

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE
A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Analytické hodnocení derivátů salicylaldehyd isonikotinoyl
hydrazonu

Hradec Králové 2020

Mgr. Michal Schöngut

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně (pod vedením doc. PharmDr. Petry Štěrbové-Kovaříkové, Ph.D.). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, dne 29. 10. 2020

.....

Mgr. Michal Schöngut

Na tomto místě srdečně děkuji doc. PharmDr. Petře Štěrbové-Kovaříkové, Ph.D., vedoucí mé rigorózní práce, za trpělivost a rady během vypracovávání práce. Dále děkuji kamarádce PharmDr. Jitce Široké, Ph.D., za pomoc a zapůjčení poučných materiálů. A v neposlední řadě děkuji celému kolektivu Farmaceutické analýzy (Kontroly léčiv) za přátelské a podporující prostředí.

Rigorózní práce byla vypracována za podpory grantu GAUK 124307/2007/C/FaF.

Obsah

1. ÚVOD.....	5
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1. ÚVOD DO CHROMATOGRAFICKÝCH METOD.....	8
2.1.1. SEPARAČNÍ METODY.....	8
2.1.2. CHROMATOGRAFICKÉ METODY.....	8
2.1.3. ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD.....	9
2.2. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	10
2.2.1. HPLC – ÚVOD.....	10
2.2.2. CHROMATOGRAFICKÝ SYSTÉM.....	12
2.2.3. CHROMATOGRAM – KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ ANALÝZA...23	
2.3. ÚPRAVA BIOLOGICKÉHO VZORKU PŘED HPLC ANALÝZOU.....	27
2.3.1. SEPARACE BÍLKOVIN DEPROTEINACÍ.....	27
2.3.2. EXTRAKCE Z KAPALINY DO KAPALINY.....	29
2.3.3. EXTRAKCE NA TUHOU FÁZI.....	30
2.4. VALIDACE METODY.....	32
2.4.1. PŘESNOST METODY (ACCURACY).....	32
2.4.2. PRECIZNOST METODY (PRECISION).....	33
2.4.3. LINEARITA A ROZSAH METODY.....	34
2.4.4. MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI.....	35
2.4.5. SELEKTIVITA METODY.....	35
2.4.6. ROBUSTNOST METODY.....	36
2.5. CHELÁTORY ŽELEZA.....	37
2.5.1. ŽELEZO V LIDSKÉM ORGANISMU.....	37
2.5.2. PŘETÍŽENÍ ORGANISMU ŽELEZEM.....	37
2.5.3. LÉČBA ANTRACYKLINY A PŘETÍŽENÍ ŽELEZEM.....	38
2.5.4. CHELÁTORY ŽELEZA.....	38
2.5.5. PIH - PYRIDOXAL ISONIKOTINOYL HYDRAZON.....	39
2.5.6. SIH – SALICYLALDEHYD ISONIKOTINOYL HYDRAZON.....	41
2.5.7. NOVÉ ANALOGY ODVOZENÉ OD SIH.....	42
3. CÍL PRÁCE.....	44
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	46

4.1. Použité chromatografické chemikálie, materiály, přístroje a pomůcky.....	47
4.1.1 Chemikálie.....	47
4.1.2 Přístroje a pomůcky.....	48
4.2. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty CAF-INH.....	49
4.3. Extrakce CAF-INH z plazmy pomocí precipitační deproteinace.....	51
4.4. Validace metody hodnocení CAF-INH v plazmě: parametry linearita, preciznost, přesnost, selektivita.....	52
4.5. Studie stability CAF-INH v plazmě.....	53
4.6. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty HMAF-INH.....	54
4.7. Extrakce HMAF-INH z plazmy pomocí precipitační deproteinace.....	56
4.8. Validace metody hodnocení HMAF-INH v plazmě: parametry linearita, preciznost, přesnost, selektivita.....	57
4.9. Studie stability HMAF-INH v plazmě.....	58
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	59
5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty CAF-INH.....	60
5.2. Analýza CAF-INH v plazmě.....	62
5.2.1. Extrakce CAF-INH z plazmy.....	62
5.2.2. Analýza CAF-INH v plazmě, validace metody: parametr linearita.....	63
5.2.3. Analýza CAF-INH v plazmě, validace metody: parametry preciznost a přesnost	64
5.2.4. Analýza CAF-INH v plazmě, validace metody: parametr selektivita.....	66
5.2.5. Stabilita CAF-INH v plazmě.....	67
5.3. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty HMAF-INH.....	69
5.4. Analýza HMAF-INH v plazmě.....	71
5.4.1. Extrakce HMAF-INH z plazmy.....	71
5.4.2. Analýza HMAF-INH v plazmě, validace metody: parametr linearita.....	72
5.4.3. Analýza HMAF-INH v plazmě, validace metody: parametry preciznost a přesnost	73
5.4.4. Analýza HMAF-INH v plazmě, validace metody: parametr selektivita.....	75
5.4.5. Stabilita HMAF-INH v plazmě.....	76
6. ZÁVĚR.....	78
7. ABSTRAKT.....	81
8. ABSTRACT.....	83
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	85

1. ÚVOD

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří k moderním analytickým separačním metodám se širokým využitím. Za její největší výhody se považuje citlivost, selektivita, rychlost, malá spotřeba analyzovaného vzorku a možnost automatizace. Umožňuje současně analýzu kvalitativní a kvantitativní. Ve farmaceutické analýze se nejčastěji využívá ke stanovení obsahu účinných a pomocných látek v léčivých přípravcích, nebo k analýze léčiva, jeho stability a metabolitů, v biologickém materiálu.

Železo je pro lidský organismus nepostradatelný prvek, ale pokud se hromadí v lidském těle ve větším množství, může škodit. To se týká jak pacientů podstupujících opakované transfuze, tak pacientů užívajících některé léky. Nadbytečné železo se též podílí na oxidačním stresu a poškozování buněk. (Např. Fentonovou reakcí železo katalyzuje vznik kyslíkových radikálů.) Nejúčinnější způsob, jak tomu stavu zabránit, je nadbytečné železo vyvázat použitím selektivních chelátorů železa.

Chelátory železa ze skupiny aroylhydrazonů jsou předmětem intenzivního výzkumu jako potenciální léčiva. Bylo prokázáno, že původní zástupci skupiny, pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) a salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH), vykazují antioxidační a kardioprotektivní účinky. Nicméně, jejich nevýhodou limitující použití v praxi je nízká stabilita v plazmě, a v důsledku jejich krátký biologický poločas. Snahou je proto připravit deriváty nové, stejně účinné ale s vyšší stabilitou. Předmětem této studie jsou dva chelátory, které byly připraveny cílenou obměnou struktury salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH):

- chlor-acetofenon isonikotinoyl hydrazon, zkratkou CAF-INH, celým přesným názvem (E)-N`-(1-(5-chloro-2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid,
- hydroxymethyl-acetofenon isonikotinoyl hydrazon, zkratkou HMAF-INH, celým názvem (E)-N`-(1-(2-hydroxy-4-methoxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid.

V rigorózní práci je popsán princip a rozdělení chromatografických metod, HPLC instrumentace a způsob vyhodnocení analýzy. Dále jsou popsány možnosti úpravy a extrakce z biologických vzorků a rovněž postup validace analytických metod. V závěru teoretické části je pojednáno o významu i patologii železa v lidském organismu, terapii chelátory železa a obzvláště o vybraných chelátorech ze skupiny aroylhydrazonů: PIH a SIH. V experimentální části práce je popsán vývoj HPLC analytické metody pro stanovení CAF-INH a HMAF-INH v biologickém materiálu (plazma).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. ÚVOD DO CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

2.1.1. SEPARAČNÍ METODY

Stanovení jedné složky ve složitějším vzorku obvykle není možné provést přímo po převedení vzorku do roztoku. Většinou je nutné před vlastní analýzou oddělit stanovovanou složku od ostatních, nebo oddělit složky, které stanovení ruší. K tomuto účelu se používá separace, kterou můžeme definovat jako operaci, při které se vzorek dělí alespoň na dva podíly odlišného složení. ^[1]

2.1.2. CHROMATOGRAFICKÉ METODY

Chromatografické metody jsou v analýze (např. léčiv) využívány velice široce. Je to především z důvodu, že se jedná o metody separační, které umožňují analýzu směsí – s možností kvalitativního a často též kvantitativního hodnocení separovaných složek směsi. ^[2]

Chromatografická metoda byla objevena M. S. Cvetem v roce 1903, kdy jako první v uspořádání kapalina-adsorbent rozdělil listová barviva na sloupci sorbentu (uhličitan vápenatý). ^[3, 4]

Při všech chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna nepohyblivá, stacionární fáze (v koloně nebo na tenké vrstvě) má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi, druhá pohyblivá, mobilní fáze pak vymývá (eluuje) jednotlivé separované součásti směsi z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich oddělení. Stacionární fáze může být kapalná nebo tuhá (sorbent), mobilní fáze může být kapalná (eluent) nebo plynná (nosný plyn).

K separaci dochází na základě různé afinity dělených látek ke stacionární a mobilní fázi. Vlastní dělení látek v systému závisí na brzdící síle (retenci), která působí selektivně: některá

látka je brzděna více, jiná méně. Při chromatografickém procesu se ustavuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí do mobilní fáze. Čím pevněji se látka sorbuje na stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje. ^[1, 2]

Chromatografický systém se může natolik blížit rovnováze, že distribuci složky A mezi dvě fáze můžeme popsat distribuční konstantou K_D , což je poměr rovnovážných koncentrací této složky $[A]$ ve dvou koexistujících fázích, přičemž podle konvence se koncentrace složky ve stacionární fázi $[A]_s$ uvádí v čitateli:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s \cdot V_m}{(n_A)_m \cdot V_s}$$

Kde $(n_A)_s$ a $(n_A)_m$ jsou látková množství složky A ve stacionární a mobilní fázi a V_s a V_m jsou objemy stacionární a mobilní fáze.

Interakce složky a chromatografických fází jsou určujícím faktorem pro rychlost migrace složky v chromatografickém systému. Čím vyšší je hodnota distribuční konstanty pro danou látku, tím delší dobu setrvají její molekuly ve stacionární fázi a tím delší je její retence.

Poměr látkového množství separované látky ve stacionární fázi k jejímu látkovému množství v mobilní fázi udává kapacitní poměr k (kapacitní faktor):

$$k = \frac{(n_A)_s}{(n_A)_m} = K_D \cdot \frac{V_s}{V_m} = K_D \cdot \beta, \text{ kde } V_s / V_m \text{ udává fázový poměr } \beta. \quad [3, 4]$$

2.1.3. ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD

V současnosti používané chromatografické metody se liší z hlediska povahy:

- separačního děje (chromatografie adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná, gelová)
- použité techniky (sloupcová, papírová, na tenké vrstvě)
- způsobu vyvíjení (eluční, vytěšňovací)
- skupenství pohyblivé a nepohyblivé fáze (kapalina – tuhá látka, plyn – kapalina atd.)

2.2. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

2.2.1. HPLC – ÚVOD

Nejčastějším uspořádáním kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Při tomto uspořádání je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku. ^[4]

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jedna z nejprogresivnějších analytických metodik a nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. ^[2] Umožňuje analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek a polymerů a odstraňuje tak hlavní nedostatek plynové chromatografie. ^[1]

Podobně jako u chromatografie v plošném uspořádání (papírová, tenkovrstvá) nastává dělení látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou. Protože k dělení látek lze využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů (adsorpce, rozdělování, iontová výměna, síťový efekt gelu), je možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech. ^[1]

Separací účinnost kapalinové kolonové chromatografie závisí na velikosti částic stacionární fáze. U klasické kapalinové chromatografie přitom mobilní fáze protéká stacionární fází v koloně samospádem. Čím menší a stejnoměrnější jsou jednotlivé částice stacionární fáze, tím větší je účinná plocha a separační účinnost. Pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze je však zapotřebí ji protlačit kolonou pomocí čerpadla pod vysokým tlakem. (Pro chromatografický systém, kde je kolona naplněna ještě menšími částicemi a používají se ještě vyšší tlaky, se užívá název UHPLC (ultra high performance liquid chromatography)).

Separované zóny analytů vycházející z kolony jsou zaznamenávány při průchodu detektorem a signál je převeden od podoby chromatografického záznamu, který je nazýván chromatogram (časová závislost intenzity veličiny, která je sledována detektorem). Chromatografický záznam je charakteristický křivkami gaussovského tvaru, které jsou nazývány píky. ^[1, 3, 4]

Předpokladem úspěšné HPLC analýzy je optimalizace chromatografických podmínek tak, aby jednotlivé separované složky směsi poskytovaly ostré a symetrické chromatografické píky, rozdělené pokud možno až na základní linii, a aby analýzy bylo dosaženo v přijatelném čase.^[1, 2, 4]

K hlavním přednostem HPLC patří:

- separační metoda umožňující kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi,
- rychlost analýzy, citlivost stanovení,
- pro analýzu postačuje minimální množství vzorku,
- možnost automatizace.^[2]

Nejdůležitější oblasti využití HPLC v analýze léčiv jsou:

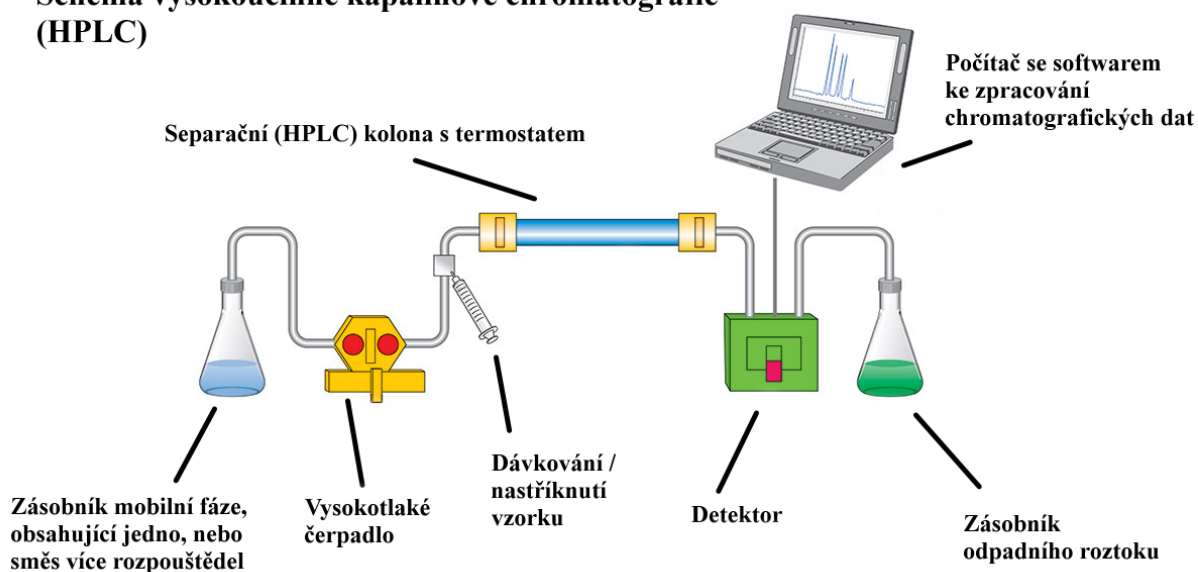
- 1) Kontrolně-analytická: identifikace léčiv, stanovení obsahu a čistoty. Při vhodně zvolených podmínkách lze z jednoho nástřiku analyzovaného vzorku určit z chromatografického záznamu totožnost léčiva, stanovit jeho obsah a zjistit přítomnost případných nečistot.
- 2) Problematika stability léčiv: na chromatografickém záznamu je patrný hlavní pík analyzovaného léčiva a případně menší píky rozkladných produktů. Metodika umožňuje kvantitativně hodnotit postupný úbytek sledovaného léčiva i vznikající rozkladné produkty.
- 3) Analýza přírodních léčiv v rostlinném materiálu (alkaloidy, glykosidy, vitamíny aj.)
- 4) Problematika monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách (krevní plazmě, séru a moči). Před vlastní HPLC analýzou je nutné izolovat léčivo a jeho metabolity z tělní tekutiny, např. extrakcí do vhodného organického rozpouštědla.^[2]

2.2.2. CHROMATOGRAFICKÝ SYSTÉM

Chromatografický systém (znázorněn na Obr. 1) se skládá z těchto částí:

- zařízení pro uchovávání a transport mobilní fáze (zásobníky mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo),
- zařízení pro dávkování vzorku (autosampler, manuální dávkovací ventil),
- zařízení pro separaci látek (chromatografická kolona a její termostát),
- zařízení pro detekci látek (detektor),
- zařízení pro záznam dat a následné vyhodnocení (počítač a software). ^[1, 3, 4]

Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)



Obr. 1: Schéma HPLC ^[5, 6]

Transport mobilní fáze - čerpadla

Při chromatografii je mobilní fáze čerpána vysokotlakým čerpadlem. Na vysokotlaká čerpadla jsou kladeny značné požadavky:

- Výstupní tlaky se musí pohybovat v širokém rozmezí 1 až 60 MPa.
- Změna průtoku mobilní fáze musí být v širokém rozmezí 0,1 – 10 ml/min.
- Průtok mobilní fáze musí být reprodukovatelný (do 1 %) a přesný (do 1 %).
- Průtok mobilní fáze musí být bezpulzní a bez monotónních změn.
- Materiály použité ke konstrukci musí být odolné vůči korozi i při použití agresivních mobilních fází (vyhovuje nerezová ocel, titan, keramika).
- Vnitřní objem čerpadla má být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze. ^[1, 3, 4]

Principiálně se vysokotlaká čerpadla mohou rozdělit do dvou skupin podle toho, zda pracují při konstantním tlaku nebo konstantním objemovém průtoku. Oba tyto typy pracují tak, že ze zásobníku vytlačují pístem nebo membránou mobilní fázi. Hlavní rozdíl však spočívá ve způsobu dosažení pohybu pístu čerpadla:

- 1) U čerpadel pracujících s konstantním tlakem se využívá tlaku plynu nebo hydraulické kapaliny na píst čerpadla. Při změně odporu kolony se však bude objemový průtok u těchto typů čerpadel měnit. Sem patří např. pneumatická čerpadla.
- 2) Čerpadla pracující s konstantním objemovým průtokem využívají k pohybu pístu mechanický pohon. Sem patří např. čerpadla injekčního typu. Narozdíl od pneumatických čerpadel zvládnou vyvinout vyšší tlak (40 až 60 MPa) a průtok mobilní fáze kolonou je bezpulzní. ^[3, 4]

Zařízení pro dávkování vzorku

Dříve se pro dávkování vzorku používaly buďto speciální injekční mikrostříkačky nebo dávkovací kohouty (smyčkové dávkovače). V současnosti jsou však v největší míře používány automatické dávkovače různé konstrukce, tzv. autosamplery. ^[1, 3, 4]

Autosamplery jsou spojené se zásobníkem vzorku, ve kterém jsou umístěny mikronádoby (vialky) uzavřené pryžovým septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. Pro zamezení přístupu světla se vialky dělají z tmavého skla. Vialky mohou mít různé objemy, nejčastěji se používají 2 ml. Pokud je k dispozici omezené množství vzorku, vkládají se do vialek tzv. inzerty, které mohou mít objem stovky mikrolitrů. ^[3, 4]

Konstrukční spojení stříkačky dávkovače a zásobníku se vyskytuje v několika druzích:

- 1) Injekční stříkačka dávkovače je fixní a pohybuje se pouze zásobník vzorku pod zvednutou jehlu injekční stříkačky dávkovače.
- 2) Zásobník vzorků je fixní a pohybuje se raménko injekční stříkačky dávkovače ve směru os x-y-z.
- 3) Zásobník i injekční stříkačka dávkovače jsou fixní, vialka je roboticky dopravena pod zvednutou jehlu injekční stříkačky dávkovače (tzv. robotické autosamplery). ^[3, 4]

Kolony

Kolony pro HPLC jsou trubice dlouhé 5 – 15 cm, dříve až 25 cm, o vnitřním průměru 3 – 5 mm. Pro jejich výrobu se používají dva materiály: Častěji jsou vyrobeny z nerezové oceli, která musí vykazovat antikorozivní vlastnosti. Při tlaku do 20 MPa je možné použít i kolony ze speciálně tvrzeného skla, ty se pak vkládají do kovového pouzdra, aby odolaly vyšším tlakům; jejich výhodou je vyšší chemická stabilita. Naplněné jsou sorbentem, stacionární fází. Nejčastěji se používají chemicky vázané stacionární fáze. Náplň kolony musí být naprosto homogenní a rovnoměrná. Běžně se používají kolony o velikosti částic náplně mezi 3 až 5 μm . ^[1, 2, 3, 4]

Spoje mezi kolonou, dávkovacím zařízením a detektorem jsou kapilární (vnitřní průměr 0,5 mm), nejčastěji vyrobené z nerezové oceli. ^[4]

Materiál pro zhotovení vnitřního povrchu kolony musí vykazovat určité vlastnosti:

