

Kurz

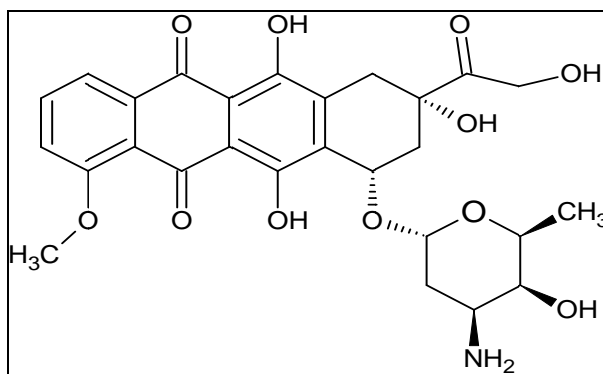
Nanotransportéry na bázi apoferritinu pro transport doxorubicinového léčiva – možnosti jeho zobrazení

Část kurzu

Doxorubicin – protinádorové léčivo, jeho využití, toxicita

Anotace

Doxorubicin patří mezi antracyklinová cytostatická antibiotika. Bývá označován také jako hydroxydaunorubicin nebo hydroxydaunomycin, protože je strukturně podobný s daunorubicinem (daunomycinem), který byl poprvé izolován z bakterie *Streptomyces peucetius* v 50. letech 20. století díky výzkumu protinádorových léčiv pocházejících z půdních mikroorganismů. Tento výzkum byl financován firmou Pharmitalia Research Laboratories. Doxorubicin byl izolován ze zmutovaného kmene stejné bakterie a byl nejprve pojmenován jako adriamycin; název doxorubicin se začal používat později [1].



Obrázek 1: Doxorubicin

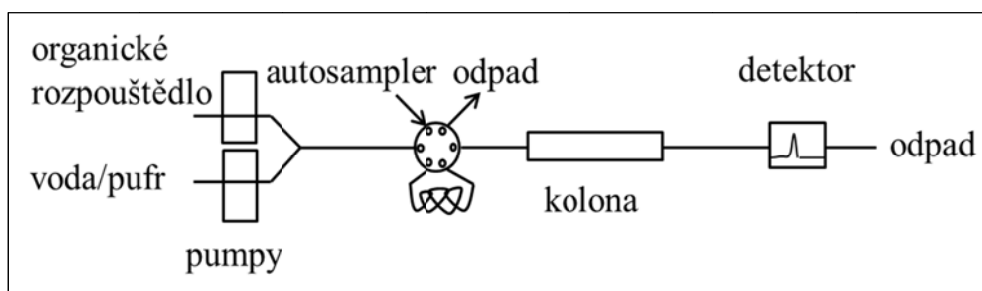
evropský
sociální
fond v ČR

EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVYOP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

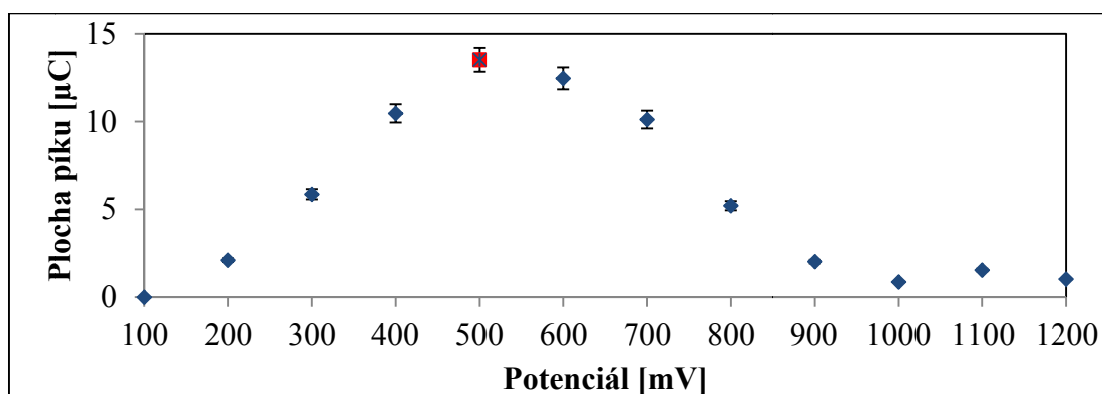
HPLC-ED stanovení doxorubicinu

Složení HPLC-ED aparatury: kolona Zorbax eclipse AAA C18 (150 × 4,6 mm; 3,5 nm částice, Agilent Technologies, USA), 2 pumpy model 584, elektrochemický detektor Coulochem III s amperometrickou celou model 5040, autosampler model 542 (vše ESA Inc., MA, USA), regulátor pulzů, šesticestný ventil, reakční cívka. Jak detektor, tak kolona byly termostatovány. V autosampleru byly vzorky během analýzy uchovávané při 8 °C. Kolona byla termostatována při 30 °C. Vždy bylo injektováno 20 μl vzorku.



