

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE
A KONTROLY LÉČIV

DIPLOMOVÁ PRÁCE

HPLC analýza dexrazoxanu a jeho metabolitů

Hradec Králové 2010

Lukáš Dlouhý

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých jsem při zpracování čerpal, jsou uvedené v seznamu použité literatury a v práci řádně citované.

Zde bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Petře Kovaříkové Ph.D. za pomoc a odborné rady při vypracování diplomové práce.

OBSAH

| | | |
|----------|--|----|
| 1. | ÚVOD | 5 |
| 2. | TEORETICKÁ ČÁST | 7 |
| 1.1. | HPLC | 8 |
| 1.1.1. | Úvod k HPLC | 8 |
| 1.1.2. | Instrumentace | 8 |
| 1.1.3. | HPLC na reverzních fázích..... | 11 |
| 1.1.4. | HPLC na normální fázi | 12 |
| 1.1.5. | HILIC | 13 |
| 1.1.5.1. | Mechanismus HILIC | 13 |
| 1.1.5.2. | Efekt mobilní fáze..... | 14 |
| 1.1.5.3. | Vliv stacionární fáze..... | 16 |
| 1.1.6. | Typy HILIC stacionárních fází | 17 |
| 1.1.6.1. | Silikagel | 17 |
| 1.1.6.2. | Chemicky vázané fáze..... | 18 |
| 1.1.6.3. | Iontovýmienné a zwitterionické stacionární fáze | 20 |
| 1.1.6.4. | Organické polymerní stacionární fáze | 21 |
| 1.2. | Chelátory železa..... | 21 |
| 1.3. | Anthrachinonové chemoterapeutika | 22 |
| 1.4. | Dexrazoxan a jeho metabolity | 23 |
| 1.4.1. | Klinické použití | 23 |
| 1.4.1.1. | Nežádoucí účinky | 24 |
| 1.4.1.2. | Kontraindikace | 24 |
| 1.4.1.3. | Dávkování | 24 |
| 1.4.2. | Chemická struktura a fyzikálně - chemické vlastnosti..... | 24 |
| 1.4.3. | Intracelulární hydrolýza dexrazoxanu | 25 |
| 1.4.4. | Mechanismus účinku..... | 25 |
| 1.5. | Přehled použitých metod pro HPLC analýzu dexrazoxanu | 27 |

| | | |
|------|--|----|
| 2. | CÍL PRÁCE | 29 |
| 3. | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 31 |
| 3.1. | Použitý chromatografický materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie..... | 32 |
| 3.2. | Vývoj chromatografických podmínek pro stanovení dexrazoxanu, jeho meziproduktů a ADR-925 pomocí HILIC s UV detekcí | 34 |
| 4. | VÝSLEDKY A DISKUSE | 37 |
| 5. | ZÁVĚR..... | 44 |
| 6. | ABSTRAKT | 46 |
| 7. | ABSTRACT..... | 47 |
| 8. | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 48 |

1. ÚVOD

Dexrazoxan je klinicky používané léčivo při léčbě některými protinádorovými chemoterapeutiky jako účinné kardioprotektivum. Dexrazoxan je možné považovat za proléčivo, které proniká do buněk, kde postupným otvíráním piperazinových cyklů vzniká přes dva částečné otevřené meziprodukty aktivní metabolit - ADR-925. Stejným způsobem dochází k rozkladu léčiva v podmínkách chemické alkalické hydrolýzy. Analytické hodnocení dexrazoxanu je poněkud komplikováno vysokou hydrofilitou léčiva a především pak jeho metabolitů/rozkladných produktů. Jistou komplikací je také absence chromoforu, jenž znemožňuje dostatečně citlivě detekovat léčivo a především jeho metabolity/rozkladné produkty při vlnových délkách > 220nm. Tyto komplikace by mohly být odstraněny využitím tzv. „Hydrophilic interaction liquid chromatography“ (HILIC) s následnou MS detekcí.

HPLC – „High Performance Liquid Chromatography“ (vysokoučinná kapalinová chromatografie) je jednou z nejprogresivnějších separačních metod, která umožňuje současně jak kvalitativní tak kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. K separaci dochází na základě interakcí dělených látek se stacionární i mobilní fází. Přednostmi této metody je rychlost analýzy, citlivost stanovení a minimální množství potřebného vzorku. V oblasti Therapeutic drug monitoring (TDM) má významné postavení. Na rozdíl od metod imunochemických má přednost v selektivitě metody a v tom, že umožňuje kvantifikovat jak původní léčivo, tak i jeho metabolity.

Velmi často se tato metoda používá ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS). Toto propojení HPLC-MS umožňuje analýzu se značnou citlivostí a selektivitou.

Tato práce se tedy zabývá vývojem takové HPLC metody, kterou bude možno využít pro HPLC-MS analýzu vhodnou pro hodnocení dexrazoxanu a jeho metabolitů a to i v komplikovaném biologickém materiálu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