- musí odolávat tlakům až do 70-100 MPa (i když pracovní tlak na koloně bývá menší),
- musí odolávat chemickému působení mobilní fáze,
- musí mít dokonale hladký vnitřní povrch. ^[3]

Stacionární fáze - sorbent

Stacionární fáze je nepohyblivou složkou chromatografického systému. Je to náplň chromatografické kolony, na které dochází k vlastnímu separačnímu procesu. Historické dělení je na fáze kapalné (kapalinová rozdělovací chromatografie, LLC) a tuhé (kapalinová adsorpční chromatografie, LSC). Mechanicky zakotvená stacionární kapalná fáze však není pro HPLC příliš vhodná – při vysokém tlaku dochází k jejímu narušení. Naopak se osvědčily chemicky modifikované stacionární fáze. [4]

Stacionární fáze mohou být rozčleněny podle způsobu, který je pro separaci použit: normální, reverzní, ionexy, HILIC (hydrofilní interakční chromatografie), HIC (hydrofobní interakční chromatografie), gely (fáze pro SEC, size exclusion chromatography). [4]

Podle chemického složení se fáze dělí na:

- anorganické oxidy (silikagel, oxid zirkoničitý, hlinitý a titaničitý),
- chemicky vázané fáze na bázi silikagelu,
- chemicky vázané fáze na bázi kovových oxidů,
- polymerní,
- hybridní,
- na bázi grafitového uhlíku. [4]

Silikagel

Silikagel je nejrozšířenější polární anorganický sorbent. Jeho vlastnosti jej činí takřka ideálním nosičem. [4]

Nemodifikovaný silikagel se využívá pro separaci látek na základě adsorpce. Na přístupné Si – OH (silanolové/ hydroxylové) skupiny silikagelu na povrchu se polární látky adsorbují prostřednictvím vodíkových vazeb. (Pro méně polární látky je vhodnějším adsorbentem oxid hlinitý.) [1]

Vysoká mechanická odolnost umožňuje použití při vysokých tlacích aplikovaných v HPLC. V přítomnosti organických rozpouštědel silikagel nebobtná ani se nesráží. Limitací je narušení silikagelu v zásaditých roztocích, při pH nad 8. [4]

Silikagel je využíván samotný pro separaci na normálních fázích nebo se po chemickém navázání organických ligandů připravují fáze s různými skupinami. Na charakteru ligandu závisí polarita a selektivita připravené fáze: od středně polárních, kde je navázán tříuhlíkatý řetězec zakončený např. skupinami $-NH_2$ nebo $-CN$, po nepolární, vysoce hydrofobní, používané pro obrácený systém fází (RP, reversed phase), kdy jsou navázány řetězce s větším počtem uhlíkových atomů; např. oktadecyl $-C_{18}H_{37}$ (označení C_{18} nebo RP-18), nebo oktyl $-C_8H_{17}$ (označení C_8 nebo RP-8).^[1, 2, 4]

Tyto stacionární fáze jsou univerzálně použitelné pro polární i nepolární analyty. Retence látek na reverzních fázích roste se zvětšujícím se počtem a délkou uhlíkatých řetězců, nebo s větším počtem aromatických jader. Vzrůst počtu silně polárních a iontových skupin ($-NH_2$, $-OH$, $-COOH$) retenci látek snižuje.^[4]

Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu mají řadu výhod:

- téměř nedochází k vymývání stacionární fáze z nosiče,
- nedochází k jejímu rozpouštění v mobilní fázi,
- nedochází k mechanickému strhávání při vysokém průtoku mobilní fáze,
- robustnost ke změně teploty a složení mobilní fáze.^[4]

Stacionární fáze na bázi kovových oxidů

Stacionární fáze na bázi kovových oxidů patří mezi polární anorganické sorbenty. Vyznačují se vyšší chemickou stabilitou než silikagel. V HPLC našly uplatnění tři typy těchto oxidů: zirkoničitý, hlinitý, titaničitý. Vysoká stabilita těchto oxidů předpokládá delší životnost analytických kolon a lepší flexibilitu při vývoji metod, díky možnosti pracovat v celém rozsahu pH a při vysokých teplotách do 200 °C.^[4]

Mobilní fáze

Mobilní fáze používané při HPLC musí být velmi čisté a zbavené rozpuštěných plynů. Dříve se k odvodu mobilní fáze užívalo např. probublávání heliem. Dnes se spíše používá vakuový degaser, který pracuje na principu membrány polopropustné pro plyny a nepropustné pro kapaliny.^[3, 4]

K získání přiměřených elučních parametrů je nutný výběr vhodné mobilní fáze. Pro dělení na normálních fázích platí, že jsou používány polární stacionární fáze a mobilní fáze má nižší polaritu než stacionární fáze. Rozpouštědla jsou podle rostoucí eluční účinnosti seřazena do eluotropní řady. Eluotropní řada pak vypadá takto: heptan (alifatické uhlovodíky) < cyklohexan < toluen (aromatické uhlovodíky) < chloroform (halogensloučeniny) < aceton (ketony) < acetonitril < ethanol < methanol < kyselina octová (karboxylové kyseliny). Při dělení na reverzních fázích se nejčastěji používá jako mobilní fáze voda ve směsi s methanolem nebo acetonitrilem; eluotropní řada pak platí v obráceném pořadí a lipofilnější methanol má tak vyšší eluotropní účinnost než voda. ^[1, 4]

Na nepolárních fázích se ustavuje rovnováha mnohem rychleji než na polárních adsorbentech, protože se zde neuplatňuje vliv stopového obsahu vody v rozpouštědle. Výběr rozpouštědel je zde užší a omezuje se na směsná rozpouštědla voda (případně vodný roztok kyselin, bází) a polární organické rozpouštědlo mísitelné s vodou (např. methanol, acetonitril, tetrahydrofluran, dioxan). Při chromatografii silně polárních nebo ionizovaných analytů je nutné používat přísady do mobilní fáze, a to pufrů, soli rozpouštědel nebo činidla, které tvoří s analytem iontové asociáty. Samotná voda bez přídavku organického rozpouštědla dobře nevyhovuje, protože hydrofobní povrch se vodou nesmáčí dobře; samotná voda je tedy složkou o velmi malé eluční síle. ^[3, 4]

Silně polární a iontové látky se na nepolárních fázích zadržují velmi málo nebo vůbec ne a eluují se v mrtvém objemu kolony. Pro látky iontové povahy můžeme jejich chromatografické chování ovlivnit volbou pH mobilní fáze, kdy dochází k potlačení disociace slabých kyselin ($\text{pH} < 7$) či slabých bází ($\text{pH} > 7$). Potlačením disociace dochází ke zvýšení retence a zamezení chvostování píku dané látky. Použití vyššího pH je ale omezeno rozpouštěním silikagelu při $\text{pH} > 8,5$. ^[3]

Eluce izokratická a gradientová

Při dělení směsi látek, jejichž eluční parametry se příliš neliší (mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti - hodnoty K_D), se používá izokratická eluce. T.j. eluce jedinou mobilní fází, jejíž složení se během chromatografie nemění (mobilní fáze má stejnou eluční sílu). U některých směsí látek však nelze tímto způsobem dosáhnout optimálního dělení, zejména jestliže se jednotlivé složky směsi svými elučními parametry významně liší. V tomto případě

se s výhodou využívá gradientová eluce, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem. Vytváří se tak plynulý koncentrační gradient mobilní fáze. [3, 4]

Tvorba gradientu mobilní fáze – rozeznáváme dva typy:

1. Nízkotlaký gradient – složky mobilní fáze se míchají za atmosférického tlaku před vstupem do vysokotlakého čerpadla v malé směšovací komůrce. Tento způsob tvorby gradientu se vyznačuje vysokou přesností, ale vyžaduje sladění pracovní periody ventilů a čerpadla a dokonalé odvodušnění mobilní fáze.

2. Vysokotlaký gradient – každá složka mobilní fáze má své vysokotlaké čerpadlo a je dávkována do směšovací komůrky před kolonou. Výhodou je malé zpoždění gradientu, nevýhodou je menší přesnost tvorby gradientu vlivem stlačitelnosti kapalin a objemových změn při jejich směšování. [3, 4]

Detektory

Detektory jsou umístěny za kolonou a analyzují efluent - zaznamenávají rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku. Detektory se nejčastěji dělí na koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v efluentu (dm/dV) nezávisle na přívodu složky do detektoru. Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky v efluentu (dm/dt) do detektoru. Koncentrační detektory se dále dělí na selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci detekované komponenty, a univerzální, jejichž signál je úměrný celkové vlastnosti efluentu jako celku (tj. mobilní fáze a detekované komponenty). Jiný způsob dělení je na detektory nedestrukční, kde nedochází k chemické změně detekované komponenty, a detektory destruktivní, kde se detekovaná komponenta ireverzibilně mění. [3]

Pro koncentrační detektor ideálně platí vztah mezi koncentrací složky v efluentu c_M a intenzitou analytického signálu R (odezva detektoru) $R = k_1 \cdot c_M$, kde k_1 je konstanta úměrnosti (citlivost). Jedná se tedy o lineární závislost. [4]

Na detektory pro HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky:

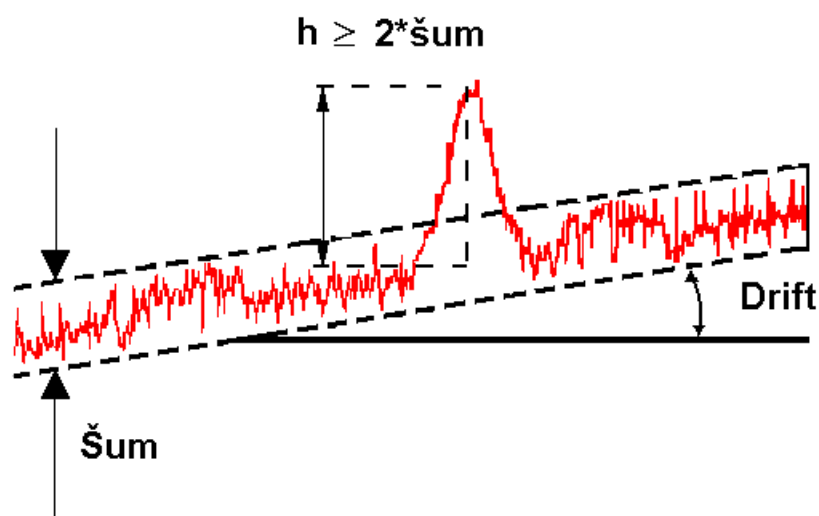
- univerzálnost – detekce všech oddělených složek vzorku,
- vysoká citlivost (detekce látek v roztoku v koncentracích ng až $\mu\text{g/ml}$),
- předvídatelná odezva,
- nízká úroveň šumu,
- reprodukovatelnost,
- rychlost odezvy,
- linearita odezvy v co nejširším koncentračním rozmezí,
- nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci,
- robustnost vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty,
- nulový příspěvek k mimokolonovému rozmývání elučních zón.

Tyto požadavky jsou převážně ideální a v praxi takový detektor neexistuje. Různé typy detektorů se jednotlivým požadavkům víceméně přibližují. ^[2, 3]

Citlivost detektoru, kolísání signálu: šum a drift

Šum (Obr. 2) je amplituda základní linie vyjádřená v příslušných jednotkách (ve voltech, ampérech nebo absorbančních jednotkách), která zahrnuje všechny nepravidelné změny signálu detektoru. Je to tedy krátkodobá změna základní linie způsobená změnou elektrického signálu, nestabilitou lampy detektoru, teplotními fluktuacemi aj. Šum se obvykle měří od píku k píku, tj. od vrcholu jednoho píku k úpatí druhého píku. Je to faktor, který limituje citlivost detektoru. Výška jednoznačně detekovatelného píku musí být alespoň dvojnásobek šumu základní linie. Ke kvalitativnímu určení (mez detekce) se pokládá výška píku trojnásobku šumu a ke kvantitativnímu stanovení musí být výška píku desetinásobek šumu. ^[3]

Další parametr vztahující se ke kolísání signálu detektoru je drift. (Obr. 2) Drift ukazuje dlouhodobou nestabilitu základní linie a vyjadřuje se jako průměrný sklon obálky šumu v příslušných jednotkách (ve voltech, ampérech nebo absorbančních jednotkách) za hodinu. Drift je často spojen se změnou teploty detektoru při jeho první půlhodině provozu. ^[3]



Obr. 2: Šum a drift signálu ^[7]

Mezi typy detektorů patří například: spektrofotometrický (UV-VIS pro ultrafialové a viditelné záření, infračervený), konduktometrický, amperometrický, fluorimetrický a detektor pro hmotnostní spektrometrii. ^[1]

Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory registrují absorpenci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektorem. Princip metody je pohlcení záření molekulou při přechodu z nižšího elektronového stavu do vyššího (excitovaného). ^[1,2]

Seskupení atomů v molekulách, které způsobuje absorpci v oblasti vlnových délek 200 až 800 nm, se nazývá chromofor. Oblast pod 200 nm se v analytické praxi neuvžívá pro silnou absorpci vzduchu, zejména kyslíku. Aromatické nebo heterocyklické sloučeniny se vyznačují rozsáhlým konjugovaným systémem a jejich spektra jsou proto charakterizována intenzivními absorpčními pásy v oblasti 200 – 250 nm. Totéž platí u sloučenin nearomatických obsahujících násobné vazby mezi atomy (chromofory C=C, C=O, N=N, N=O). Sloučeniny, jejichž molekula obsahuje atomy s volným elektronovým párem (O, N, S), vyžadují pro přechod elektronů nejmenší energii, a proto absorpční pás těchto sloučenin leží v oblasti 250-600 nm. Sloučeniny bez chromoforů s jednoduchými vazbami (C-C, C-H) neabsorbují záření v oblasti nad 200 nm. Využívají se proto také jako rozpouštědla pro UV-spektrofotometrii. ^[1]

Spektrofotometrické detektory se vyznačují citlivostí 10^{-9} až 10^{-10} g/l. K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra, mnohem méně oblast viditelná a minimálně infračervená oblast spektra. Detektor je možno použít pro gradientovou eluci. [1, 2, 4]

Podle konstrukčního typu se spektrofotometrické detektory dělí na vícero typů, od jednoduchých po modernější:

- Detektory s fixní vlnovou délkou nebo s předem danou volbou vlnových délek (pro analytické účely se dnes již nepoužívají).
- Detektory s proměnnou, volitelnou vlnovou délkou, nejčastěji v oblasti 200 – 800 nm. Vlnová délka je měnitelná i během analýzy. Některé, tzv. scanning UV-Vis detektory umožňují v maximu píku během několika sekund sejmout absorpční UV-Vis spektrum. (Takové porovnání vzorku oproti standardu slouží jako způsob kvalitativního stanovení.)
- Spektrofotometr s diodovým polem (PAD, photodiode-array, DAD, diode array detector) snímá celé absorpční spektrum eluátu v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Tento detektor umožní získat nejvíce informací a je řízený počítačem. Výsledkem je trojrozměrný chromatogram jako závislost absorbance na vlnové délce a čase; z něj lze rychle identifikovat eluované látky a posoudit jejich čistotu. [1, 2, 3]

Fluorimetrické detektory

Fluorimetrické detektory jsou použitelné v případech, kdy analyzovaná látka (např. léčivo) vykazuje fluorescenci, nebo se dá převést na fluoreskující derivát. Detektor tedy měří sekundární (emisní) záření, které látka vydá po absorpci primárního (excitačního) záření. Fluorimetrické detektory jsou méně univerzální než UV-Vis detektory, ale disponují větší citlivostí (10^{-9} až 10^{-12} g/ml) a selektivitou. Jsou rovněž použitelné při gradientové eluci. [2, 3]

Elektrochemické detektory

Elektrochemické detektory se používají k detekci látek, u nichž lze využít dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí probíhající na fázovém rozhraní elektroda – eluent (mobilní fáze). Detektory měří elektrochemickou veličinu (potenciál, proud, kapacita) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektorem. Hodnota této veličiny je závislá na

koncentraci analyzovaného léčiva. Elektrochemické detektory jsou značně citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), ale nedají se použít pro gradientovou eluci. [2, 3]

Refraktometrické detektory

Refraktometrické detektory měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony a obsahujícím analyzovanou látku. Jsou univerzální (vyhodnotí jakoukoliv látku), ovšem mají řadu nevýhod: nelze je použít pro gradientovou eluci, mají nižší citlivost (10^{-6} g/ml) a nutnost termostatování, protože odezva detektoru je závislá na teplotě. Z těchto důvodů se v analytickém hodnocení léčiv používají ojediněle. [2, 3]

Hmotnostní spektrofotometrie

Spojení HPLC s hmotnostní spektrofotometrií (MS) je v poslední době využívané čím dál více. Po výstupu z HPLC kolony je nutno z eluentu odstranit mobilní fázi a molekuly léčiva v plynném stavu jsou v hmotnostním spektrometru ionizovány. Nabité částice jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a je zaznamenáno hmotnostní spektrum (tj. četnost iontů ve vztahu k poměru hmotnost/ počet nábojů). Spojení HPLC-MS je vysoce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci léčiv. [2, 3]

2.2.3. CHROMATOGRAM – KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Separace na koloně

Hlavním cílem chromatografické metody je dosáhnout dobrého rozdělení analyzovaných látek v přijatelném čase. Míra kvality separace dvou sousedních píků je charakterizována parametrem rozlišení. Tento stupeň se dá kvantitativně vyjádřit, v praxi se používá míra relativní separace dvou sousedních píků 1, 2 – rozlišení $R_{1,2}$, které je definováno:

$$R_{1,2} = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5(w_1 + w_2)} = \frac{V_{R2} - V_{R1}}{0,5(w_1 + w_2)}$$

Kde t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy složek 1,2 a w_1 a w_2 odpovídající šířky píků na úrovni nulové linie (ve stejných jednotkách).^[3, 4]

Obdobně s využitím w_h (šířka píku v polovině výšky):

$$R_{1,2} = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad [3, 4]$$

Rozlišení se tedy udává jako rozdíl elučních časů (resp. objemů) separovaných látek, dělený průměrnou hodnotou šířky elučních křivek (píků). Rozlišení je veličina bezrozměrná a větší hodnota R znamená lepší separaci. Při volbě separačních podmínek nejde však o dosažení co největšího rozlišení, ale o dosažení právě potřebného rozlišení. Při rozlišení $R_{1,2} = 1$, kdy vzdálenost mezi maximy píků se rovná střední šířce píku, dochází k nepatrnému překryvu píků. Dokonalého rozdělení píků až na základní linii se dosáhne při $R_{1,2} = 1,5$ (pouze 0,1% překryv). Větší rozlišení není žádoucí, protože prodlužuje dobu analýzy.^[3]

Asymetrie píku

Asymetrie píku je obecná praktická veličina kvality chromatografické kolony a separace. Jedná se o nežádoucí jev, který má vliv na integraci píku, zvláště je-li nízký poměr signál-šum. Existují dvě metody vyjádření asymetrie píku: faktor asymetrie A a tailing faktor T (faktor chvostování).

Faktor asymetrie A je vyjádřen jako poměr šířky sestupné části t ku vzestupné části píku f , nejčastěji v 5 nebo 10 % výšky. Tailing faktor T je vyjádřen jako šířka píku v 5 % výšky k dvojnásobku šířky vzestupné části píku (f).

$$A_s = \frac{t}{f} \quad T = \frac{f_{5\%} + t_{5\%}}{2f_{5\%}}$$

Ideální symetrie píku je získána, je-li hodnota faktoru asymetrie A rovna 1. V případě, že pík chvostuje, je faktor asymetrie nebo tailing faktor > 1 ; v případě, že je faktor < 1 , dochází k frontování píku. Mezi faktorem asymetrie a faktorem chvostování platí vztah: $A = 2T - 1$.^[3,4]

Kvalitativní analýza - Retenční charakteristiky

Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC analýze je retenční (eluční) čas t_R . To je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu eluční křivky (chromatografického píku). Nejčastějším důkazem totožnosti látky je shoda retenčních časů chromatografického píku v analyzovaném vzorku s retenčním časem standardu.^[2] Eluční objem V_R je objem proteklý kolonou za tuto dobu. Mezi retenčním časem a objemem platí vztah:

$V_R = F_m \cdot t_R$ kde F_m je objemová rychlost nebo objemový průtok, udávaný jako objem za čas, buď $[\text{cm}^3/\text{s}]$ nebo $[\text{ml}/\text{min}]$.^[3,4]

V maximu chromatografického píku je polovina látky eluována v retenčním objemu V_R a polovina zůstává v koloně, jednak v mobilní fázi a jednak ve fázi stacionární.^[4]

,Kvantitativní analýza

Úkolem kvantitativního hodnocení je nalezení vztahu mezi plochou (výškou) píku a množstvím eluované látky.^[4] Pro vlastní kvantitativní vyhodnocování se nabízí dvě možnosti: u symetrických píků lze k vyhodnocení využít jejich výšku, obecně je ale výhodnější použít plochu pod píkem.^[1,2]

Metody HPLC stanovení mají z hlediska vyhodnocení naměřených veličin relativní charakter. To znamená, že závislost mezi naměřenou plochou píku a neznámou koncentrací stanovované složky c_x je třeba určit empiricky porovnáním se standardem.^[4]

Při kvantitativním hodnocení jsou nejčastěji používány tyto dvě metody:

1) *Metoda vnějšího standardu*. Ta se dále dělí na dva způsoby:

a) Metoda přímého porovnání: V prvním kroku se na kolonu nastříkne vzorek, roztok analyzované látky o neznámé koncentraci, a po registraci chromatografického záznamu se v druhém kroku nastříkne vnější standard – roztok stanovované látky o známé koncentraci. Koncentrace stanovované látky ve vzorku se vypočítá podle

vzorce: $c_x = \frac{A_i}{A_s} \cdot c_s$ kde A_i je plocha stanovované látky o neznámé koncentraci

c_x a A_s je plocha standardu o známé koncentraci c_s .

b) Metoda kalibrační křivky: Při této metodě je analyzována série standardů o známé, ale různé koncentraci c_s a hledá se závislost kalibrační funkce $A = f(c)$, tedy plocha píku jako funkce koncentrace látky. Neznámý obsah stanovované složky je pak určen pomocí analytické vyhodnocovací funkce $c = f(A)$, tedy výpočet koncentrace podle velikosti plochy.

Nejvýhodnější je pracovat s lineární kalibrační funkcí. Pro konstrukci kalibrační křivky je doporučováno použít 5 až 7 kalibračních standardů. Pro kalibrační přímkou platí vztah: $A_i = a + b \cdot c_i$; kde A_i je plocha píku pro koncentraci c_i , b je směrnice kalibrační přímkou, a je posunutí na ose y . Zpětným výpočtem:

$$c_x = (A_i - a) / b$$

Metoda vnějšího standardu je aplikovatelná, pokud je možné zanedbat vliv matrice vzorku. Je tedy nepoužitelná pro analýzu složitých reálných vzorků. [2, 4]

2) *Metoda vnitřního standardu*: Principem metody je přidavek roztoku vnitřního standardu, ideálně ve stejném množství, k roztoku vzorku i k roztoku standardu (nebo sérii standardů), přičemž koncentrace vnitřního standardu (I.S., internal standard) i standardu musí být známá. Pokud je tento vnitřní standard přidáván na počátku analytického postupu, metoda eliminuje vliv změny pracovních podmínek, protože jak stanovovaná látka, tak vnitřní standard jsou ovlivněny stejně. Vnitřní standard je definován jako chemická látka, která musí být dobře oddělena od všech složek analyzovaného vzorku, a přitom by měla být eluována v blízkosti stanovované složky. Měl by mít podobnou koncentraci jako analyzované látky a také podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. [2, 4]

Tato technika má opět dvě varianty: metodu přímého porovnání a kalibrační křivky.

a) Metoda přímého porovnání: K vzorku o neznámé koncentraci analytu c_x je přidán známý objem vnitřního standardu V_{IS} o koncentraci c_{IS} . Tato směs je analyzována a plochy píků vyhodnoceny – pro analyt A_i a pro vnitřní standard v neznámém vzorku $A_{IS,i}$. Dále musí být analyzován roztok standardu o známé koncentraci c_s , k němuž byl přidán stejný objem vnitřního standardu V_{IS} o koncentraci c_{IS} . Objemy a koncentrace vnitřního standardu mohou být ve výpočtu zanedbány, protože jsou shodné. Ze zjištěné plochy A_s pro analyt standardu a plochy $A_{IS,s}$ pro vnitřní standard v roztoku standardu se vypočítá koncentrace c_x :

$$c_x = \frac{A_i}{A_s} \cdot \frac{A_{IS,s}}{A_{IS,i}} \cdot c_s$$

b) Metoda kalibrační křivky: Ke standardním roztokům analytu o známé koncentraci je přidán konstantní objem vnitřního standardu V_{IS} o jedné koncentraci c_{IS} . Je změřena kalibrační křivka závislosti poměru ploch analytu standardu A_s a vnitřního standardu $A_{IS,s}$ na koncentraci analytu standardu c_s , $A_s/A_{IS,s} = f(c_s)$. Následně se přidá stejný objem vnitřního standardu v_{IS} o koncentraci c_{IS} k vzorku o neznámé koncentraci c_x . Koncentrace c_x je pak odečtena z kalibrační křivky, resp. určena pomocí vyhodnocovací funkce $c = f(A_i/A_{IS,i})$. V případě lineární kalibrační funkce, pro jejíž konstrukci je doporučováno použít 5 až 7 kalibračních standardů, platí

vztah: $\frac{A_i}{A_{IS,i}} = a + b \cdot c_i$; kde A_i je plocha píku pro koncentraci c_i , $A_{IS,i}$ je plocha vnitřního standardu pro danou koncentraci, b je směrnice kalibrační přímky, a je

posunutí na ose y . Zpětným výpočtem: $c_x = \left(\frac{A_i}{A_{IS,i}} - a \right) / b$ [4]

2.3. ÚPRAVA BIOLOGICKÉHO VZORKU PŘED HPLC ANALÝZOU

Většina reálných vzorků (krev, plazma, moč) není přímo kompatibilní s chromatografickými technikami, jimiž má být analyzována. Důvodem je složitost vzorku a vysoký obsah balastních látek (např. proteinů), které mohou interferovat se sledovanými analyty. Vzorek je nutné před analýzou upravit s cílem izolovat a zakoncentrovat analyty, přechistit extrakty a odstranit co největší množství balastních látek.

Ke konvenčním, široce užívaným, metodám úpravy vzorku patří: deproteinace/ srážení proteinů (PP), extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakce na tuhou fázi (SPE). Tyto metody jsou již dobře optimalizovány, jsou reprodukovatelné a tudíž jejich vývoj a validace pro většinu aplikací nejsou problematické. Z praktického úhlu pohledu jsou však při manuálním provedení časově relativně náročné. ^[4]

2.3.1. SEPARACE BÍLKOVIN DEPROTEINACÍ

Deproteinace znamená separaci bílkovin od biologického vzorku. Deproteinační techniky lze rozdělit na:

- 1) Fyzikální: centrifugace, ultracentrifugace, adsorpce, denaturace teplem.
- 2) Chemické: srážení protilátkami, srážení dehydratací a srážení solemi (s aniontovými nebo kationtovými srážedly). ^[8]

Všechny chemické postupy jsou silně závislé na pH, neboť bílkoviny mají jak kladné tak i záporné náboje; v kyselém prostředí se chovají jako kationty, v alkalickém jako anionty. Chování mezi oběma extrémy závisí na pH. Stav, kdy je bílkovina elektroneutrální, se nazývá isoelektrický bod (pI). V isoelektrickém bodu jsou bílkoviny labilní a snadno se srážejí.

Srážení bílkovin dehydratací lze provést buď pomocí rozpouštědel nebo vysolením. V obou případech dochází ke kompetici proteinu se srážedlem o vodu, a pokud se proteinu odejme určité množství vody, protein se sráží. ^[8]

Srážení proteinů (PP, protein precipitation) je tradiční technikou úpravy vzorků biologických materiálů a je stále oblíbeno díky své jednoduchosti a rychlosti provedení i optimalizace metody. Pro srážení jsou nejčastěji využívána organická rozpouštědla methanol, ethanol nebo acetonitril. Acetonitril je účinnějším činidlem než alkoholy. ^[9] Deproteinační činidlo nesmí ovlivňovat sledovanou látku nebo interferovat při detekci. (Proto např. není vhodná deproteinace silnou kyselinou, pokud může rozložit analyt, nebo deproteinace solemi vícemocných iontů, jako je síran zinečnatý, pokud by analyt mohl s daným kovem tvořit komplexy.) ^[4]

K odstranění proteinů jsou používány metody precipitace, enzymové deproteinace, membránové filtrace a odstředění. ^[4]

Membránová filtrace

Technikou membránové filtrace jsou proteiny z krve (plazmy, séra) separovány přes semipermeabilní membránu. Při filtraci zůstává vázaná složka sledované látky na stejné straně membrány jako proteiny, permeát tedy obsahuje jen volnou látku. Velikost prošlých molekul závisí na velikosti pórů membrány a podle toho se rozdělují různé typy membránové filtrace: mikrofiltrace (zachycuje částice větší než 10 nm), ultrafiltrace (velikost pórů 1 – 10 nm) a reverzní osmóza (zachycuje i částice menší než 1 nm).

Výhodou metody je velmi vysoká účinnost (99 %). Dále nedochází ke změně koncentrace analytu naředěním ani ke změně pH vzorku. ^[4]

Enzymová deproteinace

Enzymová deproteinace probíhá působením proteolytických enzymů. Mohou být použity papain, trypsin, subtilisin nebo směs proteáz. Metoda je šetrná k analytům. Její nevýhodou je nečirý supernatant, což snižuje selektivitu metody a což může být příčinou interferencí při chromatografické analýze. ^[4]

Odstředění (centrifugace)

Odstředivky (centrifugy) pracují na principu odstředivé síly a urychlují sedimentaci vysrážených bílkovin na dno nádoby se vzorkem (zkumavka). Následně po odstředění se analyt stanovuje v supernatantu (horní vrstva). Podmínky centrifugace jsou charakterizovány relativní centrifugační silou (RCS), časem a teplotou. RCS udává, kolikrát je odstředivé zrychlení u dna centrifugační nádoby větší než gravitační zrychlení g. ^[8]

2.3.2. EXTRAKCE Z KAPALINY DO KAPALINY

Extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction, LLE) byla jednou z prvních technik vyvinutých pro úpravy vzorků a stále patří mezi nejvíce využívané postupy. Jednoduchý princip, jímž je převedení analytu z vodné fáze do organického, s vodou nemísitelného, rozpouštědla, na bázi rozdělovacího koeficientu voda/oktanol, poukazuje na jednoduchost optimalizace tohoto postupu. Metoda není náročná na provedení ani na přístrojové vybavení a lze ji využít pro extrakci látek přítomných jak ve vysokých, tak ve stopových množstvích. [4]

Princip LLE spočívá v rozdělení extrahované látky mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny dle rozdělovacího poměru (D_c) podle Nernstova zákona:

$$D_c = \frac{c_{org}}{c_{aq}}$$

kde c_{org} je koncentrace látky v organické fázi a c_{aq} je koncentrace látky ve vodné fázi. Pro soustavu oktanol-voda se tento poměr označuje P a hodnoty $\log P$ jsou tabelovány a využívány pro hodnocení lipofility látek.

Výtěžek extrakce R_n závisí na hodnotě rozdělovacího poměru D_c , na poměru objemů jednotlivých fází r ($r = V_{org} / V_{aq}$) a na počtu extrakcí n :

$$R_n = 1 - \left[\frac{1}{1+r \cdot D_c} \right]^n$$

Výtěžek roste s počtem extrakcí n , s rozdělovacím poměrem D_c a s rostoucím r . Od určitého poměru organické a vodné fáze nemá smysl zvyšovat poměr r , neboť zvýšením r je přírůstek výtěžku extrakce R_n nepatrný. Je-li dán celkový objem organické fáze, je extrakce účinnější, je-li opakována několikrát s menšími podíly extrahující fáze, než s jedním velkým objemem. [4]

Metoda LLE v klasickém manuálním provedení má však i některé nevýhody: může docházet k tvorbě emulzí a špatnému oddělení fází. Proto je třeba vhodně vybrat dvojici rozpouštědel a třepat opatrně. [4]

2.3.3. EXTRAKCE NA TUHOU FÁZI

Extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction, SPE) přináší mnoho výhod, jako je vysoká výtěžnost, účinné zakoncentrování analytu, nižší spotřeba organických rozpouštědel (ve srovnání s dříve uvedenými postupy) a také lepší možnost automatizace. Během SPE dochází k extrakci analytu na principu rozdělování mezi tuhou fází (extrakční kolonka) a kapalnou fází (vzorek obsahující analyt). Pro úspěšnost extrakce musí mít analyt větší afinitu k tuhé fázi než k matici vzorku. K retenci může docházet na základě polárních, nepolárních, iontových nebo afinitních interakcí. [4]

Úspěšná aplikace SPE vyžaduje několik zásad týkajících se správného zacházení se sorbentem a vzorkem v průběhu všech kroků extrakce:

- 1) Výběr stacionární fáze – jako náplň SPE kolonek jsou používány sorbenty obdobné sorbentům v HPLC. V současnosti je dostupná široká škála sorbentů od klasických nepolárních (C18 a C8), přes polární fáze (silikagel, oxid hlinitý) až po iontově výměnné a různé polymerní materiály (polystyren-divinylbenzen). To umožňuje sorpci analytů různých fyzikálně chemických vlastností.
- 2) Počáteční úprava extraktu – je nutné modifikovat kapalnou vzorek tak, aby byl kompatibilní se stacionární fází. Např. je cílem odstranění pevných částic z roztoku.
- 3) Smočení sorbentu (kondicionování) – cílem smočení sorbentu je aktivace jeho funkčních skupin a příprava pro vlastní extrakci. Nejčastěji je používán methanol v dvojnásobném objemu sorbentu v kolonce. Po aplikaci solvatačního činidla je nutné se vyhnout vyschnutí sorbentu.
- 4) Ekvilibrace stacionární fáze – cílem je vytvoření takové rovnováhy na fázovém rozhraní, která bude co nejvíce odpovídat situaci při aplikaci vzorku (je prováděna nejčastěji vodou nebo pufrem).
- 5) Aplikace vzorku – při aplikaci vzorku je nutné optimalizovat rychlost průtok.
- 6) Odstranění interferujících látek – k odstranění interferujících látek je používán jeden nebo více promývacích systémů. V tomto případě jsou používána rozpouštědla, v nichž je analyt minimálně rozpustný. Např. k odstranění solí je využívána čistá voda, při SPE na reverzních fázích jsou používány pufrы ve směsi s nízkým podílem

organické složky tak, aby ještě docházelo k vymytí balastů ale ještě nedocházelo k eluci analytu.

- 7) Eluce analytu – volba rozpouštědla pro eluci analytu závisí na kompatibilitě s finální analytickou technikou. Průtok elučního činidla je srovnatelný s hodnotami průtoku používaného při kondicionování kolonek. ^[4]

Nevýhodou klasické SPE je mnoha-krokový způsob přečištění a případná nutnost odpařování extraktu a znovu-rozpouštění v mobilní fázi. Kolonky SPE jsou obvykle vyrobeny pro jednorázové použití, což zvyšuje ekonomické náklady. Nevýhodou z hlediska reprodukovatelnosti metody je možnost odlišnosti kolonek z různých šarží výrobce. ^[4]

2.4. VALIDACE METODY

Před použitím každé analytické metody v praxi je nutné ji validovat, čili ověřit a zdokumentovat, že je daná metoda vhodná k zamýšlenému použití. Je třeba dokázat, že vyvinutá metoda je spolehlivá, pro hodnocení stanovované látky dostatečně přesná a že je reprodukovatelná. Cílem validace je také určit podmínky, za kterých je analytický postup použitelný, a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo i v různých laboratořích. Validace se provádí pomocí série experimentů a jejich následným statistickým vyhodnocením.^[10]

Validaci definuje mezinárodní metrologický slovník jako ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití. Slovník managementu kvality charakterizuje validaci jako potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny. Validace potvrzuje, že měřicí postup/systém je schopen plnit požadavky na ně kladené. Jinak řečeno, že úroveň měření je dostatečná, postupy měření korektní a s řádně provedenou kalibrací.^[11]

Validace se provádí vždy při vývoji nové metody, dále pokud byla metoda změněna, má-li být metoda přenesena do jiné laboratoře, nebo při průkazu rovnocennosti dvou metod.^[10]

Ve farmaceutické analýze se často využívá validace dle americké agentury FDA (Food and Drug Administration), předpis Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry^[12], nebo validace dle evropské agentury EMA (European Medicines Agency), předpis Guideline on bioanalytical method validation.^[13] Výběr validačních parametrů je jasně daný: přesnost, preciznost, selektivita, mez detekce, mez stanovitelnosti, linearita, rozsah, robustnost.^[4, 12, 13]

2.4.1. PŘESNOST METODY

Přesnost metody je definována jako těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou (např. skutečnou koncentrací). Rozdíl mezi přijatou referenční hodnotou a hodnotou zjištěnou měřením je nazýván chyba výsledku. Složka chyby, která v průběhu řady výsledků zkoušek zůstává konstantní nebo se mění předvídatelným způsobem je

nazývána systematická (soustavná) chyba výsledku. Složka chyby, který se v průběhu řady výsledků zkoušek mění nepředvídatelným způsobem, je nazývána náhodná chyba výsledku.

Přesnost by měla být určena z minimálně pěti měření pro každou koncentrační úroveň. Je doporučeno ověřit přesnost na minimálně třech koncentracích v rozsahu předpokládaného koncentračního rozmezí analyzované látky v reálných vzorcích. Odchylna naměřených hodnot od skutečné koncentrace nesmí přesáhnout 15 %, s výjimkou limitu kvantifikace (LLOQ), kde nemůže být vyšší než 20 %. [4, 10, 12]

Rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušek (obvykle vyjádřenou jako průměr) a přijatou referenční (skutečnou) hodnotou je nazýván odchylka; odchylka charakterizuje systematickou chybu. [4]

Poměr množství analytu získaného analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě je nazýván výtěžnost, někdy též návratnost (recovery, R). Výtěžnost R se spočítá jako:

$$R = \frac{c_{změř}}{c_{skut}} \cdot 100\% \quad \text{kde } c_{změř} \text{ je stanovená koncentrace a } c_{skut} \text{ je skutečná koncentrace. V}$$

praxi tedy výtěžnost např. vyjadřuje efektivitu metody extrakce analytu z biologické matrice. [4, 12]

2.4.2. PRECIZNOST METODY

Preciznost metody je definována jako hodnota udávající míru těsnosti shody (stupeň rozptylu) mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek vzorků získaných z jednoho homogenního zdroje. Preciznost závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah k referenční hodnotě (např. skutečné koncentraci analytu). Nezávislé výsledky jsou výsledky získané bez ovlivnění jakýmkoliv předchozím výsledkem na tomtéž nebo podobném zkoušeném vzorku. [4, 10, 12]

Preciznost by měla být ověřena pomocí minimálně pěti vzorků pro každou koncentrační úroveň a to nejméně při třech koncentracích v rozsahu předpokládaného koncentračního rozmezí. Míra preciznosti je vyjadřována jako relativní směrodatná odchylka (RSD). RSD by na žádné koncentrační úrovni neměla překročit 15 %. Výjimku tvoří nejnižší limit kvantifikace, kde je tolerována RSD až 20 %. RSD je definována jako podíl směrodatné

odchylky a absolutní hodnoty ze střední hodnoty. $RSD = \frac{100 \cdot SD}{x}$ kde x je průměr naměřených hodnot a SD je směrodatná odchylka. Relativní směrodatná odchylka RSD se udává v procentech. [4, 10, 12]

SD pro počet jednotlivých měření n a jejich jednotlivé výsledky x_i je definována jako:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Dle podmínek opakování může preciznost být vyjadřována jako opakovatelnost, mezilehlá preciznost a reprodukovatelnost.

Podmínky opakovatelnosti jsou: použití téže zkušební metody, v téže laboratoři se stejnými přístroji, stejným pracovníkem, během krátkého časového období.

Podmínky mezilehlé preciznosti měření jsou: stejný postup, stejné místo, opakování na stejném vzorku; může ale zahrnovat změny jako novou kalibraci, činidla nebo obsluhu.

Podmínky reprodukovatelnosti jsou: stejný analyt ve vzorcích téhož materiálu, jednotlivá měření jsou však prováděna za různých podmínek (experimentátor, přístroj, místo). Reprodukovatelnost je realizována pomocí mezilaboratorních porovnávacích zkoušek. [4, 10, 12]

2.4.3. LINEARITA A ROZSAH METODY

Linearita je definována jako schopnost metody poskytnout v daném rozsahu přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku. Linearita v analytické chemii je přímá závislost jedné veličiny (signál) na druhé nezávislé proměnné (koncentrace), kdy hodnota první veličiny je pouze násobkem hodnoty veličiny druhé (případně s přičtením konstanty). Obecně se jedná o přímkovou závislost. Lineární závislost je matematicky vyjádřena: $y = a + b \cdot x$, kde parametr a je úsek (posunutí) na ose y a parametr b je směrnice kalibrační přímky.

Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient R . Při lineární závislosti nabývá hodnoty ± 1 a čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější. Korelační koeficient je nejčastější způsob hodnocení

linearity. Směrnice, parametr b , je mírou citlivosti a parametr a , posun na ose y , je mírou vedlejších vlivů.

Praktický postup určení linearity metody zahrnuje přípravu nejméně 5 kalibračních roztoků o různých koncentračních úrovních pokrývajících celý rozsah metody.

Pracovní rozsah je uzavřený interval hodnot měřené veličiny ve vzorku, pro který bylo validací potvrzeno, že metoda je v něm aplikovatelná, tedy že je v něm látka stanovena s náležitou precizností, přesností a linearitou. Ohraničení tvoří zdola nejčastěji mez stanovitelnosti (lower limit of quantification, LLOQ). [4, 10, 12]

2.4.4. MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI

Mez detekce (limit of detection, LOD) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Jde tedy o nejnižší detekovatelnou koncentraci látky nestanovovanou kvantitativně. Mez stanovitelnosti (limit of quantification, LOQ) odpovídá koncentraci, při které preciznost a přesnost stanovení dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Hodnota šumu se může získat analýzou roztoku blanku.

Nejčastějšími způsoby výpočtu LOD a LOQ jsou výpočet s využitím poměru signálu a šumu, ze směrodatné odchylky odezvy a ze směrnice kalibrační přímky. Při výpočtu, který vychází ze šumu, je nutné použít směrnici b v jednotkách, ve kterých je uváděn šum (výška píku): $LOD = 3 \cdot \text{šum} / b$ $LOQ = 10 \cdot \text{šum} / b$ [4, 10, 11]

2.4.5. SELEKTIVITA METODY

Selektivita analytické metody je definována jako schopnost metody poskytnout informaci o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku i v přítomnosti interferujících látek (endogenní součásti biologické matrice, metabolity, rozkladné produkty). Selektivní metoda je tedy taková, která za určitých podmínek umožňuje přesné a správné stanovení obsahu složky vzorku i v přítomnosti směsi jiných látek.

Pro důkaz selektivity se používá analýza prázdných vzorků (blank samples) použitého biologického materiálu (plazma, moč) alespoň ze šesti zdrojů. Selektivita by měla být zajištěna i na nejnižším limitu kvantifikace (LLOQ - lower limit of quantification). ^[4, 12]

2.4.6. ROBUSTNOST METODY

Robustnost metody je definována jako míra vlivu mírného kolísání hodnot jednotlivých parametrů metody na výsledek analytického stanovení. Robustnost je také definována jako míra kapacity metody poskytovat shodné výsledky při jejím reprodukování za nepatrně změněných podmínek. Změna podmínek může nastat např. při mezilaboratorních zkouškách (jiný analytik, přístroj), nebo změnou podmínek v jedné laboratoři (teplota, doba extrakce, rychlost průtoku, pH vodné fáze atd.). ^[4]

2.5. CHELÁTORY ŽELEZA

2.5.1. ŽELEZO V LIDSKÉM ORGANISMU

Železem (Fe) zprostředkované reakce podporují dýchání téměř všech aerobních organismů. Nicméně dlouhodobý vliv nadměrného množství železa může mít mnoho patologických důsledků. Kvůli nebezpečnému vlivu železa se v těle vytvořily specializované molekuly pro příjem, transport a ukládání železa. Přenos železa do buňky se děje nejčastěji navázáním na transferin, uložení se zprostředkuje přes feritin nebo hemosiderin. [14, 15, 16, 17]

2.5.2. PŘETÍŽENÍ ORGANISMU ŽELEZEM

Buňky i celý organismus mají jen omezenou možnost jak se zbavit nadbytečného železa. Vyšší hladina volného železa v plazmě urychluje ukládání železa především do dráždivých tkání obsahujících vápníkové kanály, které umožňují transport Fe^{2+} do buňky. A protože srdeční tkáň obsahuje velké množství Ca^{2+} kanálů, činí ji to obzvláště náchylnou k přetížení železem a vzniku kardiomyopatie. Dalšími orgány náchylnými k poškození jsou slinivka (může vést k diabetu) a játra (může vést k cirhóze). [14, 15, 18, 19, 20]

Volné nadbytečné železo je pro organismus toxické, protože je katalyzováno rychlou Fentonovou reakcí, při které vznikají hydroxylové anionty OH^- i hydroxylové radikály $\text{HO}\cdot$ ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ [21, 22]). Radikály způsobují lipidovou peroxidaci vedoucí k narušení membrán. Z nich pak dochází k úniku hydrolytických enzymů, které započnou narušení buněk. [23]

V etiologii přetížení železem u některých orgánů může hrát roli, že srdce a játra mají vysokou stabilní produkci superoxidu a peroxidu vodíku. Superoxidový anion má chemický vzorec O_2^- . S jedním nepárovým elektronem je superoxidový ion volným radikálem. Produkce těchto radikálů souvisí s mitochondriální aktivitou. V postižených tkáních pacientů s přetížením železa se nachází zduřelé mitochondrie s natrženými membránami. Za pozornost stojí, že podobné abnormality pozorované u přetížení železem, např. zduřelé mitochondrie, byly pozorovány u laboratorních potkanů léčených antracyklinem mitoxantronem. [24, 25, 26, 27, 28]

2.5.3 LÉČBA ANTRACYKLINY A PŘETÍŽENÍ ŽELEZEM

Antracyklíny (např. doxorubicin, daunorubicin, epirubicin nebo mitoxantron) jsou jedny z nejčastěji užívaných léků při chemoterapii nádorových onemocnění. Jejich největší nevýhodou jsou kardiotoxické účinky, které se mohou projevit jako změny na EKG, arytmie, poruchy vedení vzruchu a myokarditida. [29, 30]

Toxicita antracyklinů byla zkoumána *in vitro* na buňkách srdeční tkáně a *in vivo* u laboratorních potkanů při podání doxorubicinu 8 mg na kg. Dávka vedla k vysoké ztrátě hmotnosti, inhibici mitochondriální funkce a zdvojnásobení mortality. Podání chelátoru železa (deferioxamin, deferipron) omezilo škodlivé účinky přetížení železem a snížilo toxicitu doxorubicinu. [31] V jiné studii byl zvířatům podáván daunorubicin a části z nich jako protekce chelátor železa pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH). Všechna zvířata, kterým byl PIH podán, přežila podání antracyklinu a navíc vykazovala menší morfologické a biochemické změny než skupina, která dostávala pouze daunorubicin. [30]

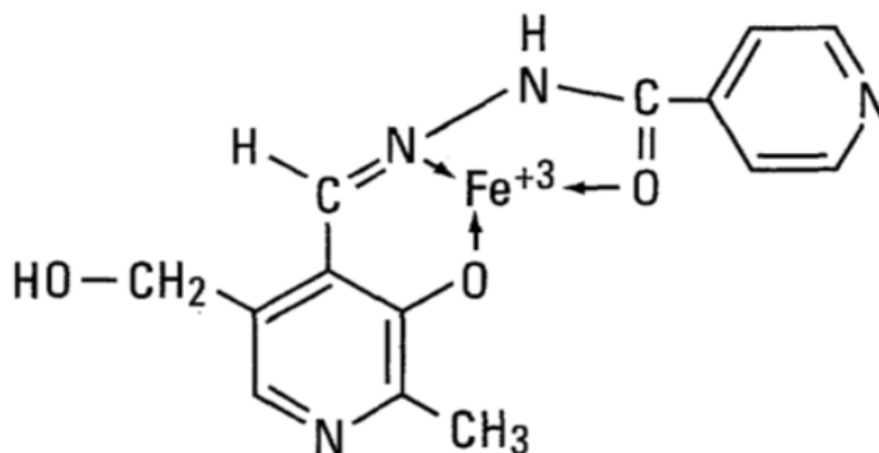
2.5.4. CHELÁTORY ŽELEZA

Podání chelátorů železa je vhodná léčba hereditární hemochromatózy i jediná možná léčba sekundárního přetížení železem. Do širokého použití se dostaly tyto tři: deferoxamin, deferipron a deferasirox. Deferoxamin je hexadentátní chelátor, který se používá od 70. let 20. století. Jeho nevýhodou je nepříjemné podkožní podání, které často vede k malé spolupráci pacienta (compliance). Novější chelátory je již možné podávat orálně: Deferipron (bidentátní) a deferasirox (tridentátní). Dentacita (vaznost) udává, kolik koordinačně kovalentních vazeb s centrálním atomem (železem) vytvoří ligand (chelátor). Koordinačně kovalentní vazba vzniká, když jeden či více atomů ligandu poskytnou centrálnímu atomu jeden nebo více elektronových párů. [14, 23]

2.5.5. PIH - PYRIDOXAL ISONIKOTINOYL HYDRAZON

Na konci 90. let 20. století byl jediným chelátorem železa v klinické praxi již zmíněný deferoxamin, kvůli jehož nízké vstřebatelnosti po perorálním podání musel být aplikován nepříjemnou několikahodinovou podkožní infuzí. Proto se objevila snaha najít vhodný chelátor, ekonomicky výhodný a dostupný pro perorální podání. Jedním takovým je pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) ze skupiny aroylhydrazonů. Trojvazný chelátor, který vykazuje schopnost vázat železo jak *in vitro* v buněčných kulturách tak *in vivo* u laboratorních potkanů a myší. Kromě toho je relativně netoxický a snadný na výrobu. [32]

Schopnost vázat železo byla u PIH (Obr. 3) objevena v 70. letech 20. století Ponkou et al. Syntéza PIH probíhá kondenzací jako Schiffova báze, z pyridoxalu (aromatický aldehyd) a isonikotinoyl hydrazonu (INH), což je kyselý hydrazid. Tato metoda je ekonomicky výhodná, protože zahrnuje jeden krok a navíc obě složky jsou lehce dostupné – pyridoxal jako jedna z forem vitamínu B6 a INH jako léčivo proti tuberkulóze.



Obr. 3: PIH váže Fe³⁺ přes fenolický kyslík, karbonylový kyslík a aldiminový dusík. [32]

Při fyziologickém pH 7,4 se PIH vyskytuje převážně (z 80 %) ve formě neutrální molekuly, což mu umožňuje absorpci ze střev i prostoupit buněčnou membránou do nitrobuněčných zásobníků železa. Pronikání do buněk je navíc usnadněno jeho malou velikostí molekuly a relativně vysokou lipofilitou. [32]

PIH váže rychle železo obou mocností, Fe^{2+} i Fe^{3+} . PIH jakožto trojvazný ligand kompletně obklopí atom železa a učiní jej nedostupný pro jiné reaktivní molekuly. Proto po vytvoření komplexu se železem nevykazuje PIH redox aktivitu v biologických podmínkách.
[33]

PIH a jeho analogy postihuje výrazná hydrolyza v buněčném médiu a v séru, k rovnováze s jejich příslušnými aldehydy a hydrazidy dojde v řádu hodin (poločas 1-8 hodin). Rozsah hydrolyzy v buněčném médiu RPMI (roztok obsahující glukózu, anorganické soli, aminokyseliny a vitamíny^[34]) je značný, i v pokusech trvajících jen hodiny. Přitom poločas PIH ve fosfátovém pufru je přibližně 24 hodin. Je proto nutné najít takové analogy, které by nebyly tolik ovlivněny hydrolyzou a vykazovaly tedy vyšší účinnost.^[35]

Následně byla stabilita PIH zkoumána pomocí techniky HPLC. Zkoušena byla sůl rozpustná ve vodě, $PIH \cdot 2HCl$, ve vodných roztocích o různém pH (2, 4, 7, 9 a 12) i za zvýšené teploty (40 °C). PIH byl nejstabilnější při pH 7, čehož bylo dosaženo fosfátovým pufrům. Naopak zvýšená teplota významně urychlila proces rozkladu a štěpení hydrazonové vazby. Analýza byla provedena za těchto chromatografických podmínek:

1) isokratické eluce:

Typ kolony: C18 kolona (250 x 4 mm) Nucleosil s náplní velikosti 5 μ m.

Mobilní fáze: směs methanolu (= složka A), a fosfátového pufru (0,01M NaH_2PO_4 v H_2O s 2mM EDTA a 5mM 1-heptansíranem sodným, pH 3; = složka B), v poměru 49:51 (v/v), s průtokem 0,9 ml/min.

UV detekce: Duální mód, vlnové délky 297 a 254 nm.

2) gradientová eluce: Byl použit gradient

0 – 6. minuta složka složka B (roztok fosf. pufru) 80 % \rightarrow 50 % (složka A: 20 \rightarrow 50 %)

6. – 18. minuta složka B 50 % \rightarrow 0 % (složka A, methanol: 50 \rightarrow 100 %)

18. - 25. minuta složka B 0 % \rightarrow 80 % (složka A: 100 \rightarrow 20 %)

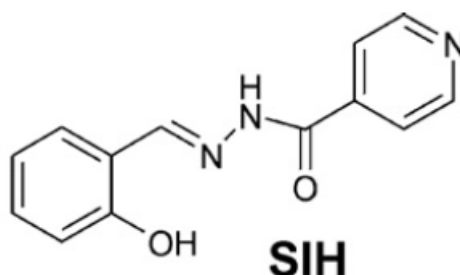
Ostatní podmínky byly stejné jako v isokratické metodě.^[36]

Dále byla zkoumána stabilita PIH a některých derivátů v biologickém médiu. Dalšími aroylhydrazony byly: salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) a pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazon (o-108). Testovány byly v RPMI buněčném médiu, v plazmě různých zvířat, v plazmatickém ultrafiltrátu a s hovězím sérovým albuminem. Stabilita analytů byla ověřena HPLC. Zatímco studie^[35] objevila rychlý rozklad aroylhydrazonů v RPMI médiu (7x

rychlejší než ve fosfátovém pufru) a předpokládala rozklad katalyzovaný aminokyselinami, stabilita v plazmě byla ještě podstatně nižší. Rychlý rozklad v plazmě, způsobený plazmatickými proteiny i složkami o nízké molekulové hmotnosti, bude mít podstatný vliv na farmakokinetiku potenciálních léčiv ze skupiny aromatických hydrazonů. [37]

2.5.6. SIH – SALICYLALDEHYD ISONIKOTINOYL HYDRAZON

Aroylhydrazony odvozené od PIH mají schopnost vázat železo a bylo prokázáno, že chrání srdce proti kardiotoxicitě způsobené dlouhodobým podáváním antracyklinů. Jedním z analogů PIH je salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) (Obr. 4), u kterého byl rovněž prokázán ochranný účinek proti oxidativnímu poškození kardiomyocytů způsobenému daunorubicinem. [38]



Obr. 4: Chemická struktura SIH [37]

SIH je žlutá krystalická látka připravená z komerčně dostupných prekurzorů salicylaldehydu a isoniazidu. Protože je SIH špatně rozpustný ve vodě o neutrálním pH, byla připravena rozpustná sůl SIH · HCl. [39] SIH je trojvazný chelátor a tvoří komplexy 2:1 se železem Fe²⁺ i Fe³⁺. Tím, že naváže železo Fe³⁺, zabrání jeho redukci na Fe²⁺. (Fe²⁺ katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku nebo kyslíku na volné radikály (např. HO·). [40]) Díky své vysoké lipofilitě může být podán perorálně a snadno proniká do buněk. [41]

SIH vykazuje velmi příznivý poměr mezi svou toxicitou a cytoprotektivním účinkem proti oxidativnímu poškození buněk, a to v porovnání např. s klinicky používanými chelátory železa jako desferoxamin, deferipron a deferasirox. [42] Např. minimalizuje *in vitro* navozený

oxidativní stres v kardiomyocytech.^[41] Dále SIH vykazuje účinky antimalarické, antituberkulotické a antiproliferativní.^[39]

Pro HPLC analýzu SIH z králičí plazmy byly jako ideální podmínky ověřeny tyto:

Typ kolony: C18 kolona (250 x 4,6mm) s náplní LiChrospher RP-18 5 µm.

Mobilní fáze: směs fosfátového pufru (0,01M NaH₂PO₄ · 2 H₂O s 2 mM EDTA, pH 6,0) a methanolu v poměru 53:47 (v/v).

Průtok: 0,9 ml/min.

UV detekce: vlnová délka 288 nm.

Jako nejlepší způsob přípravy vzorku a extrakci z biologického materiálu byla vybrána proteinová precipitace s kyselinou chloristou 0,1 M HClO₄ a acetonitrilem.

Koncentrace 0,26 µg/ml byla určena jako nejnižší mez kvantifikace (LLOQ).^[39]

Stejně jako u mateřské látky PIH, i u SIH je jeho využití omezeno krátkým poločasem v plazmě, což je způsobeno hydrolýzou labilní hydrazonové vazby.^[43, 44]

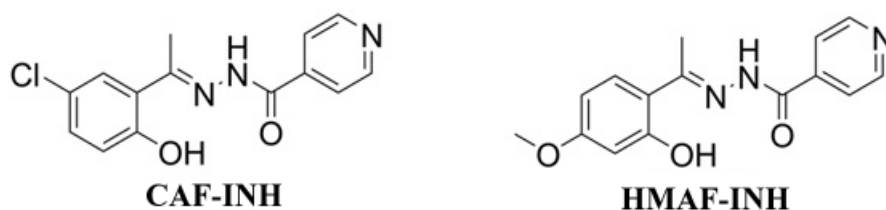
2.5.7. NOVÉ ANALOGY ODVOZENÉ OD SIH

Chelátor SIH vykazoval protektivní účinek proti oxidativnímu poškození kardiomyocytů, ale jeho využití v praxi je limitováno krátkým poločasem v plazmě. Proto byly připraveny nové sloučeniny, které by tento nedostatek měly překonat. Sloučeniny byly připraveny substitucí salicyladehydu za methyl- a ethylketonovou skupinu s různými elektronovými příjemci ve fenolickém aromatickém kruhu. Všechny připravené aroylhydrazony vykazovaly silný chelatační účinek vůči železu a většina z nich i vyšší stabilitu v plazmě než SIH, některé vykazovaly nižší toxicitu.^[43]

Předmětem analýzy budou dvě sloučeniny:

- chlor-acetofenon isonikotinoyl hydrazon, zkratkou CAF-INH, (struktura na Obr. 5), celým názvem (E)-N`-(1-(5-chloro-2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid,
- hydroxymethyl-acetofenon isonikotinoyl hydrazon, zkratkou HMAF-INH, (Obr. 6), celým názvem (E)-N`-(1-(2-hydroxy-4-methoxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid.

Obě byly připraveny na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy dle popisu^[43].



Obr. 5: Struktura chelátoru CAF-INH a Obr. 6: Struktura chelátoru HMAF-INH^[44]

CAF-INH tvoří žluté krystaly, které mají teplotu tání 236 - 238 °C. Molární hmotnost činí 289,5 g/mol.

HMAF-INH tvoří žluté krystaly, které mají teplotu tání 219 – 222 °C. Molární hmotnost činí 285 g/mol.

Schopnost vázat železo v roztoku mají obě sloučeniny podobnou jako mateřská sloučenina SIH, kdežto účinnosti SIH při testování v buňkách nedosáhla ani jedna.^[43, 44]

Při předchozích analýzách látek odvozených od SIH, hydroxyacetofenon isonikotinoyl hydrazonu (HAF-INH) a hydroxypropiofenon isonikotinoyl hydrazonu (HPF-INH), bylo zjištěno, že u nich dochází k přechodu cis/trans izomerů. V nevodném prostředí, tedy po rozpuštění do organického rozpouštědla, převažuje trans (E) izomer, jenž je stabilizován intramolekulární vodíkovou vazbou mezi fenolickým hydroxylem a N1, nad méně stabilním cis (Z) izomerem. Ve vodném prostředí a za fyziologických podmínek v plazmě částečně přechází (E) izomer na (Z) formu a ustanovuje se mezi nimi určitá rovnováha.^[45] Otázkou tedy bylo, jestli se tento jev projeví i u nových chelátorů.

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo:

- 1) Vyvinout optimální chromatografické podmínky pro HPLC analýzu čistoty CAF-INH.
- 2) Vyvinout metodu extrakce CAF-INH z plazmy.
- 3) Validovat metodu stanovení CAF-INH v plazmě: parametry linearita, preciznost, přesnost, selektivita.
- 4) Využít metodu při hodnocení stability CAF-INH v plazmě.
- 5) Vyvinout optimální chromatografické podmínky pro HPLC analýzu čistoty HMAF-INH.
- 6) Vyvinout metodu extrakce HMAF-INH z plazmy.
- 7) Validovat metodu stanovení HMAF-INH v plazmě: parametry linearita, preciznost, přesnost, selektivita.
- 8) Využít metodu při hodnocení stability HMAF-INH v plazmě.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chromatografické chemikálie, materiály, přístroje a pomůcky

4.1.1 Chemikálie

Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH),
chlor-acetofenon isonikotinoyl hydrazon (CAF-INH),
hydroxymethyl-acetofenon isonikotinoyl hydrazon (HMAF-INH),
chlor-acetofenon (CAF),
hydroxymethyl-acetofenon (HMAF),
hydroxyacetofenon isonikotinoyl hydrazon (HAF-INH)
byly syntetizovány na katedře anorganické a organické chemie FaF, UK.
Totožnost byla ověřena NMR (spektroskopie nukleární magnetické resonance).

Methanol, acetonitril a dimethylsulfoxid (DMSO) - firma Merck (Darmstadt, Německo).
Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), hydroxid sodný (NaOH) a
dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) - Lachema (Brno, ČR).
Králičí plazma - ZOO Servis (Dvůr Králové, Česká republika).
Použité chemikálie byly čistoty stupně HPLC.
Voda byla purifikována reverzní osmózou.

4.1.2 Přístroje a pomůcky

Chromatografický materiál

Chromatografická kolona 250x4 mm I. D. s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm), Merck (Německo).

Předkolona Purospher® 100, RP-18e (5 µm), Merck (Německo).

Přístroje

Analytické váhy, Helago (Česká republika).

Acidimetr 333, Drupta, Praha (Česká republika).

Vodní lázeň, Ingos, Česká Republika .

Ultrazvuková lázeň K10, Kraitek (Slovenská republika).

Chromatografický systém LC20A Prominence Shimadzu (Duisburg, Německo) sestávající z degaseru DGU-20A3, dvou pump LC-20 AD, autosampleru SIL-20 AC, termostatu kolony CTO-20AC, UV detektoru a komunikačního modulu CBM-20AC. Chromatografická data byla zpracována programem LC solution software, ver.1.21 SP1.

Pomůcky

Laboratorní sklo,

Mikropipeta,

Mikrostříkačka.

4.2. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty CAF-INH

Zkoumanými látkami byly CAF-INH, s možností výskytu dvou stereoizomerů, jeden z jeho rozkladných produktů chlor-acetofenon (CAF) a vnitřní standard HAF-INH.

Příprava roztoků

Při vývoji chromatografických podmínek byly připravovány zásobní roztoky jednotlivých analytů, o koncentraci 1 mg/ml. CAF-INH a HAF-INH (I.S.) byly rozpuštěny v DMSO, CAF byl rozpuštěn v methanolu. Pro lepší rozpuštění byly roztoky umístěny na 5 minut do ultrazvukové lázně.

Příprava mobilní fáze

Pro analýzu byl připravován fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA, upravený 0,1 mol/l roztokem NaOH na pH 6. Před použitím byl roztok přefiltrován. Smísení obou složek mobilní fáze řídil automaticky operátor.

Výběr mobilní fáze

Nastříkováno bylo 20 μl ze vzorku tvořeného 0,5 ml vody, 0,5 ml methanolu a 5 μl zásobního roztoku zkoumané látky (CAF-INH, CAF a HAF-INH) o koncentraci 1 mg/ml.

Na koloně byly vyzkoušeny tyto isokratické chromatografické podmínky:

- 1) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol, 60:40 (v/v). Průtok 1,1 ml/min.
- 2) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol, 55:45 (v/v). Průtok 1,1 ml/min.
- 3) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol, 40:60 (v/v). Průtok 1,0 ml/min.
- 4) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol, 30:70 (v/v). Průtok 1,0 ml/min.
- 5) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol : acetonitril, 50:25:25 (v/v/v). Průtok 1,0 ml/min.

6) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol : acetonitril, 40:30:30 (v/v/v). Průtok 1,0 ml/min.

Podle získaných chromatogramů byla pro analýzu CAF-INH vybrána mobilní fáze: fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH) : methanol : acetonitril, 40 : 30 : 30 (v/v/v). Průtok 1,0 ml/min.

Výběr vlnové délky detekce

Byla provedena spektrofotometrická analýza a zjištěna tato absorpční maxima:

CAF-INH: 220,0 nm, 285,5 nm, 326,5 nm.

CAF: 219,0 nm, 251,0 nm, 336,5 nm.

Pro detekci byly zvoleny tyto vlnové délky UV lampy detektoru: 285 nm (absorpční maximum CAF-INH) a 251 nm (absorpční maximum CAF).

4.3. Extrakce CAF-INH z plazmy pomocí precipitační deproteinace

Při vývoji chromatografických podmínek pro analýzu CAF-INH v plazmě byla využita HPLC metoda vyvinutá pro hodnocení čistoty. (Kapitola 4.2.)

Za účelem jednoduchosti a rychlosti procesu byla za metodu úpravy vzorku vybrána precipitační deproteinace. K precipitaci byl zvolen acetonitril (v poměru 2:1 ku plazmě).

Do 0,2 ml čisté králičí plazmy byly přidávány zkoumané látky:

- 5 μ l zásobního roztoku CAF-INH o koncentraci 1 mg/ml,
- 5 μ l zásobního roztoku HAF-INH (I.S.) o koncentraci 1 mg/ml,
- 2,5 μ l zásobního roztoku CAF o koncentraci 1 mg/ml.

Pro všechny analyzované látky byly připraveny dva vzorky. Následovalo promíchání a přidání 0,4 ml acetonitrilu. Poté byl vzorek půl minuty třepán na třepáčce, pak byl odstředován po dobu 5 minut na centrifuze při rychlosti 3000 otáček za minutu. Supernatant byl odsát mikropipetou a pipetován do vialky. Následně z něj bylo nastříknuto na kolonu.

Porovnávací vzorky obsahovaly 0,1 ml vody, 0,4 ml acetonitrilu a příslušnou zkoumanou látku.

Výtěžnost byla spočítána jako poměr plochy píku látky extrahované z plazmy ku ploše píku látky analyzované ve vodném roztoku, uvedena v procentech.

4.4. Validace metody hodnocení CAF-INH v plazmě: parametry linearita, preciznost, přesnost, selektivita

Při analytickém hodnocení v rámci validace metody byly použity chromatografické podmínky dle kapitoly 4.2. Vzorek byl upraven dle kapitoly 4.3. Metoda byla validována dle norem FDA s ohledem na linearitu, preciznost, přesnost a selektivitu. ^[12]

Pro hodnocení validačního parametru linearita byla zvolena kalibrační řada o koncentracích 10 – 20 – 30 – 50 – 80 – 100 $\mu\text{mol/l}$. Molární hmotnost CAF-INH je 289,5 g/mol; to znamená, že v 1 ml roztoku koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$ je obsaženo 28,95 μg CAF-INH. Přepočteno na objem 0,2 ml to odpovídá 5,79 μg .

Byl připraven roztok CAF-INH o obsahu 5,79 mg / 5 ml, přibližně 1,16 mg/ml. Kalibrační řada byla tvořena 6 vzorky, kde k 0,2 ml plazmy byly přidány tyto objemy výše připraveného roztoku CAF-INH: 0,5 μl - 1,0 μl – 1,5 μl – 2,5 μl – 4,0 μl – 5,0 μl .

Objem přidaného roztoku CAF-INH [μl]	0,5	1,0	1,5	2,5	4,0	5,0
Obsah látky v přidaném roztoku [μg]	0,58	1,16	1,73	2,89	4,63	5,79
Koncentrace dosažená v plazmě [$\mu\text{mol/l}$]	10	20	30	50	80	100

Jako vnitřní standard bylo přidáno 5 μl roztoku HAF-INH o koncentraci 0,5 mg/ml, což odpovídá 2,5 μg . Molární hmotnost je 255 g/mol, v 0,2 ml roztoku o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ by bylo 5,1 μg ; takže přidáním 2,5 μg byl vytvořen roztok o koncentraci 49 $\mu\text{mol/l}$.

Po úpravě vzorku bylo nastříknuto 20 μl supernatantu, každý vzorek se analyzoval dvakrát. Dle závislosti poměru plochy píku CAF-INH ku ploše píku vnitřního standardu na koncentraci CAF-INH v plazmě byla sestrojena kalibrační křivka linearit.

Obdobně byly připraveny vzorky pro validační parametry přesnost a preciznost. Analyzováno bylo pět nezávisle připravených vzorků na třech koncentračních úrovních: 10 – 50 – 100 $\mu\text{mol/l}$, tedy k 0,2 ml plazmy bylo přidáno 0,5 μl – 2,5 μl – 5 μl roztoku CAF-INH o koncentraci 1,16 mg/ml. Každý vzorek byl analyzován dvakrát.

Preciznost byla stanovena na úrovni opakovatelnosti a byla vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou (RSD) pro každou úroveň koncentrace analytu.

Při ověření přesnosti byly výsledky, vyjádřené jako procento výtěžnosti, vypočteny z hodnot získaných při měření preciznosti metody zpětným výpočtem z kalibrační křivky.

Selektivita byla ověřena analýzou 6 blankových vzorků králičí plazmy na začátku měření. Validační měření byla vždy prováděna s čerstvými roztoky analytů.

4.5. Studie stability CAF-INH v plazmě

Pro studii stability v plazmě byly použity chromatografické podmínky dle kapitoly 4.2. Vzorek byl upraven extrakcí z plazmy, kapitola 4.3.

Bylo odebráno, připraveno a analyzováno 2x14 vzorků v časovém rozmezí 0 – 10 hodin:
0 – 20 – 40 – 60 – 90 – 120 – 180 – 240 – 300 – 360 – 420 – 480 – 540 – 600 minut.

Použito bylo 2x 3 ml králičí plazmy a 2x 75 μ l roztoku CAF-INH o koncentraci 1,16 mg/ml. Množství roztoku analytu bylo voleno tak, aby se v plazmě dosáhlo koncentrace 100 μ mol/l (75 μ l roztoku CAF-INH ve 3 ml plazmy odpovídá 25 μ l v 1 ml, to odpovídá koncentraci 100 μ mol/l).

Dvě zkumavky s králičí plazmou a přidaným CAF-INH byly umístěny v temperované vodní lázni (37 °C), pro udržení homogenity lázně bylo přidáno míchadélko (120 otáček za minutu). V určených časových intervalech bylo z každé zkumavky odebráno 0,2 ml plazmy s CAF-INH a bylo přidáno 5 μ l roztoku vnitřního standardu (HAF-INH) o koncentraci 0,5 mg/ml.

Po úpravě vzorku se nastříkovalo 20 μ l, každý vzorek se analyzoval dvakrát. Stabilita byla vyjádřena jako úbytek plochy CAF-INH v čase.

4.6. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty HMAF-INH

Zkoumanými látkami byly hydroxymethyl-acetofenon isonikotinoyl hydrazon (HMAF-INH), s možností výskytu dvou stereoizomerů, jeden z jeho rozkladných produktů hydroxymethyl-acetofenon (HMAF) a vnitřní standardy – testovány byly dvě látky, HAF-INH a SIH.

Příprava roztoků

Při vývoji chromatografických podmínek byly připravovány zásobní roztoky jednotlivých analytů, o koncentraci 1 mg/ml. HMAF-INH, HAF-INH (I.S.) a SIH (I.S.) byly rozpuštěny v DMSO, HMAF byl rozpuštěn v methanolu. Pro lepší rozpuštění byly roztoky umístěny na 5 minut do ultrazvukové lázně.

Příprava mobilní fáze

Pro analýzu byl připravován fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA, upravený 0,1 mol/l roztokem NaOH na pH 6. Před použitím byl roztok přefiltrován. Smísení obou složek mobilní fáze řídil automaticky operátor.

Výběr mobilní fáze

Nastříkováno bylo 20 μl vzorku tvořeného 0,5 ml vody, 0,5 ml methanolu a 5 μl zásobního roztoku zkoumané látky (HMAF-INH, HMAF, HAF-INH, SIH) o koncentraci 1 mg/ml.

Na koloně byly vyzkoušeny tyto isokratické chromatografické podmínky:

- 1) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol, 45:55 (v/v). Průtok 1,0 ml/min.
- 2) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol, 42:58 (v/v). Průtok 1,0 ml/min.
- 3) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol, 40:60 (v/v). Průtok 1,0 ml/min.
- 4) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol : acetonitril, 40:30:30 (v/v/v). Průtok 1,0 ml/min.

5) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol : acetonitril, 50:25:25 (v/v/v). Průtok 1,0 ml/min.

6) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6) : methanol : acetonitril, 58:21:21 (v/v/v). Průtok 1,0 ml/min.

Podle získaných chromatogramů byla pro analýzu HMAF-INH vybrána mobilní fáze: fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA (pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH) : methanol : acetonitril, 50:25:25 (v/v/v). Průtok 1,0 ml/min.

Výběr vlnové délky detekce

Byla provedena spektrofotometrická analýza a podle zjištěných absorpčních maxim byla UV lampa detektoru nastavena na vlnové délky:

328 nm (absorpční maximum HMAF-INH),

275 nm (absorpční maximum HMAF).

4.7. Extrakce HMAF-INH z plazmy pomocí precipitační deproteinace

Pro vývoj chromatografických podmínek analýzy HMAF-INH v plazmě byla využita HPLC metoda vyvinutá pro hodnocení čistoty (Kapitola 4.6.)

Pro úpravu vzorku byla vybrána precipitační deproteinace, kvůli své jednoduchosti a rychlosti. K precipitaci byl zvolen acetonitril v poměru 2:1 ku plazmě.

Do 0,2 ml čisté králičí plazmy byla přidána zkoumaná látka:

- 5 µl zásobního roztoku HMAF-INH o koncentraci 1 mg/ml.

Byly připraveny dva vzorky. Vzorky byly promíchány a bylo k nim přidáno 0,4 ml acetonitrilu. Následně byl vzorek půl minuty třepán na třepačce, pak byl odstředován po dobu 5 minut na centrifuze při rychlosti 3000 otáček za minutu. Supernatant byl odsát mikropipetou a pipetován do vialky.

Porovnávací vzorek obsahoval 0,1 ml vody, 0,4 ml acetonitrilu a příslušnou zkoumanou látku.

Výtěžnost byla spočítána jako poměr plochy píku látky extrahované z plazmy ku ploše píku látky analyzované ve vodném roztoku, uvedena v procentech.

4.8. Validace metody hodnocení HMAF-INH v plazmě: parametry linearita, preciznost, přesnost, selektivita

Při analytickém hodnocení v rámci validace metody byly použity chromatografické podmínky dle kapitoly 4.6. Vzorek byl upraven dle kapitoly 4.7. Metoda byla validována dle norem FDA s ohledem na linearitu, preciznost, přesnost a selektivitu. [12]

Pro hodnocení validačního parametru linearita byla zvolena kalibrační řada o koncentracích 10 – 20 – 30 – 50 – 80 – 100 $\mu\text{mol/l}$. Molární hmotnost HMAF-INH je 285 g/mol; to znamená, že v 1 ml roztoku koncentrace 100 $\mu\text{mol/l}$ je obsaženo 28,5 μg HMAF-INH. Pro objem 0,2 ml to odpovídá 5,7 μg .

Byl připraven roztok HMAF-INH o obsahu 5,7 mg/5 ml, tedy 1,14 mg/ml. Koncentrační řada byla tvořena 6 vzorky, kde k 0,2 ml plazmy byly přidány tyto objemy výše uvedeného roztoku HMAF-INH: 0,5 μl - 1,0 μl – 1,5 μl – 2,5 μl – 4 μl – 5 μl .

Objem přidaného roztoku HMAF-INH [μl]	0,5	1,0	1,5	2,5	4,0	5,0
Obsah látky v přidaném roztoku [μg]	0,57	1,14	1,71	2,85	4,56	5,7
Koncentrace dosažená v plazmě [$\mu\text{mol/l}$]	10	20	30	50	80	100

Jako vnitřní standard bylo přidáno 5 μl roztoku SIH o koncentraci 0,5 mg/ml, to odpovídá 2,5 μg . Molární hmotnost SIH činí 241 g/mol, v 0,2 ml roztoku o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ by bylo 4,82 μg ; přidáním 2,5 μg byl vytvořen roztok o koncentraci 52 $\mu\text{mol/l}$.

Po úpravě vzorku bylo nastříknuto 20 μl supernatantu, každý vzorek se analyzoval dvakrát. Dle závislosti poměru plochy píku HMAF-INH ku ploše píku vnitřního standardu na koncentraci HMAF-INH v plazmě byla sestrojena kalibrační křivka linearity.

Obdobně byly připraveny vzorky pro validační parametry přesnost a preciznost. Analyzováno bylo pět nezávisle připravených vzorků na třech koncentračních úrovních: 10 – 50 – 100 $\mu\text{mol/l}$, tedy k 0,2 ml plazmy bylo přidáno 0,5 μl – 2,5 μl – 5 μl roztoku HMAF-INH o koncentraci 1,14 mg/ml. Každý vzorek byl analyzován dvakrát.

Preciznost byla stanovena na úrovni opakovatelnosti a byla vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou (RSD) pro každou úroveň koncentrace analytu.

Při ověření přesnosti byly výsledky, vyjádřené jako procento výtěžnosti, vypočteny z hodnot získaných při měření preciznosti metody zpětným výpočtem z kalibrační křivky.

Selektivita byla ověřena analýzou 6 blankových vzorků králičí plazmy na začátku měření. Validaci měření byla vždy prováděna s čerstvými roztoky analytů.

4.9. Studie stability HMAF-INH v plazmě

Pro studii stability v plazmě byly použity chromatografické podmínky dle kapitoly 4.6. Vzorek byl upraven extrakcí z plazmy, kapitola 4.7.

Bylo odebráno, připraveno a analyzováno 2x14 vzorků v časovém rozmezí 0 – 10 hodin: 0 – 20 – 40 – 60 – 90 – 120 – 180 – 240 – 300 – 360 – 420 – 480 – 540 – 600 minut.

Použito bylo 2x 3 ml králičí plazmy a 2x 75 μ l roztoku HMAF-INH o koncentraci 1,14 mg/ml. Množství roztoku analytu bylo voleno tak, aby se v plazmě dosáhlo koncentrace 100 μ mol/l (75 μ l roztoku HMAF-INH ve 3 ml plazmy odpovídá 25 μ l v 1 ml, to odpovídá koncentraci 100 μ mol/l).

Dvě zkumavky s králičí plazmou a přidaným HMAF-INH byly uloženy v temperované vodní lázni (37 °C), pro udržení homogenity bylo přidáno míchadélko (120 otáček za minutu). V určených časových intervalech bylo z každé zkumavky odebráno 0,2 ml plazmy s HMAF-INH a bylo přidáno 5 μ l roztoku vnitřního standardu (SIH) o koncentraci 0,5 mg/ml.

Po úpravě vzorku se nastříkovalo 20 μ l, každý vzorek se analyzoval dvakrát. Stabilita byla vyjádřena jako úbytek plochy HMAF-INH v čase.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty CAF-INH

Vývoj ideálních chromatografických podmínek spočívá ve výběru vhodné stacionární fáze, mobilní fáze, průtoku a vlnové délky UV detekce. Úkolem je nastavit podmínky tak, aby píky analyzovaných látek spolu na chromatogramu neinterferovaly, tedy byly oddělené až na základní linii, aby byly píky ostré a symetrické a aby analýza netrvala zbytečně dlouho. Např. píky zkoumané látky a jejího rozkladného produktu se nesmí překrývat kvůli studii stability. Jako vnitřní standard (I.S.) byl použit HAF-INH. Splňoval požadavky na vnitřní standard kladené, tedy aby byl eluován v blízkosti píku zkoumané látky CAF-INH, ale přitom byl dobře oddělen od všech složek vzorku. (Kapitola 2.2.3.)

Stacionární fáze

V začátku vývoje HPLC analýzy sloučeniny CAF-INH bylo možné vycházet z chromatografických podmínek použitých pro analýzu plazmatické koncentrace salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH). Analýzy probíhaly na koloně 250x4 mm s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm). Dostatečné separace jednotlivých analytů i přijatelné rychlosti analýzy bylo dosaženo pouze změnami mobilní fáze, proto jiné kolony nebyly testovány.

Mobilní fáze

Nejprve bylo snahou nalézt vhodnou dvousložkovou mobilní fázi pro analýzu za isokratických podmínek. Vyzkoušeny byly různé poměry vodné složky (fosfátový pufr s EDTA o pH 6) a methanolu při různých průtocích, ale žádný nevedl k optimálním výsledkům. Při nižším podílu organické fáze se sloučeniny zadržovaly na koloně a analýza byla zdlouhavá. Při vysokém podílu organické fáze nedocházelo k dostatečné separaci píků. Proto byla vyzkoušena mobilní fáze, kde její organickou složku tvořila směs methanolu a acetonitrilu v poměru 1 : 1 a dále byly zkoušeny různé poměry této organické složky a vodné složky.

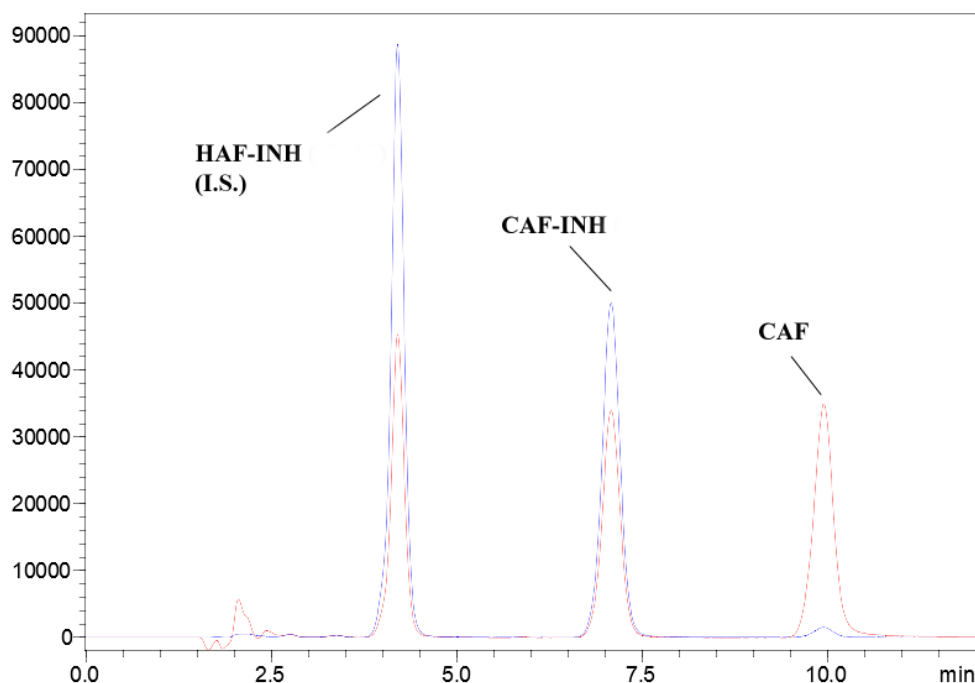
EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová, resp. její disodná sůl) se přidává, aby jako chelátor na sebe případně navázala atomy železa, které se mohou při analýze uvolnit z kolony a které mohou reagovat se zkoumanou látkou. Proto bylo možné předpokládat, že přídavek EDTA bude mít pozitivní vliv na tvar píků.

Podle získaných chromatogramů byla jako nejvhodnější mobilní fáze vybrána směs: fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA o pH 6 (bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH) : methanol : acetonitril, 40:30:30 (v/v/v). Průtok 1,0 ml/min.

(Ukázkový chromatogram separace je zobrazen na Obr. 7)

Detekce

Na počátku vývoje metody bylo změřeno absorpční spektrum CAF-INH a CAF; podle jejich maxim 285 nm, resp. 251 nm byla nastavena vlnová délka detekce.



Obr. 7: Chromatogram, analýza čistoty CAF-INH.

Detekce o dvou vlnových délkách: modrá linie 285 nm, červená linie 251 nm.

Isokratická eluce, fosfátový pufr s EDTA : methanol : acetonitril, 40:30:30.

Retenční časy: HAF-INH (I.S.): 4,2 min
CAF-INH: 7,1 min
CAF: 9,9 min

5.2. Analýza CAF-INH v plazmě

Při analýze CAF-INH v králičí plazmě byla využita HPLC metoda vyvinutá pro hodnocení čistoty. (Kapitoly 4.2. a 5.1.)

5.2.1. Extrakce CAF-INH z plazmy

Pro úpravu vzorku, králičí plazmu s obsahem zkoumaných látek, byla vybrána precipitační deproteinace, jakožto rychlá a jednoduchá metoda. Jako vhodné a účinné činidlo byl vybrán acetonitril^[9] (přídavek 0,4 ml acetonitrilu k 0,2 ml plazmy). (Kapitola 4.3.)

V tabulce (Tab. 1) jsou uvedeny plochy zkoumaných látek získané analýzou spikované plazmy a vodného roztoku. Jejich poměrem je vypočtena výtěžnost extrakce z plazmy.

Tab. 1: Extrakce CAF-INH z plazmy, výtěžnost vůči stanovení z vody.

	plazma 1	plazma 2	voda	výtěžnost 1	výtěžnost 2	průměr	S.D.
CAF-INH	700637	678953	863446	81,14 %	78,63 %	79,89 %	1,78
I.S. (HAF-INH)	954400	951284	1124554	84,87 %	84,59 %	84,73 %	0,20
CAF	390061	522539	683016	57,11 %	76,50 %	66,81 %	13,71

Použitím této metody bylo při extrakci z plazmy vůči měření ve vodném roztoku dosaženo výtěžnosti:

CAF-INH: $79,89 \pm 1,78$ %,

rozkladný produkt CAF $66,81 \pm 13,71$ %,

vnitřní standard HAF-INH $84,73 \pm 0,20$ %.

5.2.2. Analýza CAF-INH v plazmě, validace metody: parametr linearita

Linearita metody byla prokázána v rozmezí koncentrací 10 – 100 $\mu\text{mol/l}$. Protože v králičí plazmě došlo k přechodům mezi (E) a (Z) izomery CAF-INH, byly sečteny plochy píků obou izomerů. Byla použita metoda vnitřního standardu – HAF-INH.

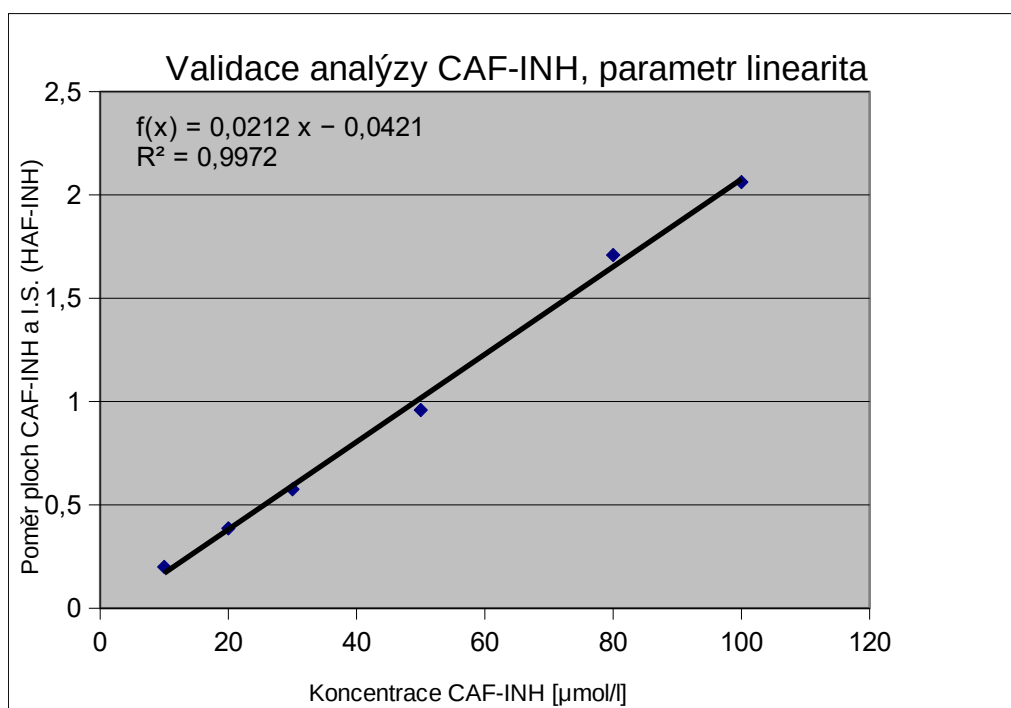
Výsledné hodnoty jsou průměr ze dvou analýz a jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2.).

Tab. 2: Analýza CAF-INH v králičí plazmě, validace metody, parametr linearita:

Koncentr. teoretická [$\mu\text{mol/l}$]	9,83	19,65	29,48	49,14	78,62	98,28
CAF-INH (plocha)	52826	104564	157542	255850	415429	551635
I.S. (HAF-INH) (plocha)	266595	270790	272826	266801	262394	266007
CAF-INH/ I.S. (HAF-INH)	0,1981	0,3861	0,5775	0,9589	1,5832	2,0737
Koncentrace změřená [$\mu\text{mol/l}$] (dle kalibrační křivky)	11,41	20,20	29,16	47,22	82,60	99,26
Konc. změř. vs konc. teor. [%]	116,09	102,77	98,75	96,10	105,06	101,00

Po vyhodnocení chromatografických záznamů byla sestrojena kalibrační křivka, která vykazuje lineární průběh v rozmezí daných koncentrací. (Obr. 8) Její parametry jsou:

Rovnice regresní přímky: $y = 0,0212x - 0,0421$. Koeficient determinace $R^2 = 0,9972$, korelační koeficient $R = 0,9986$.



Obr. 8: Linearita, závislost poměru ploch CAF-INH/ I.S. na koncentraci CAF-INH.

Při validaci metody je zásadní stanovit odchylky koncentrace vypočtené dle kalibrační přímky od hodnot teoretických. Je nutné splnění podmínek^[12] alespoň u 4 ze 6 vzorků: aby maximální odchylka byla 15 %, resp. 20 % na dolním limitu kvantifikace. Zde podmínky byly splněny, lze kalibrační přímku použít pro kvantifikaci analytu a metodu považovat za lineární.

5.2.3. Analýza CAF-INH v plazmě, validace metody: parametry preciznost a přesnost

Validační parametry preciznost a přesnost, pro analýzu CAF-INH v králičí plazmě, byly prokázány na třech koncentračních úrovních 10 – 50 – 100 $\mu\text{mol/l}$ (chromatogram na Obr. 9). Pro každou koncentraci bylo připraveno 5 vzorků, každý byl analyzován dvakrát. CAF-INH se v plazmě vyskytoval ve formě dvou stereoizomerů, plochy jejich píků byly sečteny. Jako vnitřní standard byl použit HAF-INH.

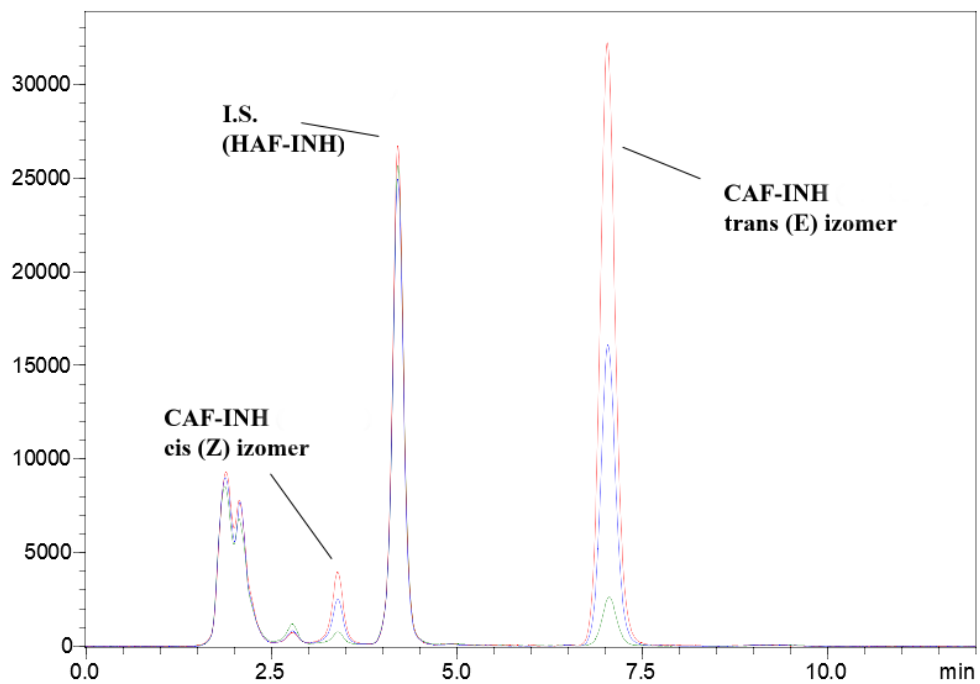
Výsledné hodnoty jsou průměr z 10 analýz (uvedeny v Tab. 3). Změřená koncentrace byla odvozena od rovnice regresní přímky: $y = 0,0212x - 0,0421$; kde x je koncentrace a y poměr ploch látky a vnitřního standardu (CAF-INH/ HAF-INH). Koncentrace x se tedy spočítá dle vzorce: $x = (y + 0,0421) / 0,0212$.

Tab. 3: Analýza CAF-INH v plazmě, validace metody: parametry preciznost a přesnost

Koncentrace teoretická [$\mu\text{mol/l}$]	9,82	49,14	98,28
Koncentrace změřená [$\mu\text{mol/l}$]	11,14	46,97	86,97
Směrodatná odchylka	0,39	1,36	7,22
Přesnost^a [%]	113,39	95,59	88,50
Preciznost^b, RSD (n = 10) [%]	3,47	2,90	8,30

^a Přesnost = koncentrace změřená \cdot 100 % / koncentrace teoretická

^b RSD = SD \cdot 100% / c, kde c je průměrná hodnota změřené koncentrace



Obr. 9: Chromatogram, analýza CAF-INH v králičí plazmě, validace metody, 285 nm.

Koncentrace 10 µmol/l (zelená linie) – 50 µmol/l (modrá) – 100 µmol/l (červená linie)

Retenční časy: CAF-INH, cis (Z) izomer: 3,4 min

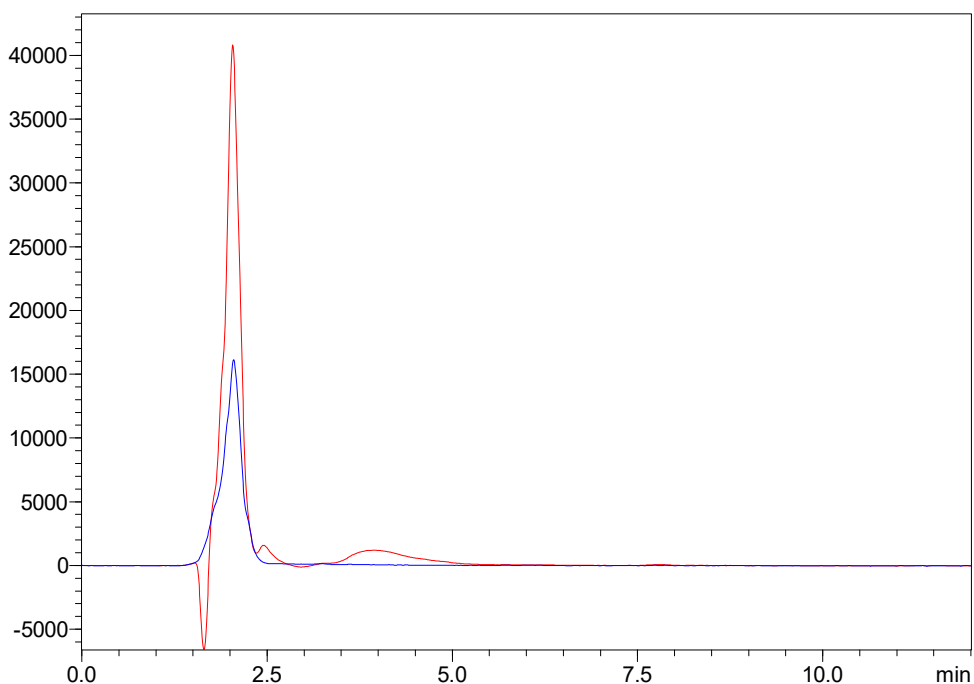
I.S. (HAF-INH) 4,2 min

CAF-INH, trans (E) izomer: 7,0 min

Výsledky preciznosti a přesnosti studované v rámci jednoho dne splňují kritéria požadovaná směrnicí FDA ^[12] pro validaci bioanalytických metod.

5.2.4. Analýza CAF-INH v plazmě, validace metody: parametr selektivita

Selektivita metody hodnocení CAF-INH v plazmě byla ověřena analýzou prázdné králičí plazmy. Z chromatografického záznamu (Obr. 10) je patrné, že nedochází k interferenci endogenních látek králičí plazmy s píky zkoumaných látek CAF-INH, CAF a vnitřního standardu (HAF-INH).



Obr. 10: Chromatogram prázdné králičí plazmy, z validace analýzy CAF-INH, zaznamenaný pro dvě vlnové délky (modrá linie 285 nm, červená linie 251 nm).

5.2.5. Stabilita CAF-INH v plazmě

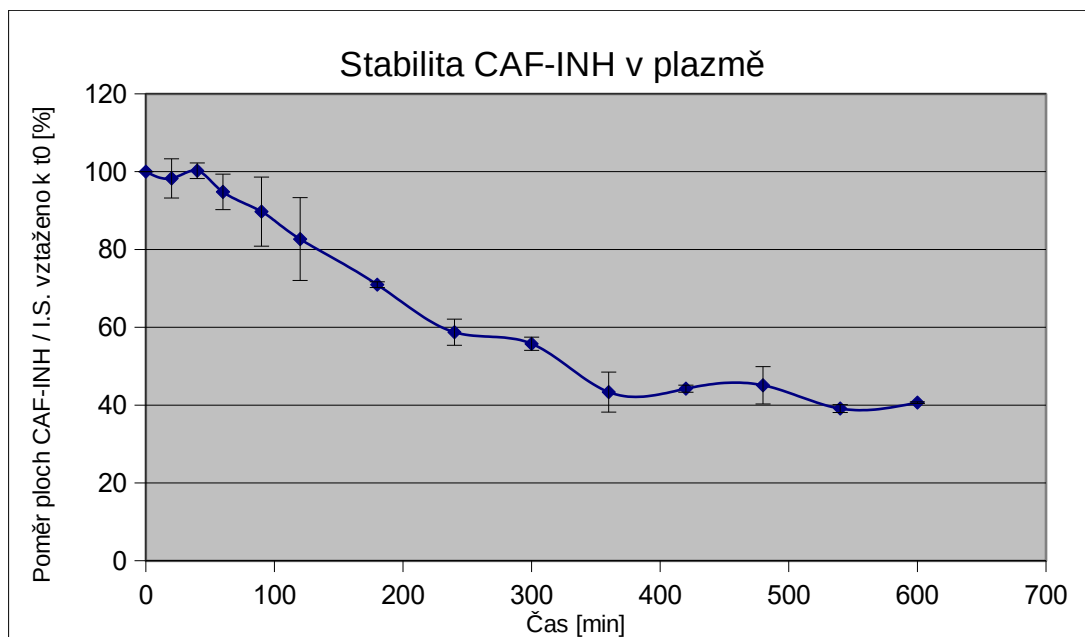
Stabilita v králičí plazmě byla zaznamenána jako pokles plochy píku v závislosti na čase. Stabilita CAF-INH v plazmě byla hodnocena za fyziologicky relevantních podmínek (teplota 37 °C). Součet ploch píků obou izomerů byl vydělen plochou vnitřního standardu (HAF-INH). Následně byly poměry vyděleny hodnotou podílu v čase $t_0 = 0$ minut a převedeny na procenta. Výsledné hodnoty uvedené v tabulce (Tab. 4) jsou průměry ze čtyř analýz. V tabulce je rovněž uvedena rostoucí plocha rozkladného produktu (R.P.) CAF.

Tab. 4: Stabilita CAF-INH v králičí plazmě.

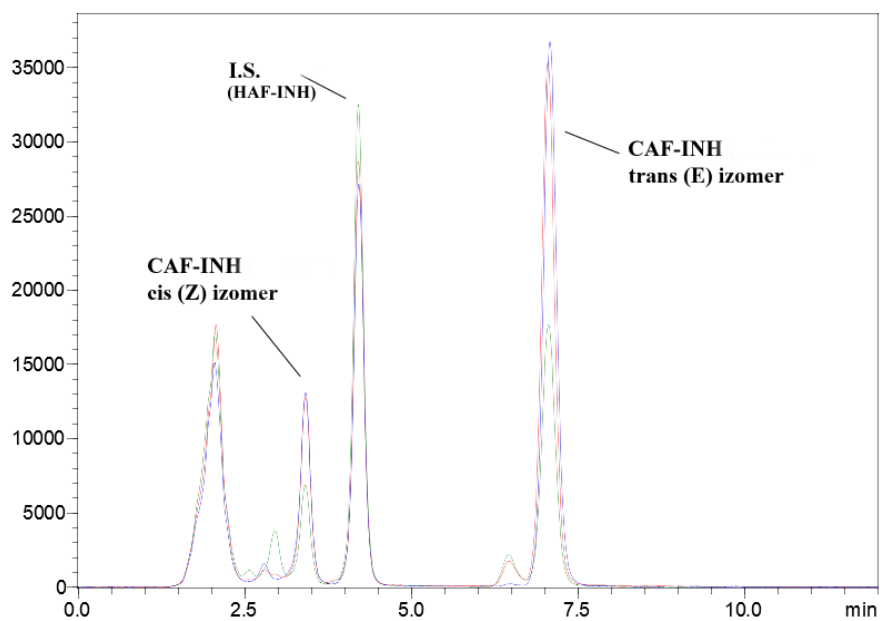
čas [min]	0	20	40	60	90	120	180	240	300	360	420	480	540	600
CAF-INH	638	629	614	628	591	563	497	405	411	381	343	342	311	321
I.S.	296	297	284	307	305	316	325	319	341	407	360	352	368	366
R.P.	2,46	2,97	3,36	4,23	5,44	8,12	9,3	12,5	14,4	16,8	18,4	20	20	21,7
CAF-INH / t_0	100	98,6	96,3	98,6	92,7	88,3	78	63,5	64,4	59,7	53,8	53,7	48,7	50,3
CAF-INH/IS	2,16	2,12	2,16	2,04	1,94	1,78	1,53	1,27	1,2	0,93	0,95	0,97	0,84	0,88
CAFIH/IS/t_0	100	98,5	100	94,9	90,4	82,9	71	58,8	55,8	43,9	44,2	45,3	39,1	40,7
S.D. (n=4)	0	5,03	2,01	4,57	8,87	10,6	0,74	3,36	1,70	5,13	0,91	4,81	0,99	0,20
RSD [%]	0	5,11	2,01	4,81	9,81	12,8	1,04	5,71	3,05	11,7	2,05	10,6	2,54	0,50

Plocha u látek uvedena v tisících. Poměry plochy CAF-INH k ploše v čase $t_0 = 0$ min jsou označeny „CAF-INH / t_0 “, uvedeny v [%]. Poměr zkoumané látky CAF-INH a vnitřního standardu (I.S.) je označen „CAF-INH/IS“. Poměr „CAF-INH/IS“ vztažený k poměru v čase $t_0 = 0$ min je označen jako „CAFIH/IS/ t_0 “, uveden v [%].