Obrázek 2: Schéma uspořádání HPLC. Převzato z [1].

Mobilní fáze byla složena z: (A) 0,05M Na₂HPO₄ s 0,05 % triethylaminem (pH 4,6 bylo nastaveno kyselinou citronovou) a (B) acetonitrilu. Gradientová eluce byla nastavena následovně: 0 min (25 % B), 10 min (45 % B), 12 min (100 % B), 12-15 min (100 % B), 16 min (25 % B), 16-22 min (25 % B). Doba jedné analýzy byla 20 min. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min⁻¹. Vzorky byly před analýzou desetkrát zředěny. Před analýzou vzorků byl pomocí FIA-ED (průtoková injekční analýza = FIA; složení aparatury stejné jako u HPLC-ED, akorát je odstraněna kolona) změřen hydrodynamický voltamogram (závislost plochy píku na potenciálu) pracovního roztoku doxorubicinu (50 μg.ml⁻¹) připraveného v roztoku 0,05M Na₂HPO₄ s 0,05% triethylaminem (pH 4,6 bylo nastaveno kyselinou citronovou), aby bylo zjištěno, při kterém potenciálu bude nejlepší provést elektrochemickou detekci u HPLC-ED. Zvolený nosný roztok byl použit i jako vodná fáze (A) při HPLC-ED.



Obrázek 3: Výběr vhodného potenciálu pro HPLC-ED pomocí FIA-ED analýzy doxorubicinu. FIA-ED analýza pracovního roztoku doxorubicinu (50 μg.ml⁻¹), který byl připraven v nosném roztoku 0,05M Na₂HPO₄ s 0,05% triethylaminem (pH 4,6). Potenciálový rozsah byl 100-1200 mV se skokem po 100 mV. Dávkováno bylo vždy 20 μl vzorku. Průtok nosného roztoku byl 1 ml.min⁻¹. Převzato z [1].

Chemikálie

- Acetonitril, $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Doxorubicin.HCl, 98,0-102,0 % (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- H₂O, čistota podle ACS (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Kyselina citronová, 99 % (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Na₂HPO₄·2H₂O, čistota podle ACS (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- triethylamin, $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, MO, USA)

Pracovní postup:

- 1) Připraví se 500 ml pufru pro HPLC-ED (mobilní fáze A) – naváží se 3,549 g Na₂HPO₄, rozpustí se ve vodě (ACS), přidá se 250 μ l triethylaminu a pomocí kyseliny citronové se nastaví pH na hodnotu 4,6. Před připojením k HPLC systému se mobilní fáze A na několik minut vloží do ultrazvuku.
- 2) Podle instrukcí vedoucího se naprogramuje následující gradient eluce: 0 min (25 % B), 10 min (45 % B), 12 min (100 % B), 12-15 min (100 % B), 16 min (25 % B), 16-22 min (25 % B). Mobilní fáze B – acetonitril.
- 3) Průtok mobilní fáze se nastaví na 1 ml·min⁻¹.
- 4) Do vialek se připraví standardní roztok doxorubicinu (1 mg·ml⁻¹) a jeho kalibrační sada o koncentraci 100,00; 50,00; 25,00; 12,50; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39 a 0,00 μ g·ml⁻¹. Také se do vialek připraví reálné vzorky (např. naředěné supernatanty po centrifugaci homogenizovaného vzorku srdce laboratorního potkana, kterému byl podán doxorubicin).
- 5) Vialky se vloží do karuselu autosampleru.
- 6) Ventily pump se otočí do svislé polohy a na pumpách se zmáčkne tlačítko PURGE a několik vteřin se nechají sát roztoky mobilních fází; po pročištění a zkontrolování, zda pumpy nenasávají vzduchové bubliny, se pumpy vypnou a otočí se jejich ventilem do horizontální polohy. Pumpy se zapnou tlačítkem PUMP.
- 7) Zapne se detektor Coulochem III a nastaví se na něm optimální hodnoty zjištěné při dřívější FIA-ED analýze (napětí 500 mV). Na PC se sleduje v programu Clarity záznam z detektoru a počká se, dokud se neustálí „base-line“.
- 8) Podle instrukcí vedoucího se v programu Clarity nastaví všechny potřebné údaje pro analýzu a spustí se automatická analýza.
- 9) Z výsledných chromatogramů se nejprve sestaví a vyhodnotí kalibrační křivka v podobě závislosti výšky/plochy píku na koncentraci doxorubicinu, následně se zjistí množství doxorubicinu v reálných vzorcích pomocí regresní rovnice.

Doporučená literatura

- [1] GURÁŇ, Roman. *Studium vlastností liposomů jako přenašečů léčiv pomocí různých analytických metod*. 2014. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Ondřej Zítka. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/270205/prif_m/>.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost