kritické parametry, které mohou ovlivnit výsledky analýzy.

### 2.3.6 Stanovení mezí detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ)

Limit detekce (LOD) představuje nejmenší množství analytu, které lze spolehlivě detekovat, ale ne nutně kvantifikovat. Odhaduje se vizuálně, na základě poměru signálu k šumu  $S/N \geq 3:1$  nebo pomocí výpočtu ze směrodatné odchylky odezvy a sklonu kalibrační křivky. Limit kvantifikace (LOQ) je nejmenší koncentrace analytu, kterou lze kvantifikovat s dostatečnou přesností a správností. Obvykle se stanovuje při poměru signálu k šumu  $S/N \geq 10:1$  nebo pomocí validačních testů přesnosti a správnosti. Pro analytické metody určené k detekci stopových množství analytu, jako je analýza nečistot nebo reziduálních kontaminantů, je přesné určení LOD a LOQ zásadní.

### 2.3.7 Stabilita

Studie stability se zaměřují na stabilitu zásobních roztoků i stability vzorků v různých podmínkách skladování. Testování probíhá při různých teplotách a v různých časových intervalech. Hodnotí se jak stabilita samotných analytů, tak i celého analytického procesu, například stabilita vzorků v autosampleru.

### 2.3.8 Test způsobilosti systému

Test způsobilosti systému (SST) ověřuje, jestli je analytický systém připraven k měření a metoda vykazuje požadovanou výkonnost. Mezi typická kritéria testu patří opakovatelnost retenčních časů, opakovatelnost odezvy, rozlišení mezi píky, symetrie píku, počet teoretických pater kolony nebo citlivost detekce. SST je standardní součástí analytických metod, zejména chromatografických technik.

## 2.4 Příklady realizovaného monitoringu cytostatik

Monitoring cytostatik v životním prostředí, zejména vnitřním, je předmětem řady vědeckých studií. Praktické využití těchto studií spočívá především v identifikaci a kvantifikaci expozice zdravotnického personálu a pacientů těmito látkami zejména ve zdravotnických zařízeních, kde dochází k manipulaci s nimi. Velká část výzkumů je směřována na analýzu více látek. Současné sledování několika cytostatik umožňuje komplexní přehled míry kontaminace.

Na základě dostupných literárních údajů byl zpracován přehled metod používaných pro stanovení cytostatik v rámci monitoringu prostředí. Tabulka 1 ukazuje srovnání aplikovaných instrumentálních technik, kde převažuje použití LC-MS/MS metodiky. Jednotlivé studie využívají různé typy chromatografických kolon a odlišné separační podmínky, avšak mobilní fáze bývá často obdobná, což poukazuje na její osvědčenou účinnost při separaci cytostatik. Studie se rovněž liší v dosažených detekčních limitech, které se pohybují v širokém rozmezí v závislosti na použité instrumentaci, typu matrice a konkrétních sledovaných látkách.

Tabulka 2 naopak nabízí porovnání výtěžnosti pro různé povrchy, typ použitého odběrového zařízení a extrakční proceduru. Tyto metody vykazují značnou variabilitu, což je dáno nejen rozdílným charakterem povrchových materiálů, ale také rozdílnou velikostí vzorkovaných ploch. Klíčovými faktory ovlivňující výtěžnost jsou rovněž typ použitého odběrového zařízení, volba extrakčního rozpouštědla a samotný postup extrakce. Tyto parametry jsou často optimalizovány s ohledem na specifické fyzikálně-chemické vlastnosti jednotlivých cytostatik.

Z přehledu vyplývá, že se povrchy v jednotlivých studiích liší. Často se vyskytují běžné materiály jako je nerezová ocel nebo PVC, avšak v některých pracích nebyl povrch specifikován. Nejčastěji používanými vzorkovacími zařízeními byly celulózové filtry (Whatman 42), ubrousky (Kimwipes®) a polyesterové stěrky (Texwipe® TX714A). Ze studie [45] vyplývá, že při použití celulózových filtrů (Whatman 42) a polyesterových stěrkovacích tyčinek (Texwipe® TX714A) byly dosaženy hodnoty výtěžnosti vzájemně srovnatelné, což naznačuje, že oba typy odběrových materiálů poskytují obdobnou účinnost při extrakci cílových látek z povrchů.

Extrakční rozpouštědla se v jednotlivých studiích liší zejména složením, kdy jsou běžně používány směsi vody a organických rozpouštědel, jako je acetonitril, isopropanol nebo dimethylsulfoxid (DMSO), a to v různých poměrech. Tyto směsi jsou často doplňovány o přísadu kyseliny mravenčí nebo kyseliny octové, který slouží ke stabilizaci analytů a zlepšení jejich extrakce. Variabilita ve složení extrakčních roztoků je interpretována jako výsledek snahy o optimalizaci extrakčních podmínek vzhledem ke specifickým fyzikálně-chemickým vlastnostem cílových cytostatik.

**Tabulka 1:** Přehled detekčních limitů

Analyt	Instrumentace	Stacionární fáze	Mobilní fáze	LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	Cit.
CYC IFO PAC	LC-UV	Symmetry C18 150 × 4.6 mm, 5 μm	(A) 10 mM fosfátový pufr, pH 6 (B) ACN	CYC: 100 IFO: 20 PAC: 30	[46]
5-FU CYC DOX DOC	UHPLC-MS/MS (QqQ)	SHIM-PACK XR-ODC-C18 100 × 3 mm, 2.2 μm	(A) 0,1 % kyselina mravenčí (B) ACN	5FU: 25 CYC: 50 DOX: 50 DOC: 50	[47]
CYC DOC DOX EPI ETO GEM IFO IRI MTX PAC TOP	Mikro-LC- MS/MS	YMC Triart C18 50 × 0.3 mm, 1.9 μm	(A) 0,1 % kyselina mravenčí (B) ACN + 0.1 % kyselina mravenčí	CYC: 2,5 DOC: 17,9 DOX: 1,9 EPI: 3,5 ETO: 4,0 GEM: 2,5 IFO: 3,9 IRI: 4,6 MTX: 4,5 PAC: 7,6 TOP: 2,2	[48]
5-FU CYC DOX	LC-MS	Pursuit XRs Ultra 100 × 2 mm, 2.8 μm	(A) 0,1 % kyselina mravenčí (B) ACN/H <sub>2</sub> O	5FU: 50 CYC: 5 DOX: 50	[49]
5FU CYC DOX EPI GEM IFO	UPLC-MS/MS (QqQ)	HSS T3 50 × 2.1 mm, 1.8 μm	(A) 0.5 % kyselina octová (B) ACN + 0.5 % kyselina octová	5FU: 1,25 CYC: 0,2 DOX: 1,25 EPI: 5 GEM: 0,2 IFO: 0,4	[50]
CYC	LC-MS/MS	L-column 2 ODS 150 × 2.1 mm, 5 μm	(A) H <sub>2</sub> O (B) ACN	CYC: 5	[51]

5-FU = 5-Fluorouracil, CYC = Cyklofosfamid, DOC = Docetaxel, DOX = Doxorubicin, EPI = Epirubicin, ETO = Etoposid, GEM = Gemcitabin, IFO = Ifosfamid, IRI = Irinotekan, MTX = Methotrexát, PAC = Paklitaxel, TOP = Topotekan

**Tabulka 2:** Přehled vzorkovacího a extrakčního procesu

<b>Povrch / Vzorkovací plocha (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Vzorkovací zařízení</b>	<b>Extrakční roztok / Extrakční procedura</b>	<b>Výtěžnost (%)</b>	<b>Cit.</b>
Neuveden / 400	Celulózový filtr (Whatman 42, 55 mm)	MeOH/ACN/10 mM fosfátový pufr, pH 6 (25/10/65) / ultrazvuk 10 min	CYC: 94* IFO: 96* PAC: 89*	[46]
Lam. deska Rukavice Zámek dveří / N/S	Ubrousky (Kleenex tissue)	MeOH/ethyl acetát (1/2) ultrazvuk 30 min	5-FU: 105# CYC: 103# DOX: 61# DOC: 102#	[47]
Neuveden / 900	Ubrousky (Kimwipes®)	H <sub>2</sub> O/isopropanol (70/30 + 0,1 % kyselina mravenčí) / ultrazvuk 15 min	CYC: 110* DOC: 110* DOX: 85* EPI: 90* ETO: 120* GEM: 105* IFO: 115* IRI: 105* MTX: 120* PAC: 110* TOP: 100*	[48]
Neuveden / 900	Ubrousky (Kimwipes®)	H <sub>2</sub> O/ACN (85/15 + 0,1 % kyselina mravenčí) / ultrazvuk 15 min	CYC: 90* EPI: 55* IFO: 90*	[48]
Neuveden / 900	Ubrousky (Kimwipes®)	H <sub>2</sub> O/DMSO (95/5 + 0,1 % kyselina mravenčí) / ultrazvuk 15 min	CYC: 100* EPI: 25*	[48]
Nerezová ocel / 100	Celulózový filtr (Whatman 42, 55 mm)	1 %kyselina octová / třepačka 10 min; SPE	5-FU:76.3* CYC:76.3* DOX:70.0*	[49]
Nerezová ocel 304 / 100	Celulózový filtr (Whatman 42, 55 mm)	ACN/isopropanol/H <sub>2</sub> O (20/45/35) / orbitální třepačka 30 min	MIT: 62–98#	[45]
Nerezová ocel 304 / 100	Polyesterová stěrka (Texwipe® TX714A)	ACN/isopropanol/H <sub>2</sub> O (20/45/35) / orbitální třepačka 30 min	MIT: 61–98#	[45]
PVC / 100	Celulózový filtr (Whatman 42, 55 mm)	ACN/isopropanol/H <sub>2</sub> O (20/45/35) / orbitální třepačka 30 min	MIT: 51–63#	[45]
PVC / 100	Polyesterová stěrka (Texwipe® TX714A)	ACN/isopropanol/H <sub>2</sub> O (20/45/35) / orbitální třepačka 30 min	MIT: 53–63#	[45]
Neuveden / 100	Celulózový filtr (Whatman 42, 55 mm)	1 %kyselina octová / třepačka 20 min; SPE	5-FU: 21* CYC: 75* DOX: 18* EPI: 14* GEM: 54* IFO: 81*	[50]

\* Reportována je výtěžnost extrakce ze vzorkovacího zařízení

# Reportována je výtěžnost stěru z testovaného povrchu

MIT = Mitomycin, ostatní cytostatika viz Tabulka 1

Celkově lze konstatovat, že výběr vhodné kombinace vzorkovacího zařízení, extrakčního rozpouštědla a procedury má významný dopad na účinnost extrakce analytů a měl by být optimalizován dle cílových látek a typu povrchu.

### 3 MOTIVACE A CÍLE PRÁCE

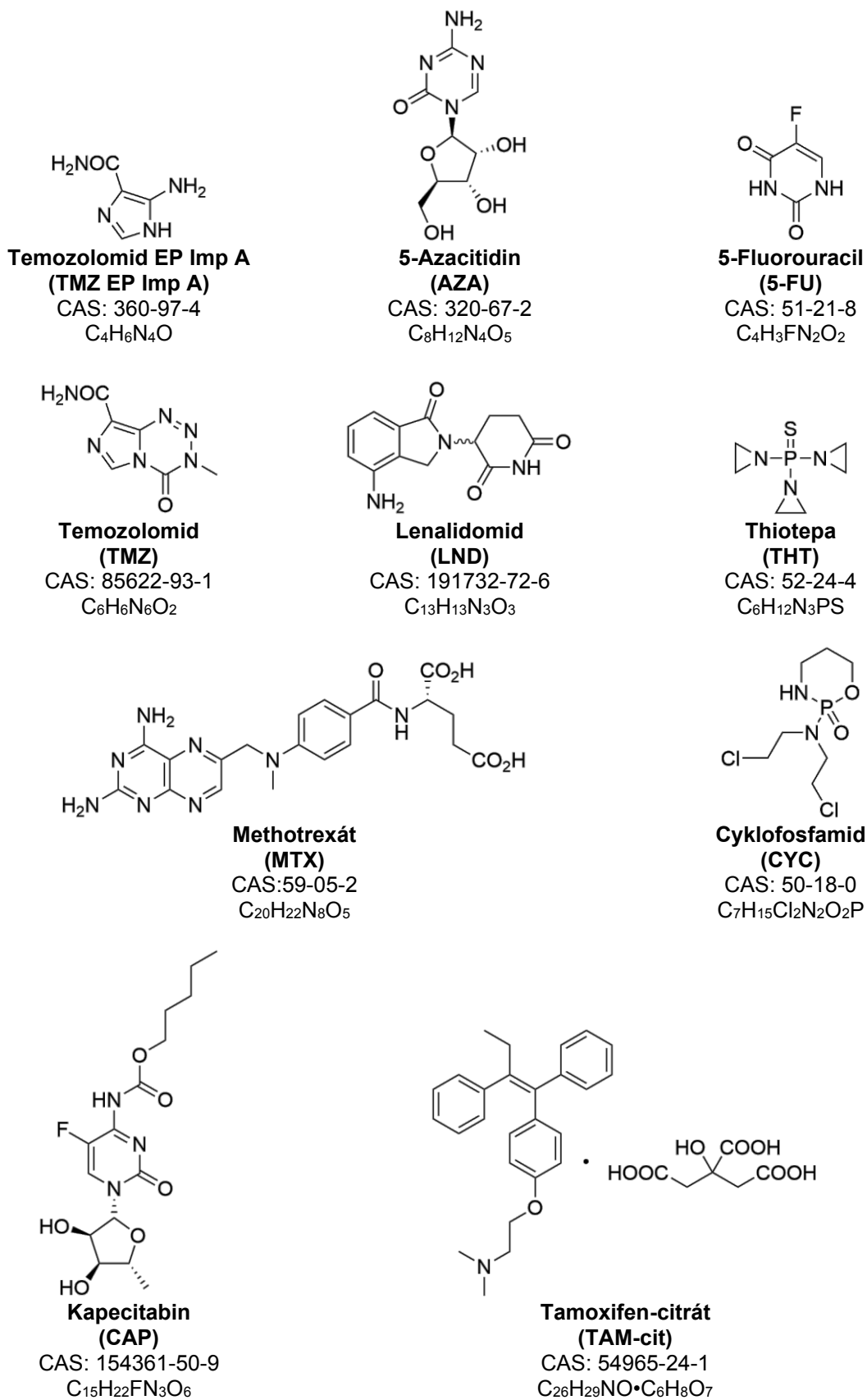
Motivací této diplomové práce je přímá potřeba společnosti Advande Labs s.r.o sledovat a vyhodnocovat míru kontaminace výrobního a laboratorního prostředí vybranými cytostatiky. Cílem je zajistit vyšší úroveň ochrany zaměstnanců a zároveň podpořit zavedení interního environmentálního monitoringu.

Hlavním cílem práce je vývoj robustní, selektivní a citlivé multireziduální LC-MS metodiky pro detekci a kvantifikaci stopových množství vybraných cytostatik na různých typech povrchových materiálů běžně se vyskytujících ve farmaceutické výrobě. Pro vývoj metody byli jako modelová cytostatika zvoleni zástupci klíčových skupin léčiv s antineoplastickou aktivitou, reflektující aktuální i plánované portfolio firmy. Výběr zahrnuje: alkylačních činidla (chlorambucil, cyklofosfamid, temozolomid a thiotepa), antimetabolity (azacytidin, 5-fluorouracil, kapecitabin a methotrexát), modulátory steroidních receptorů (tamoxifen a testosteron) a inhibitory angiogeneze (lenalidomid) (Obrázek 11). S ohledem na známou omezenou stabilitu temozolomidu byl do studie rovněž zařazen jeho hlavní degradační produkt – EP nečistota A (Obrázek 11).

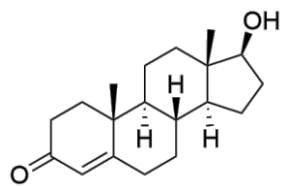
Pro účely této práce bylo vybráno 16 typů povrchových materiálů o rozměrech testovací plochy 100 × 100 mm (Obrázek 12), zahrnující plasty (polyvinylchlorid (PVC), nylon (PA), polyurethan (PU), polykarbonát (PC), plexisklo (PMMA), PETG, PEEK, PTFE, polyethylen (HDPE)), kovy (anodisovaný hliník, chromovaná ocel, 316 nerezová ocel), silikon, sklo fenolickou pryskyřici a leštěnou žulu. Tato komplexní variabilita povrchů umožňuje simulovat reálné podmínky ve výrobním prostředí.

Nedílnou součástí této práce je také systémová optimalizace metodiky přípravy vzorku. Tento proces začíná samotným vzorkováním z různých typů povrchů pomocí vhodných stěrových technik, pokračuje volbou a optimalizací extrakčních podmínek a končí úpravou vzorku pro následnou analýzu. Cílem této optimalizace je zajistit vysokou výtěžnost extrakce a reprodukovatelnost.

Po úspěšném vývoji bude analytická metoda validována v souladu s pokyny ICH pro validaci analytických postupů dle směrnice ICH Q2(R2), čímž bude připravena k rutinnímu nasazení.

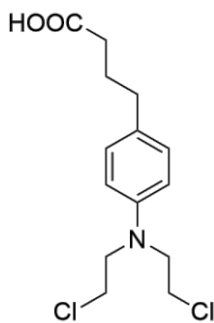


**Obrázek 11a:** Modelové látky s antineoplastickou aktivitou použité v rámci této studie



**Testosterone  
(TES)**

CAS: 58-22-0  
C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>



**Chlorambucil  
(CHL)**

CAS: 305-03-3  
C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

**Obrázek 11b:** Modelové látky s antineoplastickou aktivitou použité v rámci této studie



**Obrázek 12:** Druhy povrchových materiálů, které byly použity v této práci

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiály a přístrojové vybavení

#### 4.1.1 Chemikálie

- Acetonitril (ACN) – kvalita pro HPLC, Merck, Česká republika
- Ultra čistá voda, typ I – připraveno interně použitím výrobce ultra čisté vody
- Kyselina mravenčí, (98–100) % (FA) – reagenční čistota, Merck, Česká republika
- Etanol (EtOH), absolutní – Merck, Česká republika
- Metanol (MeOH) – kvalita pro HPLC, Merck, Česká republika
- Amoniak, 25% roztok, reagenční čistota, Merck, Česká republika
- Temozolomid EP Imp A (TMZ EP Imp A) – certifikovaný referenční standard, 95,3 %, LGC Standards, Polsko
- Azacytidin (AZA) – certifikovaný referenční standard, 98,9 %, USP, USA
- 5-Fluorouracil (5-FU) – certifikovaný referenční standard, 99,31 %, SynZeal Research, Indie
- Temozolomid (TMZ) – certifikovaný referenční standard, 100,0 %, TCI Europe, Belgie
- Lenalidomid (LND) – API, Shorla Oncology, Irsko
- Methotrexát (MTX) – certifikovaný referenční standard, 88,7 %, EDQM, Francie
- Thiotepa (THT) – certifikovaný referenční standard, 99,6 %, USP, USA
- Cyklofosfamid (CYC) – API, Eirgen Pharma, Irsko
- Kapecitabin (CAP) – API, Eirgen Pharma, Irsko
- Tamoxifen citrát (TAM-cit) – certifikovaný referenční standard, 99,18 %, SynZeal Research, Indie
- Testosteron (TES) – API, Orion Pharma, Finsko
- Chlorambucil (CHL) – certifikovaný referenční standard, 85,96 %, SynZeal Research, Indie

#### 4.1.2 Pomůcky

- Pipetovací nástavce, Brand & Co, Německo
- Skleněné čiré vialky se šroubovacím víčkem a septem PTFE/silikon, 4 mL – Chromservis, Česká republika
- Odměrné baňky třídy A o různých objemech

- Centrifugační zkumavky (PP) se šroubovacím víčkem (PE), 12 ml – Paul Bottger, Inset, Česká republika
- Tmavé kónické centrifugační zkumavky (PP) se šroubovacím víčkem (PE), 15 ml – NEST Biotechnolog, Čína
- Skleněné HPLC vialky se šroubovacím víčkem
- Štěrkové tyčinky, polyesterové – typ TX715, Texwipe, VWR / Avantor, Česká republika
- Alobal Rotilabo® 18 µm – Carl ROTH, P-Lab, Česká republika
- Polyvinylchlorid (PVC) – testovací povrch, 100 × 100 mm
- Nylon (PA) – testovací povrch, 100 × 100 mm
- Polyuretan (PUR) – testovací povrch, 100 × 100 mm
- Polykarbonát (PC) – testovací povrch, 100 × 100 mm
- Plexisklo (PMMA) – testovací povrch, 100 × 100 mm
- Anodisovaný hliník – testovací povrch, 100 × 100 mm
- Silikon – testovací povrch, 100 × 100 mm
- PETG – testovací povrch, 100 × 100 mm
- PEEK – testovací povrch, 100 × 100 mm
- PTFE – testovací povrch, 100 × 100 mm
- Chromovaná ocel – testovací povrch, 100 × 100 mm
- Polyethylen (HDPE) – testovací povrch, 100 × 100 mm
- Fenolická pryskyřice – testovací povrch, 100 × 100 mm
- Sklo – testovací povrch, 100 × 100 mm
- Leštěná žula – testovací povrch, 100 × 100 mm
- 316 nerezová ocel – testovací povrch, 100 × 100 mm

#### **4.1.3 Pomocné zařízení a vybavení**

- Výrobník ultra čisté vody – Milli-Q® EQ7000, Merck Millipore, Německo
- Mikrováhy, rozlišení 0,001 mg – MCE6.6S-2CEU-M, Sartorius, Sartalex, Česká republika
- Semimikro váhy, rozlišení 0,01 mg – Secura 225D-1CEU, Sartorius, Sartalex, Česká republika
- Pipeta krokovací – HandyStep, Brand & Co, Německo

- Dusík (čistota 5.0) – Messer Technogas s.r.o., Česká republika
- Ultrazvuková lázeň – K-25 LM, KRAINTEK CZECH, Česká republika
- Orbitální třepačka – RS-OS 20, Phoenix Instrument, Merci, Česká republika
- Centrifuga – MPW-352R, MPW Med. Instruments, Merci, Česká republika

## 4.2 Příprava roztoků standardů

Vzhledem k fotosenzitivitě některých analytů byly odměrné baňky a číré PP centrifugační zkumavky chráněny před působením světla zabalením do hliníkové fólie.