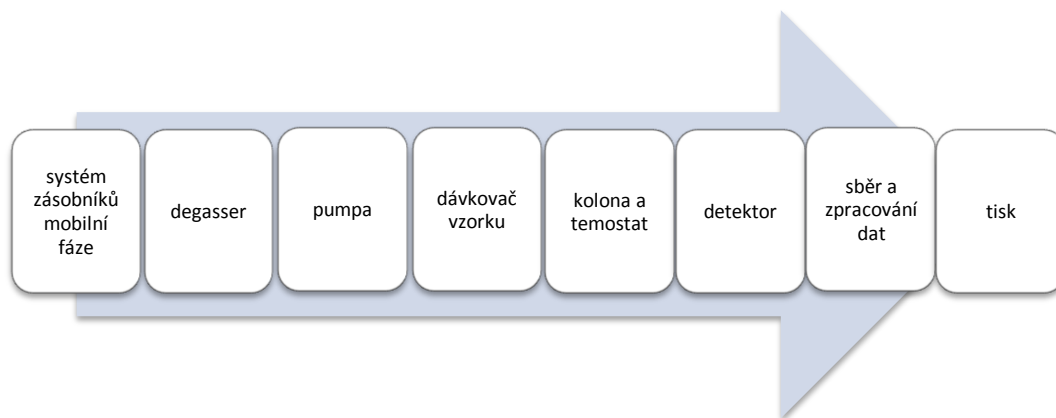
1.1. HPLC

1.1.1. Úvod k HPLC

Kapalinová chromatografie (LC) byla objevena pozorováním separace barevných látek na polárních sorbentech, jako jsou celulózová vlákna nebo anorganické oxidy, a které byly eluovány nepolárními organickými rozpouštědly. Když byly objeveny v sedmdesátých letech minulého století kolony s chemicky vázanými fázemi, bylo brzy zřejmé, že systém opačné polaritě tj. s hydrofobní stacionární fází a mobilní fází tvořenou vodnými roztoky s vodou mísitelných organických rozpouštědel nabízí podstatné výhody [1]. Jejich dominantní pozice je dána schopností materiálů používaných jako reverzní fáze zadržovat a separovat látky s velkou heterogenitou ve fyzikálně-chemických vlastnostech včetně celkové hydrofobicity [2]. Kromě toho systém reverzních fází umožňuje překonat nevýhody analýzy v normálních fázích, jako jsou pomalá ekvilibrace a stranová heterogenita sorbentu projevující se v nelineárních izotermách, jenž vede k chvostujícím píkům i posunu retenčních časů v závislosti na koncentraci nastříkovaného analytu. Další faktor, který podpořil oblibu HPLC na „reverzní fází“ (RP) byla její vhodnost pro analýzu značné části bioanalytických vzorků, které byly středem zájmu. Nejpoužívanější léčiva se tradičně nacházejí v rozmezí polaritě, které umožňuje, aby byly dobře separovány od ostatních přirozeně se vyskytujících látek v krevní plasmě na oktadecyl vázající fází za použití vodných pufrů s vodou mísitelným rozpouštědlem. Obrovská popularita RP-HPLC v průběhu času odsunula analýzu v systému normálních fází do pozadí [1].

1.1.2. Instrumentace

Jednoduchý kapalinový chromatograf se skládá ze šesti základních jednotek. Systém zásobníků mobilních fází, odplyňovač („degasser“), pumpa, dávkovací zařízení, kolona, detektor a počítač vybavený příslušným softwarem pro zpracování dat (viz schéma obr. 1) [3, 4].



Obr. č 1: Schéma jednotlivých součástí kapalinového chromatografu.

Zásobníky mobilní fáze, deggaser a pumpa

Mobilní fáze je pumpou za využití vysokých tlaků čerpána do chromatografického systému. Tok mobilní fáze musí být konstantní s minimem pulzů. Pro konstantní průtok mobilní fáze je nezbytné její odplynění pomocí deggaseru.

Dávkovač

Vzorek je dávkován nejčastěji pomocí dávkovacích ventilů (smyčkových, šesticestných). Dávkování dnes probíhá zcela automaticky, proto se často používá termín autosampler.

Kolony

Existuje značné množství různých stacionárních fází, které jsou dnes komerčně dostupné jako HPLC kolony. Ty nejpoužívanější jsou z mikročásticových, porózních silikagelových materiálů se sférickými silikagelovými částicemi o velikosti 3-5 μ m. Silikagel může být rovněž modifikován nejrůznějšími chemicky vázanými funkčními skupinami. Sorbent je naplněn do trubice z nerezové oceli, popřípadě skla (tj. chromatografické kolony). Nejběžnější provedení kolony je trubice z nerezové oceli o délce 5-25 cm s vnitřním průměrem 1-4,6 mm. Konce kolony obsahují frity z nerezové oceli či síťovinu, aby zadržovaly obalový materiál [3].

Detektory

Existuje mnoho detektorů, které nacházejí široké uplatnění v HPLC, ale těmi nejpoužívanějšími pro analýzu léčiv jsou spektrofotometrické (pracující v UV popřípadě VIS oblasti), fluorescenční, elektrochemické, radiochemické a hmotnostně-spektrometrické detektory (MS). Nejpoužívanějším detektorem v současné době je stále UV detektor, nicméně do popředí se dostávají stále více také MS detektory, zejména pak v oblasti analýzy léčiv v biomateriálu. UV/VIS detektory mají vysokou citlivost pro mnoho léčiv a metabolitů, nicméně analyty musí absorbovat záření v UV/viditelné oblasti spektra tj. v oblasti vlnových délek 190-600 nm. V moderních UV detektorech je dopadající světlo generováno z vysoce intenzivního zdroje, jako je např. deuteriová lampa. Záření o požadované vlnové délce je pak směřováno skrz vzorek za pomoci difrakčních mřížek. Světlo prochází skrz vzorek a referenční celu a je detekováno za pomoci fotonásobiče. O UV/VIS detektoru se říká, že je koncentračně citlivý tzn., že pro vyšší koncentrace analytu v průtokové cele získáme větší odpověď detektoru. Ta je dána Lambert-Beerovým zákonem. Rozšířením využití UV detektorů je detektor s diodovým polem (DAD). Výhodou DAD detektorů je získání informace o celém spektru každého analytu, což umožňuje a identifikovat analyt (porovnáním jeho spektra s naměřeným spektrem standardu či se spektrem z knihovny) a určit čistotu píku (zdali nedochází ke koeluci více látek) [3].

V případě, že analyt vykazuje přirozenou fluorescenci, je možné využít fluorescenční detekci. Excitací při jedné vlnové délce a monitorováním světla emitovaného při vyšší vlnové délce pak umožňuje selektivně detekovat analyzovanou látku. Vedle poměrně vysoké selektivity je výhodou této techniky vysoká citlivost [3].