Po 1 hodině v králičí plazmě zbylo $94,9 \pm 4,6$ % CAF-INH, po 3 hodinách $71 \pm 0,7$ % a po 10 hodinách zůstalo nerozložených $40,7 \pm 0,2$ %. CAF-INH se tedy projevil jako výrazně stabilnější v plazmě než původní látka SIH, který má v králičí plazmě poločas rozkladu přibližně půl hodiny^[37]. (Na Obr. 11 grafický záznam stability a na Obr. 12 chromatogram ze stabilitní studie.)



Obr. 11: Stabilita CAF-INH v králičí plazmě.



Obr. 12: Chromatogram, studie stability CAF-INH v králičí plazmě, 285 nm.

Vzorky v časech 0 min (modrá linie) – 60 min (červená) – 600 min (zelená).

Retenční časy: CAF-INH, cis (Z) izomer: 3,4 min

I.S. (HAF-INH): 4,2 min

CAF-INH, trans (E) izomer: 7,0 min.

5.3. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty HMAF-INH

Vývoj ideálních chromatografických podmínek spočívá ve výběru vhodné stacionární fáze, mobilní fáze, průtoku a vlnové délky UV detekce. Úkolem je nastavit podmínky tak, aby píky analyzovaných látek spolu na chromatogramu neinterferovaly, tedy byly oddělené až na základní linii, aby píky byly ostré a symetrické, a to vše v přijatelném čase.

Jako vnitřní standard (I.S.) byly testovány dvě látky, HAF-INH a SIH. Požadavky na vnitřní standard kladené, tedy eluce v blízkosti píku zkoumané látky (HMAF-INH), ale přitom dostatečná separace od všech složek vzorku (kapitola 2.2.3.), lépe splňoval SIH.

Stacionární fáze

V začátku vývoje HPLC analýzy sloučeniny HMAF-INH bylo možné vycházet z chromatografických podmínek použitých pro analýzu plazmatické koncentrace salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH). Analýzy probíhaly na koloně 250x4 mm s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm). Dostatečné separace jednotlivých analytů i přijatelné rychlosti analýzy bylo dosaženo pouze změnami mobilní fáze, proto jiné kolony nebyly testovány.

Mobilní fáze

Nejprve bylo snahou nalézt vhodnou dvousložkovou mobilní fázi pro analýzu za isokratických podmínek. Vyzkoušeny byly různé poměry vodné složky (fosfátový pufr s EDTA o pH 6) a methanolu při průtoku 1,0 ml/min, ale žádný nevedl k optimálním výsledkům. Při vyšším podílu organické fáze nedocházelo k dostatečné separaci píků. Při nižším podílu organické fáze analýza trvala ke 20 minutám (chromatogram na Obr. 13), což pro hodnocení většího množství vzorků nebylo vhodné. Proto byla vyzkoušena mobilní fáze, kde její organickou složku tvořila směs methanolu a acetonitrilu v poměru 1 : 1 a dále byly zkoušeny různé poměry této organické složky a vodné složky.

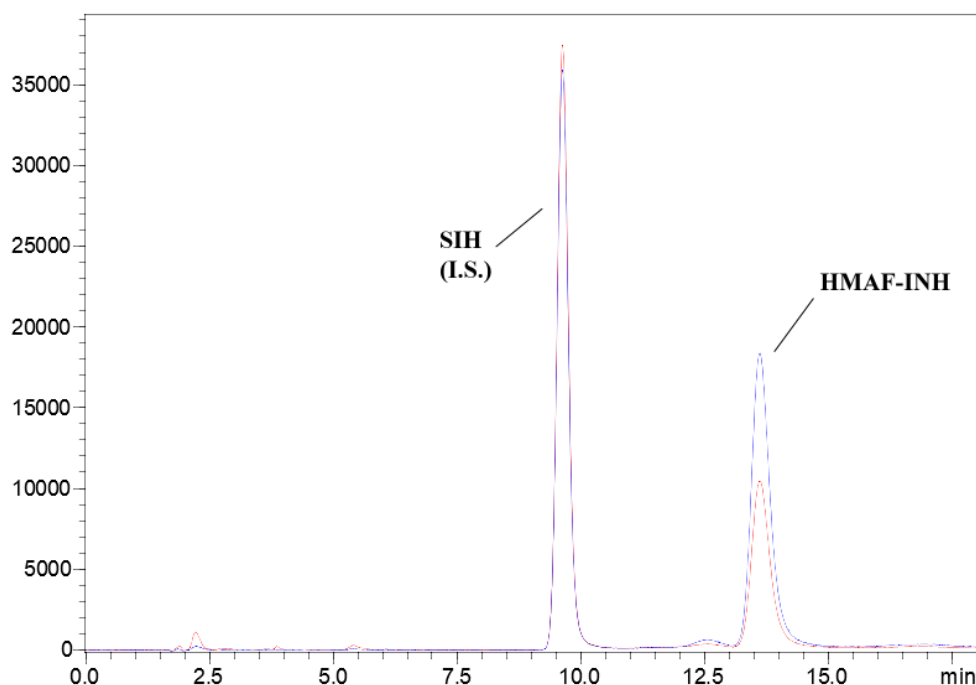
Podle získaných chromatogramů byla jako nejvhodnější mobilní fáze vybrána směs:

fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 (bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH) : methanol : acetonitril, 50:25:25 (v/v/v). Průtok 1,0 ml/min.

EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová, resp. její disodná sůl) se přidává, aby jako chelátor na sebe případně navázala atomy železa, které se mohou při analýze uvolnit z kolony a které mohou reagovat se zkoumanou látkou. Proto bylo možné předpokládat, že přídavek EDTA bude mít pozitivní vliv na tvar píků.

Detekce

Na počátku vývoje metody bylo změřeno absorpční spektrum HMAF-INH a jeho rozkladného produktu HMAF. Podle získaných absorpčních maxim 328 nm (HMAF-INH) a 275 nm (HMAF) byl na takové vlnové délky nastaven UV detektor.



Obr. 13: Chromatogram, analýza čistoty HMAF-INH.

Detekce o dvou vlnových délkách: modrá linie 328 nm, červená linie 275 nm.

„Testování mobilní fáze s nižším obsahem organické složky.“

Retenční časy: SIH (I.S.): 9,5 min

HMAF-INH: 13,4 min

HMAF se do konce analýzy v čase 18 min nestihl eluovat.

5.4. Analýza HMAF-INH v plazmě

Při analýze HMAF-INH v králičí plazmě byla využita HPLC metoda vyvinutá pro hodnocení čistoty. (Kapitoly 4.6. a 5.3.)

5.4.1. Extrakce HMAF-INH z plazmy

Pro úpravu vzorku, králičí plazmu s obsahem zkoumané látky, byla vybrána precipitační deproteinace, jakožto rychlá a jednoduchá metoda. Jako vhodné a účinné činidlo byl vybrán acetonitril^[9] (přídavek 0,4 ml acetonitrilu k 0,2 ml plazmy). (Kapitola 4.7.)

V tabulce (Tab. 5) jsou uvedeny plochy zkoumané látky získané analýzou spikované plazmy a vodného roztoku. Jejich poměrem je vypočtena výtěžnost extrakce z plazmy.

Tab. 5: Extrakce HMAF-INH z plazmy, výtěžnost vůči stanovení z vody.

	plazma 1	plazma 2	voda	výtěžnost 1	výtěžnost 2	průměr	S.D.
HMAF-INH	530921	580327	598106	88,77 %	97,03 %	92,90 %	5,84

Použitím této metody bylo při extrakci HMAF-INH z plazmy vůči měření ve vodném roztoku dosaženo výtěžnosti $92,90 \pm 5,84$ %.

5.4.2. Analýza HMAF-INH v plazmě, validace metody: parametr linearita

Linearita metody byla prokázána v rozmezí koncentrací přibližně 10 – 100 $\mu\text{mol/l}$. Kvůli vyšší návážce 1,22 místo 1,14 mg/ml byla koncentrace přepočítána. Byla použita metoda vnitřního standardu - SIH.

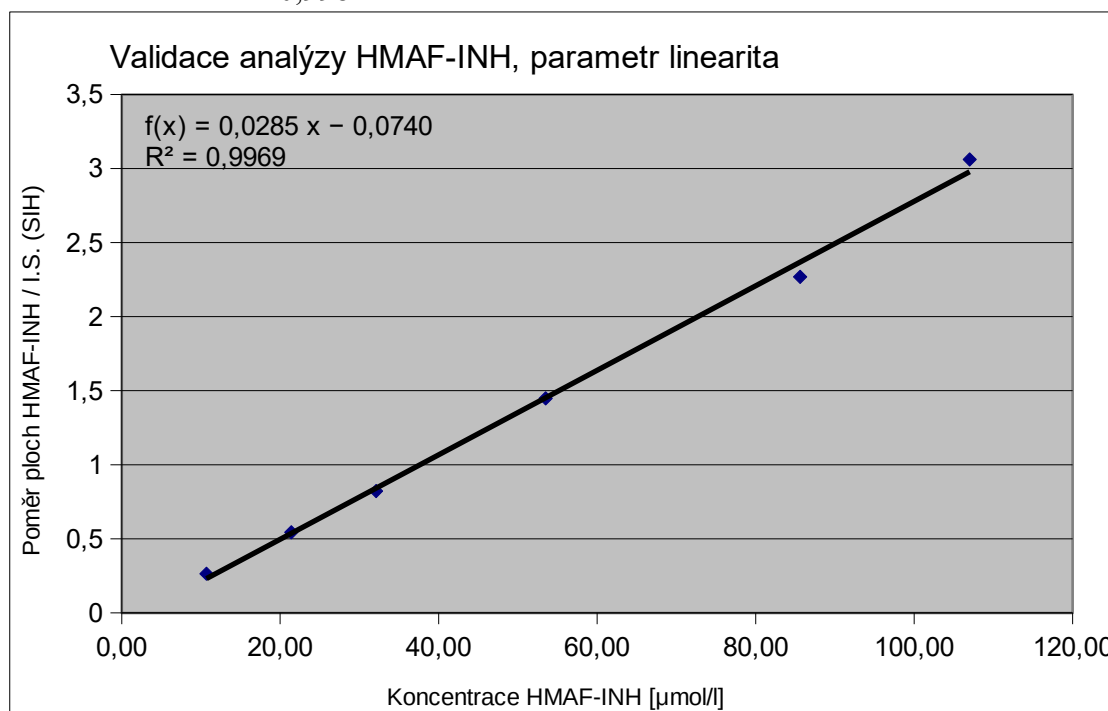
Výsledné hodnoty jsou průměr ze dvou analýz a jsou uvedeny v tabulce (Tab. 6).

Tab. 6: Analýza HMAF-INH v králičí plazmě, validace metody, parametr linearita:

Koncentr. teoretická [$\mu\text{mol/l}$]	10,70	21,40	32,11	53,51	85,61	107,02
HMAF-INH (plocha)	86080	174893	249073	414312	646799	859284
I.S. (SIH) (plocha)	325858	321521	302529	286241	285088	281111
HMAF-INH / I.S. (SIH)	0,2642	0,5440	0,8221	1,4483	2,2686	3,0612
Koncentrace změřená [$\mu\text{mol/l}$] (dle kalibrační křivky)	11,87	21,68	31,44	53,41	82,20	110,01
Konc. změř. vs konc. teor. [%]	110,87	101,30	97,93	99,82	96,01	102,79

Po vyhodnocení chromatografických záznamů byla sestrojena kalibrační křivka, která vykazuje lineární průběh v rozmezí daných koncentrací (Obr. 14). Její parametry jsou:

Rovnice regresní přímky: $y = 0,0285x - 0,0740$. Koeficient determinace: $R^2 = 0,9969$, korelační koeficient $R = 0,9984$.



Obr. 14: Linearita, závislost poměru ploch HMAF-INH / I.S. na koncentraci HMAF-INH.

Při validaci metody je zásadní stanovit odchylky koncentrace vypočtené dle kalibrační přímky od hodnot teoretických. Je nutné splnění podmínek alespoň u 4 ze 6 vzorků^[12]: aby maximální odchylka byla 15 %, resp. 20 % na dolním limitu kvantifikace. Zde podmínky byly splněny, kalibrační přímku lze použít pro kvantifikaci analytu a metodu považovat za lineární.

5.4.3. Analýza HMAF-INH v plazmě, validace metody: parametry preciznost a přesnost

Validační parametry preciznost a přesnost, pro analýzu HMAF-INH v králičí plazmě, byly prokázány na třech koncentračních úrovních 10 – 50 – 100 µmol/l (chromatogram na Obr. 15). Pro každou koncentraci bylo připraveno 5 vzorků, každý byl analyzován dvakrát. Jako vnitřní standard byl použit SIH.

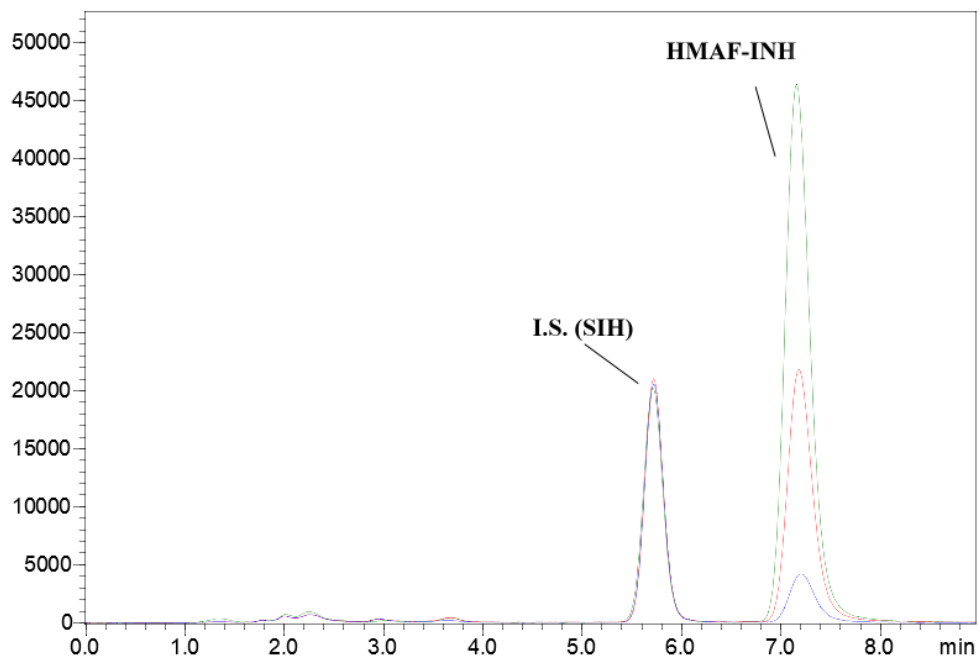
Výsledné hodnoty jsou průměr z 10 analýz (uvedeny v Tab. 7). Změřená koncentrace byla odvozena od rovnice regresní přímky: $y = 0,0285x - 0,0740$; kde x je koncentrace a y poměr ploch látky a vnitřního standardu (HMAF-INH/ SIH). Koncentrace x se tedy spočítá dle vzorce: $x = (y + 0,0740) / 0,0285$.

Tab. 7: Analýza HMAF-INH v plazmě, validace metody: parametry preciznost a přesnost

Koncentrace teoretická [µmol/l]	10,70	53,51	107,02
Koncentrace změřená [µmol/l]	12,74	53,64	104,86
Směrodatná odchylka	0,19	1,11	2,76
Přesnost^a [%]	119,07	100,24	97,98
Preciznost^b, RSD (n=10) [%]	1,57	2,07	2,66

^a Přesnost = 100 % · koncentrace změřená / koncentrace teoretická

^b RSD = SD · 100% / c, kde c je průměrná hodnota změřené koncentrace



Obr. 15: Chromatogram, analýza HMAF-INH v králičí plazmě, validace metody, 328 nm.
Vzorky o koncentracích 10 µmol/l (modrá linie) – 50 (červená) – 100 µmol/l (zelená linie)

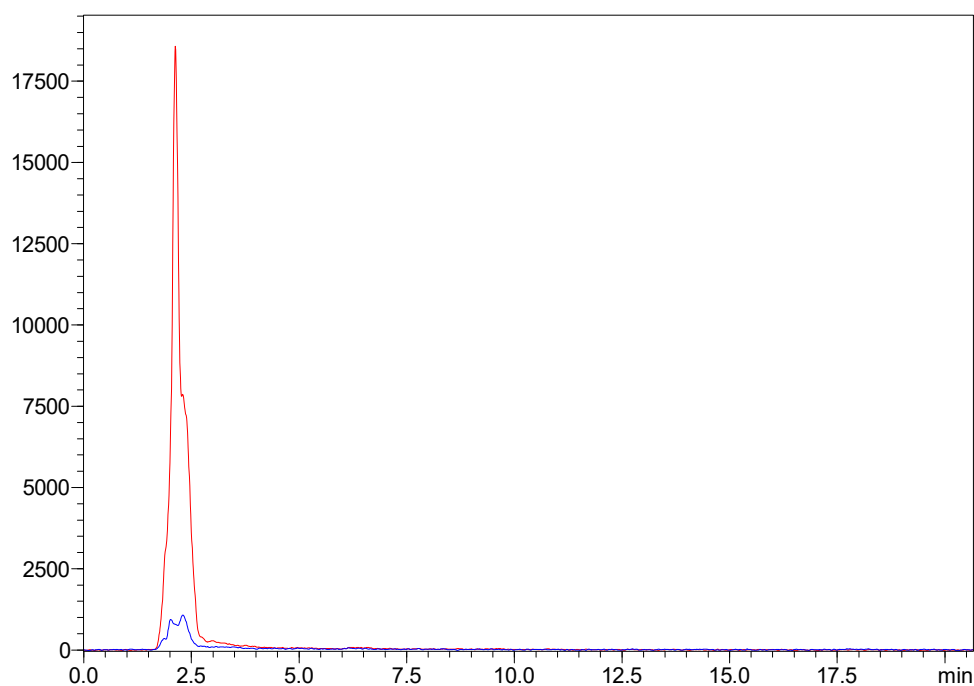
Retenční časy: I.S. (SIH): 5,7 min

HMAF-INH: 7,2 min

Výsledky preciznosti a přesnosti studované v rámci jednoho dne splňují kritéria požadovaná směrnicí FDA ^[12] pro validaci bioanalytických metod.

5.4.4. Analýza HMAF-INH v plazmě, validace metody: parametr selektivita

Selektivita metody hodnocení HMAF-INH v plazmě byla ověřena analýzou prázdné králičí plazmy. Z chromatografického záznamu (Obr. 16) je patrné, že nedochází k interferenci endogenních látek králičí plazmy s píky analyzované látky HMAF-INH a vnitřního standardu (SIH).



Obr. 16: Chromatogram prázdné králičí plazmy, z validace analýzy HMAF-INH, zaznamenaný pro dvě vlnové délky: červená linie 275 nm, modrá linie 328 nm.