### 4.2.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Zásobní roztoky standardů (TMZ EP Imp A, AZA, 5-FU, TMZ, LND, MTX, THT, CYC, CAP, TAM-cit, TES, CHL) byly připraveny navážením přesně okolo 1 mg příslušného materiálu do skleněné číré vialky o objemu 4 ml se šroubovacím víčkem a septem PTFE/silikon. Následně bylo přidáno rozpouštědlo v takovém množství, aby byly připraveny zásobní roztoky o výsledné koncentraci 1 mg/ml. V případě potřeby byl využit ultrazvuk k urychlení rozpouštění. Takto připravené zásobní roztoky byly uchovávány v mrazáku při  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

TMZ EP Imp A, 5-FU, LND, THT, CYC, CAP, TAM-cit, TES a CHL byly rozpuštěny v metanolu. Protože AZA a MTX jsou v metanolu málo rozpustné, byl AZA rozpuštěn ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O – 50/50 v/v a MTX ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>3</sub> – 50/50/0.05 v/v/v. U TMZ bylo zjištěno, že je hydrolyticky nestabilní v metanolu. Jeho zásobní roztok byl proto připraven do metanolu s přídavkem kyseliny mravenčí. Shrnutí přípravy zásobních roztoků standardů a jejich příslušné koncentrace uvádí Tabulka 3.

**Tabulka 3:** Standardy a jejich výsledná přesná koncentrace

Látka	Označení	Rozpouštědlo	Koncentrace (mg/ml)
TMZ EP Imp A	TMZ Imp A ST	MeOH	0,999985
AZA	AZA ST	MeOH/H <sub>2</sub> O – 50/50 v/v	0,999942
5-FU	5-FU ST	MeOH	1,000104
TMZ	TMZ ST	0,03 % v/v FA v MeOH	1,000000
LND	LND ST	MeOH	1,000000
MTX	MTX ST	MeOH/H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> – 50/50/0.05 v/v/v	1,000475
THT	THT ST	MeOH	0,999544
CYC	CYC ST	MeOH	1,000000
CAP	CAP ST	MeOH	1,000000
TAM-cit	TAM ST	MeOH	1,000500
TES	TES ST	MeOH	1,000000
CHL	CHL ST	MeOH	1,000170

#### 4.2.2 Příprava pracovních roztoků standardů pro účely optimalizace

Pro optimalizaci chromatografických podmínek pomocí UHPLC-UV byly připraveny jednotlivé roztoky analytů o koncentraci 50 µg/ml. Pomocí krokovací pipety byl naředěn zásobní roztok standardu (75 µl) metanolem (1425 µl) přímo v HPLC vialce.

Pro účely ladění podmínek MS detekce byly připraveny jednotlivé roztoky analytů o koncentraci 5 µg/ml. Pomocí krokovací pipety byl naředěn zásobní roztok standardu (100 µl) do 20ml odměrné baňky. Baňka byla doplněna metanolem po rysku a protřepána.

#### 4.2.3 Příprava kalibračních roztoků

Na základě různosti koncentrací bylo sestaveno individuální ředění jednotlivých látek pro přípravu zásobního roztoku ST-I a pracovních roztoků ST-II a ST-III. Všechny tyto roztoky byly připraveny v duplikátu. Zásobní roztok ST-I, pracovní roztoky ST-II a ST-III, a kalibrační roztoky byly připravovány vždy denně čerstvé.

Pro přípravu zásobního roztoku ST-I byly do 10ml odměrné baňky odpipetovány následující objemy zásobních roztoků jednotlivých standardů: MTX ST (200 µl), TAM ST (100 µl) a CHL ST (100 µl). Baňka byla doplněna metanolem po rysku a roztok byl důkladně promíchán.

Pro přípravu pracovního roztoku ST-II byly do 20ml odměrné baňky odpipetovány následující objemy zásobních roztoků jednotlivých standardů: TMZ EP Imp A ST (100 µl), AZA ST

(250 µl), 5-FU ST (100 µl), TMZ ST (100 µl), LND ST (25 µl), THT ST (50 µl), CYC ST (25 µl), CAP ST (25 µl), TES ST (50 µl) a zásobní roztok ST-I (250 µl). Baňka byla doplněna metanolem po rysku a roztok byl důkladně promíchán.

Pro přípravu pracovního roztoku ST-III bylo pipetováno 500 µl pracovního roztoku ST-II do 25ml odměrné baňky. Baňka byla doplněna metanolem po rysku a roztok byl důkladně promíchán.

Pro přípravu jednotlivých kalibračních roztoků byly použity pracovní roztoky ST-II a ST-III, a rozpouštědlo (SS = EtOH/H<sub>2</sub>O – 50/50 v/v). Kalibrační roztoky byly připraveny do PP centrifugačních zkumavek podle schématu, které uvádí Tabulka 4. Zkumavky byly uzavřeny a roztoky důkladně promíchány. Koncentrační hladiny pro jednotlivé analyty uvádí Tabulka 5.

**Tabulka 4:** Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztok	Relativní level (%)	Objem (ml)		
		ST-II	ST-III	SS
Blank	0	–	–	5,000
K1	1	–	0,100	4,900
K2	2	–	0,200	4,800
K3	10	–	1,000	4,000
K4	25	0,050	–	4,950
K5	50	0,100	–	4,900
K6	120	0,240	–	4,760

**Tabulka 5:** Koncentrace jednotlivých analytů v kalibračních roztocích

Kal. roz.	Rel. level (%)	Koncentrace (ng/ml)											
		TMZ Imp A	AZA	5-FU	TMZ	LND	MTX	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Blank	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K1	1	2	5	2	2	0,5	0,1	1	0,5	0,5	0,05	1	0,05
K2	2	4	10	4	4	1,0	0,2	2	1,0	1,0	0,10	2	0,10
K3	10	20	50	20	20	5,0	1,0	10	5,0	5,0	0,50	10	0,50
K4	25	50	125	50	50	12,5	2,5	25	12,5	12,5	1,25	25	1,25
K5	50	100	250	100	100	25,0	5,0	50	25,0	25,0	2,50	50	2,50
K6	120	240	600	240	240	60,0	12,0	120	60,0	60,0	6,00	120	6,00

### 4.3 Mytí povrchů

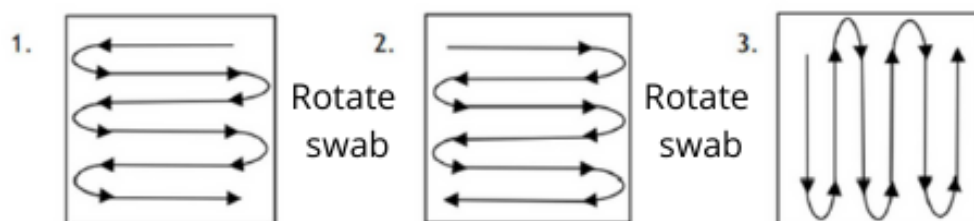
Z důvodu omezeného počtu testovacích povrchů, bylo nutné v průběhu vývoje a validace metody povrchy umývat, aby je bylo možné znova použít. Proces mytí byl postupně optimalizován a konečný postup je následující.

Testovací destičky byly nejprve drhnuty pomocí houbičky a detergentu, poté byly opláchnuty kohoutkovou vodou a vloženy na výšku do nádoby. Mezi jednotlivé desky byly vloženy perforované pořadače, aby se jednotlivé desky nedotýkaly a mytí bylo co nejúčinnější. Tímto způsobem byla naplněna celá nádoba. Povrchy byly zality směsí MeOH/H<sub>2</sub>O/kyselina mravenčí – 50/50/1 v/v/v tak, aby byly celé ponořeny. Nádoba byla vložena do ultrazvukové lázně na dobu 10 minut. Jednotlivé destičky byly následně postupně opláchnuty pod kohoutkovou vodou, vysoce čistou vodou (typ II) a metanolem.

### 4.4 Příprava vzorků

#### 4.4.1 Příprava slepého vzorku

Destičky testovacích povrchů byly stírány pomocí stěrové tyčinky namočené do smáčecího roztoku (EtOH). Před každou změnou stíracího cyklu byla stěrková tyčinka otočena a stěr byl proveden druhou stranou tyčinky (Obrázek 13). Po provedení stěru byla stěrová tyčinka ponechána přibližně 15 minut volně oschnout, přičemž byla chráněna před působením světla. Následně byla vložena do tmavé kónické centrifugační zkumavky a bylo k ní přidáno 5 ml extrakčního rozpouštědla (EtOH/H<sub>2</sub>O – 50/50 v/v). Zkumavky byly uzavřeny a následně míchány na orbitální třepače v horizontální poloze po dobu 15 minut při 400 ot./min. Po extrakci byl roztok odstředěn při 4000 g po dobu 5 minut za účelem odstranění pevných částic. Čirý supernatant byl poté převeden do HPLC vialky.



**Obrázek 13:** Ilustrace stírací metody

#### 4.4.2 Spikování stěrkových tyčinek

Na stírací plochu stěrkové tyčinky byl pomocí krokovací pipety nanesen definovaný objem pracovního roztoku podle schématu, které uvádí Tabulka 6. Po nanesení byla stěrková tyčinka ponechána přibližně 15 minut volně oschnout, přičemž byla chráněna před působením světla. Extrakce byla provedena stejně jako v případě přípravy slepého vzorku. Pro každou úroveň bylo připraveno šest vzorků. Rovněž byl připraven slepý vzorek nanesením čistého metanolu.

**Tabulka 6:** Přehled spikování pro jednotlivé úrovně

Zbytková úroveň	Relativní level (%)	Objem (μl)	
		ST-II	ST-III
L	2	–	200
H	100	200	–

#### 4.4.3 Příprava spikovaných povrchů

Spikování testovaných povrchů (velikost 100 × 100 mm, Obrázek 12) bylo provedeno podle typu povrchů na jedné nebo obou úrovních: na nízké úrovni 2 % (L), respektive vysoké úrovni 100 % (H) (Tabulka 7). Povrchy, které i po opakovaném mycím cyklu vykazovaly pozitivní slepé vzorky, byly spikovány jen na vysoké úrovni 100 % (H).

Pro spikování byly použity pracovní roztoky ST-III a ST-II, stejně jako pro přípravu kalibrační řady. Spikování bylo provedeno podle schématu, které uvádí Tabulka 6. Definovaný objem daného zásobního roztoku byl pomocí krokovací pipety nanesen rovnoměrně na celý testovací povrch. Vypouštění bylo nastaveno na nejpomalejší rychlost. Po nanesení byl povrch ponechán přibližně 15 minut volně oschnout, přičemž byl chráněn před působením světla. Následně byl povrch setřen pomocí stěrkové tyčinky namočené do smáčecího roztoku (EtOH). Stírání a extrakce byla provedena stejně jako v případě přípravy slepého vzorku. Pro každou úroveň byly připraveny tři vzorky daného povrchu.

**Tabulka 7:** Přehled spikování pro jednotlivé úrovně

Povrch	Zbytková úroveň	
	L (2 %)	H (100 %)
Polyvinylchlorid (PVC)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Nylon (PA)		<input checked="" type="checkbox"/>
Polyurethan (PU)		<input checked="" type="checkbox"/>
Polykarbonát (PC)		<input checked="" type="checkbox"/>
Plexisklo (PMMA)		<input checked="" type="checkbox"/>
Anodisovaný hliník	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Sílikon		<input checked="" type="checkbox"/>
PETG		<input checked="" type="checkbox"/>
PEEK		<input checked="" type="checkbox"/>
PTFE	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Chromovaná ocel		<input checked="" type="checkbox"/>
Polyethylen (HDPE)		<input checked="" type="checkbox"/>
Fenolická pryskyřice		<input checked="" type="checkbox"/>
Sklo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Leštěná žula		<input checked="" type="checkbox"/>
316 nerezová ocel	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

#### 4.5 UHPLC-UV metoda

Optimalizace chromatografické separace byla částečně provedena na systému UHPLC-UV, který se skládal z kapalinového chromatografu Vanquish Flex se čtyř kanálovým nízkotlakým gradientovým čerpacím systémem, nástřikovým systémem, temperovaným autosamplerem, termostatem kolony a čtyř kanálovým UV-Vis detektorem (vše Thermo Fisher Scientific, Pragolab s.r.o., Česká republika).

#### 4.6 UHPLC-MS metoda

Analýzy byly provedeny na systému UHPLC-MS, který se skládal z kapalinového chromatografu Vanquish Flex se čtyř kanálovým nízkotlakým gradientovým čerpacím systémem, nástřikovým systémem, temperovaným autosamplerem, termostatem kolony a integrovaným divertním ventilem. Tento chromatograf byl spojen s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Exploris™ 120, vybaveným iontovým zdrojem OptaMax NG s možností vyhřívané elektrosprejové ionizace (HESI-II) (oboje Thermo Fisher Scientific, Pragolab s.r.o., Česká republika). Pro dosažení vysoké přesnosti hmoty byla použita (*i*) externí

kalibrace pomocí kalibračního roztoku Pierce™ FlexMix™ v intervalu 1× týdně a (ii) interní kalibrace EASY-IC™ před každým nástřikem.

Analýza vzorků probíhala za chromatografický podmínek, které uvádí Tabulka 8. Hmotnostní spektrometr byl provozován v módu paralelního záznamu iontových reakcí (PRM). Podrobné instrumentální parametry uvádí Tabulka 9a, b, c.

Ovládání systému UHPLC-MS, sběr a vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno pomocí programu Chromeleon 7.2.10 ES (Thermo Fisher Scientific, Pragolab s.r.o., Česká republika).

**Tabulka 8:** Chromatografické parametry použité pro UHPLC-MS/MS analýzu

<b>Analytická kolona</b>	ACQUITY HSS T3, 100 × 2.1 mm, 1,8 μm (Waters, Česká republika)		
<b>Předkolona</b>	ACQUITY HSS T3 VanGuard, 5 × 2.1 mm, 1.8 μm (Waters, Česká republika)		
<b>Průtok (ml/min)</b>	0.4		
<b>Teplota kolony (°C)</b>	40		
<b>Teplota autosampleru (°C)</b>	5		
<b>Oplach jehly</b>	30 s, MeOH/voda – 50/50 v/v		
<b>Doba analýzy</b>	trvání gradientového profilu		
<b>Nástřik (μl)</b>	1		
<b>Mobilní fáze A</b>	0,1 % v/v kyselina mravenčí ve vodě		
<b>Mobilní fáze B</b>	ACN/voda – 95/5 v/v		
<b>Gradientový program<sup>a</sup></b>	<b>Čas (min)</b>	<b>Mobilní fáze A (%)</b>	<b>Mobilní fáze B (%)</b>
	0,0	95	5
	0,1	95	5
	5,0	5	95
	5,5	5	95
	5,6	95	5
	10,0	95	5

<sup>a</sup> Délka isokratického kroku může být modifikována tak, aby kompenzovala rozdíly v systémovém objemu jednotlivých LC-MS systémů.

**Tabulka 9a:** Parametry hmotnostního spektrometru použité pro UHPLC-MS/MS analýzu

<b>Mód ionizace</b>	H-ESI (pozitivní/negativní)
<b>Geometrie zdroje</b>	horizontální pozice: střed předozadní pozice: 1 hloubka: M-L
<b>Napětí kapiláry</b>	čas (min)/napětí (kV): 0,0/+1,0; 5,1/+2,0; 6,2/+3,5 0,0/-1,5; 0,8/-1,0; 5,1/-3,2
<b>Desolvatační teplota (°C)</b>	350
<b>Teplota transportní kapiláry (°C)</b>	300
<b>Sheath gas (arb)<sup>a</sup></b>	50
<b>Auxiliary gas (arb)<sup>a</sup></b>	10
<b>Sweep gas (arb)<sup>a</sup></b>	0
<b>Rozlišovací schopnost (FWHM)</b>	30000
<b>Rozsah</b>	auto
<b>Izolační okno (<i>m/z</i>)</b>	0,7
<b>Divertní ventil</b>	0,0–9,9 min do zdroje 9,9–10,0 min do odpadu

<sup>a</sup> České ekvivalenty pro označení plynů, které se používají v iontovém zdroji, nejsou standardizované. Jedná se o parametry specifické pro danou instrumentaci.

**Tabulka 9b:** Parametry hmotnostního spektrometru použité pro UHPLC-MS/MS analýzu

Analyt	Polarita	Segment (min)	Prekurzor. ion <sup>a</sup> m/z	Detekovaný ion <sup>b</sup> m/z	Typ iontu <sup>c</sup>
TMZ EP Imp A	Pozitivní	0.60±0.5	127,0614	110,0349	Q
				127,0614	q
AZA	Negativní	0.72±0.5	243,0735	110,0360	Q
				82,0411	q
5-FU	Negativní	0.92±0.5	129,0106	41,9985	Q
				129,0106	q
TMZ	Pozitivní	1.92±0.5	195.0625	138,0410	Q
				195,0625	q
LND	Pozitivní	3.60±0.5	260,1030	149,0709	Q
				187,0866	q
MTX	Pozitivní	3.69±0.5	455,1786	308,1254	Q
				134,0600	q
THT	Pozitivní	4.61±0.5	190,0562	147,0140	Q
				62,9453	q
CYC	Pozitivní	4.96±0.5	261,0321	140,0028	Q
				106,0418	q
CAP	Negativní	5.20±0.5	358,1420	154,0058	Q
				358,1420	q
TAM-cit	Pozitivní	6.16±0.5	372,2322	72,0808	Q
				372,2322	q
TES	Pozitivní	6.31±0.5	289,2162	109,0648	Q
				97,0648	q
CHL	Pozitivní	6.82±0.5	304,0866	192,1019	Q
				168,0575	Q

<sup>a</sup> Parametr byl vypočten programem Chromeleon na základě sumárního vzorce a typu iontu: [M + H]<sup>+</sup> nebo [M – H]<sup>-</sup> pro mód pozitivních iontů nebo negativních iontů.

<sup>b</sup> Stopa detekovaného iontu byla extrahována během procesování dat v programu Chromeleon s tolerancí 5 ppm. Tento parametr není součástí instrumentální metody.

<sup>c</sup> Q = kvantifikační ion; q = konfirmační ion

**Tabulka 9c:** Parametry hmotnostního spektrometru použité pro UHPLC-MS/MS analýzu

Analyt	S-lens <sup>a</sup> (%)	CE <sup>b</sup> (%)	AGC target <sup>c</sup> (%)	Max IT <sup>d</sup> (ms)
TMZ EP Imp A	70	12	200	150
AZA	70	45	400	150
5-FU	100	50	200	150
TMZ	60	10	400	150
LND	80	40	200	150
MTX	95	40	400	150
THT	65	50	200	150
CYC	80	45	400	150
CAP	100	30	200	150
TAM-cit	80	30	200	150
TES	100	50	200	150
CHL	70	50	400	150

<sup>a</sup> Parametr S-lens se týká nastavení amplitudy radiofrekvenčního napětí (RF) aplikované na tzv. S-lens.

<sup>b</sup> Normalizovaná HCD kolizní energie.

<sup>c</sup> Automatic Gain Control (AGC) automaticky upravuje dobu akumulace iontů tak, aby počet iontů odpovídal nastavenému cíli. Zabraňuje saturaci analyzátoru.

<sup>d</sup> Maximální čas, po který může trvat plnění iontové pasti, pokud není AGC target dosažen.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Optimalizace UHPLC-MS metody

#### 5.1.1 Testovací analýza

Účelem testovací analýzy bylo orientační zjištění retenčního chování vybraných analytů. Při těchto testech byly použity jednotlivé pracovní roztoky o koncentraci 50 µg/ml (AZA, TMZ, LND, MTX, THT, CYC, CAP, TES).

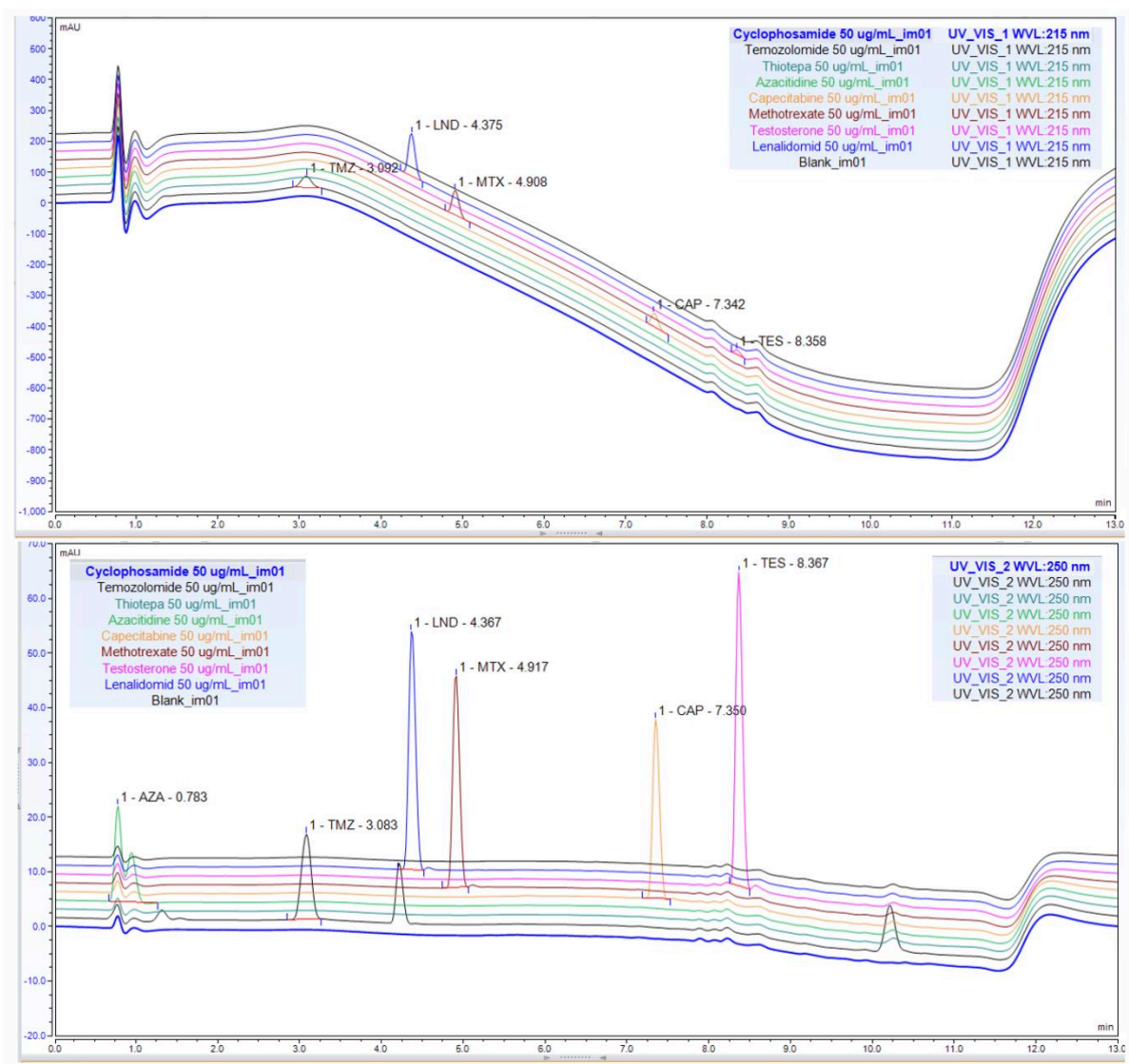
S ohledem na komplexní složení analyzované směsi byla jako výchozí separační strategie zvolena gradientová eluce v separačním systému s obrácenými fázemi s použitím kolony ACQUITY HSS T3, 100 × 2,1 mm, 1,8 µm. Tato kolona je speciálním typem reverzně-fázových C18 kolon a oproti běžným C18 kolonám nabízí lepší retenci polárních látek. Umožňuje tedy efektivní separaci hydrofilních i hydrofobních analytů v jedné metodě. Během celé analýzy byla analytická kolona chráněna předkolonou se stejnou stacionární fází (HSS T3 VanGuard, 5 × 2,1 mm, 1,8 µm).