Radiometrický detektor nachází své uplatnění především v oblasti bioanalýzy léčiv. Jednou z častých aplikací tohoto typu detekce jsou farmakokinetické studie při vývoji nových léčiv. Podáním léčiva značeného radioisotopem laboratornímu zvířeti velmi jednoduše zjistíme, které chromatografické píky jsou příbuzné a/nebo deriváty léčiva. Za předpokladu, že je radioisotop navázaný na molekulu v metabolicky stabilním místě, lze odůvodněně předpokládat, že všechny píky, které byly detekovány, jsou odvozené od léčiva[3].

Některé léčiva obsahují funkční skupiny, které jsou schopny oxidace nebo redukce. V takovém případě je možné pro detekci analytu využít elektrochemické detektory.

Základním principem elektrochemické detekce je aplikace napětí při průchodu analytu skrz elektrochemickou celu, která spouští oxidačně-redukční reakci. Tato pak vede ke vzniku elektrického proudu. Obvykle je detekován buď proud (amperometrická detekce), nebo náboj (coulometrický detektor). Přestože je tento způsob detekce poměrně citlivý, jeho širšímu využití brání fakt, že jen poměrně malá skupina léčiv je elektrochemicky aktivní [3].

V posledních letech bylo možné pozorovat dynamický rozvoj na poli spojení kapalinové chromatografie s hmotnostními spektrometry. To vedlo k velkému rozmachu v použití hmotnostních spektrometrů jako detektorů pro kvantitativní HPLC analýzy. Využití MS detektorů umožňuje dosáhnout výborné citlivosti a selektivity detekce. Kromě toho toto spojení umožňuje získat strukturní informace o analytech, jenž je v současnosti široce využíváno při identifikaci neznámých látek, rozkladných produktů nebo metabolitů léčiv. Molekuly analytů, jsou nejprve zavedeny do ionizačního zdroje hmotnostního spektrometru, kde jsou ionizovány, aby získaly pozitivní, nebo negativní náboje. Ionty dále putují přes hmotnostní analyzátor a dorazí do různých částí detektoru podle jejich poměru hmotnost/náboj (m/z). Poté co ionty dosáhnou detektoru, jsou generovány využitelné signály, které jsou zaznamenávány počítačovým systémem. Počítač zobrazuje signály graficky jako hmotnostní spektrum vyjadřující relativní intenzitu signálů podle poměru m/z [5]. Ačkoliv jsou hmotnostní spektrometry drahé, pro svou mimořádnou citlivost a selektivitu jsou často detektory volby pro kvantitativní bioanalýzu [3].

Současný chromatograf je velmi komplexní přístroj pracující při tlacích až 10 000 p. s. i. (68,9475 MPa), který poskytuje průtokové rychlosti od několika mikrolitrů za minutu do 10 či 20 ml/min v závislosti na typu LC, která se používá. Moderní detektory by měly být proto schopny detekovat látky ve vzorku v co nejširším koncentračním rozmezí při použití široké škály průtokových rychlostí [4].

1.1.3.HPLC na reverzních fázích

Z různých typů LC je nejvíce používána HPLC na reverzních fázích. Pro RP- HPLC se používá nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Retence se zvyšuje se snižující se polaritou analytů a/nebo stacionární fáze a/nebo se zvyšující se polaritou mobilní fáze. Ačkoli RP-HPLC může být použita pro různé aplikace, její hlavní nevýhodou je, že velmi polární a

hydrofilní sloučeniny nejsou retinovány nebo jen velmi nedostatečně [6]. Takové analyty typicky postrádají silné interakce s hydrofobním povrchem materiálů reverzní fáze [2].

1.1.4.HPLC na normální fázi

Na normální fázi (NPLC) je oproti RP-HPLC pevná fáze polární a nepolární rozpouštědla jsou používána jako fáze mobilní (MF). Výsledkem je vzrůstající retence při vrůstající polaritě analyzovaných sloučenin a/nebo při vzrůstající polaritě stacionární fáze (SF) a/nebo při klesající polaritě MF [6]. Polární analyty jsou silněji retinovány než nepolární v kontrastu k RP LC. Neutrální sloučeniny mohou být separovány jak RP LC tak NP LC obecně v opačném pořadí eluce. Nicméně obvykle jsou pozorovány některé rozdíly v selektivě separace a elučním pořadí mezi těmito uspořádáními [7]. Avšak nepolární rozpouštědla používané jako MP jsou docela drahé, často toxické a nepříznivé pro životní prostředí. Navíc polární a hydrofilní sloučeniny nejsou v těchto rozpouštědlech dobře rozpustné [6].

V nevodných mobilních fázích je převažujícím mechanismem adsorpce, která je chápána jako kompetice mezi vzorkem a mobilní fází o polární adsorpční centra lokalizovaná na specifických místech povrchu stacionární fáze (adsorbentu). Retence molekuly vzorku vyžaduje uvolnění jedné nebo více předtím naadsorbovaných molekul polárního rozpouštědla. Ze smíšených mobilních fází se na povrch polárních adsorbentů preferenčně adsorbují polární rozpouštědla. Kvůli značné polaritě vody je adsorpce vody na konvenční silikagelové adsorbenty obzvláště silná a v mobilních fázích obsahujících více než několik stovek ppm vody se nakonec vytváří více či méně tlustá vrstva na vodu bohaté kapaliny naadsorbované na stacionární fázi [7].

