

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE
A KONTROLY LÉČIV

DIPLOMOVÁ PRÁCA

HPLC analýza potenciálních léčiv odvozených od aroylhydrazonu
II.

Na tomto mieste by som chcel srdečne poďakovať vedúcej mojej diplomovej práce PharmDr. Petre Kovařikovej, Ph.D. za pomoc, trpezlivosť a odborné rady pri vypracovaní diplomovej práce. Moja vďaka patrí aj Vladimíre Pecuhovej za ustavičnú pomoc a podporu počas práce.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	5
2.	TEORETICKÁ ČASŤ	7
2.1	Definícia a rozdelenie chromatografických metód	8
2.2	Definície pojmov chromatografického procesu.....	12
2.2.1	Retenčné údaje	12
2.2.2	Chromatografické údaje.....	13
2.2.3	Separčné údaje	14
2.2.4	Presnosť kvantitatívnej analýzy.....	15
2.2.5	Spôsobilosť systému	16
2.3	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia	17
2.3.1	Význam a postavenie HPLC v modernej farmaceutickej analýze.....	17
2.3.2	História.....	17
2.3.3	Základná schéma HPLC	18
2.3.4	Kvalitatívna a kvantitatívna analýza HPLC chromatogramu	24
2.4	Úprava vzoriek pred HPLC analýzou	27
2.4.1	Úprava biologického vzorku.....	27
2.5	Chelátory železa.....	31
2.5.1	Železo v ľudskom tele.....	31
2.5.2	Význam terapie chelatačnými látkami.....	31
2.5.3	Chelátory železa odvodené od aroylhydrazonu	32
2.6	Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH), jeho vlastnosti a význam	34
2.7	Prehľad publikovaných prác zaoberajúcich sa analýzou SIH.....	35
2.8	Prehľad prác zaoberajúcich sa analýzou isoniazidu a acetyl-isoniazidu.	36
3.	CIEĽ PRÁCE.....	38
4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	40
4.1	Použitý chromatografický materiál, prístroje, pomôcky a chemikálie	41
4.2	Vývoj chromatografických podmienok pre stanovenie SIH pomocou HPLC s UV detekciou.....	43
4.3	Vývoj metódy izolácie analytov z moči pomocou SPE.....	47
5.	VÝSLEDKY A DISKUSIA	48
5.1	Vývoj chromatografických podmienok pre HPLC analýzu SIH	49

5.2	Výsledky SPE	52
6.	ZÁVER	56
7.	ABSTRAKT	58
8.	ABSTRACT.....	59
9.	LITERATÚRA	60

1. ÚVOD

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia – High performance liquid chromatography (HPLC) patrí v dnešnej dobe k najmodernejším a najprogressívnejším analytickým separačným metódam. Medzi jej najväčšie prednosti patrí citlivosť, selektivita, rýchlosť a malá spotreba analyzovaného vzorku. U väčšine moderných chromatografov je samozrejmosťou úplná automatizácia. HPLC ma v súčasnosti uplatnenie jak pri kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze, tak pri skúmaní stability a čistoty liečiv. Metóda je bežne používaná pri analýze liečiv a metabolitov v biologickom materiále.

Využitie chelátorov železa je u pacientov presýtených železom, no v poslednej dobe sa výskum zamerlal na použitie pri stavoch spojených s oxidačným stresom (ischemicko-reperfúzne poškodenia, neurodegeneratívne ochorenia, toxické poškodenia iných liečiv), ako aj pri liečbe malárie.

Predmetom tejto štúdie je salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH, derivát aroylhydrazonu), selektívny biokompatibilný chelátor železa, ktorý je v poslednej dobe predmetom aktívneho výskumu ako potenciálne liečivo. Vykazuje zaujímavé antioxidačné a kardioprotektívne účinky proti antracyklinovej kardiomyopatii. V preklinických experimentoch bol dokázaný účinok na modeloch *in vitro* a *in vivo*, a zároveň nízka akútna a chronická toxicita.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Definícia a rozdelenie chromatografických metód

Chromatografické metódy sú viacstupňové separačné metódy, kde zložky vzorky sú rozdeľované medzi dve fázy, z ktorých jedna je stacionárna a druhá je mobilná¹. Umožňujú oddelenie analyzovaných zložiek zo zmesi a zároveň ich kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu. Ich prednosti vyniknú predovšetkým pri analýzach zmesí látok, kde sa ostatné neseparačné metódy, ako napr. spektrofotometrické, nedajú principiálne použiť. Pretože všetky technické produkty a veľká väčšina prírodných látok sú zložité zmesi, majú chromatografické metódy analýzy prvoradý význam. V zdravotníctve zaujímajú významné postavenie pri analýze liečiv, tzv. monitorovanie liekových hladín (TDM: Therapeutic drug monitoring)².

Pri všetkých chromatografických metódach sa mnohonásobne ustanovuje rovnováha súčastí analyzovanej zmesi medzi dvoma vzájomne nemiešateľnými fázami. Jedna nepohyblivá, stacionárna fáza má schopnosť rôznou mierou zadržiavať jednotlivé súčasti analyzovanej zmesi, druhá pohyblivá, mobilná fáza na druhej strane vymýva (eluje) jednotlivé súčasti zmesi z nepohyblivej fázy a odnáša ju v smere toku rôznou rýchlosťou, čím dôjde k ich oddeleniu².

V súčasnej dobe sa používa mnoho typov chromatografických metód, ktoré je možno rozdeliť podľa niekoľkých kritérií:

- separačného procesu
- použitej techniky
- spôsobu vyvíjania
- skupenstva pohyblivej a nepohyblivej fáze²

Podľa podstaty separačného procesu

ADSORPČNÁ CHROMATOGRAFIA

K deleniu látok dochádza následkom rôznej adsorpcie z pohyblivej fázy na povrch adsorbentu. Delené látky môžu byť v plynnom stave, alebo v roztoku. Najstaršou a najpoužívanejšou je adsorpčná chromatografia, založená na schopnosti pevnej stacionárnej fázy sorbovať látky z kvapalného roztoku. Adsorbentom (stacionárnou fázou) je najčastejšie oxid hlinitý, oxid horečnatý, silikagel, aktívne uhlie, práškovaná celulóza, polyamidy. Pohyblivú fázou tvoria buď čisté rozpúšťadla zostavené podľa elučnej schopnosti do tzv. eluotropnej rady alebo zmesi rozpúšťadiel^{2,3}.

ROZDEĽOVACIA CHROMATOGRAFIA

K deleniu látok dochádza na základe ich rôznych rozdeľovacích koeficientov. Stacionárnou fázou je kvapalná zložka, ktorá je zakotvená na povrchu inertného nosiča. Tým môže byť silikagel, kremelina, silikáty, škrob, hydrofóbne gély, celulóza alebo chemicky viazaná fáza na povrchu pevného nosiča. Po vnesení roztoku delenej zmesi dochádza počas priechodu mobilnej fázy (organické rozpúšťadlo, nemiesiteľné so stacionárnou fázou) k opakovanému rozdeleniu (extrakcii) súčastí zmesi medzi obidve kvapalné fázy, pri plynovej chromatografii medzi kvapalnú a plynnú fázou. Pri rozdeľovacej chromatografii sa spravidla používa dvojfázový systém, pričom jedna fáza býva bohatšia na organické rozpúšťadla a druhá na vodu. Zakotvená býva spravidla fáza vodná a organická býva spravidla mobilná. V niektorých prípadoch je však výhodnejšie nasýtiť hydrofóbne impregnovaný nosič organickou fázou a fázou vodnú voliť ako mobilnú. Používa sa veľmi často v kvapalinovej chromatografii. Jedná sa o systém obrátených fáz (RP – reversed phase)^{2, 4}.

IONTOVO VÝMENNÁ CHROMATOGRAFIA

Na povrchu stacionarnej fázy dochádza k interakcii medzi iónmi delených látok s iónogennými skupinami týchto fáz. Ióny viazané na povrchu stacionarnej fázy sa vymieňajú na základe náboja, veľkosti iónov a disociačnej konštanty za ióny prítomné v mobilnej fáze. Podľa typu viazeného iónu potom rozlišujeme anezy (anióny) a katexy (katióny)^{2, 5}.

GELOVÁ CHROMATOGRAFIA

Jedná sa o kvapalinovú chromatografiu, pričom k deleniu látok dochádza na základe rozdielnej veľkosti a tvaru molekúl. Stacionárna fáza je tvorená nabobtnaným gélom, ktorého póry sú naplnené rovnakým rozpúšťadlom, ktoré je použité ako fáza mobilná. Zmes látok je eluovaná v poradí podľa klesajúcej molekulovej hmotnosti. Najprv sú eluované látky s väčšou molekulovou hmotnosťou. Tie totiž nemôžu difundovať do pórov gélu, a preto sú unášané mobilnou fázou rýchlejšie než menšie molekuly^{2, 6, 7}.

AFINITNÁ CHROMATOGRAFIA

Tento druh chromatografie je založený na vysoko selektívnych interakciách. Jedná sa o špeciálnu metódu izolácie biologicky aktívnych látok (napr. enzým – jeho inhibítor, alebo antigen a jeho protilátky)⁸.

Podľa spôsobu vyvíjania

FRONTÁLNA CHROMATOGRAFIA

Táto metóda spočíva v kontinuálnom privádzaní roztoku delenej zmesi na kolónu až do konca chromatografického procesu. Vzorka je takto rozpúšťaná v mobilnej fáze. Najprv vychádza z kolony zložka s najmenšou afinitou, ktorá je týmto pádom najmenej brzdená. Frontálna technika nie je vhodná k preparatívnym účelom, lebo v čistej forme sa dá izolovať len časť zložky vychádzajúcej ako prvá⁴.

VYTESŇOVACIA CHROMATOGRAFIA

Princíp tohto druhu chromatografickej analýzy spočíva v diskontinuálnom (jednorazovom) privádzaní vzorku na kolónu. Potom sa až do konca chromatografického procesu privádza roztok ďalšej látky, ktorá má ku stacionárnej fáze vyššiu afinitu a vytesňuje delené zložky zmesi v poradí podľa vzrastajúcej afinity k tejto fáze. Zložka, ktorá má najnižšiu afinitu k stacionárnej fáze, opúšťa kolónu ako prvá, ako posledné vyteká vytesňovadlo. Táto metóda nedovoľuje úplné rozdelenie zložiek zmesi. Ak má nasledujúca zložka uvoľňovať predchádzajúcu z interakcie so stacionárnou fázou, musia byť všetky zložky v kontakte a dochádza k čiastočnému miešaniu látok⁴.

ELUČNÁ CHROMATOGRAFIA

Na chromatografickú kolónu sa vnesie malá časť zmesi látok a kolóna sa premýva mobilnou fázou, ktorá má ku stacionárnej fáze menšiu afinitu než ktorákoľvek zo zložiek zmesi. Pritom dochádza k vývoji a k migrácii elučných zón jednotlivých zložiek zmesi. Látky sú z kolóny vymývané v poradí podľa veľkosti sorpcie na stacionárnej fáze a často od seba rozdelené mobilnej fázy. Pri izokratickej elúcii sa používa stále rovnaká mobilná fáza. Táto metóda je vhodná v prípadoch, keď sa delené látky od seba nelíšia v afinite ku stacionárnej fáze, takže sa eluujú skoro pri sebe. Gradientová elúcia, pri ktorej postupne rastie elučná schopnosť mobilnej fázy, nachádza svoje hlavné uplatnenie u analýz, kde sa zóny delených látok vymývajú v príliš dlhých intervaloch, alebo sa vytvárajú príliš široké píky – tzv. chvostovanie. Princíp spočíva v tom, že menej zadržované látky sa eluujú mobilnou fázou s nižšou elučnou silou, zatiaľ čo elúcia látok so silnou afinitou k stacionárnej fáze sa urýchli zvýšením elučnej sily mobilnej fázy v závere elúcie^{2, 4, 9}

Podľa použitej techniky

KOLÓNOVÉ USPORIADANIE

PLOŠNÉ USPORIADANIE - papierová

- tenkovrstevná^{2, 6}

Podľa skupenstva fáz

KVAPALINOVÁ – mobilnou fázou je kvapalina a stacionárnou fázou nemiešateľná kvapalina, alebo pevná látka.

PLYNOVÁ – mobilnou fázou je plyn a stacionárnou fázou kvapalina alebo pevná látka^{2, 6}

2.2 Definície pojmov chromatografického procesu

2.2.1 Retenčné údaje

Retenčný čas a retenčný objem

Retencia v prietokovej chromatografii sa určuje retenčným časom (t_R), ktorý je definovaný priamo polohou maxima píku na chromatograme. Z hodnoty retenčného času sa vypočíta retenčný objem (V_R),

$$V_R = t_R v,$$

kde t_R = retenčný čas alebo retenčná vzdialenosť meraná pozdĺž základnej línie medzi bodom nanosenia analytu a kolmicou spustenou z maxima píku zodpovedajúceho danej zložke,

v = prietoková rýchlosť mobilnej fázy.

Hmotnostne distribučný pomer (D_m) (známy aj ako kapacitný faktor k' alebo retenčný faktor k) je definovaný takto:

$$D_m = \frac{\text{množstvo rozpustnej látky v stacionárnej fáze}}{\text{množstvo rozpustnej látky v mobilnej fáze}} = K_C \frac{V_S}{V_M},$$

kde K_C = rovnovážny rozdeľovací koeficient (známy aj ako distribučná konštanta),

V_S = objem stacionárnej fázy,

V_M = objem mobilnej fázy.

Rozdeľovací pomer látky sa môže určiť z chromatogramu podľa vzorca

$$D_M = \frac{t_R - t_M}{t_M},$$

kde t_R = retenčný čas alebo retenčná vzdialenosť meraná pozdĺž základnej línie medzi bodom nanosenia analytu a kolmicou spustenou z maxima píku zodpovedajúceho danej zložke,

t_M = mŕtvy čas (alebo objem), čas (alebo objem) alebo vzdialenosť meraná pozdĺž základnej línie medzi bodom nanosenia analytu a kolmicou spustenou z maxima píku zodpovedajúceho nezadržanej zložke^{1, 10}.