Vzhledem k relativně jednoduchému charakteru vzorků nebylo riziko složitých matic významné; hlavním důvodem použití předkolony proto byla ochrana systému před mechanickými nečistotami obsaženými ve vzorcích. Jako vodná složka mobilní fáze byla pro gradientovou separaci použita 0.1 % v/v kyselina mravenčí ve vodě. Tato mobilní fáze je plně kompatibilní s LC-MS analýzou a její použití je zvláště výhodné při analýze bazických analytů, protože zlepšuje jejich ionizaci. Jako organický modifikátor byl testován metanol a acetonitril. Výchozí gradientový profil byl následující: čas/% organické složky: 0,0/5–0,1/5–6,0/95–9,0/95–9,1/5–13,0/5. Průtok mobilní fáze byl 0.4 ml/min. Teplota kolony nebyla v rámci této studie optimalizována; kolona byla temperována na konstantní teplotu 40 °C. Injekční objem 1 µl byl zvolen s ohledem na zajištění kompatibility mezi použitým rozpouštědlem a zvolenými chromatografickými podmínkami. K detekci byl využit UV-VIS detektor s laditelnou vlnovou délkou. Pro detekci byly vybrány neselektivní vlnové délky – 215 nm a 250 nm.

Většina píků v chromatogramu byla identifikována a byl jim přiřazen retenční čas. Látka CYC a THT nebylo možné tímto způsobem identifikovat, protože ve vybrané UV oblasti vykazují slabou absorpci.

Kvalitativní porovnání obou chromatografických profilů nabízí Obrázek 14 a Obrázek 15. Z chromatogramů je patrné, že při vlnové délce 215 nm nejsou detekovány THT a CYC, ale

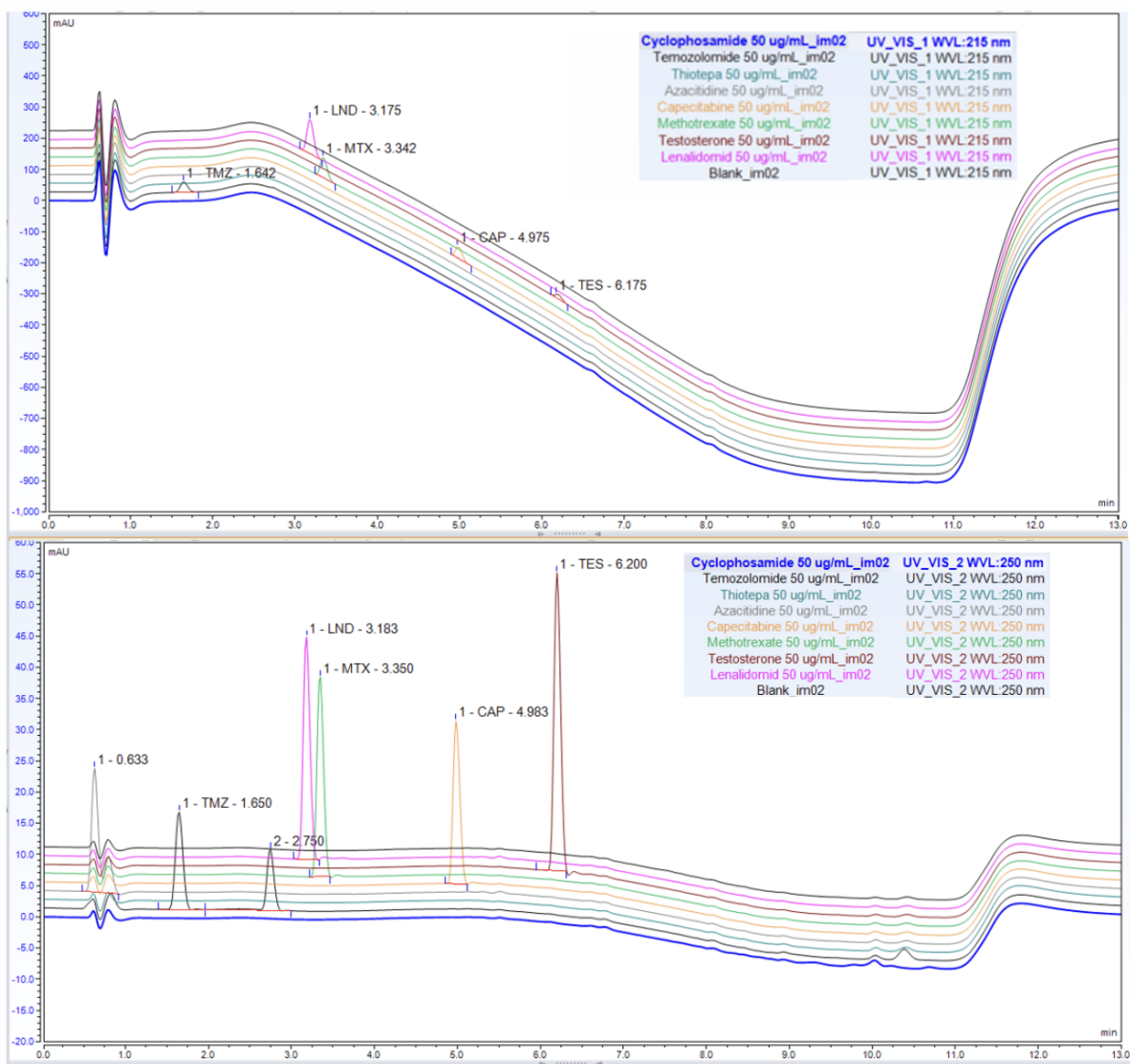
také signál odpovídající AZA chybí. Při vlnové délce 250 nm je již přítomnost AZA detekovatelná. Úvodní experimenty sloužily k posouzení základního chromatografického chování jednotlivých analytů. Následná optimalizace separačních podmínek již probíhala za využití hmotnostně spektrometrické detekce.



**Obrázek 14:** UHPLC-UV chromatogramy (@215 nm a 250 nm) vybraných analytů při použití metanolu jako organického modifikátoru

Seznam detekovaných látek – viz Obrázek 11.

Podmínky separace – kolona: ACQUITY HSS T3, 100 × 2.1 mm, 1,8 μm, předkolona: ACQUITY HSS T3 VanGuard, 5 × 2.1 mm, 1,8 μm, nástřík: 1 μl, teplota kolony: 40 °C, teplota autosampleru: 5 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce UV 215/250 nm, mobilní fáze A: 0,1 % v/v kyselina mravenčí, mobilní fáze B: metanol, gradientová eluce: čas/% organické složky: 0,0/5–0,1/5–6,0/95–9,0/95–9,1/5–13,0/5.



**Obrázek 15:** UHPLC-UV chromatogramy (@215 nm a 250 nm) vybraných analytů při použití směsi ACN/H<sub>2</sub>O – 95/5 v/v jako složky B gradientu

Seznam detekovaných látek – viz Obrázek 11.

Podmínky separace – kolona: ACQUITY HSS T3, 100 × 2.1 mm, 1,8 μm, předkolona: ACQUITY HSS T3 VanGuard, 5 × 2.1 mm, 1,8 μm, nástřik: 1 μl, teplota kolony: 40 °C, teplota autosampleru: 5 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce UV 215/250 nm, mobilní fáze A: 0,1 % v/v kyselina mravenčí, mobilní fáze B: ACN/H<sub>2</sub>O – 95/5 v/v, gradientová eluce: čas/% organické složky: 0,0/5–0,1/5–6,0/95–9,0/95–9,1/5–13,0/5.

### 5.1.2 Optimalizace gradientu, mobilní fáze a celkové doby analýzy

Cílem těchto kroků bylo nalézt vhodnou kombinaci chromatografických podmínek, která by vedla k co nejvyšší odezvě analytů a současně umožnila zkrácení doby analýzy. Úplné rozdělení jednotlivých složek nebylo prioritou, neboť byla využita detekce pomocí hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením. Optimalizace byla prováděna v režimu záznamu kompletního hmotnostního spektra.

Úvodní fáze optimalizace zahrnovala prodloužení fáze kondicionace kolony z 3.9 min na 5.9 min z důvodu potřeby dostatečného času pro návrat systému na výchozí podmínky. V dalším kroku bylo přistoupeno k optimalizaci separační fáze gradientu, které vedlo k celkovému zkrácení doby analýzy na 10 minut. V následující tabulce (Tabulka 10) jsou uvedeny všechny změny gradientu.

Nejlepších výsledků z hlediska odezvy bylo dosaženo při použití acetonitrilu jako organické složky mobilní fáze. Tyto eluční podmínky byly použity jako finální nastavení pro další analýzy. Z důvodu robustnosti metody a přenositelnosti na vysokotlaké binární systémy nebyl jako organická složka mobilní fáze použit čistý acetonitril, ale jeho směs s vodou v poměru ACN/H<sub>2</sub>O – 95/5 v/v.

**Tabulka 10:** Přehled optimalizace gradientu

Počáteční gradient			Prodloužený čas kondicionace			Finální gradient		
čas (min)	A (%)	B (%)	čas (min)	A (%)	B (%)	čas (min)	A (%)	B (%)
0,0	95	5	0,0	95	5	0,0	95	5
0,1	95	5	0,1	95	5	0,1	95	5
6,0	5	95	6,0	5	95	5,0	5	95
9,0	5	95	9,0	5	95	5,5	5	95
9,1	95	5	9,1	95	5	5,6	95	5
13,0	95	5	15,0	95	5	10,0	95	5

### 5.1.3 Optimalizace podmínek MS detekce

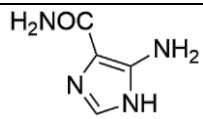
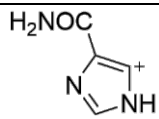
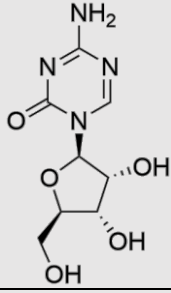
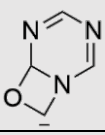
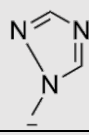
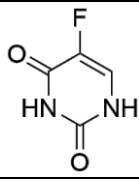

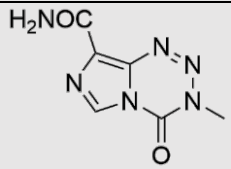
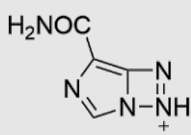
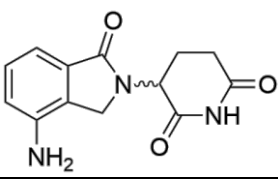
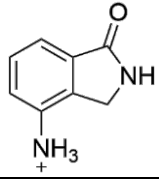
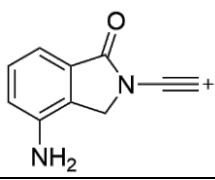
Pro detekci všech cílových analytů na stopových hladinách bylo nezbytné provést optimalizaci parametrů hmotnostního spektrometru. Tato optimalizace byla realizována pomocí přímé infuze standardních roztoků jednotlivých látek. Každý analyt byl laděn individuálně. Pro každou látku byl připraven roztok o koncentraci 5 µg/ml, který byl naplněn do mikrostřikačky typu Hamilton s objemem 0,5 ml a lineárním čerpadlem byl přiváděn přes kapiláru do slučovací T-spojky, kde se mísil s mobilní fází před vstupem do ionizačního zdroje. Rychlost infuze byla nastavena na 5 µl/min, v případě příliš vysoké odezvy signálu byla následně upravována směrem dolů. Složení mobilní fáze bylo upraveno tak, aby přibližně odpovídalo složení fáze v okamžiku elučního maxima daného analytu. Tímto způsobem bylo možné lépe simulovat podmínky reálné analýzy.

V počáteční fázi ladění bylo v záznamu kompletního hmotnostního spektra sledováno zobrazení intenzity prekurzorového iontu, aby bylo možné vizuálně kontrolovat odezvu při různých nastaveních. Následně byly postupně upravovány parametry zdroje s cílem dosáhnout co

nejvyšší intenzity signálu. Konkrétně se jednalo o průtoky plynů v iontové zdroji (sheath gas, auxiliary gas, sweep gas), napětí na kapiláře, desolvatační teplotu a v neposlední řadě teplotu transportní kapiláry. Přístroj Orbitrap Exploris 120 neumožňuje automatickou optimalizaci radiofrekvenčního napětí na soustavě prstencových elektrod (S-lens RF level) pro daný ion. Tento parametr byl tedy optimalizován ručně iteračním způsobem.

Po optimalizaci těchto základních parametrů byla optimalizována akviziční metoda – paralelní záznam iontových reakcí. Zvolený ion prekurzoru byl fragmentován v kolizní cele pomocí HCD. Jako kolizní plyn byl použit dusík (kvalita 5.0). Kolizní energie byla postupně zvyšována a pro vybrané hodnoty byly zaznamenány výsledná fragmentační spektra jednotlivých analytů. Na základě získaných spekter byly identifikovány vhodné produktové ionty. Optimalizace kolizní energie probíhala kombinací experimentálních dat a porovnáním s referenčními spektry dostupnými v online databázi m/zCloud [52]. Porovnáním obou datových sad byla pro každý prekurzorový ion stanovena optimální kolizní energie. Výsledkem optimalizace byl kompletní přechodový set pro jednotlivé analyty, sestávající z prekurzorového iontu, optimální kolizní energie a příslušných produktových iontů. Návrhy struktur pro sledované produktové ionty jednotlivých analytů uvádí Tabulka 11a, b, c. V rámci této optimalizace byla dále nastavena také šířka izolačního okna pro výběr prekurzorového iontu (isolation window). Optimální parametry MS detekce pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v příloze A (Tabulka 28 a Tabulka 29).

**Tabulka 11a:** Navržené struktury<sup>a</sup> produktových iontů pro studované analyty

Prekurzorový ion	Produktový ion	
<b>Temozolomid EP Imp A</b>		
		
[M + H] <sup>+</sup> C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>4</sub> O <sup>+</sup> m/z 127,0614	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O <sup>+</sup> m/z 110,0349	
<b>5-Azacytidin</b>		
		
[M – H] <sup>-</sup> C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup> m/z 243,0735	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O <sup>-</sup> m/z 110,0360	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>3</sub> <sup>-</sup> m/z 82,0411
<b>5-Fluorouracil</b>		
		
[M – H] <sup>-</sup> C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> m/z 129,0106	CNO <sup>-</sup> m/z 41,9985	
<b>Temozolomid</b>		
		
[M + H] <sup>+</sup> C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> m/z 195,0625	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>5</sub> O <sup>+</sup> m/z 138,0410	
<b>Lenalidomid</b>		
		
[M + H] <sup>+</sup> C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup> m/z 260,1030	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sup>+</sup> m/z 149,0709	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sup>+</sup> m/z 187,0866

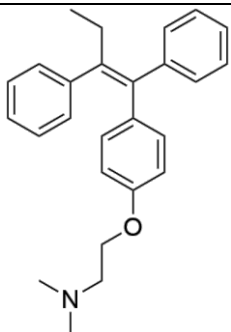
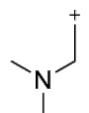
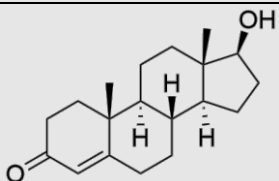
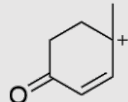
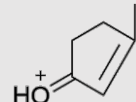
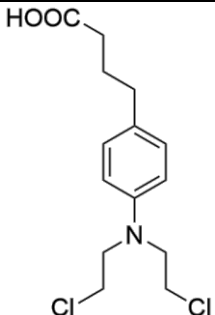
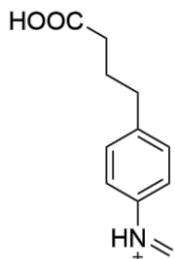
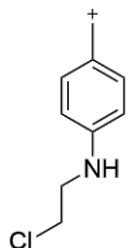
<sup>a</sup> Struktury produktových iontů nemusí reprezentovat nejstabilnější rezonanční strukturu.

**Tabulka 11b:** Navržené struktury<sup>a</sup> produktových iontů pro studované analyty

Prekurzorový ion	Produktový ion	
<b>Methotrexát</b>		
$[M + H]^+ \text{ C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_8\text{O}_5^+ \text{ m/z } 455,1786$	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_7\text{O}^+ \text{ m/z } 308,1254$	
	$\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}^+ \text{ m/z } 134,0600$	
<b>Thiotepa</b>		
$[M + H]^+ \text{ C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{PS}^+ \text{ m/z } 190,0562$	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{PS}^+ \text{ m/z } 147,0140$	$\text{PS}_2^+ \text{ m/z } 62,9453$
<b>Cyklofosfamid</b>		
$[M + H]^+ \text{ C}_7\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{P}^+ \text{ m/z } 261,0321$	$\text{C}_4\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}^+ \text{ m/z } 140,0028$	$\text{C}_4\text{H}_9\text{ClN}^+ \text{ m/z } 106,0418$
<b>Kapecitabin</b>		
$[M - H]^- \text{ C}_{15}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_6^- \text{ m/z } 358,1420$	$\text{C}_5\text{HFN}_3\text{O}_2^- \text{ m/z } 154,0058$	

<sup>a</sup> Struktury produktových iontů nemusí reprezentovat nejstabilnější rezonanční strukturu.

**Tabulka 11c:** Navržené struktury<sup>a</sup> produktových iontů pro studované analyty.

Prekurzorový ion	Produktový ion	
<b>Tamoxifen</b>		
		
$[M + H]^+$ C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> NO <sup>+</sup> <i>m/z</i> 372,2322	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sup>+</sup> <i>m/z</i> 72,0808	
<b>Testosteron</b>		
		
$[M + H]^+$ C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> <i>m/z</i> 289,2162	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sup>+</sup> <i>m/z</i> 109,0648	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> <sup>+</sup> <i>m/z</i> 97,0648
<b>Chlorambucil</b>		
		
$[M + H]^+$ C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> <i>m/z</i> 304,0866	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> <i>m/z</i> 192,1019	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ClN <sup>+</sup> <i>m/z</i> 168,0575

<sup>a</sup> Struktury produktových iontů nemusí reprezentovat nejstabilnější rezonanční strukturu.

## 5.2 Optimalizace přípravy vzorku

Aby byla příprava vzorků stěrů ploch co nejefektivnější a analyzované látky byly dobře detekovatelné, bylo nutné provést optimalizaci jednotlivých kroků postupu. Byla provedena optimalizace extrakčního rozpouštědla, optimalizace smáčecího roztoku a optimalizace stěru vzorku.

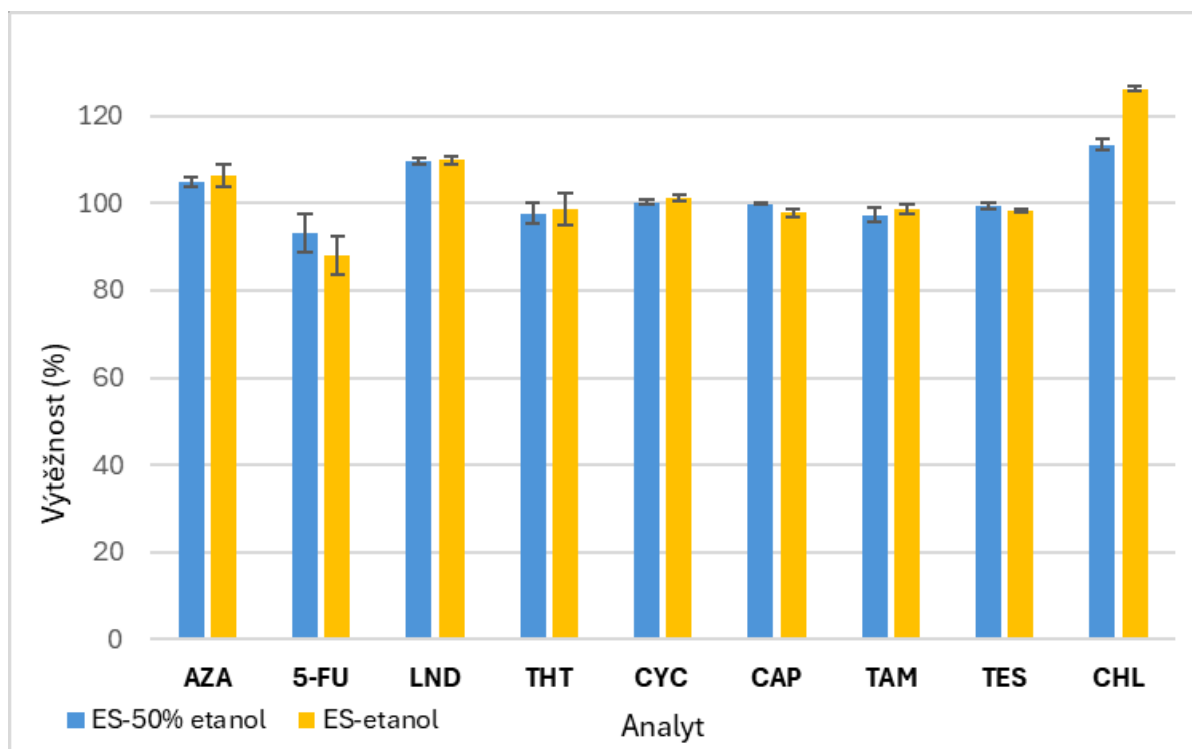
### 5.2.1 Optimalizace extrakčního rozpouštědla

Výběr extrakčního rozpouštědla byl proveden s ohledem na jeho zdravotní nezávadnost, kompatibilitu s analyty, vhodnost pro dané chromatografické podmínky a rovněž s přihlédnutím k aspektům udržitelnosti. Na základě těchto kritérií byl následně testován etanol a jeho směs s vodou v poměru EtOH/H<sub>2</sub>O – 50/50 v/v. Optimalizace extrakčního rozpouštědla (ES) byla provedena sledováním výtěžnosti analytů ze stěrkové tyčinky. Stěrkové tyčinky byly spikované na koncentrační hladině 100 % (H) a po zaschnutí extrahovány do příslušného rozpouštědla. Postup přípravy odpovídal postupu popsaného při přípravě spikovaných stěrkových tyčinek. Pro každé extrakční rozpouštědlo byly připraveny tři paralelní vzorky.