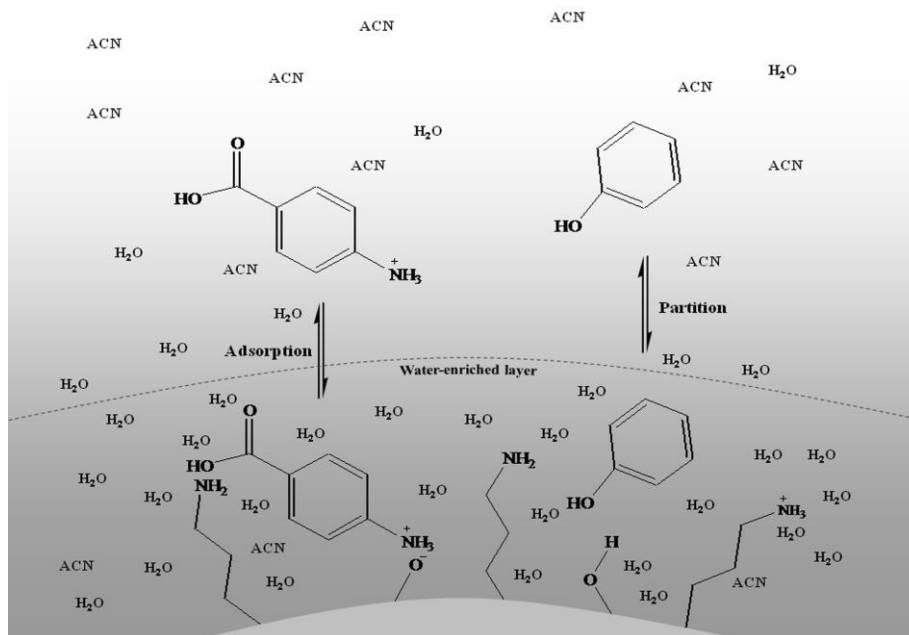
Velmi hydrofilní vzorky jsou obvykle příliš slabě retinovány v RP LC systémech, což neumožňuje jejich dostatečnou separaci. Na druhou stranu jsou často velmi silně retinovány v nevodných mobilních fázích používaných při konvenčních adsorpčních NP LC a (nebo) nejsou dostatečně rozpustné v nevodných mobilních fázích. Tento problém může být vyřešen použitím NP LC ve vodno-organických mobilních fázích, kde voda je silnějším rozpouštědlem. Alpert nazval tuto techniku „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography“(HILIC), aby ji rozlišil od NP LC s konvenčními RP mobilními fázemi [7].

1.1.5.HILIC

HILIC může být charakterizovaná jako NP LC s konvenčními RP mobilními fázemi. [7] HILIC poprvé zavedena Alperem tedy může být využívána jako alternativa NPLC. [6] Akronym HILIC byl navržen právě jím v roce 1990 ve snaze popsat chromatografickou techniku, ve které analyt interaguje s hydrofilní stacionární fází a je eluován s relativně hydrofobním binárním eluentem, ve kterém je voda silnějším elučním činidlem [1]. Je vhodným doplňkem k RP-HILIC pro retenci polárních analytů jako jsou aminokyseliny, sacharidy, peptidy a polární léčiva [8, 7]. Při HILIC chromatografii se používá hydrofilní stacionární fáze a směs voda/organické rozpouštědlo s vysokým obsahem organického rozpouštědla jako MP. U HILIC rovněž roste retence - podobně jako u NPLC, když polarita/hydrofilita analyzovaných sloučenin a/nebo pevné fáze roste. Vyšší retence je možno dosáhnout snížením polarity mobilní fáze tj. zvýšením obsahu organického rozpouštědla. Oproti NPLC mobilním fázím HILIC používá mobilní fáze o složení voda/organické rozpouštědlo, které mají vyšší rozpustnost pro polární a hydrofilní sloučeniny [6].

1.1.5.1. Mechanismus HILIC

Mechanismus HILIC byl poprvé navrhnut Alperem v roce 1990 [9]. Rozdíl mezi HILIC a NPLC je stále diskutován, nicméně definice navržená Alperem si podle všeho získává uznání: Termín HILIC by měl být používán (a) pokud je silně eluujícím činidlem voda a (b) retenčním mechanismem je rozdělování [1]. I když byla HILIC zavedena jako varianta chromatografie na normální fázi (NP LC), její mechanismus je odlišný od ostatních HPLC technik, které zahrnují adsorpci analytů přímo na stacionární fázi. Mechanismus HILIC, tak jak byl definován Alperem, zahrnuje rozdělování analytu mezi převážně polární organickou mobilní fází a vodou, která je částečně imobilizována na povrchu stacionární fáze. Nicméně v poslední době se zdá, že mechanismus HILIC je poměrně komplexní a zahrnuje jak již zmíněné rozdělování tak také adsorpci (obr. č. 2). Tyto potvrdili v nedávno vyšlém přehledovém článku také autoři Hemström a Irgum [9].



Obr. č.2: Mechanismus HILIC separace zahrnuje rozdělování a adsorpci řízené hydrofilními a elektrostatickými interakcemi na aminopropyl vázající silikagelové stacionární fázi s vodno-ACN mobilní fází. Převzato z [28].

HILIC separační mechanismus, jako v jakémkoli typu chromatografie, je dán rozdílnými interakcemi rozpuštěných látek mezi mobilní fází a stacionární fází. Interakční síly neurčují jen retenci, ale také selektivitu HILIC separace. Zahrnují vodíkové vazby, které jsou závislé kyselosti či bazicity rozpuštěných látek, elektrostatické interakce a interakce dipól-dipól, které závisí na dipólových momentech a polarizovatelnosti molekul [9].

1.1.5.2. Efekt mobilní fáze

V HILIC systému mobilní fáze obvykle obsahuje mezi 5 a 50% vody pro eluci sloučenin na kterékoli z mnoha různých typů stacionárních fází[9]. Nejméně 3% vody je potřeba pro dostatečnou hydrataci částic pevné fáze[6]. Polárním organickým rozpouštědlem je obvykle ACN, ale jsou používány také jiné směsi jako je aceton-ethylacetát nebo dichlormethan-methanol [9]. Acetonitril - jako jedno ze slabších rozpouštědel poskytuje mnohem vyšší nárůst retence v porovnání s methanolem [29].

Methanol je považován za relativně silné eluční rozpouštědlo[9, 1], které poskytuje širší píky a pouze malé změny v selektivitě [1]. Použití alkoholů jako slabě elučních rozpouštědel může být užitečné, když analyty nejsou rozpustné v ACN. Chromatografické chování epirubicinu 1 a jeho analogů bylo zkoumáno Liem a Huangem za použití různých organických

rozpouštědel včetně methanolu, isopropanolu, THF a ACN jako slabě eluujících rozpouštědel ve spojení s 10% vodným pufrem. Při použití metanolu jako složky mobilní fáze nebyly analyty v podstatě retinovány, zřejmě v důsledku jeho silné schopnosti tvořit vodíkové vazby. Ve srovnání s metanolem poskytuje isopropanol delší retenci díky svému delšímu alkylovému řetězci, který snižuje jeho hydrofilní charakter. Na druhé straně ACN má lepší separační vlastnosti, ačkoliv podle síly rozpouštědla (ϵ^0), by měl THF ($\epsilon^0 = 0,48$) způsobit silnější retenci než ACN ($\epsilon^0 = 0,50$). Ta však ve skutečnosti není pozorována, protože se THF chová jako silnější akceptor vodíkové vazby nežli ACN. Analýzy vyzdvihují význam vodíkových vazeb nejen mezi analytem a stacionární fází, ale také mezi analytem a složkami mobilní fáze během HILIC separací [9].

Podle Neueho et al. je v HILIC uspořádání retence ionizovatelných sloučenin funkcí pH a složení rozpouštědel mobilní fáze. Ali et al. navázali na tyto poznatky a zjistili, že k HILIC separaci částečně přispívá iontová výměna. Podobný efekt byl studován také skupinou Yoshidy [9]. V současnosti snad všichni výrobci HILIC kolon doporučují použití pufrovaných eluentů, aby omezili elektrostatické interakce mezi analyty nesoucími náboj a deprotonovanými silanolovými skupinami stacionární fáze. Tyto interakce jsou hlavním faktorem při separaci nabitých molekul na všech silikagelových kolonách; např. basické analyty mohou být separovány na čistém silikagelu pomocí ionto-výměnného mechanismu. Ukázalo se, že kolony vyrobeny ze silikagelu vyšší čistoty poskytují menší retenci a horší selektivitu než kolony vyrobené ze silikagelu obsahujícího nečistoty kovů. To je vysvětlováno jako „mixed mode“ fenomén, způsobený vyšší kyselostí silanolů „aktivovaných“ blízkostí kovových nečistot hlavně železa a hliníku. Octan amonný či mravenčan amonný jsou většinou doporučovány díky jejich vysoké rozpustnosti v eluentech s vysokým obsahem ACN [1, 29], pufrovacímu rozsahu vhodném pro většinu HILIC aplikací a jsou také kompatibilní s MS detekcí díky jejich těkavosti [1].

Vedle vlivu pH hraje významnou roli v retenčním mechanismu také koncentrace soli. Významný efekt byl pozorován zvláště při kombinaci hydrofilních interakcí a iontové výměny při použití polyhydroxyetylové A nebo polysulfoetylové A stacionární fáze. Polyhydroxyetylová A kolona má podle všeho malou kapacitu a omezené kation výměnné interakce pro basické sloučeniny kvůli negativně nabitým funkčním skupinám, které jsou výsledkem výrobního postupu, nebo kvůli interakcím zbylých silanolových skupin. V tomto

případě je proto potřeba využít malé koncentrace solí k eluci v HILIC uspořádání. Studie Yoshida ukazuje, že široké píky a variabilní retenční časy peptidů se mohou vyskytnout při absenci soli. Avšak omezená rozpustnost solí a vysoce polárních sloučenin v mobilních fázích s vysokým procentem organického rozpouštědla může také ovlivnit HILIC analýzu [9].

Porovnání mezi HILIC a RPLC uspořádáním bylo realizováno se separací peptidů na amidové koloně za použití ACN jako organického rozpouštědla. Výsledky ukázaly, že peptidy obsahující hydrofilní postranní řetězce byly eluovány současně v RPLC, zatímco v HILIC byly dobře zadrženy na koloně a dostatečně separovány [9].

Často je používán režim gradientové eluce využívající k postupné retenci analytů zvyšování polarity mobilní fáze (tj. zvyšování procenta vodné složky) [6].

1.1.5.3. Vliv stacionární fáze

V HILIC uspořádání mohou být použity různé stacionární fáze v závislosti na konkrétních aplikacích. Jsou jednoduše rozdělovány do dvou kategorií: silikagelové a polymerní kolony [1, 7].

Ačkoli velké množství publikovaných prací používá čisté silikagelové kolony, je zde velkým problémem ireversibilní adsorpce polárních analytů na povrch kolony. Často je obtížné použít tyto kolony pro bioanalytické separace a jiné aplikace, kde jsou analyty přítomny ve složitých směsích. Při HILIC separaci voda chrání povrch kolony, ale nedokáže zcela zabránit aktivaci silanolových skupin a následné indukci kation výměnného mechanismu pro bazické analyty. Ke kontrole separace je tudíž potřeba přidavek elektrolytů. Aby se odstranily nevýhody prostých silikagelových kolon, začaly se široce používat silikagelové fáze vázající polární skupiny. K těm patří aminopropyl-, amid-, poly(sukcinimid)-, diol-, kyanopropyl- a sulfoalkylbetain-vázající silikagelové fáze. Vlastnosti těchto stacionárních fází a jejich aplikací byly diskutovány v HILIC přehledu Hemströma a Irguma [1].

Ačkoliv má silikagel omezenou rozpustnost (~100 mg/l) ve vodných rozpouštědlech v rozmezí pH 2-7 při pokojové teplotě, stává se více rozpustným při pH vyšším než 8 či nižším než 2. Rozpustnost roste úměrně se vzrůstajícím obsahem vody. V HILIC systému je často k eluci analytů používán významný obsah vody, což může v kombinaci s extrémním pH vést

v mobilních fázích s obsahem pufru o složení ACN-mravenčan amonný, které obsahovaly 2,5–30% vody. Zaznamenal dobré účinnosti kolon a menší přetížení projevující se v symetrii píku v porovnání s RP separacemi. Do této skupiny patří např. Atlantis HILIC silica (Waters). Tento materiál byl zaveden speciálně pro HILIC aplikace. Při vyšším pH jsou silanolové skupiny ionizovány a výměna kationtů hraje významnou roli v retenci, zvláště pozitivně nabitých bazických sloučenin. Potlačení ionizace silanolů přídavkem TFA může podporovat ionto-párový mechanismus. Podobné efekty se projevují také při HILIC na monolitických silikagelových kolonách, které poskytují vyšší propustnost nežli částicemi obalené HILIC kolony. Může se však při HILIC režimu na prostém silikagelu příležitostně objevit ireversibilní adsorpce [7].

Silikagel typu C s hydrosilovaným povrchem s navázanými nepolárními silanovými skupinami místo silanolových skupin může mít až 95% silanolových skupin odstraněno, takže je méně polární než silikagely s vyšším počtem silanolových skupin. Může být použit pro separaci kyselin nebo bází při NP HILIC uspořádání s pufrovanými mobilními fázemi obsahujícími více než 50-70% organického rozpouštědla (ACN). Důležitou charakteristikou hydridových fází je malá atrakce vody a následně lepší reprodukovatelnost retence v jak organických, tak ve vodných NP. Silikagelové stacionární fáze s malou koncentrací silanolů mohou být použity v jak RP, tak NP uspořádání [7].

1.1.6.2. Chemicky vázané fáze

Nitrilové, diolové, aminové a další funkční skupiny vázající fáze používané při HILIC jsou většinou vyráběny chemickou modifikací silikagelového povrchu analogicky jako v případě C 18 nebo C8 fází pro RP LC. Obvykle síla polárních interakcí s analytem vzrůstá v pořadí: propyl-nitril < diol < aminopropyl << silikagelové stacionární fáze, nicméně selektivní interakce mohou změnit toto pořadí. Kolony s aminopropyl-ovými zbytky jsou relativně časté v HILIC uspořádání [7]. Zatímco bazické analyty jsou často silně retinovány na silikagelu vodíkovými vazbami a ionto-výměnnými interakcemi se silanolovými skupinami, kyselé sloučeniny jeví zvýšenou afinitu k aminopropyl-silikagelovým kolonám, které mohou občas vést dokonce k ireversibilní adsorpci (ionto-výměnný efekt) těchto analytů [7, 8]. Příležitostně mohou být pozorovány dlouhé ekvilibrační časy při použití některých pufrů jakožto součásti mobilních fází a/nebo tzv. „krvácení“ (bleeding) vázané fáze. Chemicky vázané diolové fáze s 2,3-

dihydroxypropylovými zbytky mají vysokou polaritu a schopnost tvořit vodíkové vazby. Neobsahují ionizovatelné skupiny jiné než zbylé nezreagované silanolové skupiny. Jsou proto vhodné pro HILIC techniku. Stacionární fáze s undecyl-1,2-diolovými zbytky vázanými na silikagel obsahují dlouhý hydrofobní řetězec nesoucí polární diolovou funkci na konci. Může být používána jak v RP LC uspořádání s nízkým obsahem organického rozpouštědla, tak v HILIC s vysokým obsahem organického rozpouštědla v závislosti na výběru mobilní fáze. Tato fáze byla použita k určení distribuce alkylových řetězců a oxyethylenových skupin v ethoxylovaných tensidech [7].

Silikagel modifikovaný kyanopropylem postrádá schopnost tvorby vodíkových vazeb [1, 7], a proto je retence polárních sloučenin ve vodno-organických mobilních fázích velmi malá. Tato fáze není tedy příliš vhodná pro HILIC separace [7]. Chemicky vázající fáze s jinými funkčními skupinami jako je polyetylenglykol, pentafluorobenzen, nebo alkyly s navázanými amidovými či karbamátovými skupinami jsou obecně určeny pro RP aplikace v mobilních fázích bohatých na vodu. Avšak při vysokém procentu organiky se retence mnoha sloučenin zvyšuje se stoupající koncentrací ACN či metanolu, což je typické chování pro HILIC [7].

Řada kolon tvořených silikagelem s navázaným amidem jsou dobře použitelné pro HILIC analýzy [7]. Amidová skupina je navázaná k povrchu silikagelu prostřednictvím krátkého alkylového řetězce a oproti aminoskupinám nemá bazické vlastnosti, takže retence je méně závislá na pH a tak je ireversibilní adsorpce analytů v těchto případech méně pravděpodobná [1, 7, 30]. Některé amidové fáze byly specificky vyvinuty pro HILIC použití, jako je například „carbamoyl-slica HILIC TSK-gel Amide-80“, poly(2-hydroxyethylaspartamid) nebo poly(sukcinimid).

Pro chirální separace se používají cyklodextranové na silikagelu založené stacionární fáze se schopností rozpoznání chirálních sloučenin. Tato schopnost je dána několika spojenými glukopyranosidovými jednotkami v šesti-, sedmi- nebo osmičlenných kruzích s množstvím vicinálních hydroxyskupin [1, 7, 30].

Monolytické silikagelové kolony s polyakrylamidovou vrstvou vyrobené „on –column“ polymerizací mají lepší chemickou stabilitu a vyšší retenci v porovnání s nepotaženým silikagelem [7].

1.1.6.3. Iontovýmienné a zwitterionické stacionární fáze

Separace sacharidů [30] a dalších neutrálních sloučenin na iontových výměnících při typických HILIC podmínkách je známá již dlouhou dobu. Jak na kation-výměnných, tak anion-výměnných styren-divinylbenzenových pryskyřicích retence neionických polárních sloučenin vzrůstá se vzrůstající koncentrací ethanolu v ethanol-vodných mobilních fázích. Tyto první překvapivě vysoce selektivní separace měly malou účinnost a byly časově náročné a byly proto později přehodnoceny [7].