2.2.2 Chromatografické údaje

Chromatografický pík sa určuje plochou (A) alebo výškou (h) a šírkou v polovičnej výške (w_h), alebo výškou (h) a šírkou píku medzi inflexnými bodmi (w_i). Na krivke opísanej Gaussovou funkciou platí závislosť:

$$w_h = 1,18w_i$$

Faktor symetrie

Faktor symetrie (A_S) píku (známy aj ako faktor chvostovania) sa môže vypočítať podľa vzorca

$$A_S = \frac{w_{0,05}}{2d},$$

kde $w_{0,05}$ = šírka píku v jednej dvadsatine jeho výšky,

d = vzdialenosť medzi kolmicou spustenou z maxima píku v príslušnom bode a čelom píku v jednej dvadsatine jeho výšky.

Hodnota 1,0 tejto veličiny zodpovedá úplnej (ideálnej) symetrii.

Účinnosť kolóny a zdanlivý počet teoretických priehradiek

Účinnosť kolóny (zdanlivá účinnosť) sa môže vypočítať z údajov získaných v izotermických, izokratických alebo izodenzických podmienkach v závislosti od použitej techniky ako zdanlivý počet teoretických priehradiek (etáží) (N) zo vzťahu, kde sa veličiny t_R a w_h vyjadrujú v rovnakých jednotkách (čas, objem alebo vzdialenosť):

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2,$$

kde t_R = retenčný čas (alebo) objem alebo retenčná vzdialenosť meraná pozdĺž základnej línie medzi bodom nanosenia analytu a kolmicou spustenou z maxima píku zodpovedajúceho danej zložke,

W_h = šírka píku v polovici jeho výšky.

Zdanlivý počet teoretických priehradiek závisí od zložky, ako aj od kolóny a retenčného času.

Pre zrovnávanie účinnosti rôznych kolón sa používa parameter **výškového ekvivalentu priehradiek** H , ktorý sa môže vypočítať podľa vzorca:

$$H = \frac{L}{N},$$

kde L = dĺžka kolóny v metroch,

N = počet teoretických priehradiek^{1, 10}.

2.2.3 Separačné údaje

Rozlíšenie

Rozlíšenie (R_S) píkov dvoch zložiek, ktoré majú porovnateľnú výšku, môže sa vypočítať podľa vzorca

$$R_S = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}},$$
$$t_{R2} > t_{R1}$$

kde t_{R1} a t_{R2} = retenčné časy alebo retenčné vzdialenosti merané pozdĺž základnej línie medzi bodom nanosenia analytu a polohami kolmíc spustených z maxim dvoch susedných píkov,

w_{h1} a w_{h2} = šírky píkov v ich polovičnej výške.

Ak sa dosiahne lepšie rozlíšenie ako 1,5; hovoríme o separácii na základnej línii.

Pomer výšky píku k sedlu

Ak nie je dosiahnutá separácia dvoch píkov na základnú líniu, môže sa ako kritérium spôsobilosti systému pri skúške na príbuzné látky použiť pomer výšky píku k sedlu (p/v).

$$p/v = \frac{H_p}{H_v},$$

kde H_p = výška píku nečistoty nad extrapolovanou základnou líniou signálu,
 H_v = výška píku nečistoty nad extrapolovanou základnou líniou signálu v najnižšom bode krivky medzi píkom analytu a nečistoty^{1, 10}.

2.2.4 Presnosť kvantitatívnej analýzy

Pomer signálu k šumu

Presnosť kvantitatívneho stanovenia ovplyvňuje veličina vyjadrená ako pomer hodnôt signálu a šumu (S/N) a vypočíta sa podľa vzorca:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h},$$

kde H = výška píku skúšanej zložky na chromatograme získanom s predpísaným referenčným roztokom meraná od maxima píku po extrapolovanú základnú líniu signálu vo vzdialenosti, ktorá zodpovedá 20-násobku šírky v polovičnej výške píku,
 h = amplitúda šumu na oboch stranách píku na chromatograme slepého roztoku vo vzdialenosti, ktorá zodpovedá 20-násobku šírky v polovičnej výške píku na chromatograme získanom s predpísaným referenčným roztokom, na mieste, kde by sa nachádzal pík.

Opakovateľnosť

Opakovateľnosť odozvy sa vyjadruje ako odhad relatívnej smerodajnej odchýlky (RSD_%) v percentách pre radu následných meraní porovnávacieho roztoku a vypočíta sa zo vzorca:

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}},$$

kde y_i = jednotlivé hodnoty vyjadrené ako plocha píku, výška píku alebo relatívne hodnoty plôch pri použití metódy vnútorného štandardu,
 \bar{y} = priemer vypočítaný z jednotlivých hodnôt,
 n = počet jednotlivých hodnôt^{1, 10}.

2.2.5 Spôsobilosť systému

Test spôsobilosti systému predstavuje neoddeliteľnú súčasť metódy a slúži pre zaistenie primeranej účinnosti chromatografického systému. Pre hodnotenie účinnosti kolóny sa používajú nasledujúce parametre: zdanlivá účinnosť, kapacitný faktor, rozlíšenie, relatívna retencia a faktor symetrie. Faktory, ktoré môžu ovplyvniť chromatografické chovanie, zahŕňujú zloženie mobilnej fázy, jej iónovú silu, teplotu a zdanlivé pH, prietokovú rýchlosť, dĺžku kolóny, teplotu a tlak, charakteristiku stacionárnej fázy, vrátane porozity, veľkosti a typu častíc, špecifického povrchu a u nosičov používaných v chromatografii s obrátenými fázami rozsah chemickej modifikácie (odstránenie povrchových silanolových skupín, obsah viazaného uhlíku atď.).

Jednotlivé časti použitého zariadenia musia byť kvalifikované a musia byť schopné dosiahnuť presnosť požadovanú pre prevedenie skúšky alebo stanovenie obsahu^{1, 10}.

2.3 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia

2.3.1 Význam a postavenie HPLC v modernej farmaceutickej analýze

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC) zaujíma pre mnohé výhody dominantné miesto vo farmaceutickej analýze. HPLC metódy založené na tzv. reverznom móde (RP-HPLC) sú najčastejšie používanými separačnými metódami v celej oblasti zaoberajúcej sa analýzou liečiv¹¹. Na rozdiel od iných (neseparačných) techník umožňuje HPLC najprv efektívne rozdelenie jednotlivých zložiek analyzovanej zmesi do tzv. elučných zón, a následne ich selektívnu detekciu. Výhoda v porovnaní s plynovou chromatografiou spočíva v detekcii širšieho spektra látok, pretože nevyžaduje prevedenie analytu na prchavý derivát. Staršie chromatografické techniky (papierová, tenkovrstevná, gélová) na druhej strane neumožňujú dosiahnuť tak efektívnu separáciu a citlivosť¹². Prednosťou HPLC je relatívne jednoduché kvalitatívne a kvantitatívne hodnotenie i pomerne zložitých zmesí chemických látok. V priebehu jednej analýzy je možné presné a správne stanovenie aktívnych, pomocných i príbuzných látok (nečistôt, degradačných produktov). V bioanalýze na druhej strane táto metóda umožňuje hodnotiť liečivá a ich metabolity v biologickom materiáli bez interferencie s nízko molekulárnymi endogénnymi látkami^{11, 13}. V poslednej dobe sa pozornosť sústredila na vývoj automatických systémov pre analýzu liečiv v biologickom materiáli spájajúcich on-line úpravu vzorku (napr. extrakciu alebo mikroextrakciu na pevnej fáze – SPE, SPME) s následnou chromatografickou analýzou^{14,15}.

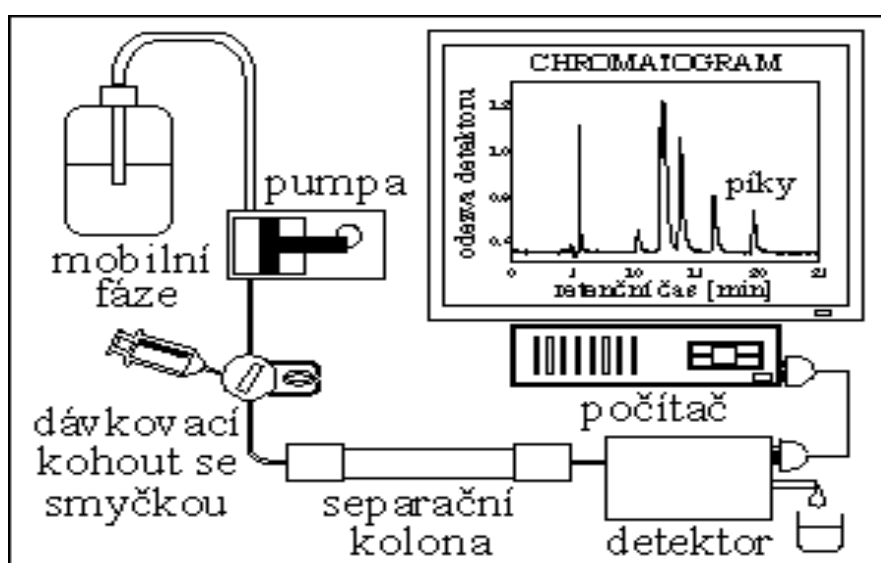
2.3.2 História

Pred rokom 1970 bolo pre vedeckých pracovníkov komerčne dostupných veľmi málo chromatografických metód. V sedemdesiatych rokoch bola väčšina separácií vykonávaná použitím množstva techník, vrátane otvorenej kolónovej chromatografie, papierovej chromatografie a chromatografie na tenkej vrstve. No napriek tomu boli tieto chromatografické techniky nedostatočné pre kvantifikáciu a rozlíšenie podobných zlúčenín. V tomto čase sa začala používať tlaková kvapalinová chromatografia, aby sa znížil prietokový čas a zároveň doba, za ktorú sa oddelia zložky izolované v kolónovej chromatografii. No prietoková rýchlosť bola nestála a začalo sa diskutovať, či je lepšie mať konštantný prietok, alebo konštantný tlak.

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia bola vyvinutá v polovici 70-tych rokov minulého storočia a bola rýchlo vylepšená vývojom kolónových náplní a vymoženosťou on-line detektorov. Na konci 70-tych rokov novo vynájdená metóda reverzných fáz umožnila separáciu veľmi podobných zlúčenín.

Od 80-tych rokov bola HPLC bežne používaná na separáciu chemických zlúčenín. Nové techniky umožňovali lepšiu separáciu, identifikáciu, purifikáciu a kvantifikáciu ako techniky používané predtým¹⁶.

2.3.3 Základná schéma HPLC



Zásobníky mobilnej fázy

Konstrakčným materiálom zásobníkov býva najčastejšie sklo, plasty (polyetylen, polypropylen, polytetrafluorethylen) alebo nerezová oceľ. Na prepojenie chromatografických systémov sa často používajú kapiláry z plasty. Tiež sa používajú kapiláry z nehrdzavejúcej ocele^{17,18}.

Mobilná fáza

Úlohou mobilnej fázy v HPLC je kontinuálne vnašať vzorku do kolóny, čiže na stacionárnu fázu. V chromatografii s normálnymi fázami sa ako mobilné fázy používajú menej polárne rozpúšťadla. V chromatografii s obrátenými fázami sa používajú vodné mobilné fázy s organickým rozpúšťadlom.

Vzorka je do mobilnej fázy nastrekovaná cez injektor. Počas toho ako je unášaná cez kolónu, jej zložky migrujú podľa nekovalentných interakcií zlúčeniny a kolóny. Chemické interakcie mobilnej fázy a analytu s kolónou určujú stupeň migrácie a separácie zložiek obsiahnutých vo vzorku. Napríklad, tie vzorky, ktoré majú silnejšiu afinitu k mobilnej fáze ako k stacionárnej, sa budú eluovať rýchlejšie a budú mať kratší retenčný čas a naopak. Zložky mobilnej fázy sa obvykle filtrujú, aby z nich boli odstránené častice väčšie ako 0,45 µm. Zloženie mobilnej fázy môže byť v priebehu analýzy menené za účelom ovplyvnenia interakcií medzi vzorkou a mobilnou fázou. Podľa toho rozoznávame dve základné typy analýz (módy analýz): isokratickú a gradientovú.

V izokratickej sa zložky vymývajú použitím mobilnej fázy, ktorá ma stále zloženie počas celej doby separácie. Výhoda tohto typu analýzy spočíva v rýchlejšom ustálení rovnováhy v kolóne (ekvilibrácia kolóny). Problémom je však rozlíšenie podobných látok a dlhší čas analýzy vzoriek obsahujúcich jak lipofilné, tak hydrofilné zložky.

V gradientovej elúcii sú rozdielne zlúčeniny vymývané vzrastajúcou silou organického rozpúšťadla. Vzorka je zväčša nastrieknutá práve vtedy, keď je v systéme mobilná fáza so slabšou elučnou silou. Tá je neskôr zvýšená vzrastajúcim percentom organickej fázy, čo následne vedie k vymývaniu zložiek, ktoré sú sorbované silnejšie. To je obvyčajne vykonávané skokovite, alebo lineárne. Výhody gradientovej elúcie v porovnaní s isokratickou sú:

- rýchlejšia elúcia silne zadržovaných analytov
- ostrejšie píky
- menšie chvostovanie píkov
- urýchlenie analýzy

Bežným problémom pri HPLC analýze je obsah plynov v mobilnej fáze. Pri vyššom tlaku v kolóne je vzduch rozpustený v mobilnej fáze. Pri výstupe z kolóny alebo v detektore sa môže z mobilnej fázy uvoľňovať, a tým pádom meniť tvar píkov. Odplynenie môže byť prevedené manuálne alebo pomocou degassera. Jedná sa o zariadenie zabudované priamo v chromatografe, takže proces je automatický. Vzduch je možné odstrániť pomocou vákua, ultrazvuku alebo prebublaním s héliom^{19, 20}.

Pumpy (čerpadla mobilnej fázy)

HPLC pumpa je považovaná za jednu z najdôležitejších komponent v kvapalinovej chromatografii. Jej úlohou je zaistenie kontinuálneho a konštantného toku eluentu cez HPLC injektor, kolónu a detektor. Požiadavky na štandardnú HPLC pumpu sú:

- prietokové rozmedzie od 0,01 do 10 ml/min
- tlakové rozmedzie od 1 do 5,000 psi (68,95 mbar – 344,74 bar).
- pulzácie tlaku menej ako 1% pri normálnom a reverznom móde a menej ako 0,2% pri gélovej chromatografii.

Pumpy sa delia do dvoch základných kategórií, a to na pumpy s konštantným tlakom a konštantným prietokom.

Výhodou púp s konštantným tlakom je absencia pulzácií, výsledkom čoho je pravidelná základná línia. Nevýhodou je možnosť kolísania prietoku, čo sa prejaví zmenou retenčného času a objemu a následne ovplyvnením kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy. Preto je kladený dôraz na jeho monitorovanie.

Pumpy s konštantným prietokom majú schopnosť opakovane dosahovať rovnaký elučný objem bez ohľadu na zmeny viskozity mobilnej fázy alebo zablokovanie kolóny. Problémom sú však pulzácie, ktoré však môžu byť absorbované tmičmi.

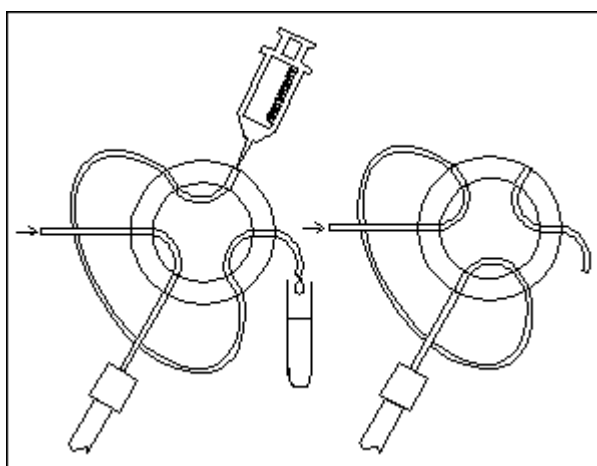
Miešanie mobilnej fázy sa rozdeľuje na nízkotlakové a vysokotlakové. Pri nízkotlakovom dochádza k miešaniu zložiek mobilnej fázy pred čerpadlom, ktoré následne pumpuje mobilnú fázu v požadovanom zložení. Pri vysokotlakovom miešaní má každá zložka vlastné čerpadlo a k zmiešaniu dochádza za pumpou²⁰.

Dávkovacie zariadenia (injektory)

Úlohou injektorov v kvapalinovej chromatografii je možnosť injikovania kvapalných vzoriek v rozmedzí od 0,1 do 100 ml s vysokou reprodukovateľnosťou a pod vysokým tlakom (4000 psi). Požiadavky sú taktiež kladené na minimálne ovplyvňovanie prietoku.

Najčastejšie pracujú na princípe šesťcestného ventilu (obr. 1). Vzorka je striekačkou vpravená do dávkovacej smyčky, pootočením jadra ventilu je smyčka napojená na prúd mobilnej fázy a tým nastrieknutá na kolónu. Objem nástreku sa môže pohybovať od 60 nl.

Dávkovanie sa delí na manuálne a automatické. Pri manuálnom je potrebné dávkovaciú smyčku ručne naplniť striekačkou a otočiť ventil. Nevýhodou je potreba výmeny dávkovacej smyčky pri zmene objemu nástreku. Automatické dávkovanie väčšinou umožňuje nástrek variabilného množstva vzorky bez potreby výmeny dávkovacej smyčky. Využíva sa hlavne pri spracovaní väčšieho množstva vzoriek bez zásahu operátora²⁰.



Obrázok 1: Schéma šest'cestného ventilu

Kolóny

Kolóny pre HPLC analýzu sú adsorbentom naplnené oceľové alebo sklenené trubice². Dĺžka kolón sa zväčša pohybuje v rozmedzí 5 – 25 cm, priemer je najčastejšie 3 mm; 4 mm alebo 4,6 mm. Existujú však aj kratšie kolóny (2 – 3 cm) a s menším priemerom. Veľkosť častíc adsorbentu je najčastejšie 3 – 10 μm , ale v niektorých prípadoch môže byť i menšia²⁰.

HPLC sorbent (stacionárna fáza) je materiál, ktorým je naplnená kolóna a ktorý umožňuje adsorpciu analytu, čiže separáciu. Dominantným typom HPLC adsorbentu je silikagel (oxid kremičitý, $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$). Ten môže byť nemodifikovaný (polárny), v tomto prípade sa jedná o separáciu v systéme normálnych fáz. Druhým typom je modifikovaný (nepolárny) silikagel, v ktorom bývajú hydroxylové skupiny upravované naviazaním rôznych radikálov. Ide o chemicky viazané stacionárne fázy (tzv. reverzné fázy alebo RP fázy). Z 80% sú to uhlíkové reťazce obsahujúce 18 (prípadne 8) uhlíkových atómov. Radikál môže tiež obsahovať trojuhlíkatý reťazec zakončený skupinami $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$, a iné. V tomto prípade sa jedná o stredne polárne fázy^{6, 20}.

Taktiež sa používajú polymérne kolóny, kolóny na báze oxidu zirkoničitého a iné²⁰.

Detektory

Detektory sú zariadenia, ktoré slúžia na identifikáciu analytu vychádzajúceho z kolóny. Princíp spočíva v detekcii eluátu pomocou vhodného snímača. Signál je po zosilnení ďalej spracovaný a vyhodnotený. Požiadavky na detektor pre HPLC sú:

- nízka hodnota šumu

- vysoká citlivosť
- rýchla odozva
- reprodukovateľnosť
- široké lineárne rozmedzie
- nezávislosť odozvy na zmene mobilnej fázy pri gradientovej elúcii
- nízka citlivosť pri pulzáciách a rýchlosti prietoku mobilnej fázy
- univerzálnosť
- ľahká obsluha a spoľahlivosť^{2, 20}

Detektory sa delia na selektívne a univerzálne. U selektívnych je signál úmerný koncentrácii samotnej detegovanej látky a u univerzálnych je odozva úmerná určitej celkovej vlastnosti eluátu, jak analytu tak i zložiek mobilnej fázy²¹.

SPEKTROFOTOMETRICKÉ DETEKTORY (UV/VIS DETEKTORY)

UV detektory využívajú elektromagnetické žiarenie o vlnovej dĺžke 190 – 400 nm, VIS 400 – 800 nm. IR spektrum má v HPLC minimálne využitie. Každá chemická zlúčenina má schopnosť interakcie s elektromagnetickým vlnením, pričom sa menia jeho vlastnosti, čo je princípom optických HPLC detektorov. Táto zmena je podľa Lambert-Beerovho zákona závislá na koncentrácii analytu. Časť molekuly, ktorá je schopná meniť vlastnosti elektromagnetického vlnenia sa nazýva chromofor²⁰.

UV/VIS detektory je možné rozdeliť na:

- UV detektory s fixnou vlnovou dĺžkou (najčastejšie 254 nm alebo 280 nm). Majú dvojpraprskové usporiadanie a merajú rozdiel absorpcie medzi mernou a porovnávacou celou. Ako zdroj žiarenia sa používa nízkotlaková ortuťová výbojka s fixnou vlnovou dĺžkou. Patrí medzi staršie typy detektorov.
- UV-VIS detektory s premenlivou vlnovou dĺžkou. Poskytujú možnosť nastavenia rôznych hodnôt vlnových dĺžok. Zdrojom polychromatického žiarenia je deutériová lampa, požadovaná vlnová dĺžka sa nastavuje pomocou monochromátora.
- Scanning UV detektory. Umožňuje v priebehu niekoľkých sekúnd snímať celé absorpčné spektrum v maxime píku hodnoteného liečiva.
- Diode array detektory umožňujú v priebehu analýzy merať celé spektrum, vzniká trojrozmerná projekcia. Princíp spočíva v meraní signálu veľkého počtu miniatúrnych plošných fotodiód. Citlivosť je však o niečo nižšia ako u obyčajného detektoru²².

Citlivosť spektrofotometrických detektorov je 10^{-9} až 10^{-10} g/ml. Mobilnou fázou môžu byť rozpúšťadla, ktoré neabsorbujú pri danej vlnovej dĺžke, možná je aj gradientová elúcia⁶.

FLUORESCENČNÉ DETEKTORY

Fluorescenčné detektory patria medzi najcitlivejšie detektory v modernej HPLC analýze. Umožňujú detegovať prítomnosť jedinej molekuly analytu. Typicky je citlivosť fluorescenčných detektorov asi 10 až 1000 krát vyššia ako pri UV detektoroch (10^{-9} až 10^{-12} g/ml)^{6, 20}.

Princípom je absorpcia krátkovlnného žiarenia špecifickými funkčnými skupinami analytu a následne emitovanie žiarenia o vyššej vlnovej dĺžke. Tento jav sa nazýva fluorescencia.

Normálne však vykazuje prirodzenú fluorescenciu iba 15% všetkých látok. Pri jej absencii je v niektorých prípadoch možné previesť derivatizáciu, pri ktorej sa na analyt naviaže funkčná skupina vykazujúca fluorescenciu, ktorá následne umožní detekciu.

Citlivosť detekcie akejkoľvek látky závisí na vybranej vlnovej dĺžke. Väčšina moderných detektorov umožňuje rýchle prepínanie medzi excitačnými a emitačnými vlnovými dĺžkami, čo je výhodné pri detekcii rôznych zložiek zmesi²⁰.

ELEKTROCHEMICKÉ DETEKTORY

Princíp detekcie spočíva v meraní prúdu produkovaného oxidačno-redukčnými reakciami analytu na vhodnej elektróde. Podmienkou je elektrická vodivosť mobilnej fázy, takže sa nedajú použiť v systémoch s normálnymi fázami. Taktiež je dôležité odplynenie mobilnej fázy, aby nedochádzalo k porušeniu základnej línie.

Oblasť využitia elektrochemických detektorov v HPLC nie je široká, zato sa však pre svoju citlivosť a selektivitu preferujú pri analýze niektorých liečiv, nečistôt a prírodných produktov (napr. organické kyseliny, catecholaminy, fenol). Ich špecifita a citlivosť umožňuje použitie pri monitorovaní zlúčenín v komplexných maticiach, ako sú napr. telové tekutiny²⁰. Väčšinou však nie je možná gradientová elúcia⁶.

Princíp elektrochemickej oxidovateľnosti a redukovateľnosti sa využíva u voltametrických, ampérometrických a polarografických detektoroch. Citlivosť sa pohybuje v rozmedzí 10^{-9} až 10^{-12} g/ml⁶.

REFRAKTOMETRICKÉ DETEKTORY

Sú to univerzálne detektory. Princíp detekcie spočíva v meraní rozdielu indexu lomu eluátu a čistej mobilnej fázy. Čím vyšší je rozdiel, tým väčšia je citlivosť. Každá zmena v zložení mobilnej fázy vyžaduje kalibráciu, čiže sú nepoužiteľné pri gradientovej elúcii. Taktiež je výrazná závislosť medzi teplotou a indexom lomu, čo vyžaduje nutnosť termostatovania. Tieto vlastnosti a nízka citlivosť detektorov (10^{-6} g/ml) výrazne obmedzujú ich uplatnenie v praxi^{6, 20}.

HMOTNOSTNÉ DETEKTORY

Pre detekciu liečiv je v poslednej dobe využívané tiež spojenie HPLC s hmotnostnou spektrometriou (MS). Po výstupe z kolóny je potrebné z eluátu odstrániť mobilnú fázu a ionizovať molekuly liečiva v plynnom stave. Pre spojenie s HPLC sa najviac používa ionizácia elektrosprejom, chemická ionizácia za atmosférického tlaku a fotoionizácia za atmosférického tlaku. Nabité častice (molekulárne a fragmentové ióny) sú v magnetickom alebo vysokofrekvenčnom poli separované podľa hmotnosti a náboja (hodnôt m/z) a je zaznamenané hmotnostné spektrum (tj. počet iónov vo vzťahu k pomeru – hmotnosť/počet nábojov). Spojenie HPLC-MS je vysoko selektívne, vysoko citlivé a navyše poskytuje celú radu údajov potrebných pre identifikáciu neznámych látok. No zatiaľ sú hmotnostné detektory pomerne finančne veľmi náročné⁶.

Zariadenie pre spracovanie dát

Slúžia na vyhodnotenia, spracovanie a uloženie dát z chromatografu. V dnešnej dobe sa používajú hlavne bežné počítače vybavené softwarom špeciálne vyvinutým výrobcom. Pomocou počítača môže operátor pohodlne ovládať celý analytický postup (zloženie mobilnej fázy, prietok, tlak a teplotu na kolóne, gradient atď.). Moderné chromatografy umožňujú vopred naprogramovať a vykonávať celú sériu analýz bez prítomnosti operátora (napr. cez noc)²¹.

2.3.4 Kvalitatívna a kvantitatívna analýza HPLC chromatogramu

Na určenie kvalitatívnych a kvantitatívnych parametrov v HPLC analýze slúži chromatografická krivka.

Kvalitatívnou charakteristikou je retenčný (elučný) čas t_R , čo je doba nastrieknutia vzorku na kolónu k maximu chromatografického píku. Ďalšou metódou je porovnanie kompletných UV/VIS spektier získaných DAD alebo využitím techniky on-line analýzy píku hmotnostnej spektrometrie (HPLC-MS)².

Koncentráciu analytu (kvantitatívnu charakteristiku) je možno určiť z plochy píku, prípadne výšky píku. Kvantitatívna analýza za použitia dávkovacieho ventilu s objemom smyčky 50-200 μ l umožňuje stanovenie s relatívnou presnosťou 0,2 %; izokratická elúcia pritom poskytuje reprodukovateľnejšie výsledky než gradientová. Pre vlastné kvantitatívne vyhodnocovanie na základe kalibračnej závislosti alebo metódy štandardného prídavku je výhodnejšie použiť plochu pod píkom, iba u symetrických píkov je možné využiť vyhodnotenie výšky píku. Pre stanovenie jednotlivých zložiek sa najčastejšie používa metóda vonkajšieho, metóda vnútorného štandardu, postup kalibrácie alebo postup normalizácie^{2, 10}.

Metóda vonkajšieho štandardu

Spočíva v dvoch krokoch, v dvojitom dávkovaní. V prvom kroku sa na kolónu nastriekne roztok analyzovaného vzorku a po registrácii chromatografického záznamu sa v druhom kroku nastriekne roztok vonkajšieho štandardu a opäť sa registruje jeho chromatogram. Ako vonkajší štandard sa spravidla používa u substancií chemická referenčná látka (CRL), alebo u zložených liekových prípravkoch jedna zo zložiek analyzovanej zmesi. Koncentrácia stanovovaných zložiek zmesi sa potom vypočíta porovnaním plôch (výšok) píkov jednotlivých stanovovaných látok a plochy píku vonkajšieho štandardu²³.

Metóda vnútorného štandardu

Princíp spočíva v pridaní známeho množstva štandardnej látky k analyzovanej zmesi. Koncentrácia analytu sa následne vypočíta z pomeru plôch (výšok) píkov jednotlivých separovaných zložiek a plochy píku vnútorného štandardu. Metóda je menej časovo náročná a hlavne presnejšia, pretože nie je zaťažovaná chybou dvojitého nástreku. Sú však kladené vysoké nároky na výber vhodného štandardu. Musí mať podobné vlastnosti ako analyt, musí byť eluovaný v blízkosti píku analyzovanej látky, musí mať podobnú koncentráciu a byť chemicky inertný. Z chromatografických záznamov sa vypočíta obsah analytu vyhodnotením pomerov plôch píku štandardu a skúmanej látky²³.

Postup kalibrácie

Určí sa vzťah medzi meraným alebo hodnoteným signálom (y) a množstvom (koncentráciou, hmotnosťou a pod.) látky (x), z ktorého sa vypočíta kalibračná funkcia. Obsah analytu vo vzorku sa vypočíta pomocou inverznej kalibračnej funkcie.¹⁰

Postup normalizácie

Percentuálny obsah jednej alebo viacerých zložiek skúšanej látky sa vypočíta určením veľkosti plochy píku alebo píkov ako percentuálny podiel z celkovej plochy všetkých píkov okrem píkov, ktoré zodpovedajú rozpúšťadlám alebo pridaným činidlám, a píkov, ktoré sú pod prahom citlivosti¹⁰.

2.4 Úprava vzoriek pred HPLC analýzou

Úprava vzorku je dôležitou súčasťou prevažnej časti HPLC analýz, pretože umožňuje získať homogénny roztok obsahujúci analyzované látky, ktorý môže byť následne nastrieknutý na chromatografickú kolónu. Zatiaľ čo samotná HPLC je v prevažnej miere vykonávaná automaticky, úprava vzorku je zväčša ručný proces, ktorý vyžaduje viac času ako samotná HPLC separácia a analýza dát. Význam tohto procesu je získať vzorku, ktorá je zbavená nečistôt, nepoškodzuje kolónu, je kompatibilná s používanou HPLC metódou a v prípade potreby ju môžeme skoncentrovať alebo derivatizovať, čo je vhodné pre zlepšenie citlivosti detekcie a zlepšenie kvality separácie²⁴.

2.4.1 Úprava biologického vzorku

Biologické vzorky sú pomerne zložité matrice, ktoré väčšinou nie je možné (s výnimkou vzoriek moči alebo žlči) priamo nastriekavať na chromatografickú kolónu. Medzi najviac používané biologické materiály patria: plazma, sérum, krv, erytrocyty, moč alebo feces. Medzi menej bežné materiály patria sliny, pot, vlasy alebo koža. V experimentálnych podmienkach môžu byť tiež analyzované vzorky žlči alebo lyzátov rôznych tkanív^{25,26}.

K najčastejšie užívaným technikám pre úpravu biologických vzoriek patria: deproteinácia, extrakcia kvapalina – kvapalina (LLE: liquid - liquid extraction) a extrakcia na pevných fázach (SPE: solid - phase extraction). V poslednej dobe sa začína využívať tiež mikroextrakcia na pevných fázach (SPME: solid phase microextraction) alebo technika prepínania kolón (column - switching)^{27,28,29}.

2.4.1.1 Deproteinácia

Je to najjednoduchšia metóda úpravy biologických vzoriek pred HPLC analýzou. Je založená na vyzrážaní proteínov vo vzorke pomocou chemických činidiel (málokedy pomocou proteolytických enzýmov) a získaný supernatant je nastrieknutý na HPLC kolónu. Medzi deproteináciu je niekedy zaradzovaná aj metóda ultrafiltrácie, ktorá však umožňuje iba stanovenie voľnej frakcie liečiva^{25,30}.

Precipitačná deproteinácia

Proteíny sú zo vzorku vyzrážané pomocou organických rozpúšťadiel miesiteľných s vodou: silných kyselín, soli ťažkých kovov alebo kombináciou niekoľkých týchto činidiel. Najviac sú využívané organické rozpúšťadla, napr. acetonitril, acetón, ethanol a methanol. Z kyselín sa využíva kyselina trichloroctová a chloristá. Soli ťažkých kovov sú vzhľadom na nízku účinnosť využívané len zriedka, používa sa napr. síran zinočnatý^{25, 30}.

Ultrafiltrácia

Princíp spočíva v oddelení nízko a vysokomolekulárnej frakcie vzorku použitím semipermeabilnej membrány (prepustí látky do molekulovej hmotnosti 30 000) a odstredivej sily. Na rozdiel od precipitačnej deproteinácie, do ultrafiltrátu prejde iba voľná frakcia liečiva, tj. neviazaná na proteíny. Membrána dokáže zachytiť 99,9 % sérových proteínov²⁵.

Enzymová deproteinácia

Proteíny sú odstránené pomocou proteolytických enzýmov (trypsin, papain atď.)²⁵.

2.4.1.2 Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE: liquid-liquid extraction)

Základným princípom tohto druhu extrakcie je rozdelenie vzorku medzi dve nemiešateľné kvapaliny alebo fázy. Prvou fázou je obyčajne vodné, druhou organické rozpúšťadlo. Hydrofilnejšie zlúčeniny preferujú polárnu (vodnú) fázu, zatiaľ čo hydrofóbnejšie nájdeme hlavne v organickom rozpúšťadle. Zlúčeniny extrahované do organickej fázy môžeme ľahko získať späť odparením rozpúšťadla.

Extrakciu môžeme popísať Nernstovým rozdeľovacím zákonom, ktorý udáva, že pomer koncentrácií analytu medzi dvoma nemiešateľnými rozpúšťadlami je stály a nazýva sa distribučná konštanta:

$$K_D = \frac{c_o}{c_v},$$

kde K_D = distribučná konštanta,

c_o = koncentrácia látky v organickej fáze,

c_v = koncentrácia látky vo vodnej fáze.

V praxi je užitočnejšie vyjadrenie podielu frakcie látky extrahovanej do organického rozpúšťadla:

$$E = \frac{c_o V_o}{c_o V_o + c_v V_v} = \frac{K_D V}{1 + K_D V},$$

kde E = extrahovateľná frakcia v organickej fáze,

V_o = objem organickej fáze,

V_v = objem vodnej fáze,

V = fázový pomer V_o/V_v .

Typickými rozpúšťadlami pre LLE extrakciu sú alifatické uhľovodíky (hexan, isooktan), ethery, dichlormethan, chloroform, ethylacetát atď. Pri extrakcii je okrem nemiesiteľnosti s vodou dôležitá aj polarita rozpúšťadla. Maximálna výťažnosť sa získava ak je polarita rozpúšťadla blízka polarite analyzovanej látky. Taktiež úpravou pH vzorku je možné podporiť prechod liečiva do organickej fázy²⁴.

2.4.1.3 Extrakcia na pevných fázach (SPE: Solid-phase extraction)

Extrakcia na pevných fázach patrí medzi najviac používané techniky prípravy vzorku pred HPLC analýzou. Teoreticky by sa dala tiež pomenovať ako extrakcia kvapalina - pevná látka. Princíp metódy je analogický separácii na HPLC a spočíva v sorpcii analytu na SPE sorbent, ktorý je následne eluovaný selektívnym rozpúšťadlom. Cieľom je kvantitatívne vyizolovať analyt zo vzorku a kompletne ho prečistiť a skoncentrovať v malom objeme rozpúšťadla vhodnom pre ďalšiu analýzu, napr. HPLC. Ako mechanizmy retencie sa využívajú reverzné fázy, normálne fázy alebo iónovo-výmenné fázy³¹.

Sorbenty pre SPE sú vyrábané v rôznych formách:

- naplnené v kolónkach (kartridžoch), (100 mg - 1 g sorbentu)
- naplnené v kolónkach v tvare „striekačiek“, (50 mg – 10 g sorbentu)
- disky
- obalené vlákna (SPME)^{24, 31}.

Najviac využívanou formou sú kolónky v tvare striekačiek, ktoré sú zvyčajne vyrobené z polypropylénu, alebo polyetylénu a sú naplnené sorbentom o veľkosti častíc 40 μm a viac (HPLC kolónka je vyplnená časticami o veľkosti 3-10 μm). Disky sú na rozdiel od kolóniek tvorené sieťou vlákien a líšia sa väčšou plochou sorbentu, a tým aj vyššou rýchlosťou extrakcie. Obalené vlákna sa využívajú u mikroextrakcii na pevnej fáze (SPME: Solid - phase microextraction).

Hnacou silou elúcie je pretlak alebo podtlak. Pretlak sa využíva u striekačiek, u ktorých je analyt tlačенý cez kolónku. Podtlak sa využíva u vákuových zariadení. Je to najčastejší spôsob, ktorý umožňuje eluovať viac kolóniek naraz. Gravitačná sila je vzhľadom na pomalosť prakticky nepoužiteľná.

SPE zvyčajne zahŕňa 4 kroky:

1. aktivácia sorbentu
2. nanosenie vzorky
3. vymytie sorbentu (odstránenie interferencií)
4. izolácia analytu.

Na začiatku extrakcie je kolónka aktivovaná. Význam spočíva v tom, že sa odstránia nečistoty a zároveň sa zvlhčia funkčné skupiny sorbentu. Navyše vzduch prítomný v sorbente je nahradený rozpúšťadlom. Typickým aktivačným roztokom je methanol, po ktorom nasleduje voda, alebo pufr. Takto je kolónka aktivovaná a sorpčné mechanizmy sú pripravené pre vzorky rozpustené vo vode alebo vodných matriciach. Počas tohto procesu nesmie dôjsť k vyschnutiu kolónky (znížila by sa výťažnosť extrakcie), inak je potrebné ho zopakovať.

Ďalším krokom je aplikácia roztoku analytu. Podľa typu vzorky sa zvyčajne aplikuje 1 ml až 1 l roztoku. Uplatňujú sa retenčné mechanizmy ako van der Waalsove interakcie, vodíkové väzby, väzby dipól - dipól a interakcie anión - kation.

Následne je kolónka prepláchnutá rozpúšťadlom o malej elučnej sile (zvyčajne voda alebo pufr). Tým sa odstránia naviazané interferencie.

Posledným krokom je elúcia analytu rozpúšťadlom, ktoré je zvolené tak, aby selektívne narušilo interakciu analyt – sorbent. Obvykle sa používa rozpúšťadlo o veľkej elučnej sile, aby sa minimalizovala jeho spotreba³¹.

Výhody SPE:

- vyššia účinnosť extrakcie
- efektívnejšia separácia analytu od interferencií
- nižšia spotreba organických rozpúšťadiel
- ľahší odber celkovej analytickej frakcie
- možnosť automatizácie²⁴.

2.5 Chelátory železa

2.5.1 Železo v ľudskom tele

Železo je nenahradiateľným biogénnym prvkom. V organizme sa uplatňuje prevažne v procesoch bunecného dýchania. Závisí na ňom väzba kyslíku na hemoglobín i ďalšie významné biochemické reakcie.

Za normálnych okolností je jeho vstrebávanie regulované pomocou bariéry epiteliálnych buniek GIT. Prevažná časť železa je v organizme viazaná v hemoglobíne a v myoglobíne, zásobné železo je uskladnené vo feritine a transportované pomocou transferínu, malý podiel sa vyskytuje v neviazanej forme (tzv. voľné železo, schopné katalyzovať vznik toxických radikálov). V organizme sa vyskytuje v dvoch oxidačných stavoch: vo ferro (Fe^{2+}) a ferri (Fe^{3+}) forme. Ferro forma je charakteristická pre hemové železo (viaže reverzibilne kyslík), kdežto skladovacie a transportné proteíny viažu železo v trojmocnej forme. To je dôležité preto, lebo vo ferro forme je železo náchylné k hydrolyze a k tvorbe biologicky nevyužitelných komplexov³².

Niektoré patologické stavy však môžu viesť k zvýšeniu podielu voľného železa. Dochádza k tomu napríklad pri preťažení organizmu železom (iron overload), alebo pri jeho uvoľnení z väzby na feritin pri intracelulárnej acidóze, ktorá sprevádza napr. ischemicko - reperfúzný syndróm. Voľné železo má schopnosť ľahko prechádzať medzi svojou oxidovanou a redukovanou formou, a tak pôsobí ako katalyzátor pri vzniku hydroxylových radikálov. Tie predstavujú najtoxickjšiu a najreaktívnejšiu známu formu kyslíka. Okamžite reagujú s akoukoľvek susednou molekulou a následkom je nevratné poškodenie lipidov, proteínov a nukleových kyselín³³.

2.5.2 Význam terapie chelatačnými látkami

Chelátory sú látky, ktoré vďaka svojej štruktúre vytvárajú komplexy s viacmocnými iónmi pomocou koordinačných väzieb. Medzi základné požiadavky na chelátor použiteľný v medicíne patrí jeho dostatočná lipofilita umožňujúca vstup látky do buniek, vysoká selektivita k iónom železa a naopak nízka afinita k ostatným biogénnym prvkom (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , atď) a v neposlednom rade nízka redoxná aktivita vzniknutých komplexov.

Chronické preťaženie železom je stav, ktorý sa prakticky nachádza zväčša u pacientov s genetickou poruchou. Napr. u pacientov, ktorí majú porušené vstrebávanie

železa z tráviaceho traktu (hemochromatóza), alebo u tých, ktorí trpia defektom syntézy hemoglobínu a potrebujú pravidelnú transfúziu krvi, aby sa u nich predišlo anémii (β -thalasémia). Nadbytok železa sa ukladá najmä v pečeni, pankrease a v srdci a môže vyústiť až ku zlyhaniu týchto orgánov a následne k smrti. Väčšina doterajších výskumov sa zamerala na vychytávanie prebytku železa pomocou chelátorov u pacientov s β -thalasémiou, pretože ľudské telo nemá žiadne efektívne mechanizmy ako sa zbaviť prebytku železa nahromadeného pri transfúzii krvi. Pacienti s β -thalasémiou sú momentálne liečení pomocou deferoxaminu a deferipronu. Obe látky vychytávajú železo a vo forme chelátov ho vylučujú močom a stolicou. Deferoxamin sa však musí aplikovať subkutánnou infúziou 4-7 dní v týždni, čo výraznou mierou znižuje compliance a zvyšuje cenu. Deferipron je možno aplikovať aj orálne^{34,35}. Ďalším potenciálnym chelátorom železa je ICL670 (deferasirox), ktorý sa nachádza v pokročilých fázach klinických štúdií³⁶.

V poslednej dobe sa výskum zamerl na možnosti využitia chelátorov železa pri liečbe mnoho ďalších onemocnení, ktoré priamo nevznikajú z preťaženia orgánov železom (iron-overload). Účinnosť chelátorov železa bola preukázaná u onemocnení súvisiacich s oxidačným stresom (antracyklinové kardiomyopatie, ischemicko-reperfúzne poškodenie srdca, neurodegeneratívne choroby). Okrem toho bola účinnosť chelátorov železa dokázaná pri liečbe nádorových onemocnení. Klinicky užívaným liečivom pri metastázujúcej rakovine prsu je Triaprin (thiosemikarbazonový analóg aroylhydrazonu)³⁷. Navyše bol zistený účinok pri liečbe malárie, kde deplecia železa v mikroorganizme môže inhibovať jeho rast³⁴.

2.5.3 Chelátory železa odvodené od aroylhydrazonu

Táto skupina chelátorov železa je odvodená od materskej látky a to od pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu (PIH). V klinických štúdiách bola potvrdená nízka toxicita PIH a výrazná schopnosť exkrécie železa z organizmu. Vďaka priaznivým farmakologickým vlastnostiam PIH sa rozbehol ďalší výskum a boli pripravené jeho analógy. Rozdeľujú sa do piatich podskupín³⁸.

Analógy série 100

Do tejto podskupiny patrí už spomínaný PIH, ktorý je per-os aktívny trojmocný chelátor železa. Železo viaže pomocou karbonylového kyslíku, iminového dusíku a fenylového kyslíku v pomere ligand/železo 2:1³⁸.

Analógy série 200

Táto skupina vznikla ďalším štúdiom závislosti štruktúry a aktivity analógov PIH a nahradením pyridoxalovej skupiny za hydrofóbnejšiu isonikotinovú. Hlavný reťazec a chelatačné skupiny ostali nezmenené, no zvýšila sa afinita k Fe^{3+} iónom. Základnou látkou je salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazon (SIH)³⁸.

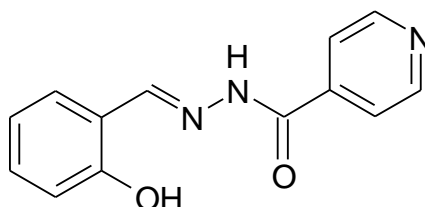
Analógy série 300

Náhrada pyridoxalu materskej látky skupinou 2-hydroxy-1-naftaldehydovou viedla k ďalšiemu zvýšeniu lipofility³⁸.

Poslednými dvoma podskupinami sú **analógy 2-pyridylkarboxaldehyd isonicotinoyl hydrazonu** a **analógy 2-pyridylketon isonicotinoyl hydrazonu**³⁸.

2.6 Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH), jeho vlastnosti a význam.

Štruktúrny vzorec:



Sumárny vzorec: $C_{13}H_{11}N_3O_2$

M_R : 241,24

Fyzikálne-chemické vlastnosti SIH

SIH je kryštalická látka žltkastej farby. Má tri hodnoty pK_a (3,34; 8,29 a 9,8). Pri hodnote pH 7,5 sa 86 % látky vyskytuje v neutrálnej forme (H_2L) a 14 % v ionizovanej forme (HL^-)³⁹. Rozdeľovací koeficient n-octanol : voda ($\log P$) má hodnotu -0,45⁴⁰. Hodnota rozdeľovacieho koeficientu, čiže lipofilita, ovplyvňuje farmakologické účinky napr. prienik do buniek. Nedávne štúdie dokázali, že schopnosť analógov PIH (teda aj SIH) mobilizovať železo z buniek je závislá na effluxe komplexu železo – chelátor z buniek, hlavne pasívnou difúziou⁴¹.

Syntéza SIH

SIH sa pripravuje Schiffovou kondenzáciou salicylaldehydu a isoniazidu. Pre zlepšenie rozpustnosti chelátoru vo vodnom prostredí bola na katedre anorganickej a organickej chémie pripravená vo vode lepšie rozpustná soľ s kyselinou chlorovodíkovou ($SIH \cdot HCl$) (M_R : 277,7).

Farmakologické účinky SIH

Farmakologické účinky SIH sú závislé na fyzikálne - chemických vlastnostiach. Význam má tiež lipofilita komplexu železo – (SIH)₂, ktorá ovplyvňuje jeho efflux z bunky a exkréciu⁴². Základné farmakologické účinky SIH sú:

- Mobilizácia Fe z buniek^{41, 43}.
- Antioxidačné pôsobenie – chelátor bol vysoko účinný *in vitro* na modeloch oxidačného stresu experimentálne vyvolaného H₂O₂. Taktiež bol preukázaný *in vivo* protektívny účinok proti kardiotoxicite antracyklinových cytostatik^{44, 45}.
- Antiproliferatívne pôsobenie – experimentálne bolo dokázané antiproliferatívne pôsobenie SIH a schopnosť indukovať apoptický zánik nádorových buniek (*in vivo*)⁴⁶.
- Antimalarické pôsobenie – voči plasmodium falciparum (*in vitro*)⁴⁷.
- Antimikrobiálne pôsobenie⁴⁷.

Toxicita SIH

Toxicita chelátorov železa závisí od možnosti effluxu cez biologické membrány, čiže od akumulácie v bunke a následnej toxicite⁴². *In vivo* toxicita SIH bola skúmaná zatiaľ iba v jednej štúdií. Boli pozorované potenciálne toxické efekty po opakovanom podávaní SIH (50 mg/kg/týždeň počas 10 týždňov). Štúdiá nepreukázala žiadne viditeľné známky toxicity⁴⁸.

Pilotná farmakokinetická štúdia

Popis plazmatických koncentrácií SIH *in vivo* bola doposiaľ skúmaný iba v jednej štúdií. Po i. v. aplikácii 10 mg/kg SIH králikom bola pozorovaná pomerne rýchla distribúcia a eliminácia. Používaná metóda umožňovala sledovať profil plazmatickej koncentrácie iba do 60 minúty od aplikácia, no napriek tomu bol možné zo získaných údajov vypočítať základné farmakokinetické parametre⁴⁹.

2.7 Prehľad publikovaných prác zaoberajúcich sa analýzou SIH

Vzhľadom na to, že SIH je relatívne nová látka, sa v dostupnej literatúre nachádza málo odkazov na štúdie zaoberajúce sa analýzou SIH. V štúdiách boli použité metódy HPLC s UV detekciou, RP-TLC chromatografia a UV spektroskopia^{49, 50, 51}.

Autori Kovaříková P., Mokry M., Klimeš J. a Vávrová K. sa zaoberali separáciou biokompatibilných chelátorov v prítomnosti ich syntetických prekurzorov. Chromatografická analýza SIH bola dosiahnutá na kolóne s náplňou Nucleosil 120-5 C₁₈ so zrnitosťou 5 μm. Mobilná fáza sa pozostávala z 0,01 M fosfátového pufru (pH 6,0) a methanolu (60:40, v/v). Zároveň bola vyvinutá RP-TLC chromatografia na separáciu jednotlivých chelátov (PIH,

SIH, o-108), ich komplexov so železom a prekursorov. Ako mobilná fáza bola použitá zmes fosfátového pufru [0,01 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; pH 7,0] a acetonitrilu (60:40, v/v)⁵¹.

Vývojom metódy HPLC stanovenia SIH v plazme kráľika a následne jej uplatnenie v štúdiách *in vivo* sa zaoberali Kovaříková P., Klimeš J., Štěrba M., Popelová O., Mokřý M., Geršl V., Poňka P. Chromatografická separácia bola prevádzaná na kolóne (250×4,6 mm) s náplňou LiChrospher RP-18 so zrnitosťou 5 μm (Merck, Nemecko) za pomoci predkolóny s náplňou Purospher RP-18 so zrnitosťou 5 μm (Merck, Nemecko). Mobilnou fázou bol fosfátový pufr (0,01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ s prídavkom EDTA, pH 6,0) a methanol (53:47; v/v). Vzorka bola pred analýzou upravená proteínovou precipitáciou pomocou 0,1 M HClO_4 a acetonitrilu⁴⁹.

2.8 Prehľad prací zaoberajúcich sa analýzou isoniazidu a acetylisoniazidu.

Vzhľadom na to, že jedným z predpokladaných metabolitov SIH v organizme je isoniazid, ktorý je následne acetylovaný na acetylisoniazid, bolo nutné pri vývoji metódy vychádzať s dostupných informácií o HPLC analýze tohto liečiva a jeho metabolitu v biologickom materiáli.

Autori Moussa L. A., Khassouani C. E., Soulaymani R., Jana M., Cassanas G., Alric R. a Hue B vyvinuli metódu na stanovenie isoniazidu a acetylisoniazidu v ľudskej plazme. Vzorky plazmy boli deproteinizované kyselinou trichloroctovou, analyty boli následne separované na kolóne microBondapack C18 (Waters). Ako vnútorný štandard bol použitý nikotínamid. Mobilná fáza obsahovala 0,05 M octan amónny (pH 6) a acetonitril (99:1, v/v). Detekcia bola UV pri 275 nm⁵².

Kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu isoniazidu a acetylisoniazidu z plazmy a moči sa zaoberali Saxena S. J., Stewart J. T., Honigberg I. L., Washington J. G. a Keene G. R. Bola použitá kolóna C18 a ako mobilná fáza methanol:voda (60:40, v/v) pri pH 2,5; obsahujúca dioktylsulfosukcinát sodný. Prietoková rýchlosť bola 2,0 ml/min⁵³.

Štúdia autora von Sassen W. sledovala stanovenie isoniazidu a acetylisoniazidu v telových tekutinách. Bola použitá kolóna s reverznou fázou NUCLEOSIL 100-10 C18, 300 × 4,5 mm ID. Mobilná fáza obsahovala 10 mM fosfátový pufr (pH 5,5) - methanol - acetonitril - dichlormethan (73:17:9:1, v/v), prietoková rýchlosť 2 ml/min. Detekcia UV pri 220 nm⁵⁴.

Princíp derivatizácie hydrazidovej väzby aldehydom pre stanovenie isoniazidu, acetylisoniazidu a hydrazinu pomocou HPLC využili autori Seifart H. I., Gent W. L., Parkins D. P., van Jaarsveld P. P. a Donald P. R. K 200 µl deproteinizovanej plazmy pridali 40 µl 1% methanolickeho roztoku aldehydu kyseliny škoricovej. Použitá bola UV detekcia pri 340 nm⁵⁵.

Autor el-Sayed Y. M. a Islam S. I. sa zaoberali analýzou isoniazidu a jeho hlavného metabolického produktu N-acetylisoniazidu v moči využitím HPLC. Analyty boli extrahované pomocou zmesi chloroform : isopropanol (70 : 30, v/v) a následne eluované na kolóne C18. Mobilná fáza obsahovala octan sodný : methanol : acetonitril (40 : 40 : 20, v/v) a 10 mM dioctylsulfosukcinátu sodného, pH upravené na hodnotu 2,9 kyselinou sírovou. Prietoková rýchlosť bola 1 ml/min, detekcia UV pri 266 nm⁵⁶.

Ďalšie nájdené spôsoby analýzy neboli pri vývoji metódy použiteľné. Veľká časť štúdií sa zaoberala analýzou pomocou derivatizácie a následnou fluorimetrickou detekciou, čo je pomerne nevýhodne pre komplikovanosť prevedenia. Iné boli zasa určené iba na stanovenie analytov pomocou hmotnostnej spektrometrie, ktorej negatívom je ekonomické hľadisko.

3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo vypracovanie optimálnych chromatografických podmienok HPLC separácie SIH a jeho potenciálnych metabolitov (salicylaldehyd, isoniazid, acetylisoniazid) a následne využitia tejto separácie k štúdiu možnosti izolácie uvedených látok z králičej moči pomocou SPE ako úpravy vzorku.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použitý chromatografický materiál, prístroje, pomôcky a chemikálie

Chromatografický materiál

Chromatografická kolóna 250×4 mm I. D. s náplňou LiChrospher 100 RP-18 (5 µm), Merck, Nemecko.

Chromatografická kolóna 250×4,6 mm I. D. s náplňou Prodigy 5u ODS3 100A (5 µm), Phenomenex, USA.

Prístroje

Analytické váhy, Helago, Česká Republika, Slovenská Republika, Maďarsko.

Acidimeter 333, Druopta, Praha, Česká Republika.

Ultrazvuková kúpeľ K10, Kraintek Slovenská Republika.

Vákuové zariadenie, SUPELCO VISIPREP, Nemecko.

Chromatografická zostava HP 1100 series, pozostávajúca z pumpy, degassera, autosamplera, UV detektora, Agilent Technologies, Japonsko.

PC s chromatografickým programom Chemstation, Rev.A.08.03(847), Agilent Technologies, Japonsko.

Pomôcky

Laboratórne sklo.

Mikrostriekačka – 25 µl, Hamilton, Švajčiarsko.

Kolónky na SPE extrakciu, Discovery® DSC 18, 1ml TUBES, 100 mg, SUPELCO, Nemecko.

Mikropipeta.

Chemikálie

Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon hydrochlorid, syntetizovaný na katedre anorganickej a organickej chémie FaFUK, Hradec Králové – totožnosť overená NMR.

Isoniazid, Sigma-Aldrich Nemecko.

Acetylisoniazid, pripravený na katedre farmaceutickej chémie a kontroly liečiv FaFUK, Hradec Králové - totožnosť overená NMR.

Salicylaldehyd, Sigma-Aldrich Nemecko.

Pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (o-108), syntetizovaný na katedre anorganické a organickej chémie FaFUK, Hradec Králové – totožnosť overená NMR.

Disodná soľ kyseliny ethylendiamintetraoctovej p.a. (EDTA), Lachema Brno, Česká Republika.

Octan amónny, Lachema, Česká Republika.

Fosforečnan sodný, Penta, Česká Republika.

Hydroxid sodný, Lachema Brno, Česká Republika.

Methanol p.a., Penta, Česká Republika.

Nitril kyseliny octovej p.a., Balex, Česká Republika..

Čistená voda.

PBS, Sigma-Aldrich, Nemecko.

Biologický materiál – prázdna králičia moč, Lekárska fakulta, Hradec Králové, Česká Republika

4.2 Vývoj chromatografických podmienok pre stanovenie SIH pomocou HPLC s UV detekciou

Pre stanovenie SIH v prítomnosti jeho rozkladných produktov bolo v prvom rade potrebné nájsť vhodné chromatografické podmienky, ktoré zahrňujú optimálnu stacionárnu fázu, mobilnú fázu, prietokovú rýchlosť a vhodnú vlnovú dĺžku pri UV detekcii. Cieľom bolo dosiahnutie separácie všetkých analytov (SIH, isoniazid, acetylisoniazid, salicylaldehyd a vnútorný štandard o-108) na základnú líniu a detekcia symetrických píkov.

Pri kvantitatívnej analýze bola využitá metóda vnútorného štandardu za použitia pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108). Jedná sa o analóg PIH patriaci do série 100 (viď 2.5.3).

Výber stacionárnej a mobilnej fázy

Ako prvá stacionárna fáza bola použitá chromatografická kolóna s náplňou LiChrosper RP-18 (5 μ m), 250×4 mm (číslo 1). Potom bola použitá kolóna s náplňou Prodigy 5u ODS3 100A (5 μ m), 250×4,6 mm (číslo 2).

Na jednotlivých kolónach boli skúšané tieto chromatografické podmienky:

- na kolóne č.1 :
 1. methanol : vodný roztok EDTA (0,002 mol/l) 50:50 (v/v), prietok 0,9 ml/min, detekcia 288 nm
 2. methanol : vodný roztok EDTA (0,002 mol/l) 40:60 (v/v), prietok 0,9 ml/min, detekcia 288 nm
 3. methanol : vodný roztok EDTA (0,002 mol/l) 30:70 (v/v), prietok 0,9 ml/min, detekcia 288 nm
 4. methanol : vodný roztok EDTA (0,002 mol/l) 20:80 (v/v), prietok 0,9 ml/min, detekcia 288 nm
 5. methanol : vodný roztok EDTA (0,002 mol/l), prietok 0,9 ml/min, detekcia 288 nm, gradientová elúcia:
 0. min. 15:85, 5. min. 30:70, 10. min. 15:85 (v/v)
 0. min. 30:70, 5. min. 15:85, 10. min. 30:70 (v/v)
 0. min. 20:80, 5. min. 20:80, 10. min. 50:50 (v/v)
 0. min. 20:80, 5. min. 20:80, 10. min. 40:60 (v/v)
 0. min. 20:80, 5. min. 20:80, 8. min. 70:30 (v/v)
 0. min. 20:80, 5. min. 20:80, 25. min 80:20 (v/v)

6. methanol : fosfátový pufr (Na_2HPO_4 0,01 mol/l; pH 3,0 – upravené 10% H_3PO_4), prietok 0,9 ml/min, detekcia 288 nm, gradientová elúcia:
 0. min. 10:90, 50. min. 90:10 (v/v)
 0. min. 10:90, 25. min. 85:15, 50. min. 60:40 (v/v)
 0. min. 20:80, 5. min. 20:80, 7. min. 50:50 (v/v)
 7. methanol : fosfátový pufr (Na_2HPO_4 0,01 mol/l; pH 7,0 – upravené zriedeným NaOH), prietok 0,9 ml/min, detekcia 288 nm, gradientová elúcia:
 0. min. 20:80, 5. min. 20:80, 7. min. 50:50 (v/v)
 0. min. 20:80, 5. min. 20:80, 7. min. 60:40 (v/v)
 0. min. 20:80, 5. min. 20:80, 25. min. 60:40 (v/v)
 0. min. 15:85, 5. min. 15:85, 7. min. 55:45 (v/v)
 0. min. 15:85, 5. min. 15:85, 7. min. 50:50 (v/v)
 0. min. 15:85, 5. min. 15:85, 7. min. 48:52 (v/v)
 0. min. 15:85, 5. min. 15:85, 25. min. 60:40 (v/v)
 0. min. 15:85, 5. min. 15:85, 20. min. 70:30 (v/v)
 0. min. 15:85, 5. min. 15:85, 7. min. 50:50 (v/v)
 0. min. 15:85, 5. min. 15:85, 7. min. 52:48 (v/v)
 8. acetonitril : fosfátový pufr (Na_2HPO_4 0,01 mol/l; pH 7,0 – upravené zriedeným NaOH), prietok 0,9 ml/min, detekcia 288 nm, gradientová elúcia:
 0. min. 13:87, 5. min. 13:87, 7. min. 50:50 (v/v)
 0. min. 11:89, 5. min. 11:89, 10. min. 45:55 (v/v)
- na kolóne č. 2:
 1. methanol : fosfátový pufr (Na_2HPO_4 0,01 mol/l; pH 7,0 – upravené zriedeným NaOH), prietok 0,9 ml/min, detekcia 288 nm, gradientová elúcia:
 0. min. 15:85, 5. min. 15:85, 7. min. 52:48 (v/v)
 0. min, 15:85, 10. min. 52:48 (v/v)
 0. min, 10:90, 7. min. 10:90, 10. min. 52:48 (v/v)
 0. min. 5:95, 7. min. 5:95, 10. min. 52:48 (v/v)
 2. methanol : fosfátový pufr (Na_2HPO_4 0,01 mol/l; pH 7,0 – upravené zriedeným NaOH + EDTA 0.001 mol/l), prietok 1 ml/min, detekcia 288 nm, gradientová elúcia:
 0. min. 5:95, 7. min. 5:95, 10. min. 52:48 (v/v)

3. methanol : fosfátový pufr (Na_2HPO_4 0,01 mol/l; pH 7,0 – upravené zriedeným NaOH + EDTA 0.001 mol/l), prietok 0,9 ml/min, detekcia: 0 – 20 min.: 260 nm, 20 – 30 min.: 288 nm, gradientová elúcia:

0. min. 5:95, 7. min. 5:95, 10. min. 52:48 (v/v)

4. methanol : acetátový pufr ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,05 mol/l; pH 7,0 – upravené zriedeným NaOH), prietok 0,9 ml/min, detekcia: 0 – 10 min.: 260 nm, 10 – 30 min.: 288 nm, gradientová elúcia:

0. min. 15:85, 5. min. 15:85, 7. min. 52:48 (v/v)

0. min. 10:90, 7. min. 10:90, 10. min. 52:48 (v/v)

0. min. 8:92, 9. min. 8:92, 12. min. 52:48 (v/v)

0. min. 6:94, 11. min. 6:94, 14. min. 52:48 (v/v)

0. min. 7:93, 9. min. 7:93, 12. min. 52:48 (v/v)

0. min. 7:93, 9. min. 7:93, 12. min. 55:45 (v/v)

0. min. 7:93, 9. min. 7:93, 11. min. 54:46 (v/v)

0. min. 6:94, 9. min. 6:94, 12. min. 52:48 (v/v)

0. min. 6:94, 9. min. 6:94, 12. min. 56:44 (v/v)

0. min. 6:94, 9. min. 6:94, 12. min. 58:42 (v/v)

0. min. 5:95, 10. min. 5:95, 13. min. 56:44 (v/v)

0. min. 5:95, 10. min. 5:95, 12. min. 58:42 (v/v)

0. min. 5:95, 10. min. 5:95, 13. min. 52:48 (v/v)

Mobilná fáza methanol : acetátový pufr ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,05 mol/l; pH 7,0 – upravené zriedeným NaOH) v pomere 7 : 93 (v/v), prietok 0,9 ml/min, bola najvhodnejšia pre separáciu isoniazidu a acetylisoniazidu. Ďalší vývoj metódy spočíval v optimalizácii podmienok pre vhodnú separáciu SIH, salicylaldehydu a o-108, pričom pomer mobilnej fázy methanol : acetátový pufr 7:93 (v/v) od 0. do 8. minúty sa nemenil. Najprv bolo potrebné nájsť vhodné zloženie mobilnej fázy. Boli vyskúšané mobilné fázy s podielom methanolu od 52 do 58 %. Ďalej bolo potrebné určiť časové rozmedzie nástupu gradientu. Pri rýchlym nástupe (8. až 10. min.) dochádzalo k výraznému porušeniu základnej línie. Pomalší nástup (8. až 15. min.) bol nevýhodný tým, že sa predĺžili elučné časy analytov a taktiež dochádzalo k chvostovaniu pík. Najvhodnejšia gradientová elúcia bola: 0.min. 7:93, 8. min. 7:93, 13. min. 58:42, 30. min. 58:42, 31. min. 7:93, 50. min. 7:93 (v/v).

Pri vývoji metódy bola využitá gradientová elúcia, čiže sa menilo zloženie mobilnej fázy počas analýzy, a tým sa porušovala základná línia. Po každej gradientovej elúcii bolo potrebné kolónu ekvilibrovať na počiatočné podmienky, a preto sa 20 minút premývala

mobilnou fázou, ktorej zloženie bolo rovnaké, aké sa použilo na začiatku nasledujúcej separácie.

Príprava mobilnej fázy

Analýza bola dosiahnutá použitím mobilnej fázy o zložení methanol : acetátový pufr ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,05 mol/l; pH 7,0 – upravené NaOH zriedeným RS) a bol využitý nasledujúci gradient:

0.min. 7:93, 8. min. 7:93, 13. min. 58:42, 30. min. 58:42, 31. min. 7:93, 50. min. 7:93 (v/v).

Najprv bol pripravený vodný roztok $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (0,05 mol/l), ktorého pH bolo následne upravené pomalým prikvapkávaním NaOH zriedeného RS na hodnotu 7,00. Roztok bol prefiltrovaný a pripravený pre použitie. Obe zložky mobilnej fázy boli zmiešané automaticky podľa podmienok definovaných operátorom.

Príprava roztokov

Pri vývoji chromatografických podmienok boli využívané zásobné roztoky jednotlivých analytov o koncentrácii 1 mg/ml. Soľ SIH ($\text{SIH}\cdot\text{HCl}$), salicylaldehyd a o-108 boli rozpustené v methanole, isoniazid a acetylisoniazid vo vode. Jednotlivé látky boli navážené každá zvlášť do odmernej banky a doplnené príslušným rozpúšťadlom.

Pri vývoji SPE extrakcie boli používané pracovné roztoky analytov o koncentrácii 0,2 mg/ml. Boli pripravené nariadením príslušných zásobných roztokov methanolom (v prípade $\text{SIH}\cdot\text{HCl}$, salicylaldehydu a o-108) alebo PBS pufrom (v prípade isoniazidu a acetylisoniazidu).

4.3 Vývoj metódy izolácie analytov z moči pomocou SPE

Pri vývoji podmienok vhodných pre extrakciu SIH i jeho potenciálnych metabolitov z moči boli použité extrakčné kolónky s reverznými fázami C-18 od firmy Supelco. Cieľom bolo upraviť podmienky extrakcie tak, aby bola dosiahnutá dobrá výťažnosť všetkých analytov. Boli testované rôzne spôsoby premytia kolónky i elúcie analytov.

Do moči kráľika o objeme 0,5 ml bol pridaný pracovný roztok v objeme 20 μ l. Extrakčné kolónky boli pripevnené na vakuové zariadenie (tzv. vacuum manifold). Kolónka bola aktivovaná metanolom o objeme 1 ml a premytá PBS pufrom (0,5 – 1 ml). Na kolónku bola následne aplikovaná vlastná vzorka. Nečistoty boli vymyté PBS pufrom (0,5 ml – 1,5 ml). Nakoniec bola kolónka premytá metanolom (prípadne acetonitrilom) o objeme 0,5 – 1,5 ml a eluát bol zachytávaný. Boli vyskúšané nástreky od 20 do 50 μ l.

Najlepšia extrakčná výťažnosť analytov bola dosiahnutá pri nasledujúcich podmienkach:

- aktivácia kolónky 1 ml metanolu
- premytie kolónky PBS pufrom o objeme 1 ml
- aplikácia 0,5 ml samotného moču kráľika
- vymývanie balastov PBS pufrom o objeme 0,5 ml
- vymývanie analytov z kolónky metanolom o objeme 1ml

Pri analýze vzoriek bol taktiež hľadaný vhodný pomer organickej a vodnej zložky, aby aj pri nástreku väčšieho objemu vzorku (cca 50 μ l) bola dosiahnutá separácia a tiež dobrý tvar píkov. Najlepšie výsledky sa dosahovali vtedy, ak bol vo finálnom roztoku nastrekovanom na kolónu pomer organickej a vodnej fázy 1:2,33. K organickému extraktu bola preto pridaná vodná zložka mobilnej fázy. Takto upravená vzorka bola nastrieknutá na kolónu v objeme 50 μ l.

5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Vývoj chromatografických podmienok pre HPLC analýzu SIH

Stacionárna fáza

Pri vývoji chromatografických podmienok separácie SIH a jeho potenciálnych metabolitov bolo možné vychádzať z chromatografickej metódy použitej pri stanovení plazmatických koncentrácií SIH. Na základe tejto práce bola prvou kolóna s náplňou LiChrospher, avšak za použitia tejto stacionárnej fázy nebola dosiahnutá dostatočná separácia isoniazidu a acetylisoniazidu.

Následne bola použitá kolóna s náplňou Prodigy, na ktorej sa zlepšila separácia isoniazidu a jeho metabolitov a tiež píky SIH boli ostrejšie. Ako najvhodnejšia stacionárna fáza pre ďalší vývoj metódy bola vybraná kolóna s náplňou Prodigy 5u ODS3 100A (5 µm), 250×4,6 mm.

Mobilná fáza

Výber vhodnej mobilnej fázy bol zdĺhavý a veľmi náročný. Vzhľadom na to, že vo vzorke bolo prítomných päť analytov (SIH, salicylaldehyd, isoniazid, acetylisoniazid, o-108), bolo ťažké nájsť optimálne zloženie mobilnej fázy. Ohľad musel byť kladený aj na to, že metóda bola vyvíjaná za účelom stanovenia SIH a jeho metabolitov z moču, takže žiadny pík z matrice nesmel interferovať zo skúmanými analytmi.

Najprv boli vyskúšané zmesi methanolu a vodného roztoku EDTA, ktorý zabraňoval tvorbe komplexov chelátoru s voľnými iónmi. Preto bolo možné predpokladať, že bude mať pozitívny vplyv na tvar jeho píkov. Pri isokratických podmienkach nedochádzalo k separácii isoniazidu a acetylisoniazidu, navyše sa SIH silne zadržiaval na kolóne a jeho píky chvostovali. Preto bola odskúšaná gradientová elúcia, vďaka ktorej sa výrazne skrátil retenčný čas SIH a píky boli ostrejšie. Pomerne značným problémom sa ukázala separácia isoniazidu a acetylisoniazidu, a tak bolo najviac pozornosti venované rozdeleniu týchto dvoch látok. Boli vyskúšané rôzne zloženia mobilnej fázy jak organickej zložky (methanol, acetonitril), tak vodného podielu (prídavok EDTA, fosfátový pufr, acetátový pufr) a pH.

Po rozdelení isoniazidu a acetylisoniazidu sa pozornosť sústredila na separáciu ostatných analytov (SIH, salicylaldehydu a o-108). Bolo potrebné nájsť vhodný gradientový profil, aby sa dosiahli prijateľné retenčné časy a nedochádzalo k porušovaniu základnej línie a k nežiaducemu šumu. Nakoniec bola metóda vyskúšaná na extrakte čistého moču. Cieľom bolo vyhnúť sa interakcii píkov analytu s balastmi v moči, aby bola metóda vhodná jak na

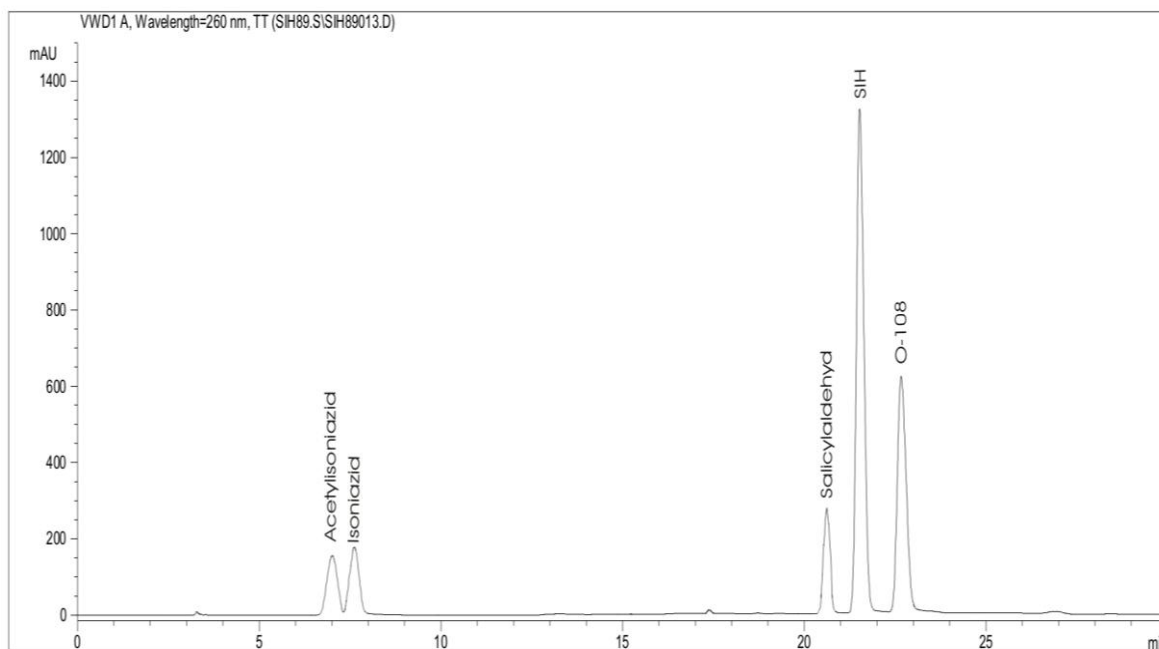
kvalitatívne, tak na kvantitatívne stanovenie. Preto bol gradient upravený a k interakcii dochádzalo minimálne.

Ako najvhodnejšia mobilná fáza bola vybraná zmes methanol : acetátový pufr ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,05 mol/l; pH 7,0 – upravené zriedeným NaOH). Vyhovujúci gradient bol: 0. min. 7:93, 8. min. 7:93, 13. min. 58:42, 30. min. 58:42, 31. min. 7:93, 50. min. 7:93 (v/v). Pri jej použití dochádzalo k dostatočnému rozdeleniu všetkých pík (SIH, jeho potenciálnych metabolitov i vnútorného štandardu) (Obr. 2).

Prietoková rýchlosť bola stanovená na 0,9 ml/min. Vyššia rýchlosť prietoku neposkytovala adekvátne rozdelenie pík isoniazidu a acetylisoniazidu.

Detekcia

Detekcia bola na začiatku vývoja metódy prevádzaná v oblasti absorpcie SIH (288 nm). Vzhľadom na to, že isoniazid a acetylisoniazid absorbujú pri kratších vlnových dĺžkach (260 nm), bolo výhodné pre dosiahnutie dostatočnej citlivosti využiť možnosť prepnutia vlnovej dĺžky. Ako najvhodnejšia sa ukázala detekcia pri 260 nm od 0. do 10 min. a 288 nm od 10. min.



Retenčný čas: acetylisoniazid – 6,99 min.

isoniazid - 7,62 min.

salicylaldehyd – 20,56 min.

SIH – 21,52 min.

o-108 – 22,67 min.

Obr. 2: Chromatografický záznam separácie SIH, jeho potenciálnych metabolitov (isoniazid, acetylisoniazid, salicylaldehyd) a vnútorného štandardu (o-108).

5.2 Výsledky SPE

Výt'aznosť SPE bola testovaná na prázdnej moči kráľika. K 0,5 ml čistej moči bolo pridané 20 µl pracovného roztoku analytu o koncentrácii 0,2 mg/ml, čiže 8 µg skúmaného analytu. Moč bol extrahovaný, upravený prídavkom acetátového pufru a analyzovaný pomocou HPLC. Štandardné roztoky použité pre výpočet výt'aznosti boli pripravené prídavkom 20 µl pracovného roztoku analytu do 1 ml methanolu a upravené prídavkom acetátového pufru. Nástrek na kolónu bol v objeme 50 µl (obr. 3, 4).

Namerané výsledky:

1. SIH

Analyt	t _R (min)	Plocha pod píkom	Výt'aznosť (%)	Priemer výt'aznosť (%)
SIH v moči	21,602	214,38	77,19	73,51
SIH v moči	21,695	194,47	70,02	
SIH v moči	21,669	203,62	73,32	
SIH štandard	21,930	277,72	————	————

2. isoniazid

Analyt	t _R (min)	Plocha pod píkom	Výt'aznosť (%)	Priemer výt'aznosť (%)
isoniazid v moči	7,882	121,64	52,07	55,06
isoniazid v moči	7,874	135,47	57,98	
isoniazid v moči	7,883	128,83	55,14	
isoniazid štandard	7,886	233,63	————	————

3. acetylisoniazid

Analyt	t _R (min)	Plocha pod píkom	Výt'aznosť (%)	Priemer výt'aznosť (%)
acetylisoniazid v moči	7,078	98,31	63,01	55,38
acetylisoniazid v moči	7,082	86,43	55,40	
acetylisoniazid v moči	7,054	74,47	47,73	
acetylisoniazid štandard	7,124	156,02	————	————

4. salicylaldehyd

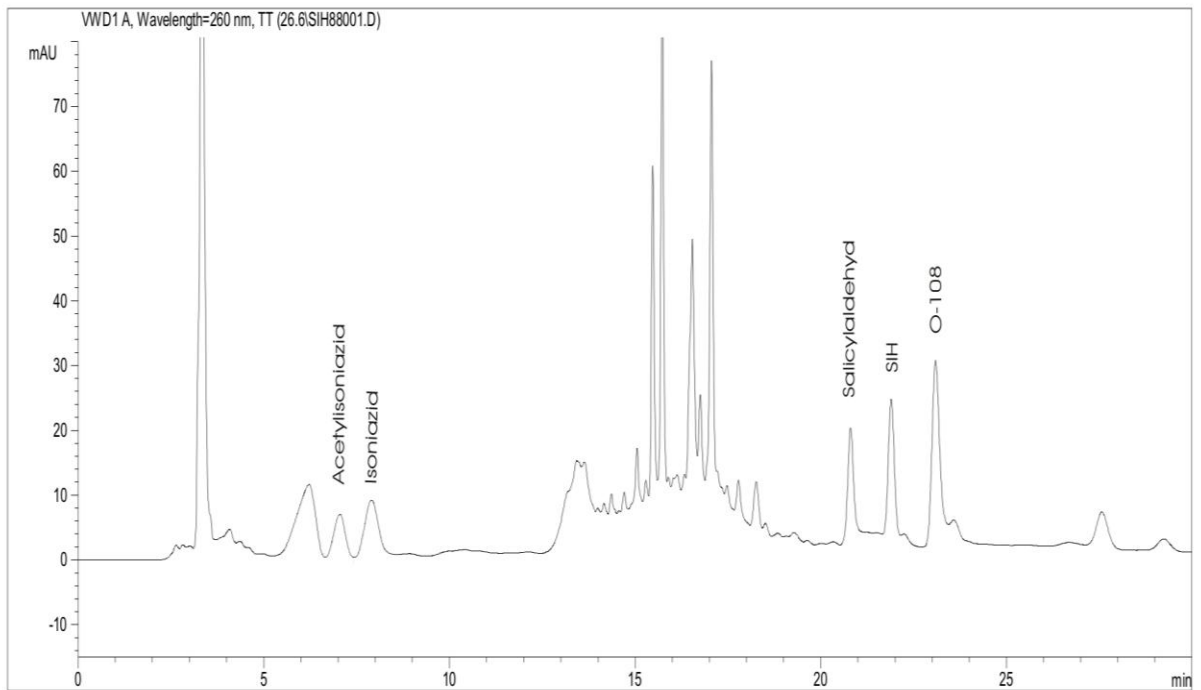
Analyt	t _R (min)	Plocha pod píkom	Výt'aznosť (%)	Priemer výt'aznosť (%)
salicylaldehyd v moči	20,773	49,78	96,29	97,03
salicylaldehyd v moči	20,775	50,89	98,43	
salicylaldehyd v moči	20,779	48,79	94,37	
salicylaldehyd štandard	20,762	51,70	—————	—————

5. o-108

Analyt	t _R (min)	Plocha pod píkom	Výt'aznosť (%)	Priemer výt'aznosť (%)
o-108 v moči	23,105	299,00	86,87	88,31
o-108 v moči	22,958	306,18	88,95	
o-108 v moči	22,953	306,69	89,10	
o-108 štandard	23,254	344,20	—————	—————

Počas vývoja SPE boli za účelom zvýšenia výt'aznosti vyskúšané rôzne postupy extrakcie. Dôraz bol zameraný na určenie optimálneho objemu PBS pufru potrebného na odstránenie balastov z moči naviazaných na kolónke a typu, resp. množstva rozpúšťadla potrebného na elúciu analytu. Objem PBS pufru 1 ml a viac sa neosvedčil, pretože došlo k zvýšenému vymývaniu naviazaného isoniazidu a acetylisoniazidu a následne k poklesu výt'aznosti. Pri elúcii analytov z kolónky sa vzhľadom na vyššie výt'aznosti viac osvedčil methanol než acetonitril. Malý objem methanolu (0,5 ml) nebol dostatočný na kvantitatívne vyviazanie analytov z kolónky, pri veľkom (1,5 ml) zasa vznikol objemný extrakt a navyše sa nepreukázalo zvýšenie extrakcie.

Výt'aznosť SIH získaná pomocou SPE extrakcie z prázdnej králičej moči bola 73,51%. Isoniazid a acetylisoniazid dosahovali nižšie výt'aznosti (55,06% resp. 55,38%) vzhľadom na to, že sa jedná o hydrofilnejšie látky, takže mali slabú retenciu na kolónke počas vymývania balastov z moči pomocou PBS pufru. Na druhej strane, lipofilnejšie látky (salicylaldehyd a o-108) sa zadržovali silnejšie, a preto bola ich výt'aznosť vyššia (97,03% resp. 88,31%).



Retenčný čas: acetylisoniazid – 6,17 min.

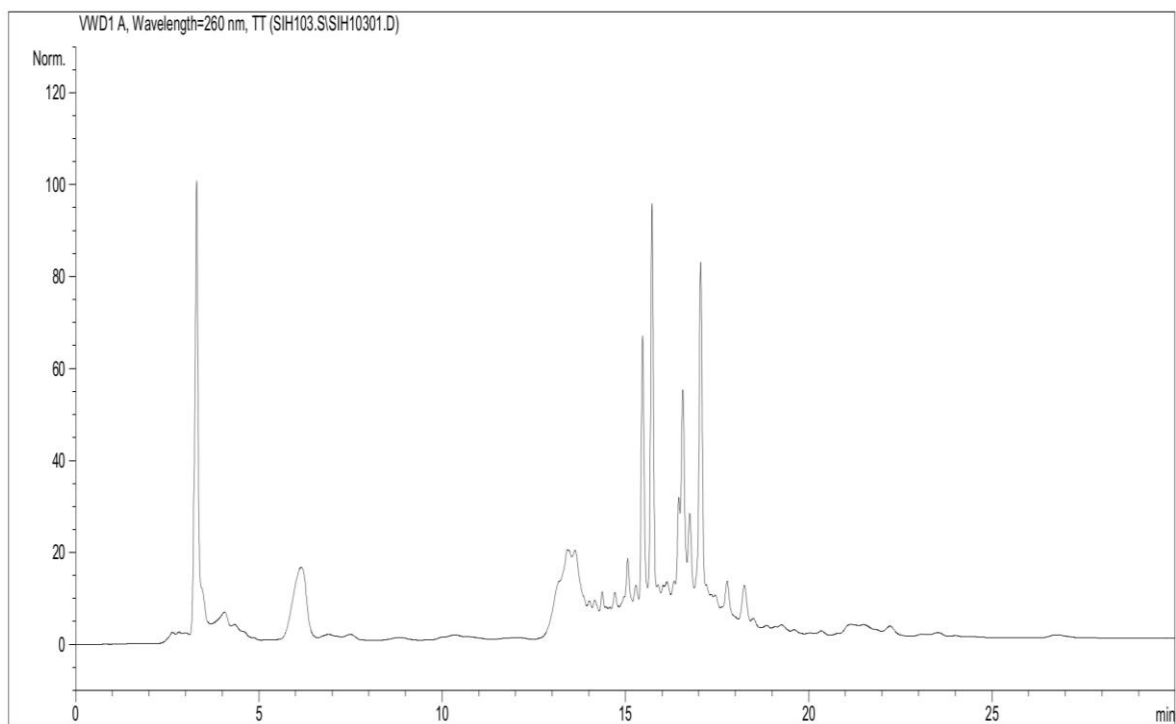
isoniazid – 7,93 min.

salicylaldehyd – 20, 83 min.