Na základě vyhodnocení experimentálních dat byla u MTX pozorována nízká extrakční výtěžnost (přibližně 20 %) a vysoká variabilita výsledků. Byla vyslovena hypotéza, že i přes ochranu stěrkových tyčinek před světlem dochází k fotodegradaci MTX. Tato domněnka byla následně potvrzena experimentem, při kterém byly stěrkové tyčinky vystaveny dennímu světlu po dobu 30 min. Analýza extraktů ze světlem exponovaných tyčinek prokázala úplný rozklad MTX, jelikož tato látka nebyla detekována v odpovídajícím záznamu analýzy. Vzhledem k tomu, že laboratorní prostory společnosti Advance Labs s.r.o. nejsou technicky vybaveny pro manipulaci s fotosenzitivními látkami (např. chybějící zatemnění oken či speciální osvětlení), nebylo možné dále pokračovat v analýze MTX. Na základě těchto zjištění byl MTX ze studie vyřazen.

Nízkou extrakční výtěžnost vykazoval také TMZ, jehož hydrolytická nestabilita v neutrálním a bazickém prostředí je dobře známa. Během experimentů bylo zjištěno, že k hydrolyze dochází na povrchu stěrkové tyčinky rychleji než v roztoku. Vzhledem k chemické povaze ostatních analytů však nebylo možné použít smáčecí roztok ani extrakční rozpouštědlo s přísadkou kyseliny mravenčí, která by hydrolyzu potlačila. Z těchto důvodů byl TMZ ze studie rovněž vyřazen.

Z experimentálních dat vyplývá, že většina analytů vykazovala srovnatelnou extrakční výtěžnost při použití obou extrakčních rozpouštědel, což je patrné z grafu (Obrázek 16). U polárních analytů bylo pozorováno mírné zhoršení tvaru píku při separaci v případě použití etanolu jako extrakčního rozpouštědla. Na základě těchto informací byla vybrána směs EtOH/H<sub>2</sub>O – 50/50 v/v jako vhodné extrakční rozpouštědlo.

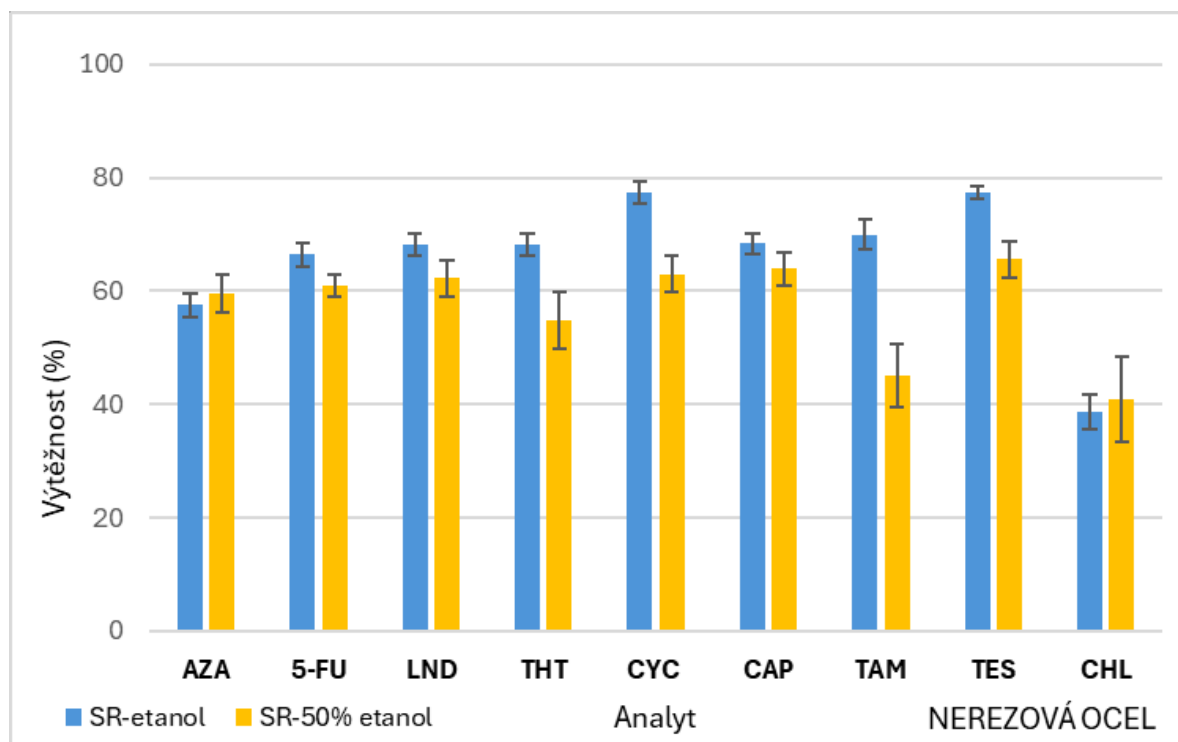


**Obrázek 16:** Graf porovnání extrakční výtěžnosti pro testované extrakční rozpouštědla

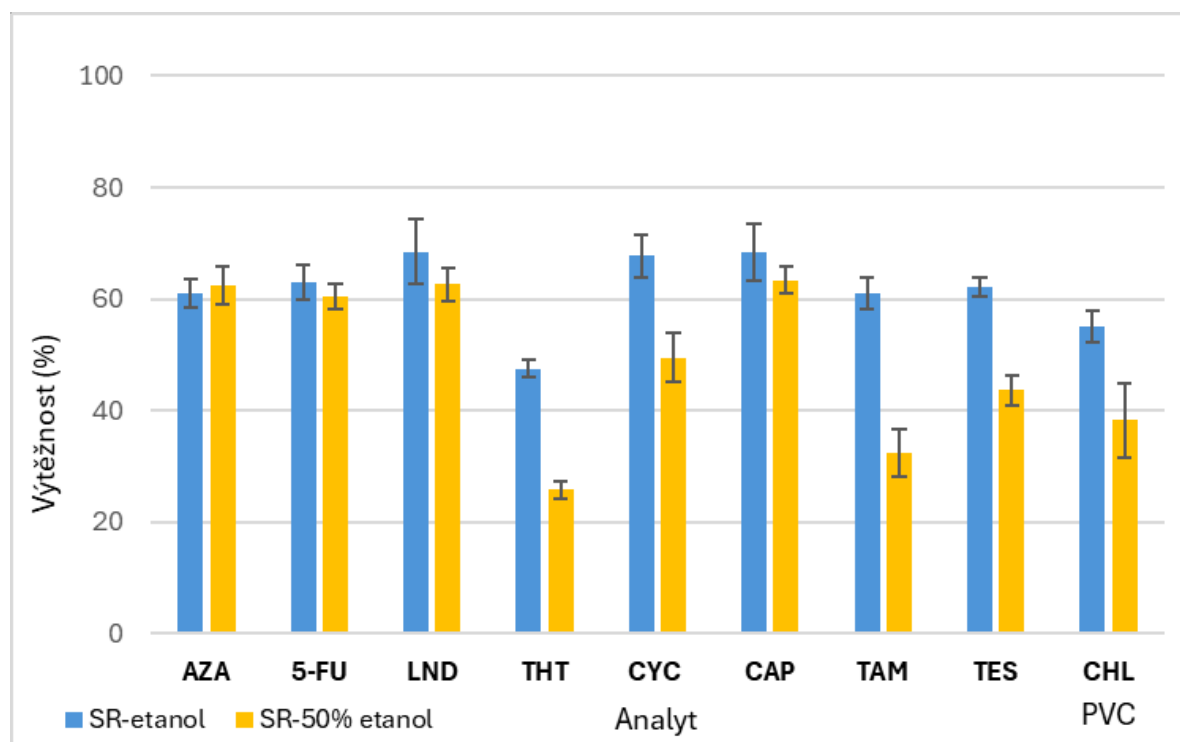
### 5.2.2 Optimalizace smáčecího roztoku

Výběr smáčecího roztoku byl proveden s ohledem na jeho zdravotní nezávadnost, kompatibilitu s analyty a rovněž s přihlédnutím k aspektům udržitelnosti. Na základě těchto kritérií byl následně testován etanol a jeho směs s vodou v poměru EtOH/H<sub>2</sub>O – 50/50 v/v. Pro optimalizaci smáčecího roztoku byly zvoleny dva typy povrchových materiálů, a to 316 nerezová ocel a PVC. Nerezová ocel byla vybrána jako zástupce materiálů s hladkým povrchem a PVC jako zástupce pórovitých materiálů. Povrch materiálu byl spikován na koncentrační hladině 100 % (H) a po zaschnutí byl aplikován stěr s využitím dvou různých smáčecích roztoků (SR). Použit byl stěr typu B (Obrázek 19). Postup přípravy odpovídal postupu popsaného při přípravě spikovaných povrchů. Pro každý smáčecí roztok byly připraveny tři paralelní vzorky na daném typu povrchu.

Na základě porovnání výsledků z obou grafů (Obrázek 17 a Obrázek 18) vyplývá, že jako smáčecí roztok je vhodnější čistý etanol.



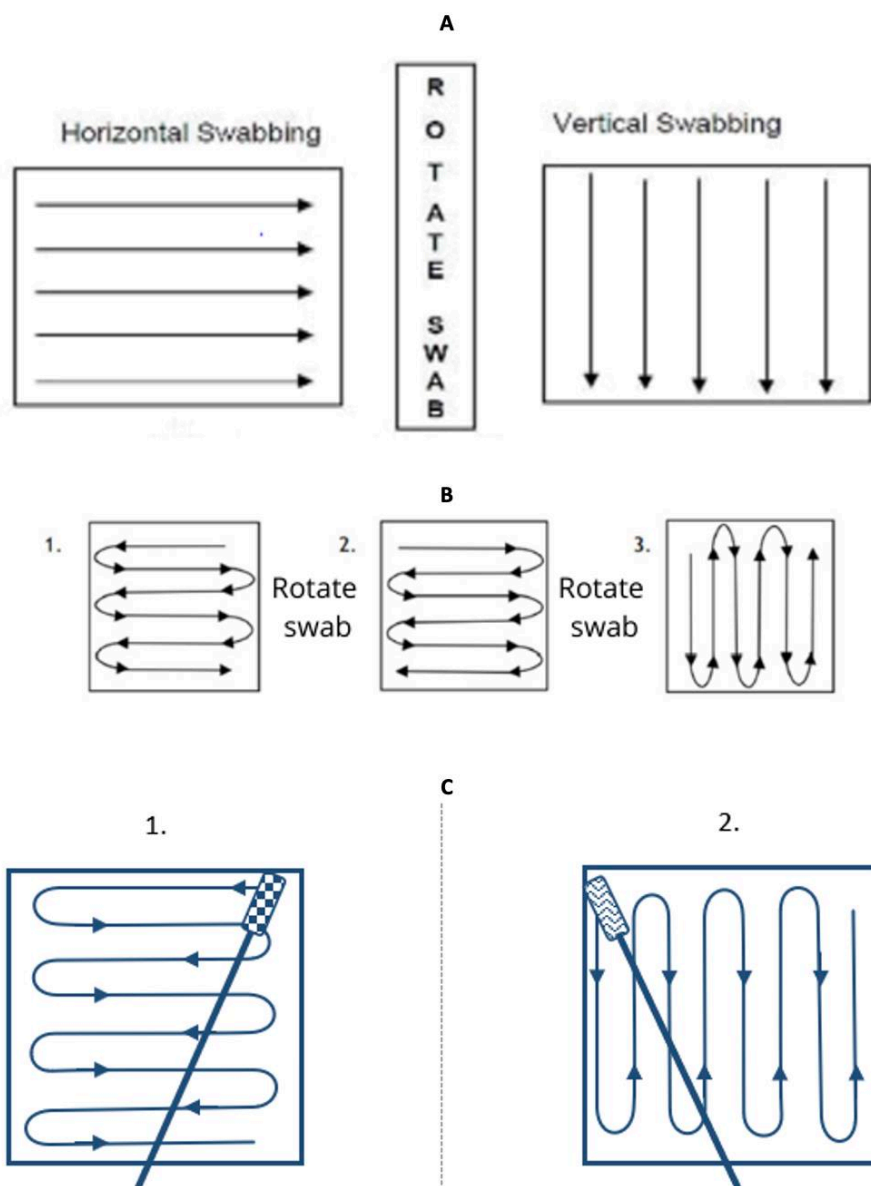
**Obrázek 17:** Graf porovnání výtěžnosti pro testované smáčecí roztoky pro povrch 316 nerezová ocel



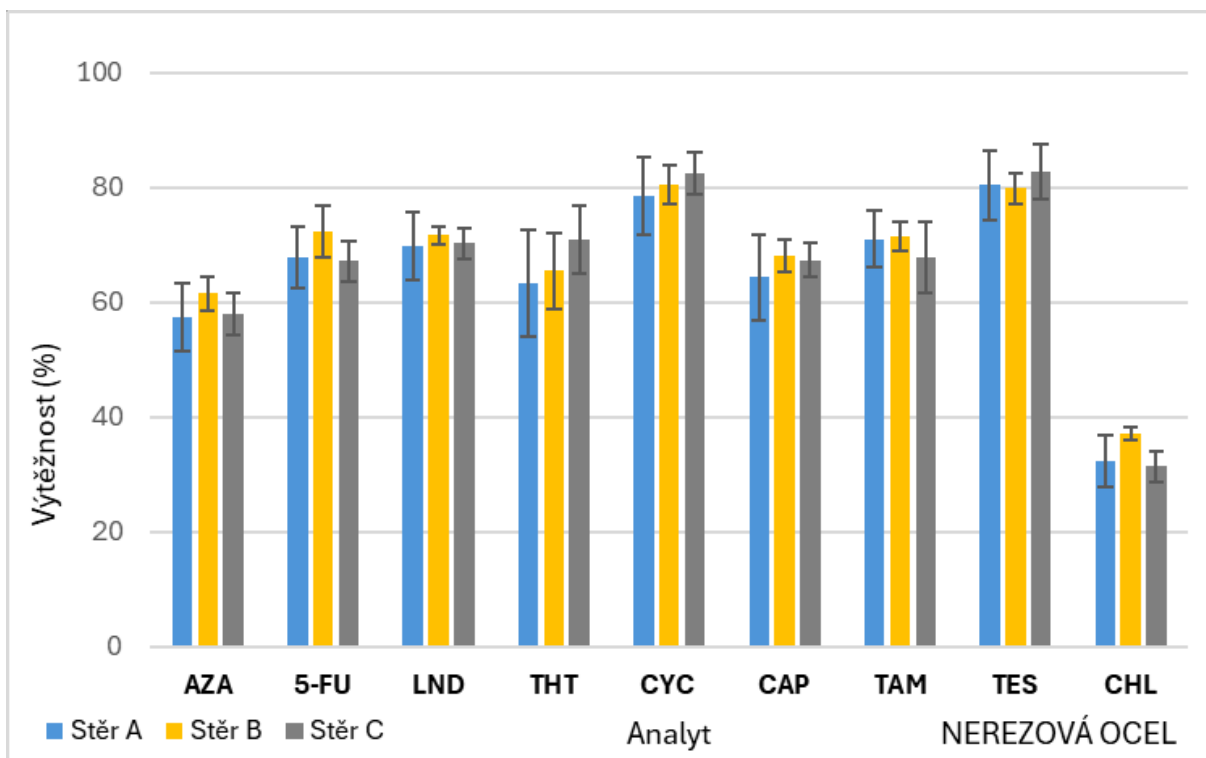
**Obrázek 18:** Graf porovnání výtěžnosti pro testované smáčecí roztoky pro povrch PVC

### 5.2.3 Optimalizace stěru vzorku

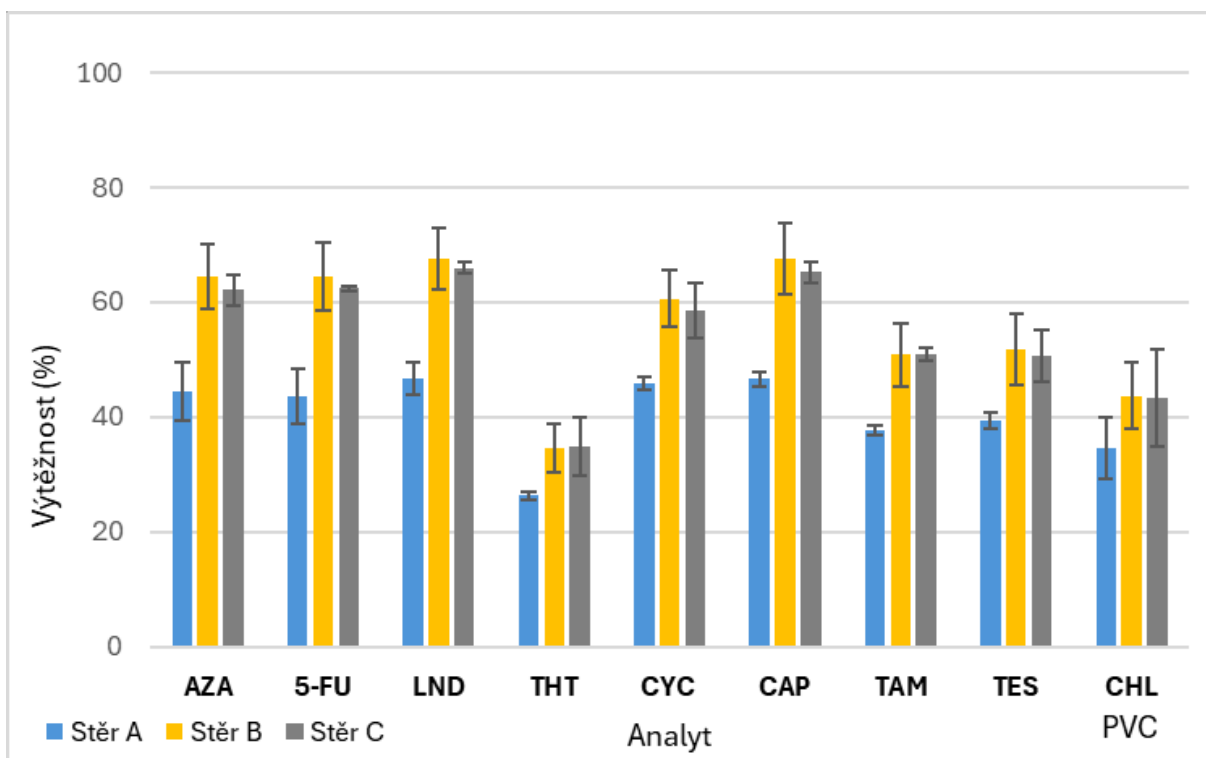
Pro optimalizaci způsobu stěru vzorku byly vybrány stejné materiály jako v předchozích krocích optimalizace (316 nerezová ocel a PVC). Povrchový materiál byl spikován na koncentrační hladině 100 % (H) a po zaschnutí byly na každý z těchto povrchů aplikovány tři různé způsoby stěru (Obrázek 19) – stěr A, B, C. Postup přípravy odpovídal postupu popsaného při přípravě spikovaných povrchů. Pro každý typ stěru a daný materiál byly připraveny tři paralelní vzorky.



**Obrázek 19:** Ilustrace různých stíracích metod testovaných v rámci této práce



**Obrázek 20:** Graf porovnání výtěžnosti jednotlivých typů stěrů na povrchu 316 nerezová ocel



**Obrázek 21:** Graf porovnání výtěžnosti jednotlivých typů stěrů na povrchu PVC

Na základě porovnání získaných výsledků (Obrázek 20 a Obrázek 21) lze konstatovat, že stěr typu B vykazoval nejvyšší účinnost jak na hladkém povrchu nerez, tak na pórovitém PVC.

### **5.3 Validace metody**

Po vývoji UHPLC-MS/MS metody a optimalizaci přípravy vzorku následovala validace celé analytické metody. Účelem validace bylo ověření vhodnosti analytické metody pro kvantitativní stanovení cytostatik z povrchů.

Pro zamýšlené použití metody byly hodnoceny validační parametry jako je linearita, test způsobilosti systému, přesnost, správnost, selektivita, mez detekce a mez stanovitelnosti.

#### **5.3.1 Test způsobilosti systému**

V rámci validace metody byl proveden test způsobilosti systému (SST), cílem toho testu je ověření, že systém LC-MS vykazuje reprodukovatelnost a stabilitu pro danou analytickou metodu. SST test byl realizován pomocí šesti po sobě jdoucích nástřiků kalibračního standardu na úrovni kalibračního bodu K5.

Pro vyhodnocení testu způsobilosti byly sledovány dva parametry. Jednalo se o relativní směrodatnou odchylku retenčního času (RSD RT) a relativní směrodatnou odchylku plochy píku (RSD area). Za vyhovující podmínky byly stanoveny následující akceptační meze: RSD retenčního času  $\leq 1,0 \%$  a RSD plochy píků  $\leq 10 \%$ . Tyto limity byly aplikovány na všechny validované analyty.

Všechny analyty tyto podmínky splnily, konkrétní hodnoty RSD pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v příloze B (Tabulka 30 až Tabulka 39).

Na základě výsledků je možné konstatovat, že systém vykazuje potřebnou opakovatelnost pro rutinní použití metody a je způsobilý pro kvantitativní stanovení sledovaných látek v rámci navržené LC-MS metody.