5.4.5. Stabilita HMAF-INH v plazmě

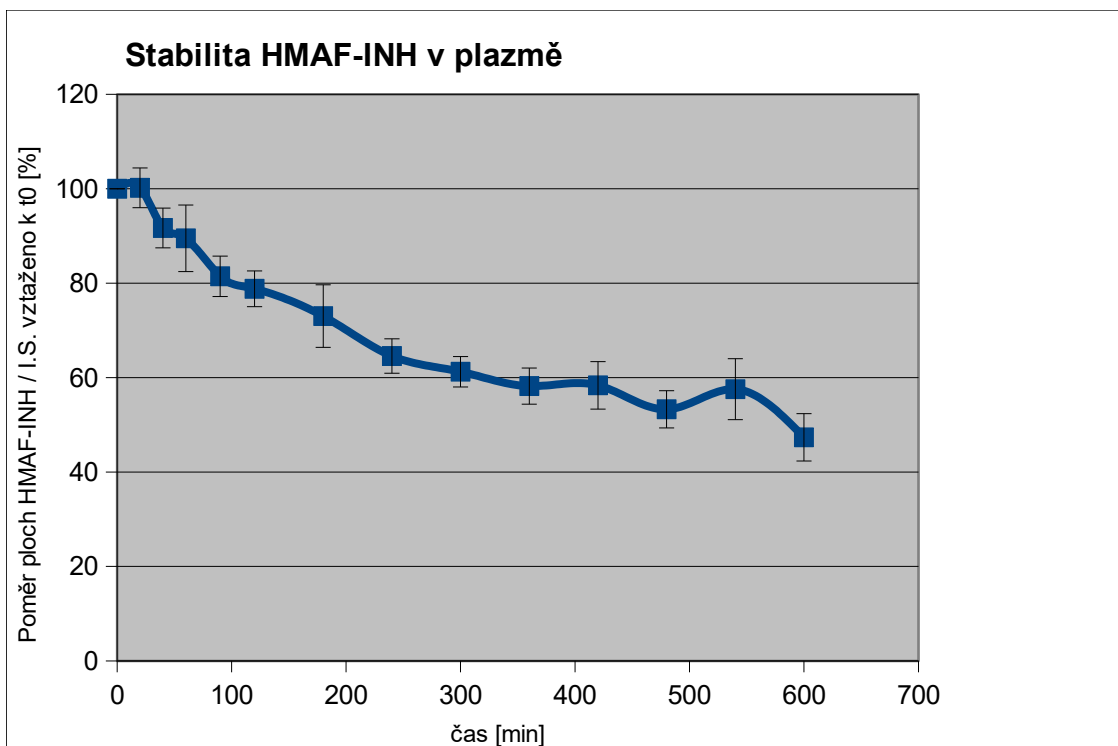
Stabilita v králičí plazmě byla zaznamenána jako pokles plochy píku v závislosti na čase. Stabilita HMAF-INH v plazmě byla hodnocena za fyziologicky relevantních podmínek (teplota 37 °C). Plocha píku zkoumané látky byla vydělena plochou vnitřního standardu (SIH). Následně byly poměry vyděleny hodnotou podílu v čase $t_0 = 0$ minut a převedeny na procenta. Výsledné hodnoty uvedené v tabulce (Tab. 8) jsou průměry ze čtyř analýz. V tabulce je rovněž uvedena rostoucí plocha rozkladného produktu (R.P.) HMAF.

Tab. 8: Stabilita HMAF-INH v králičí plazmě.

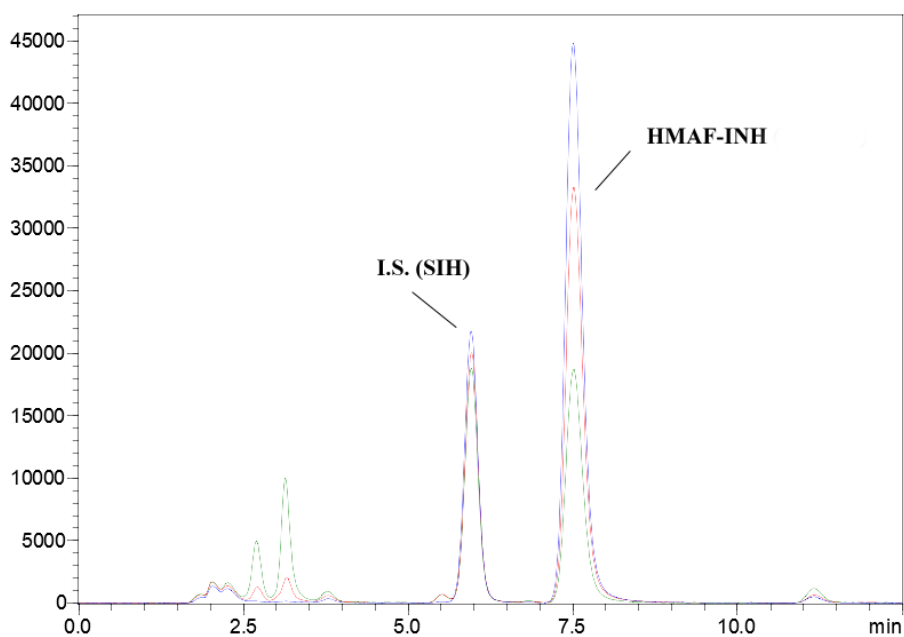
čas [min]	0	20	40	60	90	120	180	240	300	360	420	480	540	600
HMAF-INH	816	751	718	689	629	585	516	480	438	401	375	360	342	326
I.S.	317	291	305	300	300	289	276	289	278	268	250	263	232	267
R.P.	25	24	26	29	29	31	34	37	40	44	48	51	54	56
HMAF-INH/ t_0	100	92,1	88	84,5	77,2	71,7	63,3	58,9	53,7	49,1	45,9	44,1	41,9	39,9
HMAF-INH/IS	2,58	2,59	2,36	2,3	2,1	2,04	1,88	1,66	1,58	1,51	1,51	1,38	1,49	1,23
HMAIH/IS/t_0	100	100	91,7	89,5	81,4	78,8	73	64,6	61,2	58,2	58,4	53,3	57,5	47,3
S.D. (n=4)	0	4,20	4,21	7,06	4,28	3,79	6,62	3,65	3,22	3,82	5,02	3,95	6,46	5,02
RSD [%]	0	4,20	4,60	7,88	5,26	4,82	9,07	5,65	5,25	6,56	8,60	7,40	11,2	10,6

Plocha u látek uvedena v tisících. Poměry plochy zkoumané látky HMAF-INH k ploše v čase $t_0 = 0$ min jsou označeny „HMAF-INH/ t_0 “, uvedeny v [%]. Poměr látky HMAF-INH a vnitřního standardu (I.S.) je označen „HMAF-INH/IS“, poměr „HMAF-INH/IS“ vztažený k poměru v čase $t_0 = 0$ min je označen jako „HMAIH/IS/ t_0 “, uveden v [%].

Po 1 hodině v králičí plazmě zbylo $89,5 \pm 7,1$ % HMAF-INH, po 3 hodinách $73,0 \pm 6,6$ % a po 10 hodinách zůstalo nerozložených $47,3 \pm 5,0$ %. HMAF-INH se tedy projevil jako výrazně stabilnější než původní látka SIH, který má poločas rozkladu v králičí plazmě přibližně půl hodiny^[37]. (Na Obr. 17 grafický záznam stability a na Obr. 18 chromatogram ze stabilitní studie.)



Obr. 17: Stabilita HMAF-INH v králičí plazmě.



Obr. 18: Chromatogram, studie stability HMAF-INH v králičí plazmě, 328 nm.
 Vzorky v časech: 0 min (modrá linie) – 120 min (červená) – 600 minut (zelená).
 Retenční časy: I.S. (SIH) 5,9 min
 HMAF-INH: 7,5 min.

6. ZÁVĚR

V rigorózní práci byly vypracovány optimální chromatografické podmínky pro analytické hodnocení dvou chelátorů železa (odvozených od SIH) v plazmě s využitím HPLC:

- chlor-acetofenon isonikotinoyl hydrazon, zkratkou CAF-INH, celým přesným názvem (E)-N`-(1-(5-chloro-2-hydroxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid,
- hydroxymethyl-acetofenon isonikotinoyl hydrazon, zkratkou HMAF-INH, celým názvem (E)-N`-(1-(2-hydroxy-4-methoxyfenyl)ethyliden)isonikotinohydrazid.

Dále byla provedena částečná validace metod a následně hodnocení stability uvedených chelátorů v králičí plazmě. Na základě předchozích zkušeností byla k analýze obou chelátorů vybrána chromatografická kolona s reverzní fází C18: Merck 250x4 mm I. D. s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm) s předkolonou Purospher® 100, RP-18e (5 µm).

Jako optimální mobilní fáze při hodnocení chelátoru CAF-INH v plazmě byla vybrána směs fosfátového pufru (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ o pH 6 s přidavkem 2 mmol/l EDTA), methanolu a acetonitrilu, v objemovém poměru 40:30:30 (v/v/v). UV detektor byl nastaven na vlnové délky 251 a 285 nm.

U chelátoru HMAF-INH byla jako ideální mobilní fáze zvolena směs fosfátové pufru (0,01 mol/l vodný roztok $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ o pH 6 s přidavkem 2 mmol/l EDTA), methanolu a acetonitrilu v objemovém poměru 50:25:25 (v/v/v). UV detektor byl nastaven na vlnové délky 275 nm a 328 nm.

Pro oba chelátory byl průtok nastaven na 1,0 ml/min a kolona temperována na 25 °C.

Jako vnitřní standard byl pro chelátor CAF-INH použit HAF-INH, pro chelátor HMAF-INH byl použit SIH.

Za těchto podmínek bylo dosaženo oddělení píků jednotlivých analyzovaných látek od sebe i od balastních látek přítomných v plazmě, a to v akceptovatelném čase. Retenční časy látek byly: (Z) izomer CAF-INH 3,4 min, (E) izomer 7,0 min, vnitřní standard HAF-INH 4,2 min; HMAF-INH 7,2 min, vnitřní standard SIH 5,8 min.

Pro úpravu vzorku byla vybrána precipitační deproteinace acetonitrilem (v poměru 2:1, 0,4 ml acetonitrilu k 0,2 ml plazmy) a byla ověřena výtěžnost extrakční metody (80 % pro CAF-INH, 93 % pro HMAF-INH).

Pro rozmezí koncentrací 10 – 100 µmol/l v plazmě byla u obou chelátorů provedena částečná validace metody s ohledem na parametry linearita, selektivita, preciznost a přesnost.

Výsledky všech hodnocených validačních parametrů vyhovovaly akceptačním kritériím směrnice ^[12].

Vyvinuté analytické metody byly použity pro hodnocení stability látek v plazmě. Studie stability byla prováděna po dobu 10 hodin a u obou chelátorů vykazala výrazně pomalejší rozklad oproti mateřské látce SIH. Zatímco SIH má poločas rozkladu v králičí plazmě kolem 30 minut^[37], oba zkoumané chelátory projevily poločas rozkladu minimálně 10x větší.

Zvýšená stabilita zkoumaných chelátorů v plazmě oproti mateřské látce SIH může být způsobena zvýšením elektronové hustoty na karbonylovém uhlíku a také přítomností methylové skupiny, která stericky brání hydrazonovou vazbu vůči hydrolytickému rozkladu.

7. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát Mgr. Michal Schöngut

Konzultant doc. PharmDr. Petra Štěrbová, Ph.D.

Název rigorózní práce Analytické hodnocení derivátů salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu

Následuje stručný souhrn záměrů práce, použitých metod, dosažených výsledků a učiněných závěrů

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi nejmodernější a nejpoužívanější analytické separační metody současnosti. Její předností je, že umožňuje kvalitativní a kvantitativní stanovení látek i ve složité biologické matrici.

Biokompatibilní chelátory železa jsou v terapii používány především pro léčbu přetížení organismu železem. Nicméně díky svým antioxidačním a antiproliferativním účinkům by mohly nalézt uplatnění i v oblasti léčby jiných chorob, například v terapii Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby nebo u nádorových onemocnění.

Velmi nadějným byl biokompatibilní chelátor železa salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) ze skupiny aroylhadrazonů, s nízkou toxicitou a signifikantním antioxidačním a cytoprotektivním účinkem. Jeho využití však ztěžuje krátký poločas rozkladu v plazmě. Proto byly od jeho struktury odvozeny deriváty, u kterých se předpokládá vyšší stabilita. Zkoumanými látkami byly: chlor-acetofenon isonikotinoyl hydrazon (CAF-INH) a hydroxymethyl-acetofenon isonikotinoyl hydrazon (HMAF-INH).

Cílem této práce bylo vyvinutí optimálních chromatografických podmínek HPLC analýzy těchto chelátorů a metody úpravy vzorku pro stanovení v biologickém materiálu.

Analýza byla prováděna na koloně Merck 250x4 mm I. D. s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm) s předkolonou Purospher® 100, RP-18e (5 µm).

Pro hodnocení chelátoru CAF-INH v plazmě byla jako mobilní fáze vybrána směs fosfátového pufru, methanolu a acetonitrilu, v objemovém poměru 40:30:30 (v/v/v). UV detektor byl nastaven na vlnové délky 251 a 285 nm. Pro chelátor HMAF-INH byla jako mobilní fáze zvolena směs fosfátové pufru, methanolu a acetonitrilu v objemovém poměru 50:25:25 (v/v/v). UV detektor byl nastaven na vlnové délky 275 nm a 328 nm. Průtok v obou případech činil 1 ml/min. Retenční čas činil 3,4 min pro (Z) a 7,0 min pro (E) izomery CAF-INH a 7,2 min pro HMAF-INH.

Pro úpravu vzorku byla vybrána precipitační deproteinace acetonitrilem (0,4 ml k 0,2 ml plazmy), byla dosažena extrakční výtěžnost 80 % pro CAF-INH, 93 % pro HMAF-INH.

Linearita metody stanovení obou analytů byla ověřena v rozmezí koncentrací 10-100 µmol/l. Preciznost a přesnost metody byly ověřeny pro stanovení obou látek v plazmě a oba validační parametry vyhovovaly akceptačním kritériím pro oba analyty ^[12].

Byla provedena studie stability v plazmě trvající 10 hodin. Na jejím konci zbylo 40 % CAF-INH a 47 % HMAF-INH. Oba chelátory se tak ukázaly jako výrazně stabilnější než mateřská látka SIH. Zvýšená stabilita může být způsobena zvýšením elektronové hustoty na karbonylovém uhlíku a sterickým bráněním hydrazonové vazby.

8. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate Mgr. Michal Schöngut

Consultant doc. PharmDr. Petra Štěrbová, Ph.D.

Title of Thesis Analytical evaluation of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone derivatives

High performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most modern and widely used analytical separation methods. Its advantage is that it enables qualitative and quantitative determination of substances even in a complex biological matrix.

Biocompatible iron chelators are used in therapy primarily for the treatment of iron overload. However, due to their antioxidant and antiproliferative effects, they could also find application in the treatment of other diseases (Parkinson's and Alzheimer's disease, cancer).

The biocompatible iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) from the group of aroylhydrazones was very promising, with low toxicity and significant antioxidant and cytoprotective effect. However, its use is complicated by the short half-life in plasma. Therefore, chelators were derived from its structure that are expected to have higher stability. The tested substances were: chloroacetophenone isonicotinoyl hydrazone (CAF-INH) and hydroxymethyl acetophenone isonicotinoyl hydrazone (HMAF-INH).

The aim of this work was to develop optimal chromatographic conditions for HPLC analysis of these chelators and a sample treatment method in order to determine the analyte in a biological material.

The analysis was performed on a Merck 250x4 mm I. D. column packed with LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm) with a Purospher® 100, RP-18e (5 µm) precolumn.

For the analysis of the CAF-INH chelator in plasma, a mixture of phosphate buffer, methanol and acetonitrile, in a volume ratio of 40:30:30 (v / v / v), was selected as the mobile phase. The UV detector was set to wavelengths of 251 and 285 nm. For the HMAF-INH chelator, a mixture of phosphate buffer, methanol and acetonitrile in a volume ratio of 50:25:25 (v / v / v) was chosen as the mobile phase. The UV detector was set at 275 nm and 328 nm. The flow rate in both cases was 1 ml / min. The retention time was 3.4 min for (Z) resp. 7.0 min for (E) CAF-INH isomer and 7.2 min for HMAF-INH.

Precipitation deproteination with acetonitrile (0.4 ml to 0.2 ml plasma) was chosen for sample preparation, an extraction yield of 80% (CAF-INH), 93% (HMAF-INH) was achieved.

The linearity of the method for the determination of both analytes was verified in the concentration range of 10-100 µmol / l. The precision and accuracy of the method were verified for the determination of both substances in plasma and both validation parameters met the acceptance criteria for both analytes ^[12].

A 10-hour plasma stability study was performed. At its end, 40% CAF-INH and 47% HMAF-INH remained. Both chelators thus proved to be significantly more stable than the parent compound SIH. The increased stability may be due to an increase in the electron density on the carbonyl carbon and steric hindrance of the hydrazone bond.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] **Karlíček, R., a kol.;** *Analytická chemie pro farmaceuty*; Praha 2013
- [2] **Klimeš, J., a kol.;** *Kontrola léčiv I*; Praha 2008
- [3] **Douša, M.;** *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*; Brno 2002
- [4] **Nováková, L., a Douša, M.;** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I+II*; Praha 2013
- [5] <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html> ; 27.10.2020
- [6] <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> ; 27.10.2020
- [7] <http://hplc.cz> ; 19.8.2020
- [8] **Chromý, V., a kol.;** *Bioanalytika*; Brno 2011
- [9] **Alzweiri, M., et al.;** DOI: 10.1016/j.talanta.2007.07.037; 2008, Talanta, 74(4), 1060-1065
- [10] **Klimeš, J., a kol.;** *Kontrola léčiv II*; Praha 2007
- [11] **Friedecký, B., Šprongl, L., Kratochvíla, J., Plzák, Z.;** *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích*; 2011
- [12] **FDA;** *Guidance for industry, Bioanalytical Method Validation*; 2001
- [13] **EMA;** *Guideline on bioanalytical method validation*; 2011
- [14] **Ponka, P., Tenenbein, M., Eaton, J.W.;** DOI: 10.1016/B978-0-444-59453-2.00041-X; Handbook on the Toxicology of Metals 2015
- [15] **Zhang, H., et al.;** DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.08.030; 2019, Biochimica et Biophysica Acta, 1865(7), 1925-1937
- [16] **Silbernagl, S.;** *Atlas fyziologie člověka*; Grada 2004
- [17] **Andrews, N.C.;** DOI: 10.1056/NEJM199912233412607; 2000, New England Journal of Medicine 342, 1293

- [18] **Vokurka, M., a kol.;** *Patofyziologie pro nelékařské směry*; Praha 2018
- [19] <https://www.wikiskripta.eu/w/Hemochromat%C3%B3za> 21.8.2020
- [20] **Oudit, G.Y., et al.;** DOI: 10.1038/nm920y; 2003, Nature Medicine 9, 1187-94
- [21] https://www.wikiskripta.eu/w/Fentonova_reakce 30.8.2020
- [22] **Ledvina, M., et al.;** *Biochemie pro studující medicíny*; Praha 2004
- [23] **Gujja, P., et al.;** DOI: 10.1016/j.jacc.2010.03.083; 2010, J Am Coll Cardiol., 56(13), 1001–1012.
- [24] **Chance et al.;** 1979
- [25] https://www.wikiskripta.eu/w/Z%C3%A1kladn%C3%AD_reaktivn%C3%AD_formy_kysl%C3%ADku_a_dus%C3%ADku, 21.8.2020
- [26] **Harman;** 1983
- [27] **Thakerngpol et al.;** 1996
- [28] **Herman et al.;** 1997
- [29] **Cruz, M., et al.;** DOI: 10.1016/j.repce.2015.12.020; 2016, Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition), 35(6), 359-371
- [30] **Šimůnek, T., et al.;** DOI: 10.1016/j.phrs.2004.08.005; 2005, Pharmacological Research, 51(3), 223-231
- [31] **Link, G., et al.;** DOI: 10.1016/S0022-2143(96)90095-5; 1996, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 127(3), 272-278
- [32] **Richardson, D.R., Ponka, P.;** DOI: 10.1016/s0022-2143(98)90180-9; 1998, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 131(4), 306-315
- [33] **Chen, Y.-L., et al.;** DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.12.007; 2018, Journal of Inorganic Biochemistry, 180, 194-203

- [34] **Moore, G.E., Gerner, R.E., Franklin, H.A.;** *Culture of normal human leukocytes;* 1967, JAMA, 199(8), 519-524
- [35] **Buss, J.L., Ponka, P.;** DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00478-6; 2003, Biochimica et Biophysica Acta, 1619(2), 177-186
- [36] **Kovaříková, P., et al.;** DOI: 10.1016/j.jpba.2005.06.021; 2006, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 40(1), 105-112
- [37] **Kovaříková, P., Mrkvičková, Z., Klimeš, J.;** 10.1016/j.jpba.2008.01.011; 2008, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 47(2), 360-370
- [38] **Štěřba, M., et al.;** DOI: 10.1016/j.tox.2007.03.020; 2007, Toxicology 235(3), 150-166
- [39] **Kovaríková, P., et al.;** DOI: 10.1002/jssc.200500077; 2005, Journal of Separation Science, 28(12), 1300-1306
- [40] **Caro, A. A., et al.;** DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.08.005; 2015, Biochimica et Biophysica Acta, 1850(11), 2256-2264
- [41] **Simunek, T., et al.;** doi: 10.1016/j.yjmcc.2005.05.008; 2005, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 39(2), 345-354
- [42] **Bendova, P., et al.;** DOI: 10.1021/tx100125t; 2010, Chemical Research in Toxicology, 23(6), 1105-1114
- [43] **Hruskova, K., et al.;** DOI: 10.1021/tx100359t; 2011, Chemical Research in Toxicology, 24(3), 290-302
- [44] **Macková, E., et al.;** DOI: 10.1016/j.cbi.2012.03.010; 2012, Chemico-biological interactions, 197(2-3), 69-79
- [45] **Kovaříková, P., et al.;** DOI: 10.1016/j.jpba.2007.12.017; 2007, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 48(2), 295-302