SIH – 21,91 min.

o-108 – 23,11 min.

Obrázok č. 3. Chromatografický záznam analýzy moči kráľika obsahujúceho SIH, isoniazid, acetylisoniazid, salicylaldehyd a o-108.



Obrázok č. 4.: Chromatografický záznam analýzy čistej moči kráľika.

6. ZÁVER

V diplomovej práci boli vypracované chromatografické podmienky pre stanovenie SIH a jeho potenciálnych metabolitov (isoniazid, salicylaldehyd a acetylisoniazid) v moči králika.

Meranie bolo prevádzané na kolóne od firmy Phenomenex o rozmeroch 250×4,6 mm I. D. s náplňou Prodigy 5u ODS3 100A (5 µm). Bola použitá mobilná fáza v zložení methanol : acetátový pufr (CH₃COONH₄ 0,05 mol/l; pH 7,0 – upravené hydroxidom sodným zriedeným RS), za využitia gradientu: 0. min. 7:93, 8. min. 7:93, 13. min. 58:42, 30. min. 58:42, 31. min. 7:93, 50. min. 7:93 (v/v). Prietoková rýchlosť bola 0,9 ml/min. Použitá bola UV detekcia, a to 260 nm od 0. do 10. min. a 288 nm od 10. min.

Ako metóda úpravy vzorku pred HPLC analýzou bol vypracovaný postup SPE extrakcie. Extrakčná kolónka bola aktivovaná 1 ml methanolu, premytá 1ml PBS pufrom a bola aplikovaná vzorka moči v objeme 0,5 ml. Nečistoty z matrice boli vymyté 0,5 ml PBS pufru. Analyty boli vymývané 1 ml methanolu. Organický podiel bol pred nástrekom zriedený vodnou zložkou mobilnej fázy v pomere 1 : 2,33.

Pri analýze v moči králika bola získaná výťažnosť SIH 73,51%; isoniazid 55,06%; acetylisoniazid 55,38%; salicylaldehyd 97,03% a o-108 (vnútorný štandard) 88,31%.

Vyvinutá metóda extrakcie poskytovala akceptovateľné výsledky všetkých analytov (SIH, isoniazid, acetylisoniazid, salicylaldehyd, o-108). Uvedená metodika by mohla byť v budúcnosti po adekvátnej validácii použitá pre štúdium metabolizmu SIH.

7. ABSTRAKT

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) je v oblasti liečiv jednou z najčastejšie používanou analytickou technikou.

Železo je dôležitým biogénnym prvkom, no napriek tomu jeho zvýšené množstvo v organizme pôsobí toxicky. Výskum vysoko selektívnych a účinných biokompatibilných chelátorov železa bol pôvodne inšpirovaný potrebou mobilizovať železo v tkanivách s chronickým preťažením železa. Avšak v posledných rokoch je pozornosť venovaná využitiu chelátorov železa tiež pri liečbe bežných onemocnení.

Salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazon (SIH), biokompatibilný chelátor železa odvodený od aroylhydrazonu, je v dnešnej dobe predmetom aktívneho výskumu ako potenciálne liečivo. Okrem schopnosti viazať železo, vykazuje aj ďalšie zaujímavé farmakologické účinky: antioxidačný, antiproliferatívny, kardioprotektívny, antimalarický a antimikróbny.

Táto práca sa zaoberá vypracovaním optimálnych chromatografických podmienok HPLC separácie SIH a jeho potenciálnych metabolitov (isoniazid, acetylisoniazid, salicylaldehyd) a následne využitiu tejto separácie k štúdiu možnosti izolácie uvedených látok z moči kráľika pomocou SPE ako úpravy vzorku.

Najlepšia chromatografická analýza bola dosiahnutá použitím kolóny od firmy Phenomenex (250×4,6 mm I. D.) s náplňou Prodigy 5u ODS3 100A (5 μm). Mobilná fáza bola v zložení methanol : acetátový pufr ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,05 mol/l; pH 7,0 – upravené hydroxidom sodným zriedeným RS), za využitiu gradientu: 0. min. 7:93, 8. min. 7:93, 13. min. 58:42, 30. min. 58:42, 31. min. 7:93, 50. min. 7:93 (v/v). Prietoková rýchlosť bola 0,9 ml/min, detekcia pri 260 nm od 0. do 10. min. a 288 nm od 10. min.

Pri SPE extrakcii boli dosiahnuté nasledujúce výťažnosti: SIH 73,51%; isoniazid 55,06%; acetylisoniazid 55,38%; salicylaldehyd 97,03% a o-108 (vnútorný štandard) 88,31%.

8. ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most frequently used analytical techniques for the analysis of drugs.

Although iron is a vital element, excessive amounts in the body are highly toxic. The search for highly selective and effective iron chelating agents has been mainly inspired by the need to mobilize iron from tissues that are chronically overloaded with iron. However, recent investigations focused on the possibility to use iron chelators for the treatment of many other pathologies.

Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH), a biocompatible iron chelator derived from aroylhydrazone, is under extensive investigation as a promising drug candidate. Besides ability to bind iron, it shows interesting pharmacological effects: antioxidative, antiproliferative, cardioprotective, antimalarical and antimicrobial.

The aim of this study was to develop optimal HPLC conditions for the separation of SIH and its potential metabolites (isoniazide, acetylisoniazide, salicylaldehyde) and to apply the method to the study focused on the isolation of analytes from rabbit urine using SPE.

The best chromatographic analysis was achieved on a HPLC column (Phenomenex 250×4.6 mm I. D.) packed with Prodigy 5u ODS3 100A (5 µm) as a stationary phase. The mobile phase was composed of methanol : acetate buffer (CH₃COONH₄ 0.05 mol/L; pH 7.0 – adjusted with sodium hydroxide diluted RS). The following gradient was used: 0. min. 7:93, 8. min. 7:93, 13. min. 58:42, 30. min. 58:42, 31. min. 7:93, 50. min. 7:93 (v/v). A flow rate was 0.9 ml/min. and the UV detector was set at 260 nm from 0. to 10. min. and at 288 nm from 10. min.

Employing SPE extraction, following recoveries of the analytes were achieved: SIH 73.51%; isoniazid 55.06%; acetylisoniazid 55.38%; salicylaldehyde 97.03% and o-108 (internal standard) 88.31%.

9. LITERATÚRA

¹ Český lékopis (ČL 2005), Grada, Praha 2005.

² Karlíček R. a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 2001.

³ Motl O., Novotný L., Adsorpční a rozdělovací kolonová chromatografie, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.

⁴ Mikeš O., Základní typy chromatografie, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.

⁵ Mikeš O., Štamberg J., Hejtmánek M., Šebesta K., Ionově výměnná chromatografie, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.

⁶ Klimeš J. a kol., Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002.

⁷ Tomášek V., Gelová chromatografie, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.

⁸ Turková J., Afinitní chromatografie, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.

⁹ Churáček J., Jandera P., Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha 1993.

¹⁰ Slovenský liekopis, Vydanie prvé, Herba, Bratislava 1997.

¹¹ Ahuja S., Scypinski S., Handbook of modern pharmaceutical analysis, Academic press, London, 2001.

¹² Poole C. F., Poole S. K., Chromatography Today, Elsevier Science, Amsterdam 1991.

-
- ¹³ Szepesi G., How to use HPLC, VCH Publisher, New York 1992.
- ¹⁴ Hyötyläinen T., Riekkola M. L., J. Chromatogr. B. 817, 13-25 (2005).
- ¹⁵ Guttman A., Varogula M., Khandurina J., Drug. Discov. Today 9, 136-144 (2004).
- ¹⁶ Brown P. R., Anal. Chem. 62, 995-1008 (1990).
- ¹⁷ Meloun B., Automatizace a mechanizace kolonových operací v kolonovej chromatografii, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.
- ¹⁸ Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Fundamentals of analytical chemistry – Seventh Edition, Orlando, Florida, USA 1997.
- ¹⁹ Snyder L. R., Stadalius M. A., Quarry M. A., Anal. Chem. 55, 1412-30 (1983).
- ²⁰ <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>, 20.2.2007.
- ²¹ Jandera P., Pokroky v instrumentaci kapalinové chromatografie, in.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha 1993.
- ²² Jandera P., Pokroky v instrumentaci kapalinové chromatografie, in.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha 1993.
- ²³ Klimeš J. a kol., Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2004.
- ²⁴ Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L., Practical HPLC method development 2nd edition, John Wiley & Sons, Inc., New York 1997.
- ²⁵ Babjuk J., Perlík F., Šidlo Z., Bioanalytika léků, Avicenum, Praha 1990.

-
- ²⁶ Klíma J., Grajnetterová J., Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii, Avicenum, Praha 1987.
- ²⁷ Kataoka H., *Trac-Trends Anal. Chem.* 22, 232-244 (2003).
- ²⁸ Klimeš J., Sochor J., Križ J., *Farmaco.* 57, 117-122 (2002).
- ²⁹ Pederson-Bjergaad S., Rasmussen K. E., *Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 817, 3-12 (2005).
- ³⁰ Klíma J., Grafnetterová J., in: Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii, Avicenum, Praha 1987.
- ³¹ Thurman E. M., Mills M. S., *Solid-Phase Extraction: Principles and Practise*, John Wiley & Sons, Inc., New York 1998.
- ³² Trojan S. a kol., *Lékařská fyziologie*, GRADA Publishing, Praha, 1997.
- ³³ Chen S. X., Schopfer P., *Eur. J. Biochem.* 260, 726-35 (1999).
- ³⁴ Tam T. F., Leung-Toung R., Li W., Wang Y., Karimian K., Spinio M., *Current Med. Chem.* 10, 983-995 (2003).
- ³⁵ Buss J. L., Torti F. M., Torti S. V., *Current Med. Chem.* 10, 1021-1034 (2003).
- ³⁶ Cappellini M. D., *Best Pract. & Res. Clin. Haematol.*, 18, 289 – 298 (2005).
- ³⁷ Faller B., Spanka C., Sergejev T., Tschinke V., *J. Med. Chem.* 43, 1467 -1475 (2000).
- ³⁸ Kalinowski D. S., Des Richardson R., *Pharmacol. Rew.* 57, 547-583 (1995).
- ³⁹ Des Richardson R., Wis Vitolo L. M., Hefter G. T., May P. M., Clarke B. W., Webb J., *Inorg. Chim. Acta* 170, 165 – 170 (1990).

-
- ⁴⁰ Ponka P., Des Richardson R., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *72*, 659 – 666 (1994).
- ⁴¹ Buss J. L., Arduini E., Ponka P., *Biochem. Pharmacol.* *64*, 1689 - 1701 (2002).
- ⁴² Buss J. L., Arduini E., Shepard K. C., Ponka P., *Biochem. Pharmacol.* *65*, 349-360 (2003).
- ⁴³ Zanninelli G., Glickstein H., Breur W., Miligram P., Brissot P., Hider R. C., Konijin A. M., Liman J., Shanzer A., Cabantchik Z. I., *Mol. Pharmacol.* *51*, 842-852 (1997).
- ⁴⁴ Horackova M., Ponka P., Byczko Z., *Cardiovasc. Res.* *47*, 529-536 (2000).
- ⁴⁵ Simunek T., Boer C., Bouwman R. A., Vlasblom R., Versteilen A. M., Sterba M., Berel V., Hrdina R., Ponka P., de Lange J. J., Paulu W. J., Musters R. J., *J. Mol. Cell. Cardiol.* *39*, 345-354 (2005).
- ⁴⁶ Buss J. L., Neuzil J., Gellert N., Weber C., Ponka P., *Biochem. Pharmacol.* *65*, 161-171 (2003).
- ⁴⁷ Walcourt A., Litevsky M., Lovenou D. B., Gordeuk V. R., Des Richardson R., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* *36*, 401-407 (2004).
- ⁴⁸ Klimtova I., Simunek T., Mazurova Y., Kaplanova J., Sterba M., Hrdina R., Gersl V., Adamcova M., Ponka P., *Acta Medica* *46*, 163-70 (2003).
- ⁴⁹ Kovaříková P., Klimeš J., Štěrba M., Popelová O., Mokřý M., Berel V., Ponka P., *J. Sep. Sci.* *28*, 1300-1306 (2005).
- ⁵⁰ Buss J. L., Ponka P., *Biochim. et Biophys. Acta* *1619*, 177-186 (2003).
- ⁵¹ Kovaříková P., Mokřý M., Klimeš J., Vávrová K., *J. Sep. Sci.* *27*, 1503-1510 (2004).
- ⁵² Moussa L. A., Khassouani C. E., Soulaymani R., Jana M., Cassanas G., Alric R., Hue B., *J. Chromatogr. B. Analyt. Techno. Biomed. Life. Sci.* *766*, 181-7 (2002).

⁵³ Saxena S. J., Stewart J. T., Honigberg I. L., Washington J. G., Keene G. R., *J. Pharm. Sci.* *66*, 813-16 (1977).

⁵⁴ von Sassen W., *J. Chromatogr.* *338*, 113-122 (1985).

⁵⁵ Seifart H. I., Gent W. L., Parkin D. P., van Jaarsveld P. P., Donald P. R., *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* *674*, 269-75 (1995).

⁵⁶ el-Sayed Y. M., Islam S. I., *J. Clin. Pharm. Ther.* *14*, 197-205 (1989).