#### **5.3.2 Specifita/Selektivita**

Specifita/selektivita vyvinuté metody byla hodnocena s cílem spolehlivě identifikovat a kvantifikovat daná cytostatika bez vlivu interferencí. Selektivita byla ověřena proměřením slepého vzorku, který vykazoval nulový nebo zanedbatelný signál v retenčním čase daných analytů. Jedním z prvků zajišťující vysokou selektivitu je využití hmotnostního analyzátoru s vysokým rozlišením. Nezbytným prvkem pro zajištění selektivity bylo využití konfirmačního

iontu pro každý analyt, což současně zvyšuje spolehlivost jeho identifikace a eliminuje riziko vzniku falešně pozitivní odezvy.

### 5.3.3 Správnost

Správnost extrakčního kroku metody byla provedena na dvou koncentračních hladinách. Na koncentrační hladině L (2 %) a hladině H (100 %). Pro každou koncentrační úroveň byly připraveny tři nezávislé vzorky spikování stěrové tyčinky. Hodnocení správnosti bylo provedeno za základě procentuální výtěžnosti (rovnice 1), pro kterou bylo stanoveno akceptační kritérium (80–120) %.

$$\text{Správnost (\%)} = \frac{c_{exp}}{c_{nom}} \cdot 100 \quad (1)$$

Kde  $c_{exp}$  je koncentrace zjištěná měřením a  $c_{nom}$  je teoretická (nominální) koncentrace, která byla ke vzorku přidána.

Výsledky všech měření splnila stanovená kritéria, je možné tedy konstatovat, že metoda extrakce vykazuje dostatečnou míru správnosti v rámci daného rozsahu. Výsledky pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v souhrnných tabulkách v příloze B (Tabulka 30 až Tabulka 39).

### 5.3.4 Přesnost

Přesnost extrakčního kroku metody z hlediska opakovatelnosti přípravy spikované stěrové tyčinky byla také ověřena na dvou koncentračních hladinách. Na koncentrační hladině L (2 %) a hladině H (100 %), kde každá koncentrační hladina byla připravena v šestici. Přesnost byl hodnocena výpočtem relativní směrodatné odchylky (RSD). Pro vyhovující výsledek bylo stanoveno kritérium  $RSD \leq 20\%$  pro obě koncentrační úrovně. Jak vyplývá z výsledků uvedených v tabulkách v příloze B (Tabulka 30 až Tabulka 39), pro všechny testované analyty nebylo zvolené kritérium přesnosti překročeno.

### 5.3.5 Robustnost

Robustnost metody byla hodnocena již v průběhu vývoje analytického postupu, a to prostřednictvím cíleného testování různých parametrů na výtěžnost extrakce. Podle směrnice ICH Q2 (R2) pro validaci metod je tento přístup hodnocení robustnosti možný, pokud jsou změny provedeny systematicky a reprodukovatelně.

V rámci hodnocení robustnosti byly testovány tři klíčové parametry: smáčecí roztok, extrakční roztok a vhodný typ stěru.

### 5.3.6 Stanovení meze detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ)

Při validaci metody byly mez detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) stanoveny v souladu s ICH Q2 (R2). Mez detekce (LOD) byla stanovena základě metody minimální detekovatelné koncentrace (MDL). Z důvodu použití hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením nebylo možné pro stanovení hodnoty LOD využít přístup založený na poměru signálu k šumu (S/N), protože vykazuje nulovou hodnotu signálu ve slepém vzorku.

Metoda MDL vychází se statistického vyhodnocení opakovaných měření nízké koncentrace analytu. Výpočet byl proveden podle rovnice 2.

$$MDL = S \cdot t_{(n-1, 1-\alpha=0,99)} \quad (2)$$

Kde  $t$  je hodnota Studentova t-testu pro příslušný počet stupňů volnosti a hladinu významnosti 99 %. Pro  $n = 6$  a  $\alpha = 0,01$  je hodnota  $t = 3,365$  a  $S$  je směrodatná odchylka opakovaných měření nízké koncentrace. Hodnoty MDL, které reprezentují LOD, jsou uvedeny v souhrnných tabulkách v příloze B (Tabulka 30 až Tabulka 39).

Mez kvantifikace (LOQ) byla stanovena na základě experimentálního ověření metody v nízkých hladinách. Tento přístup odpovídá doporučením směrnice ICH Q2 (R2), která umožňuje stanovit LOQ na základě dat o správnosti a přesnosti. Měření bylo provedeno na hladině očekávaného limitu kvantifikace. K hodnocení byla použita relativní směrodatná odchylka (RSD) a procentuální odchylka nalezené hodnoty od nominální koncentrace. Z výsledků vyplývá, že jako hodnotu LOQ lze použít koncentraci odpovídající 2 % analyzovaného koncentračního rozsahu.

### 5.3.7 Linearita

Jedním z hodnocených validačních parametrů je linearita metody. Linearita metody byla hodnocena pro deset cílových analytů. Pro všechny analyty byl využit kalibrační model založený na lineární regresi se zahrnutím offsetu a použitím váhového faktoru 1/množství. Tento přístup byl zvolen na základě vyšší variability dat při nízkých hladinách a zajišťuje tak potlačení vlivu rozptylu hodnot na vyšších kalibračních hladinách. Koncentrační rozsah metody byl specifický pro každý analyt, ale vždy pokrýval rozsah (1–120) % vztaženo na hladinu H (100 %).

Pro hodnocení linearitu byl využit korelační koeficient ( $r$ ) a koeficient determinace ( $R^2$ ). Pro vyhovující výsledek bylo stanoveno kritérium  $r \geq 0,995$  a  $R^2 \geq 0,990$ . Tato kritéria splňovaly všechny analyty, což potvrzuje dobrou lineární závislost mezi koncentrací analytu a odezvou detektoru v daném rozsahu a vhodnosti regresního modelu. Dalším parametrem pro hodnocení modelu byl RSE, ten vyjadřuje relativní směrodatnou chybu regresního modelu. Pro RSE nebylo stanoveno kritérium, jedná se doplňkové hodnocení spolehlivosti kalibračního modelu.

Parametry hodnotící kalibrační model jednotlivých analytů jsou uvedeny v souhrnných tabulkách v příloze B (Tabulka 30 až Tabulka 39), kde je pro každý analyt uveden koncentrační rozsah metody, rovnice kalibrační přímky ve tvaru  $y = kx + q$  ( $k$  je směrnice kalibrační přímky,  $q$  je průsečík s osou  $y$ ,  $y$  odpovídá odezvě detektoru a  $x$  koncentraci standardu v ng/ml) a dále pak parametry hodnotící model jako je  $r$ ,  $R^2$  a RSE. Kalibrační závislosti pro jednotlivé analyty jsou uvedeny na v příloze C (Obrázek 24 až Obrázek 33). Na základě výsledků uvedených v tabulkách je možno konstatovat, že navržený kalibrační model splňuje požadovaná kritéria pro testované analyty.

### **5.3.8 Stabilita**

V rámci validace metody nebyla testována stabilita analytů v roztoku. Pro zajištění správnosti výsledků byla stabilita řešena organizačními opatřeními. Zásobní roztoky analytů byly uchovávány v mrazáku při teplotě  $-15\text{ °C}$ . Tím bylo minimalizováno riziko jejich degradace v čase. Pracovní standardy byly vždy připravovány čerstvé a těsně před analýzou. Tento postup snižuje vliv možné nestability na výsledky měření. Během analýzy nebyla pozorována změna odezvy nebo problémy s opakovatelností měření.

### **5.3.9 Rozsah metody**

Rozsah metody byl stanoven jako rozmezí koncentrací, ve kterém byla prokázána linearita odezvy, přesnost a správnost metody.

Na základě výsledků měření byly pro jednotlivé analyty určeny rozsahy metody, které jsou uvedeny v souhrnných tabulkách v příloze B (Tabulka 30 až Tabulka 39).

## **5.4 Výsledky stěrů z povrchů materiálů**

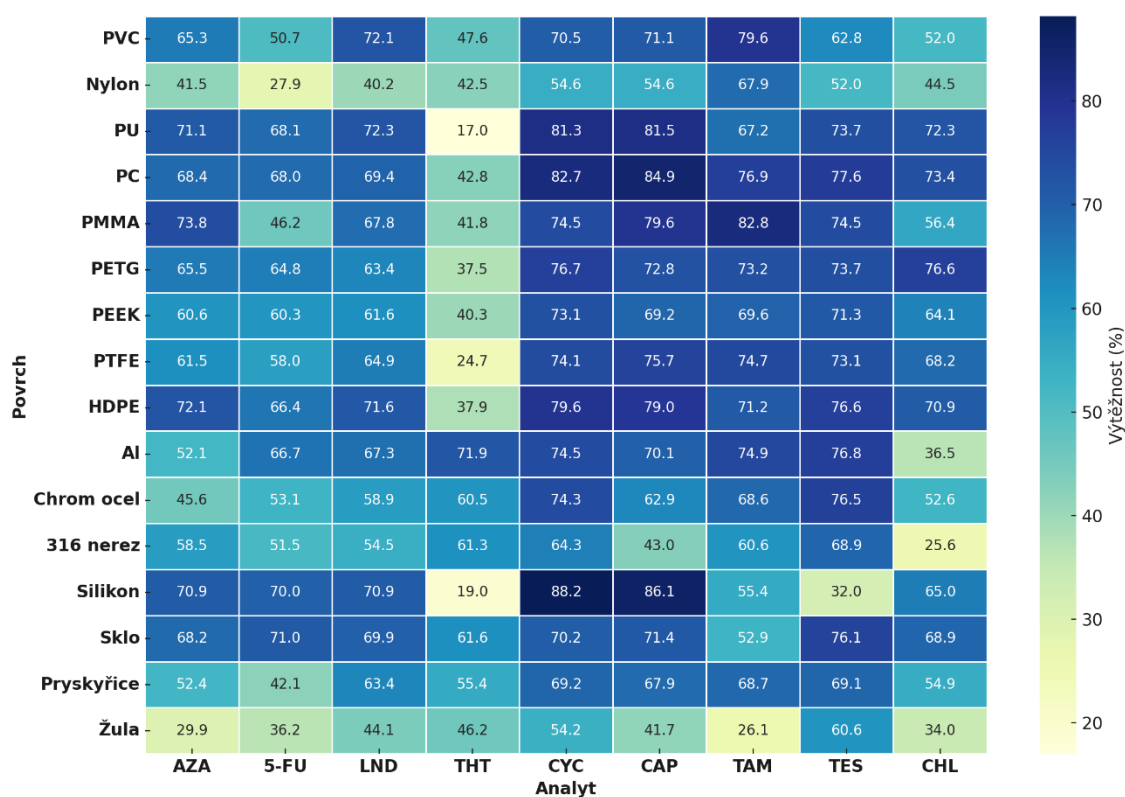
Experimentálně stanovené výtěžnosti pro testované analyty a povrchy jsou souhrnně uvedeny v Tabulce 12 až Tabulce 27. V nich je rovněž reportována hodnota LOD specifická pro daný

typ materiálu. Pro jeho výpočet byla použita instrumentální hodnota LOD a průměrná výtěžnost stěru.

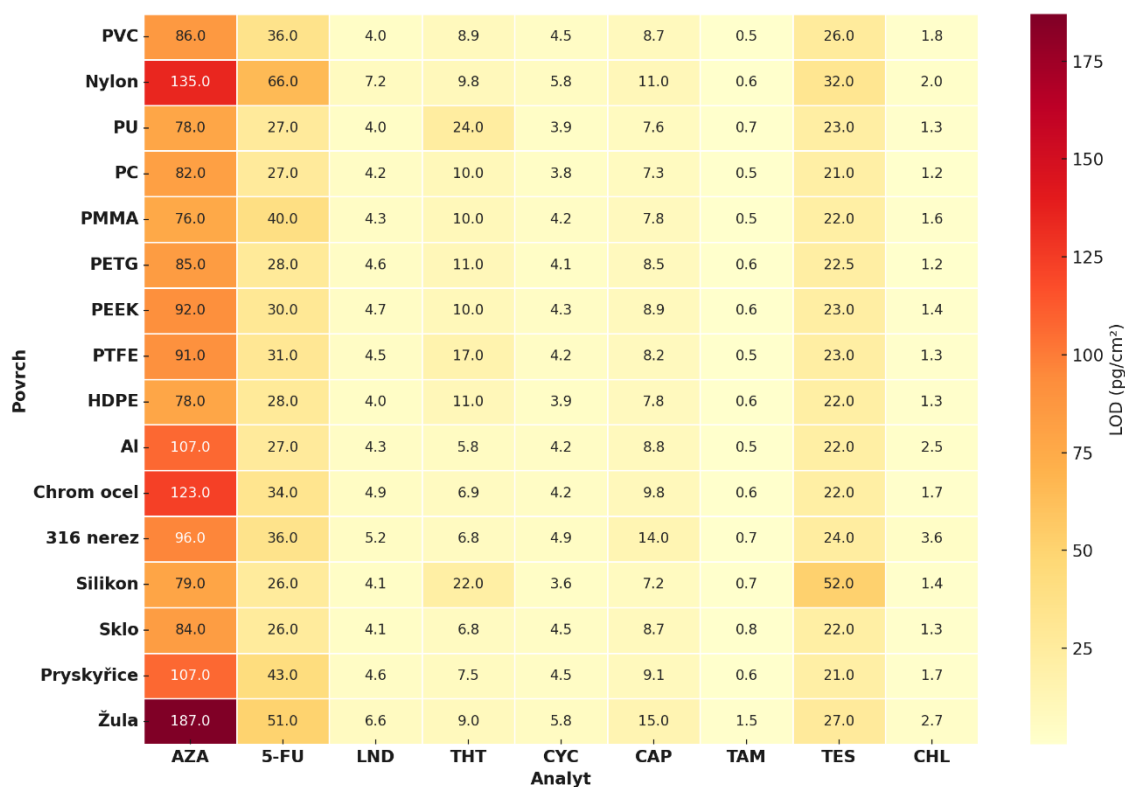
Z porovnání experimentálně stanovených výtěžností na různých testovaných površích a v závislosti na konkrétním analytu lze vysledovat zajímavé trendy (Obrázek 22). U AZA byla nejnižší výtěžnost zjištěna na leštěné žule (29,9 %), nejvyšší na plexiskle (73,8 %) a průměrná 60 %. Celkově AZA vykazuje konzistentní výtěžnost, výjimku ale tvoří již zmiňovaná leštěná žula. 5-FU vykazuje nejnižší výtěžnost z nylonu (27,9 %), nejvyšší ze skla (71,0 %) a průměrnou 56 %. Celkově 5-FU vykazuje konzistentní výtěžnost, výjimku ale tvoří již zmiňovaný nylon. LND vykazuje nejnižší výtěžnost z nylonu (40,2 %), nejvyšší z polyuretanu (72,3 %) a průměrnou 63 %. THT vykazuje nejnižší výtěžnost z polyuretanu (17,0 %), nejvyšší z anodisovaného hliníku (71,9 %) a průměrnou 44 %. Celkově THT vykazuje konzistentní výtěžnost, výjimku ale tvoří některé plastové materiály: již zmiňovaný polyuretan, PTFE (16,5 %) a silikon (19,0 %). CYC vykazuje nejnižší výtěžnost z leštěné žuly (54,2 %), nejvyšší ze silikonu (88,2 %) a průměrnou 73 %. CAP vykazuje nejnižší výtěžnost z leštěné žuly 41,7 %, nejvyšší ze silikonu (86,1 %) a průměrnou 69 %. TAM-cit vykazuje nejnižší výtěžnost z leštěné žuly (26,1 %), nejvyšší z plexiskla (82,8 %) a průměrnou 67 %. Celkově TAM-cit vykazuje konzistentní výtěžnost, výjimku ale tvoří již zmiňovaná leštěná žula. TES vykazuje nejnižší výtěžnost ze silikonu (32,0 %), nejvyšší z polykarbonátu (77,6 %) a průměrnou 68 %. Celkově TES vykazuje konzistentní výtěžnost, výjimku ale tvoří již zmiňovaný silikon. CHL vykazuje nejnižší výtěžnost z 316 nerezové oceli (25,6 %), nejvyšší z PETG (76,6 %) a průměrnou 57 %. Celkově CHL vykazuje konzistentní výtěžnost, výjimku ale tvoří již zmiňovaná 316 nerezová ocel, leštěná žula (34,0 %) a anodisovaný hliník (36,5 %). Mezi analyty, které se obecně hůře stírají z povrchů, patří polární až středně polární analyty: THT, 5-FU a AZA. Naopak nepolární analyty, např. CYC, CAP a TES, vykazují lepší spolehlivěji výtěžnost z povrchů. Toto zjištění může na první pohled působit paradoxně ve světle výsledků optimalizace smáčecího roztoku. Možným vysvětlením tohoto jevu může být kombinace interakce mezi analytem a povrchem a zároveň smáčivosti smáčecího roztoku. Polární analyty mohou s povrchem tvořit vodíkové vazby nebo elektrostatické interakce, které jsou účinněji narušovány polárnějším smáčecím roztokem (EtOH/H<sub>2</sub>O – 50/50 v/v). Nicméně důležitou roli může sehrát také povrchové napětí/smáčivost smáčecího roztoku – čistý etanol, díky schopnosti lépe smáčet jak hydrofobní, tak hydrofilní povrchy, může působit jako efektivnější smáčecí roztok než jeho směs s vodou. Tato kombinace silnější vazby polárních analytů k povrchu a vyšší smáčivosti etanolu tak může ve výsledku vést k lepší účinnosti čistého etanolu při stírání.

Výtěžnosti napříč analyty se pro povrchy pohybují v rozmezí (60–75) %. Trochu překvapivě bylo zjištěno, že leštěná žula jednoznačně vykazuje nejnižší výtěžnosti napříč většinou analytů (průměrně 41,7 %). Žula jako hornina je tvořena křemenem, živci a slídou, a má obecně malou přirozenou poréznost. Navíc leštěním se její povrch ještě více uzavírá. Možným vysvětlením tedy může být přítomnost mikroskopických trhlinek na povrchu modelového povrchu. Nejvyšší výtěžnost byla zjištěna pro silikon (průměrně 66,0 %) s výjimkou THT (výtěžnost 19,0 %), zbytek výtěžností je konzistentně vysoký.

Porovnání hodnot LOD napříč testovanými povrchy ukazuje, že vyvinutá metoda vykazuje nejvyšší citlivost vůči TAM-cit (Obrázek 23).



Obrázek 22: Heatmapa výtěžnosti pro jednotlivé analyty napříč povrchy



Obrázek 23: Heatmapa LOD (pg/cm<sup>2</sup>) pro jednotlivé analyty napříč povrchy

Tabulka 12: Výsledky sěrů z povrchového materiálu – polyvinylchlorid (PVC)

Parametry	Analyt									
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL	
Výtěžnost – L (%)	54.1	40.3	71.6	49.0	65.5	63.2	92.6	63.5	48.0	
RSD (%)	10.4	14.5	5.6	2.8	5.7	10.0	21.4	2.9	5.5	
Výtěžnost – H (%)	76.5	61.1	72.6	46.2	75.5	78.9	66.5	62.0	56.0	
RSD (%)	0.9	13.9	1.6	7.9	2.3	1.0	1.0	6.1	5.8	
Průměrná výtěžnost (%)	65.3	50.7	72.1	47.6	70.5	71.1	79.6	62.8	52.0	
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	86	36	4.0	8.9	4.5	8.7	0.5	26	1.8	

Tabulka 13: Výsledky sěrů z povrchového materiálu – nylon (PA)

Parametry	Analyt									
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL	
Výtěžnost – H (%)	41.5	27.9	40.2	42.5	54.6	54.6	67.9	52.0	44.5	
RSD (%)	17.0	18.6	13.6	13.2	13.6	13.7	8.6	11.7	14.5	
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	135	66	7.2	9.8	5.8	11	0.6	32	2.0	

**Tabulka 14:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – polyuretan (PU)

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – H (%)	71.1	68.1	72.3	17.0	81.3	81.5	67.2	73.7	72.3
RSD (%)	5.3	6.1	5.8	23.6	4.8	3.6	8.1	5.8	7.4
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	78	27	4.0	24	3.9	7.6	0.7	23	1.3

**Tabulka 15:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – polykarbonát (PC)

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – H (%)	68.4	68.0	69.4	42.8	82.7	84.9	76.9	77.6	73.4
RSD (%)	4.2	2.0	3.3	19.6	1.2	8.9	2.8	3.7	3.6
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	82	27	4.2	10	3.8	7.3	0.5	21	1.2

**Tabulka 16:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – plexisklo (PMMA)

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – H (%)	73.8	46.2	67.8	41.8	74.5	79.6	82.8	74.5	56.4
RSD (%)	5.8	5.8	4.7	7.3	4.6	4.2	5.3	4.3	5.9
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	76	40	4.3	10	4.2	7.8	0.5	22	1.6

**Tabulka 17:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – PETG

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – H (%)	65.5	64.8	63.4	37.5	76.7	72.8	73.2	73.7	76.6
RSD (%)	10.1	12.4	10.5	25.2	7.9	10.3	9.8	9.4	19.6
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	85	28	4.6	11	4.1	8.5	0.6	22.5	1.2

**Tabulka 18:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – PEEK

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – H (%)	60.6	60.3	61.6	40.3	73.1	69.2	69.6	71.3	64.1
RSD (%)	7.8	5.3	6.9	20.8	5.2	4.7	7.1	5.8	5.7
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	92	30	4.7	10	4.3	8.9	0.6	23	1.4

**Tabulka 19:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – PTFE

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – L (%)	57.9	51.3	63.7	16.5	74.7	77.7	78.0	73.3	66.9
RSD (%)	29.8	7.3	1.5	8.5	4.9	4.5	1.7	7.0	3.1
Výtěžnost – H (%)	65.1	64.6	66.1	32.8	73.5	73.6	71.4	72.8	69.4
RSD (%)	3.3	3.3	4.9	12.6	3.6	5.9	4.6	3.9	4.9
Průměrná výtěžnost (%)	<b>61.5</b>	<b>58.0</b>	<b>64.9</b>	<b>24.7</b>	<b>74.1</b>	<b>75.7</b>	<b>74.7</b>	<b>73.1</b>	<b>68.2</b>
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	<b>91</b>	<b>31</b>	<b>4.5</b>	<b>17</b>	<b>4.2</b>	<b>8.2</b>	<b>0.5</b>	<b>23</b>	<b>1.3</b>