HILIC separace mohou být v současné době uskutečněny na mnohem více účinných iontovýmienných kolonách. Například některé monosacharidy, glykoly a glycerol byly separovány na porózních styren-divinylbenzen kation výměnných pryskyřicích s jen mírně sulfonovaným povrchem v ACN-voda mobilních fázích. Pro separaci hydrofilních peptidů byl používán poly(2-sulfoethyl)aspartamid jakožto silný kation výměnný materiál ve vodno-organických mobilních fázích obsahujících 50% či více ACN. Kvůli přítomnosti iontovýmienných skupin, smíšený HILIC/ionto-výměnný mechanismus určuje retenci a může působit specifické selektivní efekty. Smíšený anion výměnný/ kation-výměnný/HILIC mechanismus na silikagelu založených slabých ionto-výměnných pryskyřic s malými póry se ukázal užitečným pro analýzu a čištění dipeptidů a dalších sloučenin jak biologického, tak syntetického původu za použití kombinovaného gradientu pH a vzrůstající koncentrace vody [7]. Slabé kation iontoměničové připravené polymerizací „on-column“ kyseliny akrylové na monolitických kapilárních silikagelových kolonách byly použity pro HILIC a kation-výměnné separace polyaminoderivatizovaných cukrů, peptidů, proteinů a nukleosidů [7].

Nedávno byly zavedeny pro HILIC separace anorganických solí, malých organických iontových sloučenin a proteinů zwitterionické sulfoalkylbetainové stacionární fáze, které jsou užitečné i pro další typy sloučenin. Aktivní vrstva, která je navázána na vysoce porózní silikagelový nebo polymerový nosič, obsahuje jak silně kyselé zbytky kyseliny sulfonové, tak silně bazické kvarterní amoniové baze oddělené krátkým alkylovým můstkem. Obě dvě opačně nabitě skupiny jsou zastoupeny v molárním poměru 1:1. Na povrchu navázané vrstvy je přítomna velmi řídká síť negativního náboje, která se přisuzuje větším vzdálenostem sulfonových skupin od silikagelového povrchu [7]. Tento náboj je pouze málo ovlivňován pH [1, 7, 29]. Proto se předpokládá, že iontovýmienné interakce zwitterionické stacionární fáze

jsou slabší v porovnání s iontoměniči a vázanými amino-fázemi. Uvádí se, že elektrostatické interakce jsou zde dokonce slabší než u prostého silikagelu, amid a jiné funkční skupiny vázajících fází, jelikož jsou zbylé silanolové skupiny účinně stíněné vlastní asociací s opačně nabitými funkčními skupinami [7]. Proto se chromatografické vlastnosti zwitterionických materiálů významně liší od ostatních HILIC fází [1].

Zwitterionické kolony jsou komerčně dostupné pod obchodními značkami ZIC-HILIC (na silikagelovém nosiči) a ZIC-pHILIC (na polymerním nosiči) [7, 8].

1.1.6.4. Organické polymerní stacionární fáze

Polymerní zwitterionické kolony pro HILIC separace jsou vyráběny např. polymerizací 2-methakryloyloxyethyl fosforylcholinu na povrchu silikagelu. Tepelná ko-polymerizace N,N-dimethyl-N-methakryloyloxyethyl-N-(3-sulfopropyl)amonium betainu a ethylendimethakrylátu uvnitř kapiláry s vnitřním průměrem 100 μm dá vzniku zwitterionickým kapilárním monolitickým kolonám vhodným pro HILIC separace neutrálních, basických a kyselých sloučenin ve vodno-organických mobilních fázích s 60% či více procenty ACN [7].

1.2. Chelátory železa

Chronicky zvýšená hladina železa je stav, který se téměř výlučně objevuje u pacientů s genetickými defekty, které pozměňují regulovanou absorpci železa ze střeva (např. hemochromatóza) nebo vedou k defektu v syntéze hemoglobinu. Léčba těchto onemocnění vyžaduje pravidelné krevní transfúze jako prevenci vážné anemie (např. talasemie). Hlavní pozornost byla v minulosti zaměřena na použití chelátorů železa k odstranění nadbytku železa z těla u pacientů s talassemia major, protože lidské tělo nemá efektivní způsob jak vylučovat železo nahromaděné z krevních transfúzí. V současnosti jsou pacienti, kteří trpí thalasemií léčeni deferoxaminem, deferipronem nebo nověji deferasiroxem. Po podání těchto léčiv je železo vylučováno ve formě chelátu do moči a stolice[10].

Vedle této původní indikace však chelátory železa také vykazují jiné zajímavé účinky, které sou v současnosti v popředí výzkumných aktivit. Klinicky užívaný dexrazoxan působí významně kardioprotektivně při současném podání s anthracykliny. Chelátor furildioxim je vyvíjen jako fotoprotektivní agens. Zileuton, inhibitor enzymu 5-lipoxygenasy, která katalyzuje tvorbu leukotrienů z arachidonové kyseliny, je používán k léčbě astmatu.

Chelátory železa mohou být také užitečné v prevenci tvorby hydroxylových radikálů, léčbě rakoviny, malárie, postischemického reperfúzního poškození a neurodegenerativních onemocnění[10].

1.3. Anthrachinonové chemoterapeutika

Anthracykliny jsou cytotoxická léčiva široce používaná v klinické praxi při léčbě hematologických malignit (leukémií, lymfomů [11]) a solidních nádorů (žaludku, prsu a vaječníků [11]). Ačkoliv jsou nová protinádorová léčiva velmi slibná, anthracykliny jsou stále významnou a nepostradatelnou součástí řady terapeutických režimů např. v léčbě rakoviny prsu [12].

Anthracyklinové chemoterapeutikum doxorubicin (DOX) je inhibitor topoisomerasy II [10, 13], které zastavuje buněčné dělení zabráněním replikace DNA [10]. Doxorubicin zůstává jedním z nejvíce používaných protinádorových léčiv. Je cennou součástí různých chemoterapeutických režimů používaných při léčbě karcinomu prsu a plicního malobuněčného karcinomu. U metastazujícího karcinomu štítné žlázy je pravděpodobně nejlepší dostupnou léčbou. Je také významný pro úspěšnou léčbu Hodgkinovy nemoci a non-Hodgkinových lymfomů. Avšak efektivní použití při léčbě všech těchto malignit má svůj velký limitující faktor [14].