**Tabulka 20:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – Polyethylen (HDPE)

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – H (%)	<b>72.1</b>	<b>66.4</b>	<b>71.6</b>	<b>37.9</b>	<b>79.6</b>	<b>79.0</b>	<b>71.2</b>	<b>76.6</b>	<b>70.9</b>
RSD (%)	0.6	3.1	1.4	13.7	2.0	2.1	3.0	0.2	0.5
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	<b>78</b>	<b>28</b>	<b>4.0</b>	<b>11</b>	<b>3.9</b>	<b>7.8</b>	<b>0.6</b>	<b>22</b>	<b>1.3</b>

**Tabulka 21:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – anodisovaný hliník

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – L (%)	49.0	59.4	63.3	75.1	74.8	72.8	75.3	76.4	27.4
RSD (%)	4.6	10.9	5.1	2.3	14.8	28.2	15.0	8.1	8.7
Výtěžnost – H (%)	55.1	73.9	66.1	68.7	74.2	67.4	74.4	77.2	45.6
RSD (%)	6.7	2.3	4.9	4.9	1.2	2.4	2.2	4.3	4.0
Průměrná výtěžnost (%)	<b>52.1</b>	<b>66.7</b>	<b>67.3</b>	<b>71.9</b>	<b>74.5</b>	<b>70.1</b>	<b>74.9</b>	<b>76.8</b>	<b>36.5</b>
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	<b>107</b>	<b>27</b>	<b>4.3</b>	<b>5.8</b>	<b>4.2</b>	<b>8.8</b>	<b>0.5</b>	<b>22</b>	<b>2.5</b>

**Tabulka 22:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – chromovaná ocel

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – H (%)	<b>45.6</b>	<b>53.1</b>	<b>58.9</b>	<b>60.5</b>	<b>74.3</b>	<b>62.9</b>	<b>68.6</b>	<b>76.5</b>	<b>52.6</b>
RSD (%)	20.9	10.1	12.1	1.1	4.3	13.8	4.7	4.1	23.3
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	<b>123</b>	<b>34</b>	<b>4.9</b>	<b>6.9</b>	<b>4.2</b>	<b>9.8</b>	<b>0.6</b>	<b>22</b>	<b>1.7</b>

**Tabulka 23:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – 316 nerezová ocel

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – L (%)	59.5	52.4	55.3	66.9	64.7	45.0	57.7	69.6	19.0
RSD (%)	5.7	16.0	3.7	3.5	7.3	6.5	6.5	9.0	26.2
Výtěžnost – H (%)	57.5	50.6	53.6	55.7	63.8	40.9	63.5	68.1	32.2
RSD (%)	3.8	9.3	15.7	16.9	7.1	16.9	13.1	6.2	14.7
<b>Průměrná výtěžnost (%)</b>	<b>58.5</b>	<b>51.5</b>	<b>54.5</b>	<b>61.3</b>	<b>64.3</b>	<b>43.0</b>	<b>60.6</b>	<b>68.9</b>	<b>25.6</b>
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	<b>96</b>	<b>36</b>	<b>5.2</b>	<b>6.8</b>	<b>4.9</b>	<b>14</b>	<b>0.7</b>	<b>24</b>	<b>3.6</b>

**Tabulka 24:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – silikon

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – H (%)	<b>70.9</b>	<b>70.0</b>	<b>70.9</b>	<b>19.0</b>	<b>88.2</b>	<b>86.1</b>	<b>55.4</b>	<b>32.0</b>	<b>65.0</b>
RSD (%)	4.0	3.8	2.6	19.9	5.2	2.8	6.8	11.6	15.0
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	<b>79</b>	<b>26</b>	<b>4.1</b>	<b>22</b>	<b>3.6</b>	<b>7.2</b>	<b>0.7</b>	<b>52</b>	<b>1.4</b>

**Tabulka 25:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – sklo

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – L (%)	66.7	73.0	71.1	66.9	73.0	73.0	58.9	82.7	65.2
RSD (%)	29.3	13.0	10.4	1.1	5.1	13.3	15.4	23.7	3.8
Výtěžnost – H (%)	69.6	69.0	68.7	56.2	67.3	69.8	46.9	69.5	72.6
RSD (%)	3.2	3.3	3.9	2.5	4.0	4.2	20.4	3.5	3.6
<b>Průměrná výtěžnost (%)</b>	<b>68.2</b>	<b>71.0</b>	<b>69.9</b>	<b>61.6</b>	<b>70.2</b>	<b>71.4</b>	<b>52.9</b>	<b>76.1</b>	<b>68.9</b>
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	<b>84</b>	<b>26</b>	<b>4.1</b>	<b>6.8</b>	<b>4.5</b>	<b>8.7</b>	<b>0.8</b>	<b>22</b>	<b>1.3</b>

**Tabulka 26:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – fenolická pryskyřice

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – H (%)	<b>52.4</b>	<b>42.1</b>	<b>63.4</b>	<b>55.4</b>	<b>69.2</b>	<b>67.9</b>	<b>68.7</b>	<b>69.1</b>	<b>54.9</b>
RSD (%)	7.3	11.1	5.5	6.6	5.2	5.1	3.2	4.7	1.3
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	<b>107</b>	<b>43</b>	<b>4.6</b>	<b>7.5</b>	<b>4.5</b>	<b>9.1</b>	<b>0.6</b>	<b>21</b>	<b>1.7</b>

**Tabulka 27:** Výsledky stěrů z povrchového materiálu – leštěná žula

Parametry	Analyt								
	AZA	5-FU	LND	THT	CYC	CAP	TAM	TES	CHL
Výtěžnost – H (%)	29.9	36.2	44.1	46.2	54.2	41.7	26.1	60.6	34.0
RSD (%)	4.1	2.0	8.8	8.8	6.0	4.0	14.2	2.4	14.1
LOD (pg/cm <sup>2</sup> )	187	51	6.6	9.0	5.8	15	1.5	27	2.7

## 6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na problematiku monitoringu cytostatik ve výrobním a analytickém prostředí, přičemž hlavním cílem bylo vyvinout a validovat multireziduální analytickou metodu umožňující stanovení velmi nízkých koncentrací cytostatik z různých typů povrchů.

V teoretické části práce byla zpracována rešerše zaměřená na charakteristiku cytostatik, jejich mechanismus účinku a důvody, proč je jejich přítomnost v pracovním prostředí třeba sledovat. Součástí této části bylo rovněž shrnutí dostupných přístupů k environmentálnímu monitoringu.

Experimentální část se věnovala vývoji metody pro stanovení jedenácti vybraných cytostatik za využití techniky LC-MS. Metoda byla úspěšně validována v souladu s požadavky ICH Q2(R2) pro devět z těchto látek. V rámci validace byly hodnoceny kritické parametry jako test způsobilosti systému (SST), selektivita, správnost, přesnost, linearita, limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). Přesnost analytické metody byla hodnocena ve formě opakovatelnosti. Mezilehlá preciznost nebyla hodnocena, neboť v rámci validace bylo možné ověřit pouze variabilitu mezi jednotlivými dny analýzy, bez možnosti změny dalších relevantních podmínek, např. přístroj, analytik. Vzhledem k jednoduchosti přípravy vzorku a nízkému riziku variability je tento přístup považován za odpovídající účelu metody. Parametr stability analytu nebyl v rámci validace hodnocen, jelikož nebyl považován za kritický vzhledem k zamýšlenému použití metody. Robustnost metody byla prokazatelně ověřena v průběhu jejího vývoje a byla shledána vyhovující.

Experimenty byly prováděny na šestnácti typech povrchů s rozdílnou strukturou, zahrnující materiály s hladkým i porézním charakterem, které reprezentují běžně se vyskytující pracovní a konstrukční materiály ve výrobním a laboratorním prostředí. Pro každý z testovaných analytů byly stanoveny výtěžnosti stěru z jednotlivých povrchů, přičemž byl hodnocen vliv typu materiálu na efektivitu odběru. Zároveň byly pro různé povrchové typy určeny meze detekce, což umožnilo posoudit citlivost a použitelnost metody v podmínkách odpovídajících reálnému provozu.

Výsledky této práce potvrzují, že navržená analytická metodika představuje spolehlivý nástroj pro monitoring povrchové kontaminace cytostatiky ve výrobních a laboratorních prostorách společnosti Advande Labs s.r.o. S ohledem na zvolený soubor cytostatik je metodika vhodná

i pro sledování kontaminace cytostatiky v jiných prostředích, např. ve zdravotnických zařízeních. Metodika tak vykazuje vysoký potenciál pro praktické využití jak v rámci společnosti, tak i mimo ni.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

[1] HAMPL F., PALEČEK J.: *Farmakochemie*. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2002. 640 s. ISBN 80-7080-495-5

[2] MEHTA S. C., KAR. Chemotherapy of Malignancy and Immunosuppressive Agents. In *Pharmaceutical Pharmacology*. London: New Academic Science Limited, 2014, s. 793-808. ISBN: 978 1 781830 68 0

Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpPP000032/pharmaceutical-pharmacology/pharmaceutical-pharmacology>

[3] ZIPFEL P. F., SKERKA CH. From magic bullets to modern therapeutics: Paul Ehrlich, the German immunobiologist and physician coined the term „complement“. *Molecular Immunology*. 2022, 150, s. 90-98. ISSN 0161-5890.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.08.002>.

[4] HOLÝ A. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik* 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2004. 414 s. ISBN:80-244-0855-4

[5] VARDANYAN R., HRUBY V. Temozolomide-Temodar. in *Synthesis of Best-Seller Drugs*. Elsevier 2016, s 495-547. ISBN: 978-0-12-411492-0.

Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010V0MT1/synthesis-best-seller/temozolomide-temodar>

[6] U.S. Department of Health and Human Services. Cyclophosphamide. *15th Report on Carcinogens 2021*. U.S. Department of Health and Human Services. 2021, s. 163.

Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt013DNCMC/15th-report-carcinogens/cyclophosphamide>

[7] IARC. Chlorambucil. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, In Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents*. Lyon, France:

International Agency for Research on Cancer. 1981. s. 115–136. vol. 26. [cit. 13.03.2024]  
ISBN 9283212266. Dostupné z: <https://publications.iarc.fr/44>

[8] U.S. Department of Health and Human Services. Thiotepea. *15th Report on Carcinogens 2021*. U.S. Department of Health and Human Services. 2021, s. 532.

Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt013DNGV2/15th-report-carcinogens/thiotepa>

[9] Temozolomide (Temodar) - Uses, Side Effects, and More. WebMD [online]. WebMD LLC ©2005-2025.

Dostupné z: <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-17512/temodar-oral/details>

[10] POHANISH R. P. *M-methotrexate. Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens (Seventh Edition)*. William Adrew Publishing, 2017, s. 1912-1914.

ISBN9780323389686.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-38968-6.00012-0>.

[11] ROUTLEDGE P. A, HUTCHINGS A. D. Chapter 9.22 - Therapeutic Drug Monitoring (TDM). IN: WILD T. ed. *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*. Elsevier, 2013, s. 945-962. ISBN 9780080970370.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00076-2>.

[12] Fluorouracil (5FU). *Cancer Research UK [online]*. Last reviewed: 26 Jul 2023.

Dostupné z: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/treatment/drugs/fluorouracil>

[13] Capecitabine Accord: EPAR - Product Information. *European medicines agency [online]*. European Medicines Agency © 1995 - 2025

Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/capecitabine-accord-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/capecitabine-accord-epar-product-information_en.pdf)

- [14] Capecitabine Accord: EPAR - Medicine overview. *European medicines agency [online]*. European Medicines Agency © 1995 - 2025.  
Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/capecitabine-accord-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/capecitabine-accord-epar-medicine-overview_en.pdf)
- [15] U.S. Department of Health and Human Services. Azacitidine. *15th Report on Carcinogens 2021*. U.S. Department of Health and Human Services. 2021, s. 65.  
Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt013DNBI1/15th-report-carcinogens/azacitidine>
- [16] BHAT S.Z., DOBS A.S. Testosterone Replacement Therapy: A Narrative Review with a Focus on New Oral Formulations. *Touch REVIEWS in Endocrinology*. 2022, 18(2), 133-140.  
doi: 10.17925/EE.2022.18.2.133.  
Dostupné z: [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9835814/?utm\\_source=chatgpt.com](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9835814/?utm_source=chatgpt.com)
- [17] OSTERBERG E.C., BERNIE A.M., RAMASAMY R. Risks of testosterone replacement therapy in men. *Indian Journal of Urology*. 2014, 30(1), 2-7. doi: 10.4103/0970-1591.124197.  
Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3897047/>
- [18] ARMOIRY X., AULAGNER G., FACON T. Lenalidomide in the treatment of multiple myeloma: a review. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2008 Jun, 33(3), 219-26.  
DOI: 10.1111/j.1365-2710.2008.00920.x. PMID: 18452408.  
Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18452408/>
- [19] PORTILHA-CUNHA M.F., ALVES A., SANTOS M.S.F. Cytostatics in Indoor Environment: An Update of Analytical Methods. *Pharmaceutical*. 2021, 14, 574.  
Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph14060574>
- [20] LIU Y., YIN T., FENG Y., CONA M. M., HUANG G., LIU J., SONG S., JIANG Y., XIA Q., SWINNEN J. V., BORMANS G., HIMMELREICH U., OYEN R., NI Y.

Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quant Imaging Med Surg.* 2015, 5(5), 708-729. doi:10.3978/j.issn.2223-4292.2015.06.01.

Dostupné z: <https://qims.amegroups.org/article/view/7044/8821>

[21] SARASIN A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2003, 544(2-3), 99-106. ISSN 1383-5742.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.06.024>.

[22] GREŠÁKOVÁ V. Cesty mutageneze. *Živa.* 2017, 44.

Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/2017-2/cesty-mutageneze.html>

[23] QUEREMEL MILANI D.A., TADI P. Genetics, Chromosome Abnormalities. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557691/>

[24] KUPEC, J., Toxikologie. Vyd. 2. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2004. 176s. Učební text vysokých škol. ISBN 80-7318-216-5.

[25] MCELHATTON P.R. Principles of teratogenicity. *Current Obstetrics & Gynaecology.* Volume 9, Issue 3, 1999, 163-169. ISSN 0957-5847.

Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0957-5847\(99\)90060-4](https://doi.org/10.1016/S0957-5847(99)90060-4).

[26] MAZZU-NASCIMENTO T., MELO D.G., MORBIOLLI G.G., CARRILHO E., VIANNA F.S.L., SILVA A.A., SCHULER-FACCINI L. Teratogens: a public health issue - a Brazilian overview. *Genet Mol Biol.* 2017, 40(2), 387-397. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0179.

Dostupné z: [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5488458/?utm\\_source=chatgpt.com](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5488458/?utm_source=chatgpt.com)

[27] HORÁK, J., KLUSOŇ, P., LINHART, I., Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004. 188 s. ISBN 80-7080-548-X.

[28] ŠÍPEK, A. jr. Vrozené vývojové vady. *Genetika - Biologie; Váš zdroj informací o genetice a biologii. [online]*. [cit. 12. 4. 2025]

Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/vrozene-vyvojove-vady>

[29] ALYOUSEF, H. A multimodal discourse analysis of English dentistry texts written by Saudi undergraduate students: A study of theme and information structure. *Open Linguistics*. 2020, 6, s. 267–283. DOI: 10.1515/opli-2020-0103

[30] VALERO-GARCIA S., GONZÁLEZ-HABA E., GORGAS-TORNER M. Q., Herreros ALONSO-HERREROS J.M., CERCÓS-LLETÍ A.C., POVEDA-ANDRÉS J.L., et al. Monitoring contamination of hazardous drug compounding surfaces at hospital pharmacy departments. A consensus Statement. Practice guidelines of the Spanish Society of Hospital Pharmacists (SEFH). *Farmacia Hospitalaria*. 2021, 45(2), 96-107. DOI: 10.7399/fh.11655

[31] GONZALO N., MONTSE R., FONTANALS S., QUER N., CLOPÉS A. & MUNOZ C. Simultaneous determination of five cytotoxic drugs in surface wiped samples using liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the control of environmental contamination in a comprehensive cancer centre. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2024, 104(11), 2675-2690, DOI: 10.1080/03067319.2022.2070013.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/03067319.2022.2070013>

[32] KAREDAL M., JÖHNSSON R., WETTERLING M., BJÖRK B. & HEDMER M. A quantitative LC–MS method to determine surface contamination of antineoplastic drugs by wipe sampling, *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 2022, 19 (1), 50-66, DOI: 10.1080/15459624.2021.2000617.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/15459624.2021.2000617>

[33] DUGHERI S., MUCCI N., BUVALLETI E., et al. Monitoring surface contamination for thirty antineoplastic drugs: a new proposal for surface exposure levels (SELs). *Med Pr Work Health Saf*. 2022, 73(5), 383-396. doi:10.13075/mp.5893.01288.

Dostupné z:

<https://doi.org/10.13075/mp.5893.01288>

[34] Kimwipes® disposable wipers. *Merck [online]*. Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. © 2025.

Dostupné z:

[https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/z188956?utm\\_source=google%2Cgoogle&utm\\_medium=organicsshopping%2Ccpc&utm\\_campaign=21930340687&utm\\_content=174333280681&gad\\_source=1&gbraid=0AAAAAD8kLQSmY7QkliF7vUOZd18afWaU&gclid=CjwKCAiAh6y9BhBREiwApBLHCy0Ko6FqrPRYl3wkEn6rlGZ7hxp6zsj7518vebJ4kha6IAeBJmAZxRoC-UIQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/z188956?utm_source=google%2Cgoogle&utm_medium=organicsshopping%2Ccpc&utm_campaign=21930340687&utm_content=174333280681&gad_source=1&gbraid=0AAAAAD8kLQSmY7QkliF7vUOZd18afWaU&gclid=CjwKCAiAh6y9BhBREiwApBLHCy0Ko6FqrPRYl3wkEn6rlGZ7hxp6zsj7518vebJ4kha6IAeBJmAZxRoC-UIQAvD_BwE)

[35] Whatman® quantitative filter paper, ashless, Grade 42. *Merck [online]*. Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. © 2025.

Dostupné z:

[https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/wha1442047?utm\\_source=google%2Cgoogle&utm\\_medium=organicsshopping%2Ccpc&utm\\_campaign=21930340687&utm\\_content=174333280681&gad\\_source=1&gbraid=0AAAAAD8kLQSmY7QkliF7vUOZd18afWaU&gclid=CjwKCAiAh6y9BhBREiwApBLHC\\_hjdqMU5kpVWQudYDfDaSPyTeQO9MITN4ixTzNm2mr\\_RghrzrY4NhoCWq8QAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/aldrich/wha1442047?utm_source=google%2Cgoogle&utm_medium=organicsshopping%2Ccpc&utm_campaign=21930340687&utm_content=174333280681&gad_source=1&gbraid=0AAAAAD8kLQSmY7QkliF7vUOZd18afWaU&gclid=CjwKCAiAh6y9BhBREiwApBLHC_hjdqMU5kpVWQudYDfDaSPyTeQO9MITN4ixTzNm2mr_RghrzrY4NhoCWq8QAvD_BwE)

[36] Polyester Alpha Swabs. *Texwipe [online]*. ©2025 Texwipe.

Dostupné z: <https://www.texwipe.eu/polyester-large-alpha-swab>

[37] COLOMBO, M.; JERONIMO, M.; ASTRAKIANAKIS, G.; APTE C.; HON, C.-Y. Wipe sampling method and evaluation of environmental variables for assessing surface contamination of 10 antineoplastic drugs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Ann Work Expo Health* 2017, 61, 1003–1014.

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29028255/>

[38] SIMON N., GUICHARD N., ODOU P., DECAUDIN B., BONNABRY P., FLEURY-SOUVERAIN S. Efficiency of four solutions in removing 23 conventional antineoplastic drugs from contaminated surfaces. *PLOS ONE*. 2020, 15(6).

Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235131>

[39] dle ústního sdělení Jana Staňková, Zentiva k.s.

[40] HOLČAPEK M., JIRÁSKO R., LÍSA L. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*. Volume 1259, 2012, 3-15. ISSN 0021-9673.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.072>.

[41] KHALIKOVA M., JIREŠ J., HORÁČEK O., DOUŠA M., KUČERA R., NOVÁKOVÁ L. What is the role of current mass spectrometry in pharmaceutical analysis? *Mass Spectrometry Reviews*. 2023, 1-50.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mas.21858>

[42] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *The Evolution of Orbitrap Mass Analyzer Technology* [online]. 2022 [cit. 2025-04-05].

Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/blog/proteomics/the-evolution-of-orbitrap-mass-analyzer-technology/>

[43] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Thermo Fisher Scientific Launches LTQ Orbitrap Mass Spectrometer* [online]. 2005 [cit. 2025-04-05].

Dostupné z:

[https://web.archive.org/web/20090220174653/http://www.thermo.com/com/cda/newsevents/news\\_detail/0,,20344,00.html?ca=ms](https://web.archive.org/web/20090220174653/http://www.thermo.com/com/cda/newsevents/news_detail/0,,20344,00.html?ca=ms)

[44] ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline. *European Medicines Agency [online]*. European Medicines Agency © 1995 - 2025.

Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>

[45] B'HYMER C., CONNOR T., STINSON D., PRETTY J. Validation of an HPLC-MS/MS and wipe procedure for mitomycin C contamination. *Journal of Chromatographic Science*.

2015, 53, 619–624.

Dostupné z: <https://academic.oup.com/chromsci/article-abstract/53/4/619/348245?redirectedFrom=fulltext>

[46] RAMÍREZ M. C., SQUIBB K., MCDIARMID M. Accessible analytical methodology for assessing workplace contamination of antineoplastic drugs in limited-resource oncology health-care settings. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2016, 7, 11.

Dostupné z: <https://jast-journal.springeropen.com/articles/10.1186/s40543-016-0091-8>

[47] DA SILVA C.B.P, JULIO I.P., DONADEL G.E., MARTINS I. UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of cyclophosphamide, docetaxel, doxorubicin and 5-fluorouracil in surface samples. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2016, 82, 68–73.

Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1056871916300843?via%3Dihub>

[48] HETZEL T., VOM EYSER C., TUERK J., TEUTENBERG T., SCHMIDT T.C. Microliquid chromatography mass spectrometry for the analysis of antineoplastic drugs from wipe samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, 408, 8221–8229. Dostupné z:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-016-9932-y>

[49] BOBIN-DUBIGEON C., AMIAND M., PERCHERON C., AUDEVAL C., ROCHARD S., LEVNIA P., BARD J.-M. A New, validated wipe-sampling procedure coupled to LC–MS analysis for the simultaneous determination of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide in surface contamination. *J. Anal. Toxicol.* 2013, 37, 433–439.

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23828102/>

[50] ROSSIGNOL E., AMIAND M.B., SORRIEULL J., BARD J.M., BOBIN-DUBIEGON C. A fully validated simple new method for environmental monitoring by surface sampling for cytotoxics. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2020, 101, 106652.

Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31734280/>

[51] WAKUI N., OOKUBO T., IWASAKI Y., ITO R., MITUI M., YANO Y., SAITO K., NAKAZAWA H. Determination of exposure of dispensary drug preparers to cyclophosphamide by passive sampling and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Oncology Pharmacy Practise*. 2013, 19, 31–37.

Dostupné z: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1078155212451196>

[52] m/zCloud: Advanced Mass Spectral Database; Thermo Fisher Scientific.

[cit.06. 05. 2025]

Dostupné z: <https://www.mzcloud.org>

## **SEZNAM PŘÍLOH**

PŘÍLOHA A: Optimalizace MS podmínek

PŘÍLOHA B: Výsledky validace

PŘÍLOHA C: Kalibrační přímky

## PŘÍLOHA A: Optimalizace MS podmínek

Tabulka 28: Přehled laděných MS podmínek – AZA, TMZ, LND, MTX, THT, CYC, CAP, TES

Parameter	AZA		TMZ		LND		MTX	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
<i>m/z</i>	245.0876	243.0735	195.0625	193.05	260.1029	258.0884	455.1789	453.1645
Intenzity	8.00E+06	4.5E+06	9.0E+06	1.8E+05	8.0E+07	2.8E+06	5.5E+07	1.4E+07
Voltage (V)	1000	1500	1000	1000	1000	2900	1200	2900
Sheat gas (arb)	50	50(55)	50	50	50	50 (55)	50	50(45)
Aux gas (arb)	10	10	10	10	10	10	10	10
Sweep gas (arb)	0	0	0	0	0	0	0	0
ITT temp. (°C)	300	300	300	300	320	300	300	350 (320)
Vaporizer temp. (°C)	350	350	350	350	350	350	350	350
S-lens RF level (%)	90	70	60	70	80	90	95	100
Resolution (FWHM)	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000
Isol. Win.	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
MF B (%)	10 %		10 %		30 %		30 %	
Parameter	THT		CYC		CAP		TES	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
<i>m/z</i>	190.0562	188.0417	261.032	259.0175	360.1565	358.1422	289.2162	258.0884
Intenzita	5.5E+07	7.0E+05	1.5E+08	5.5E+05	1.5E+08	2.0E+08	1.5E+08	-
Voltage (V)	1000	-	1000	1000	2000	3200	3500	-
Sheat gas (arb)	50	-	50 (55)	50	50	50	50(40)	-
Aux gas (arb)	10	-	10	10	10	10	10	-
Sweep gas (arb)	0	-	0	0	0	0	0	-
ITT temp. (°C)	300	-	300	300	300	300	300	-
Vaporizer temp. (°C)	350	-	350	350	350	350	350	-
S-lens RF level (%)	65 %	-	80 %	90 %	85 %	100 %	100 %	-
Resolution (FWHM)	30000	-	30000	30000	30000	30000	30000	-
Isol. Win.	0.7	-	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	-
MF B (%)	50 %		50 %		80 %		80 %	

**Tabulka 29:** Přehled laděných MS podmínek - 5-FU, CHL, TAM

Parameter	5-FU		CHL		TAM	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
<i>m/z</i>	131.0251	129.0106	304.0866	302.0720	372.2322	370.2176
Intenzity	1.0E+06	3.5E+07	3.50E+08	-	2.0E+08	-
Voltage (V)	1000	1000	3500 (1500)	-	2000	-
Sheat gas (arb)	50	50	50	-	50	-
Aux gas (arb)	10	10	10	-	10	-
Sweep gas (arb)	0	0	0	-	0	-
ITT temp. (°C)	300	300	300	-	320	-
Vaporizer temp. (°C)	350	350	350	-	350	-
S-lens RF level (%)	100	100	70	-	80	-
Resolution (FWHM)	30000	30000	30000	-	30000	-
Isol. Win.	0.7	0.7	0.7	-	0.7	-
MF B (%)	10 %		80 %		80 %	

## PŘÍLOHA B: Výsledky validace

Tabulka 30: Výsledky validačních parametrů pro azacytidin

Validační výsledky:		Azacytidin			
<b>Parametr</b>					
<b>Test způsobilosti systému</b>	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (RT) (%)	≤ 1,0 %	0.7	Vyhovuje	
	RSD (Area) (%)	≤ 10 %	2.6	Vyhovuje	
<b>Správnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	18.4	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	98.0	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
RSD (Area) (%)	≤ 20 %	1	Vyhovuje		
Výtěžnost (%)	(80–120) %	104.9	Vyhovuje		
<b>Přesnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	13.5	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	98,1	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
RSD (Area) (%)	≤ 20 %	1,6	Vyhovuje		
Výtěžnost (%)	(80–120) %	105.0	Vyhovuje		
<b>Mez detekce</b>	<b>Výsledek</b>				
		<b>LOD (ng/ml)</b>	0.06		
<b>Linearita</b>	Kalibrační rozsah metody:	(5–600) ng/ml		r:	0,9993
	Rovnice:	$y = 12,466x - 31,965$		R <sup>2</sup> :	0,9986
	RSE (%) :	13,65			
<b>Rozsah metody</b>	(ng/ml):	(10–600)			
	(ng/cm <sup>2</sup> ):	(0.5–30.0)			

**Tabulka 31:** Výsledky validačních parametrů pro 5-fluorouracil

Validační výsledky:		5-Fluorouracil			
<b>Parametr</b>					
<b>Test způsobilosti systému</b>	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (RT) (%)	≤ 1,0 %	<b>0,3</b>	Vyhovuje	
	RSD (Area) (%)	≤ 10 %	<b>2,1</b>	Vyhovuje	
<b>Správnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>9</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>93.2</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>4.7</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>93.1</b>	Vyhovuje	
<b>Přesnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>8.4</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>93.5</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>3.3</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>93.6</b>	Vyhovuje	
<b>Mez detekce</b>			<b>Výsledek</b>		
			<b>LOD (ng/ml)</b>	<b>0.4</b>	
<b>Linearita</b>					
	Kalibrační rozsah metody:	<b>(2–240) ng/ml</b>		r:	<b>0,9973</b>
	Rovnice:	<b><math>y = 220,428x + 149,504</math></b>		R <sup>2</sup> :	<b>0,9946</b>
	RSE (%) :	<b>19,90</b>			
<b>Rozsah metody</b>					
	(ng/ml):	<b>(4–240)</b>			
	(ng/cm <sup>2</sup> ):	<b>(0.2–12.0)</b>			

**Tabulka 32:** Výsledky validačních parametrů pro lenalidomid

Validační výsledky:		Lenalidomid			
<b>Parametr</b>					
<b>Test způsobilosti systému</b>	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (RT) (%)	≤ 1,0 %	<b>0,1</b>	Vyhovuje	
	RSD (Area) (%)	≤ 10 %	<b>1,0</b>	Vyhovuje	
<b>Správnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>1</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>107.8</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>0.7</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>109.6</b>	Vyhovuje	
<b>Přesnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>1</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>107.5</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>0.7</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>109.5</b>	Vyhovuje	
<b>Mez detekce</b>			<b>Výsledek</b>		
			<b>LOD (ng/ml)</b>	<b>0.06</b>	
<b>Linearita</b>	Kalibrační rozsah metody:	<b>(0,5–60) ng/ml</b>		r:	<b>0,9998</b>
	Rovnice:	<b><math>y = 1593,581x + 21,253</math></b>		R <sup>2</sup> :	<b>0,9995</b>
	RSE (%) :	<b>3,65</b>			
<b>Rozsah metody</b>	(ng/ml):	<b>(1–60)</b>			
	(ng/cm <sup>2</sup> ):	<b>(0.05–3.00)</b>			

**Tabulka 33:** Výsledky validačních parametrů pro methotrexát

Validační výsledky:		Methotrexát			
Parametr					
Test způsobilosti systému	Parametr testu	Kritéria	Výsledky	Hodnocení	
	RSD (RT) (%)	≤ 1,0 %	0,1	Vyhovuje	
	RSD (Area) (%)	≤ 10 %	2,1	Vyhovuje	
Mez detekce			Výsledek		
		LOD (ng/ml)	0.1		
Linearita					
	Kalibrační rozsah metody:	(0,1–12) ng/ml		r:	0,9997
	Rovnice:	$y = 745,513x - 16,027$		R <sup>2</sup> :	0,9993
	RSE (%) :	6,68			

**Tabulka 34:** Výsledky validačních parametrů pro thiotepu

Validační výsledky:		Thiotepa			
<b>Parametr</b>					
<b>Test způsobilosti systému</b>	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (RT) (%)	≤ 1,0 %	<b>0,0</b>	Vyhovuje	
	RSD (Area) (%)	≤ 10 %	<b>1,7</b>	Vyhovuje	
<b>Správnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>2.9</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>97.9</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>2.4</b>	Vyhovuje	
Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>97.7</b>	Vyhovuje		
<b>Přesnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>2.2</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>97.9</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>2.2</b>	Vyhovuje	
Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>96.5</b>	Vyhovuje		
<b>Mez detekce</b>			<b>Výsledek</b>		
			<b>LOD (ng/ml)</b>	<b>0.08</b>	
<b>Linearita</b>	Kalibrační rozsah metody:	<b>(1–120) ng/ml</b>		r:	<b>0,9996</b>
	Rovnice:	<b><math>y = 1409,464x - 137,681</math></b>		R <sup>2</sup> :	<b>0,9992</b>
	RSE (%) :	<b>3,90</b>			
<b>Rozsah metody</b>	(ng/ml):	<b>(2–120)</b>			
	(ng/cm <sup>2</sup> ):	<b>(0.1–6.0)</b>			

**Tabulka 35:** Výsledky validačních parametrů pro cyklofosfamid

Validační výsledky:		Cyklofosfamid			
<b>Parametr</b>					
<b>Test způsobilosti systému</b>	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (RT) (%)	≤ 1,0 %	<b>0,0</b>	Vyhovuje	
	RSD (Area) (%)	≤ 10 %	<b>1,4</b>	Vyhovuje	
<b>Správnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>4.4</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>102.2</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>0.6</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>100.2</b>	Vyhovuje	
<b>Přesnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>6</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>103.8</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>0.7</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>100.7</b>	Vyhovuje	
<b>Mez detekce</b>			<b>Výsledek</b>		
			<b>LOD (ng/ml)</b>	<b>0.06</b>	
<b>Linearita</b>	Kalibrační rozsah metody:	<b>(0,5–60) ng/ml</b>		r:	<b>0,9996</b>
	Rovnice:	<b><math>y = 532,146x + 49,737</math></b>		R <sup>2</sup> :	<b>0,9992</b>
	RSE (%) :	<b>5,74</b>			
<b>Rozsah metody</b>					
	(ng/ml):	<b>(1–60)</b>			
	(ng/cm <sup>2</sup> ):	<b>(0.05–3.00)</b>			

**Tabulka 36:** Výsledky validačních parametrů pro kapecitabin

Validační výsledky:		Capecitabine			
<b>Parametr</b>					
<b>Test způsobilosti systému</b>	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (RT) (%)	≤ 1,0 %	<b>0,0</b>	Vyhovuje	
	RSD (Area) (%)	≤ 10 %	<b>0,9</b>	Vyhovuje	
<b>Správnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>0.8</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>118.7</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>0.3</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>99.9</b>	Vyhovuje	
<b>Přesnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>2.9</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>120.4</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>1.2</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>99.8</b>	Vyhovuje	
<b>Mez detekce</b>			<b>Výsledek</b>		
			<b>LOD (ng/ml)</b>	<b>0.12</b>	
<b>Linearita</b>	Kalibrační rozsah metody:	<b>(0,5–60) ng/ml</b>		r:	<b>0,9997</b>
	Rovnice:	<b><math>y = 758,816x + 1,974</math></b>		R <sup>2</sup> :	<b>0,9993</b>
	RSE (%) :	<b>3,58</b>			
<b>Rozsah metody</b>	(ng/ml):	<b>(1–60)</b>			
	(ng/cm <sup>2</sup> ):	<b>(0.05–3.00)</b>			

**Tabulka 37:** Výsledky validačních parametrů pro tamoxifen citrát

Validační výsledky:		Tamoxifen citrát			
<b>Parametr</b>					
<b>Test způsobilosti systému</b>	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (RT) (%)	≤ 1,0 %	<b>0,0</b>	Vyhovuje	
	RSD (Area) (%)	≤ 10 %	<b>1,4</b>	Vyhovuje	
<b>Správnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>4.7</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>95.9</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>1.8</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>97.3</b>	Vyhovuje	
<b>Přesnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>4.5</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>95.5</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>1.2</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>97.0</b>	Vyhovuje	
<b>Mez detekce</b>			<b>Výsledek</b>		
			<b>LOD (ng/ml)</b>	<b>0.008</b>	
<b>Linearita</b>	Kalibrační rozsah metody::	<b>(0,05–6) ng/ml</b>		r:	<b>0,9996</b>
	Rovnice:	<b><math>y = 11388,598x - 1,142</math></b>		R <sup>2</sup> :	<b>0,9992</b>
	RSE (%) :	<b>4,14</b>			
<b>Rozsah metody</b>	(ng/ml):	<b>(0,1–6)</b>			
	(ng/cm <sup>2</sup> ):	<b>(0.005–0.300)</b>			

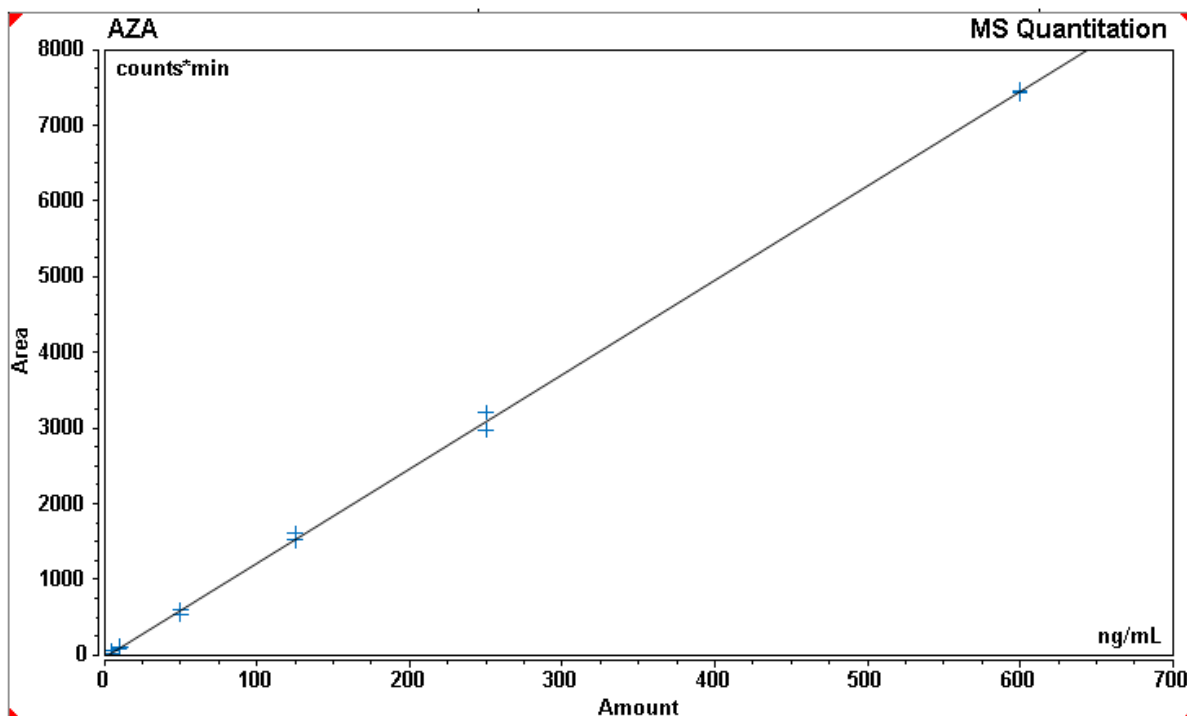
**Tabulka 38:** Výsledky validačních parametrů pro testosteron

Validační výsledky:		Testosteron			
<b>Parametr</b>					
<b>Test způsobilosti systému</b>	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (RT) (%)	≤ 1,0 %	<b>0,1</b>	Vyhovuje	
	RSD (Area) (%)	≤ 10 %	<b>0,8</b>	Vyhovuje	
<b>Správnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>1.4</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>96.2</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>0.8</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>99.4</b>	Vyhovuje	
<b>Přesnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>2.4</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>95.5</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>0.9</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>99.1</b>	Vyhovuje	
<b>Mez detekce</b>			<b>Výsledek</b>		
			<b>LOD (ng/ml)</b>	<b>0.3</b>	
<b>Linearita</b>	Kalibrační rozsah metody::	<b>(1–120) ng/ml</b>		r:	<b>0,9995</b>
	Rovnice:	<b><math>y = 712,888x + 150,444</math></b>		R <sup>2</sup> :	<b>0,9991</b>
	RSE (%) :	<b>5,72</b>			
<b>Rozsah metody</b>	(ng/ml):	<b>(2–120)</b>			
	(ng/cm <sup>2</sup> ):	<b>(0.1–6)</b>			

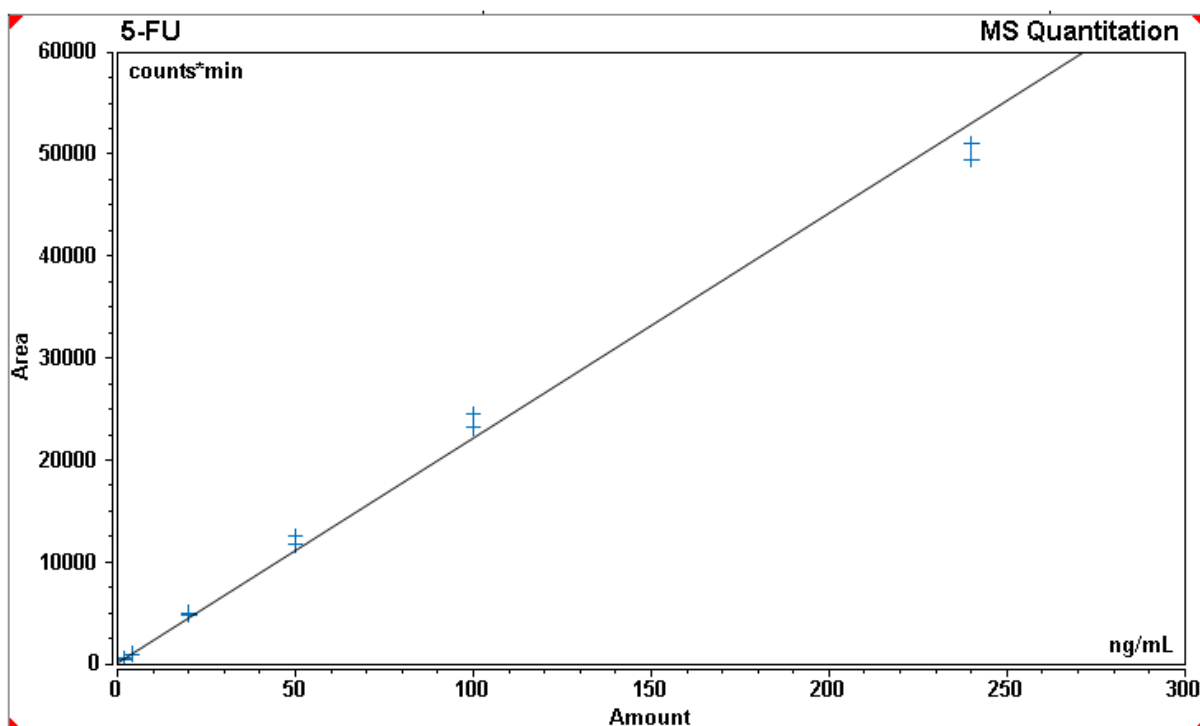
**Tabulka 39:** Výsledky validačních parametrů pro chlorambucil

Validační výsledky:		Chlorambucil			
<b>Parametr</b>					
<b>Test způsobilosti systému</b>	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (RT) (%)	≤ 1,0 %	<b>0,0</b>	Vyhovuje	
	RSD (Area) (%)	≤ 10 %	<b>1,2</b>	Vyhovuje	
<b>Správnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>6.3</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>102.5</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>1.1</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>113.4</b>	Vyhovuje	
<b>Přesnost</b>	<b>L - 2 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>4.4</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>103.5</b>	Vyhovuje	
	<b>H - 100 %</b>				
	<b>Parametr testu</b>	<b>Kritéria</b>	<b>Výsledky</b>	<b>Hodnocení</b>	
	RSD (Area) (%)	≤ 20 %	<b>1.4</b>	Vyhovuje	
	Výtěžnost (%)	(80–120) %	<b>112.2</b>	Vyhovuje	
<b>Mez detekce</b>			<b>Výsledek</b>		
			<b>LOD (ng/ml)</b>	<b>0.02</b>	
<b>Linearita</b>	Kalibrační rozsah metody:	<b>(0,05–6) ng/ml</b>		r:	<b>0,9995</b>
	Rovnice:	<b><math>y = 2981,748x - 6,256</math></b>		R <sup>2</sup> :	<b>0,9990</b>
	RSE (%) :	<b>7,89</b>			
<b>Rozsah metody</b>	(ng/ml):	<b>(0,1–6)</b>			
	(ng/cm <sup>2</sup> ):	<b>(0.005–0.300)</b>			

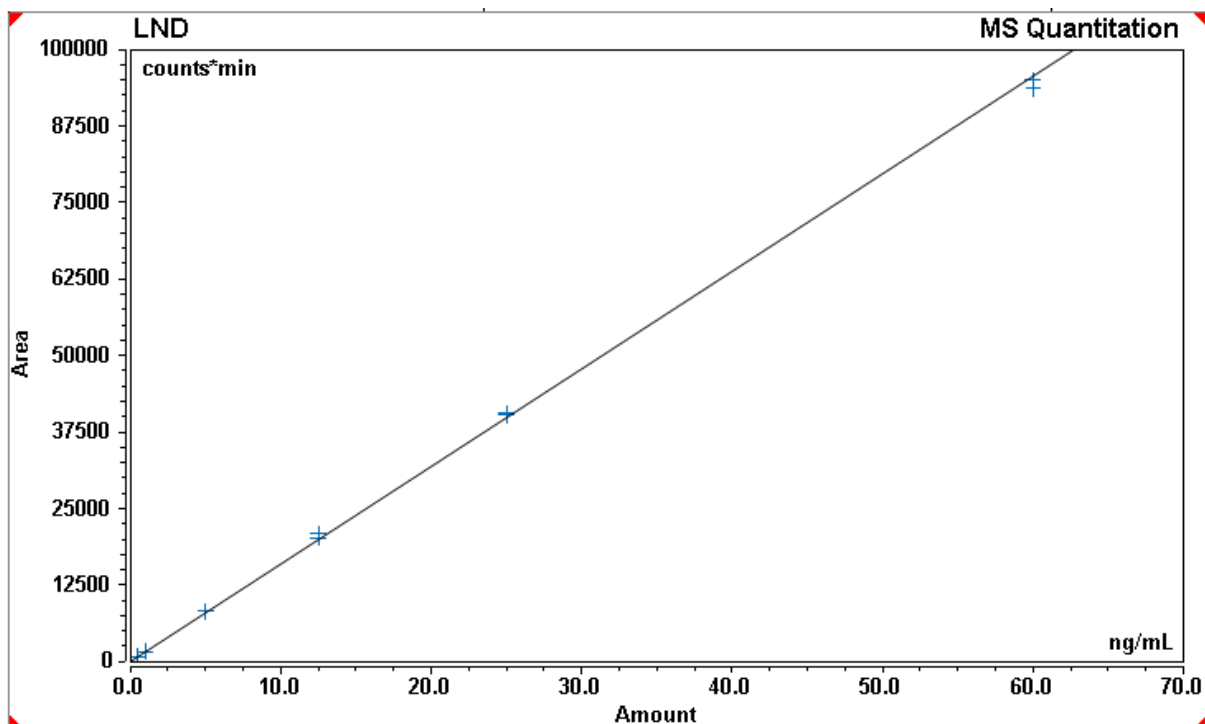
## PŘÍLOHA C: Kalibrační přímky



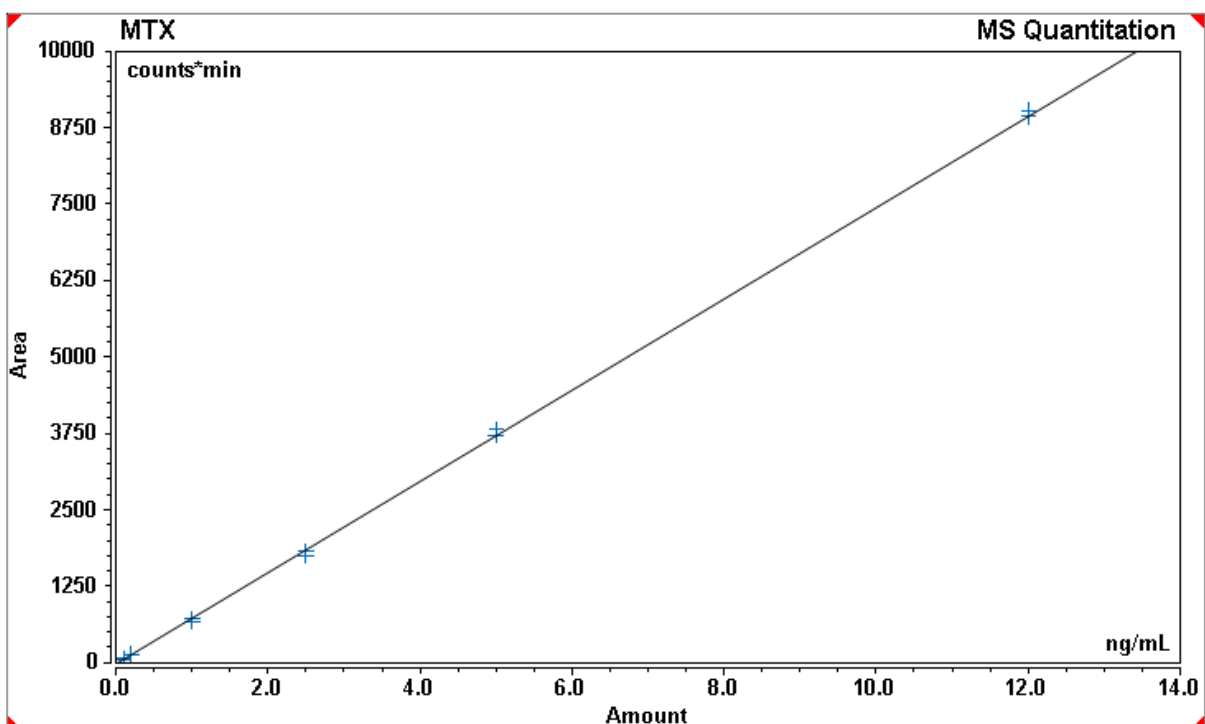
Obrázek 24: Kalibrační závislost azacytidinu pro koncentrační rozsah (5–600) ng/ml



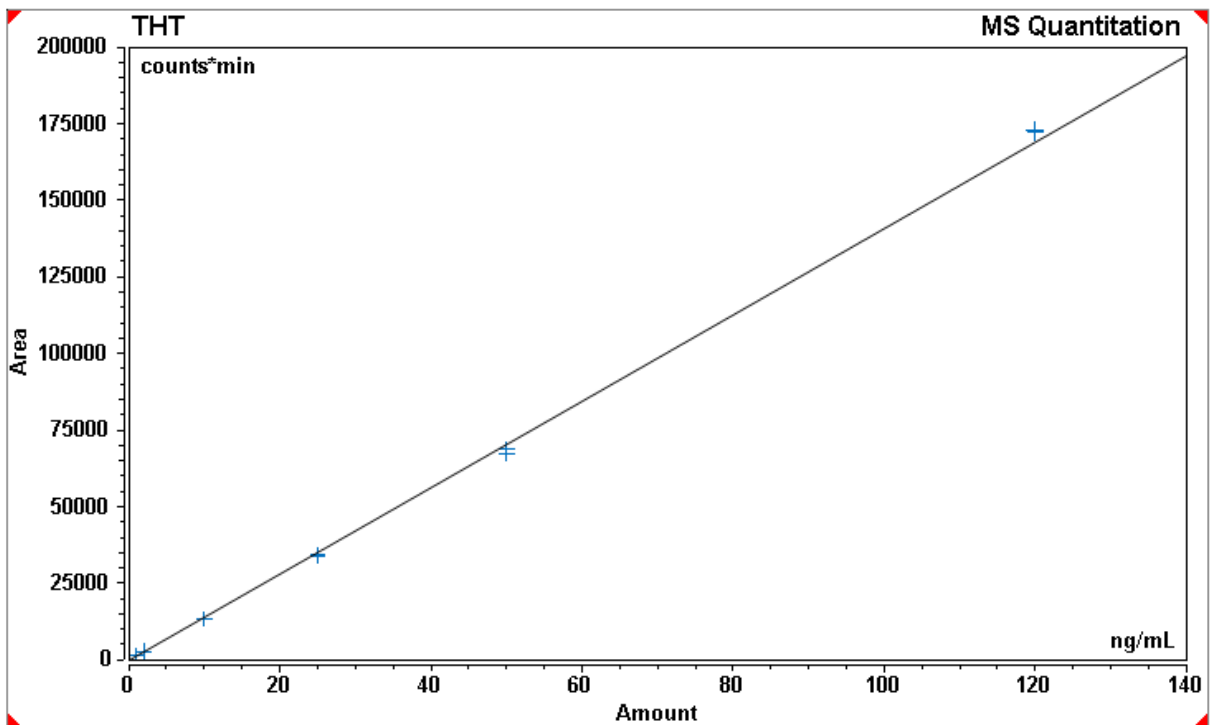
Obrázek 25: Kalibrační závislost 5-fluorouracilu pro koncentrační rozsah (2–240) ng/ml



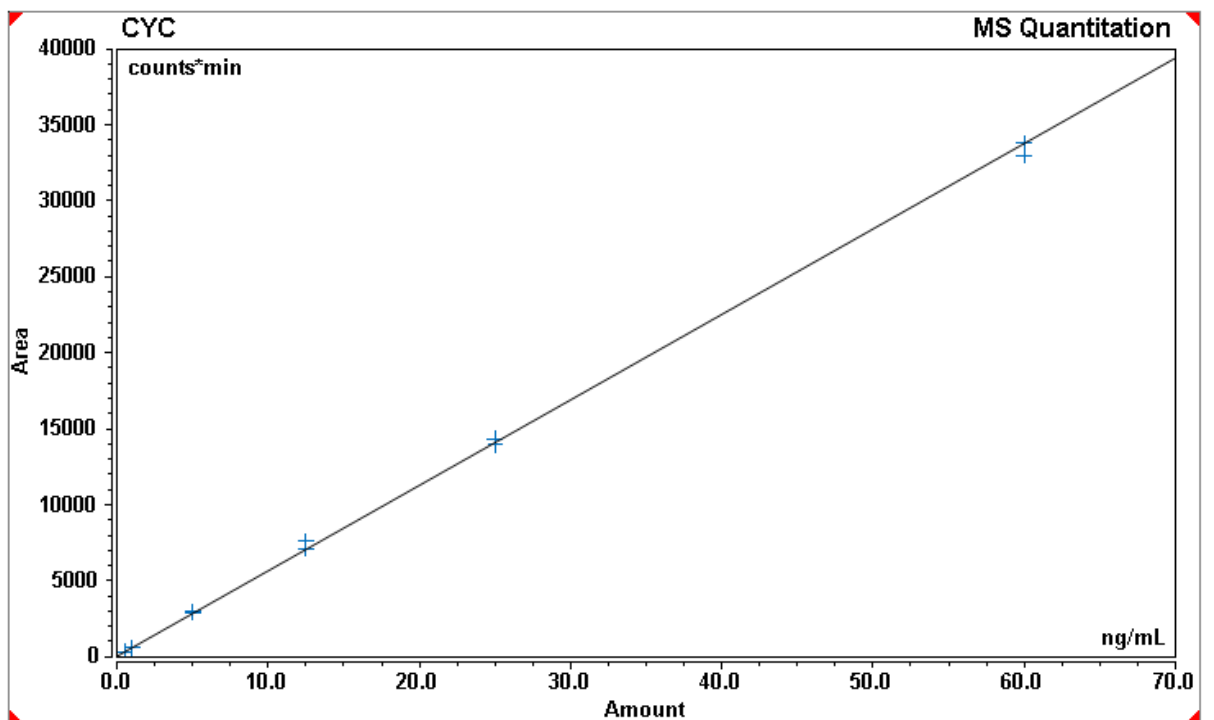
**Obrázek 26:** Kalibrační závislost lenalidomidu pro koncentrační rozsah (0,5–60,0) ng/ml



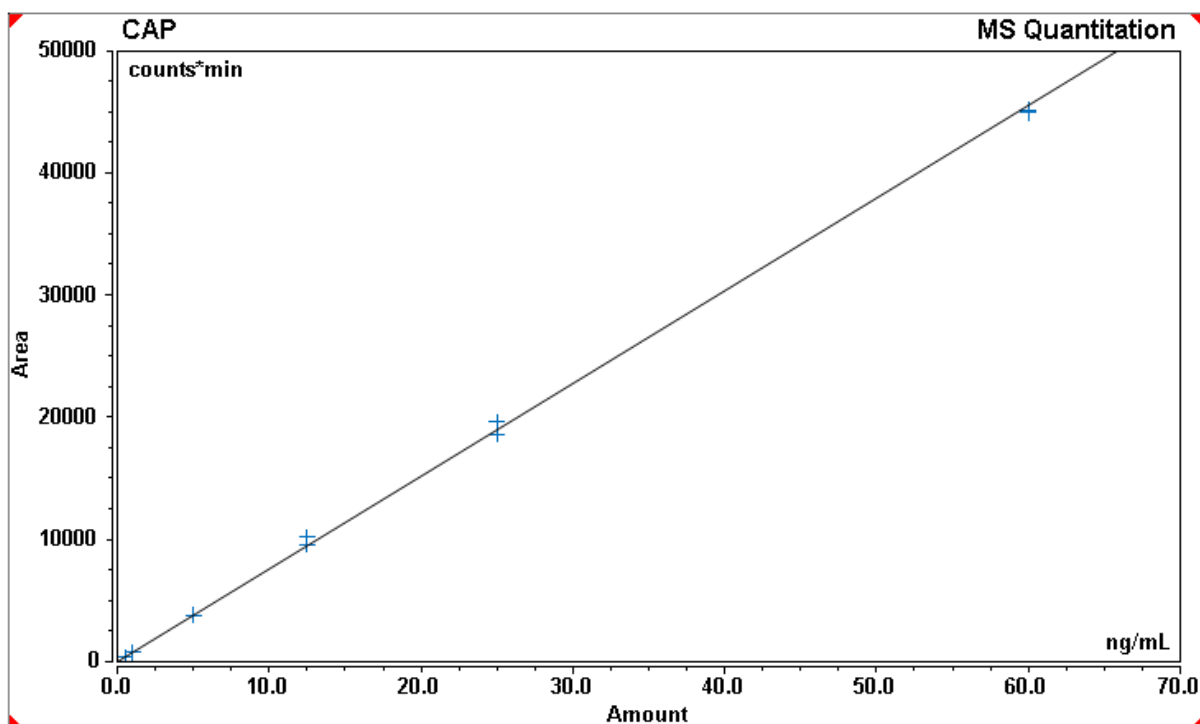
**Obrázek 27:** Kalibrační závislost methotrexátu pro koncentrační rozsah (0,1–12) ng/ml



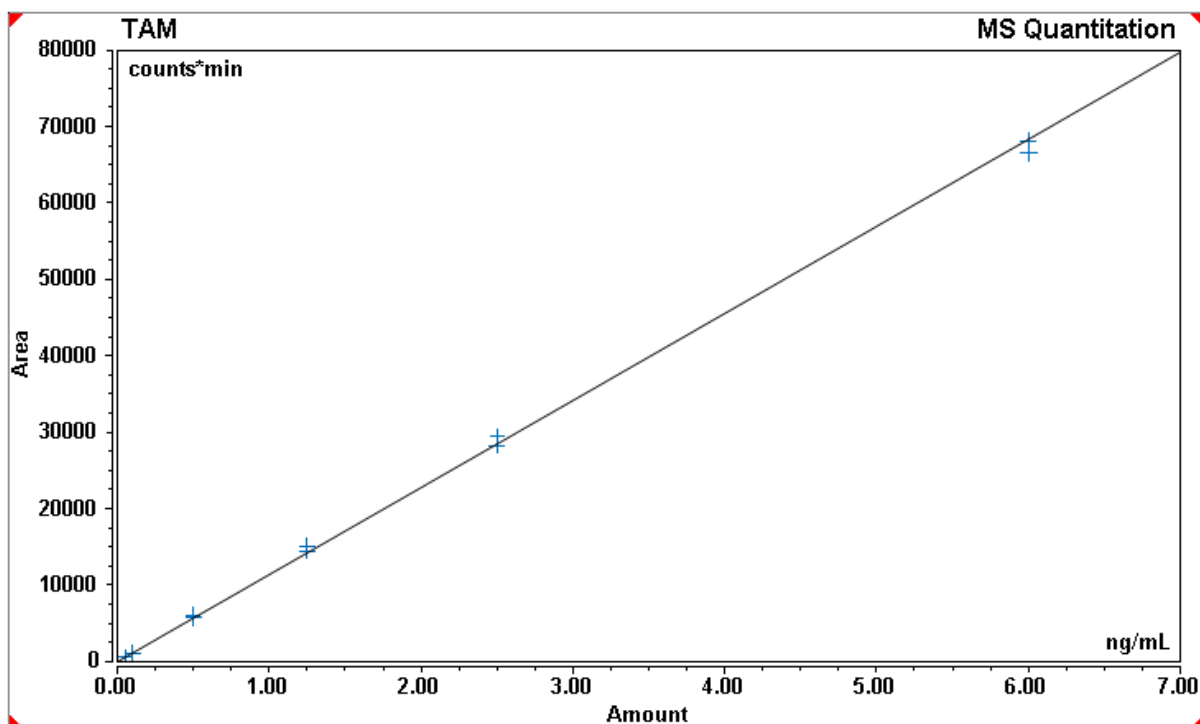
**Obrázek 28:** Kalibrační závislost thiotopy pro koncentrační rozsah (1–120) ng/ml



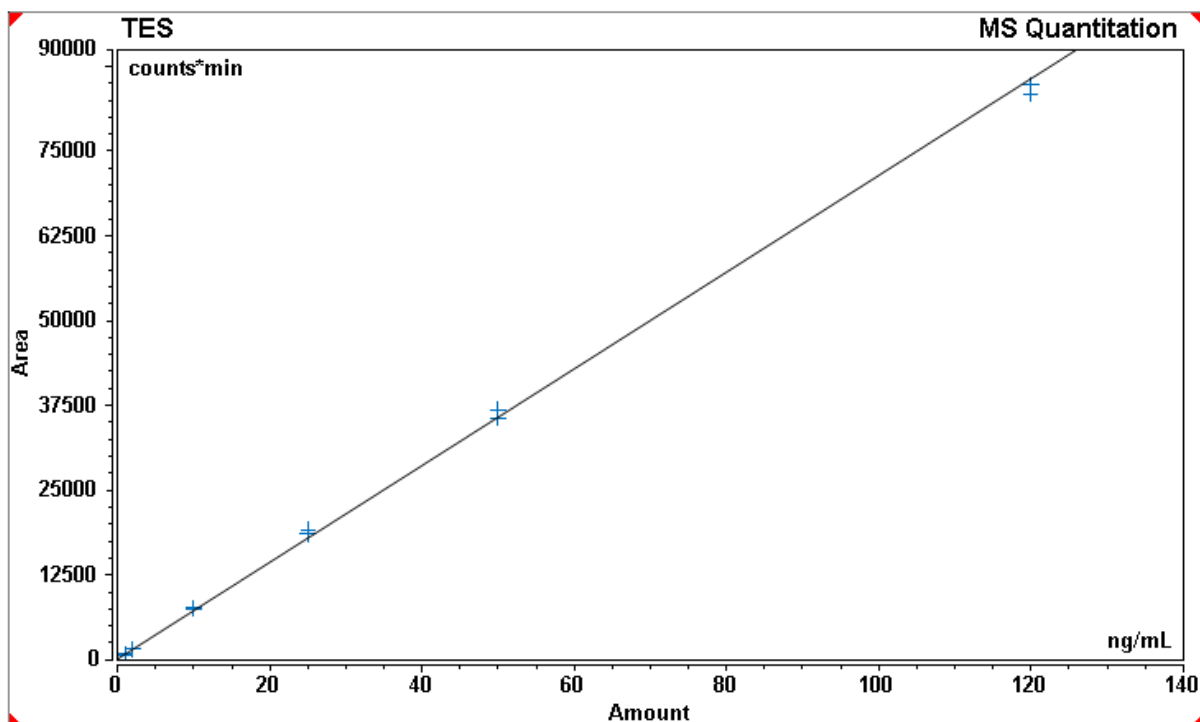
**Obrázek 29:** Kalibrační závislost cyklofosfamidu pro koncentrační rozsah (0,5–60,0) ng/ml



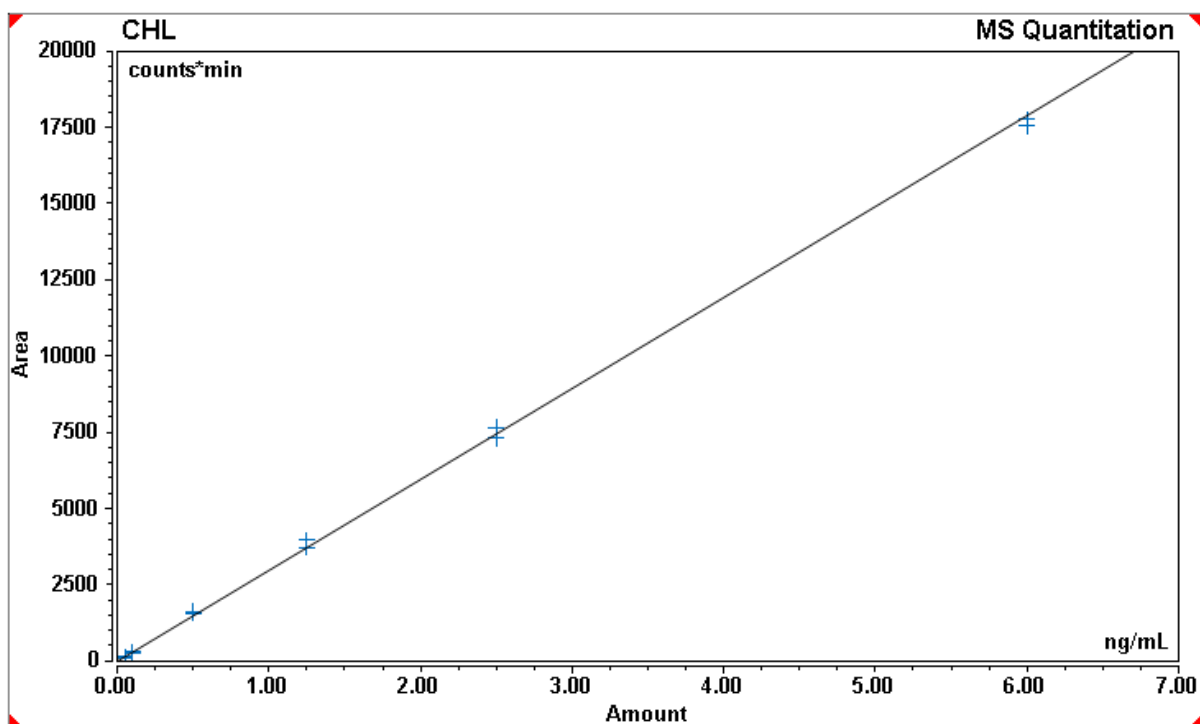
Obrázek 30: Kalibrační závislost kapecitabinu pro koncentrační rozsah (2–240) ng/ml



Obrázek 31: Kalibrační závislost tamoxifenu pro koncentrační rozsah (0,05 – 6,00) ng/ml



Obrázek 32: Kalibrační závislost testosteronu pro koncentrační rozsah (1–120) ng/ml



Obrázek 33: Kalibrační závislost chlorambucilu pro koncentrační rozsah (0,05 – 6,00) ng/ml