Dlouhotrvající léčba anthracykliny při kumulativní dávce přibližně 550 mg/m^2 způsobuje neobvyklou srdeční toxicitu známou jako anthracykliny indukovaná kardiotoxicita [10]. U téměř poloviny všech pacientů léčených doxorubicinem v dávce $\geq 1000 \text{ mg/m}^2$ se během života projeví srdeční selhání. Kardiotoxicita se objevuje až v 71% pacientů, kteří byli léčeni anthracykliny jako děti. Zatímco pravděpodobnost kardiotoxicity jasně souvisí s kumulativní dávkou anthracyklinů, je důležité pamatovat, že účinky těchto látek na srdce začínají od první dávky. Skutečně chronické srdeční selhání bylo popsáno po jediné dávce 50 mg/m^2 doxorubicinu. Při dávkách $200 - 250 \text{ mg/m}^2$ se známky kardiotoxicity nemusí klinicky projevit, ale mohou být odhaleny např. měřeními ejekční frakce levé komory [15]. Vedle doxorubicinu byla kardiotoxicita prokázána i u dalších protinádorových anthracyklinů jako je daunorubicin, epirubicin a idarubicin. [9] Na molekulární úrovni doxorubicin vytváří při neutrálním pH Fe(III)-(DOX)_3 komplex. Ten pak může podléhat redukci za vzniku Fe(II)-(DOX)_3 komplexu, což je spojeno s produkcí hydroxylových radikálů prostřednictvím Haber-Weissovy

reakce. Toto může mít za následek peroxidaci kardiolipidů vnitřní mitochondriální membrány, což vede k ireversibilnímu poškození srdečních myocytů a selhání srdečního svalu [10]. Specifická senzitivita myokardu vůči anthracyklinům je pravděpodobně způsobena nízkými koncentracemi katalázy a superoxid dismutázy (SOD) v srdečních kardiomyocytech [16].

Doxorubicin je chinon, který může být aktivovaný tím, že je redukován pomocí různých reduktás jako je xanthinoxidasa, cytochrom P450 reduktasa a NADH dehydrogenasa na svůj semichinonový radikál [13, 17]. Semichinonový radikál pak rychle reaguje s kyslíkem za vzniku reaktivních forem kyslíku jako je superoxidový anion a peroxid vodíku [13].



Výsledky řady studií ukazují, že doxorubicin je schopen indukovat jak apoptózu, tak nekrózu srdečních myocytů (při vyšších koncentracích doxorubicinu) [17, 11, 16, 14].

Náhodná extravazace anthracyklinů je další obávanou komplikací léčby těmito látkami. Odhaduje se, že se vyskytuje u 0,5-6% všech pacientů léčených chemoterapií. Lokální toxicita je charakterizována okamžitou bolestí, erytémem a otokem v místě extravazace [12]. Tkáňové poškození může progredovat během dnů a týdnů působíce bolest a rostoucí riziko infekce, destrukci kloubu, lézi nervů a trvalé dysfunkční a kosmetické změny v dané oblasti. Vše může vyústit i v nutnost amputace postižené končetiny [19]. Ulcerace se nemusí projevit během několika dní či dokonce týdnů a může se zhoršovat po měsíce, pravděpodobně z důvodu difuze do přilehlé tkáně [12]. Anthracykliny mohou přetrvávat ve tkáních týdny či dokonce měsíce po extravazaci [19]. Zatímco malé rány se mohou hojit, velké ulcerace vyžadují chirurgické odstranění nekrotické tkáně [12] a/nebo transplantaci kůže [19].

1.4. Dexrazoxan a jeho metabolity

1.4.1. Klinické použití

Dexrazoxan se klinicky používá ke snížení doxorubicinem indukované kardiotoxicity [20]. Snižuje kardiotoxický účinek anthracyklinů a dovoluje bezpečné použití jejich vyšších dávek. Váha důkazů poukazuje na to, že neovlivňuje protinádorovou aktivitu anthracyklinů [15].

Kromě své schopnosti předcházet doxorubicinem indukované kardiotoxicitě, dexrazoxan prokázal na zvířecích experimentálních modelech snížení či prevenci mortality způsobené ischemií předního mozku, neomycinem indukované plicní toxicity, isoproterenolem indukované kardiotoxicity, acetaminofenem indukované hepatotoxicity, alloxanem indukovaného diabetu a hyperoxií indukovaným plicním poškozením. Je pravděpodobné, že většina či všechny tyto toxické účinky zahrnují nějaký kritický krok na železu závislé produkce kyslíkových radikálů [21].

Do nedávna neexistovala žádná efektivní léčba ničivých následků anthracyklinové extravazace. Preklinické a klinické studie vedou k zařazení dexrazoxanu do klinické praxe jako prvního a jediného účinného antidota. Ve dvou multicentrických studiích prováděných v Evropě dexrazoxan prokázal, že je vysoce účinný v prevenci nekrózy kůže a ulcerací. V každé studii byla po infuzním podání dexrazoxanu pozorována významně nižší četnost a závažnost tkáňového poškození způsobeného extravazací anthracyklinu [19].

1.4.1.1. Nežádoucí účinky

Méně často přechodná leukopenie nebo trombocytopenie, zvýšení hodnot transamináz, alergické kožní reakce; vzácně alopecie; velmi vzácně anafylaktický šok [22].

1.4.1.2. Kontraindikace

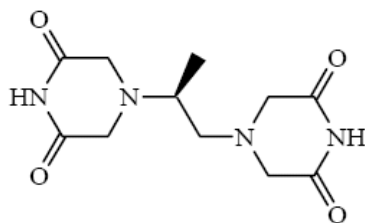
Přecitlivělost na dexrazoxan, gravidita, laktace; opatrnosti je třeba u útlumu krvetvorby nebo těžké poruchy funkce jater či ledvin [22].

1.4.1.3. Dávkování

Dexrazoxan se aplikuje 30 minut před zahájením infuze doxorubicinu, nebo epirubicinu nitrožilní infuzí trvající alespoň 15 minut; dávka dexrazoxanu odpovídá dvacetinásobku aplikované dávky doxorubicinu, nebo deseti násobku aplikované dávky epirubicinu [22].

1.4.2. Chemická struktura a fyzikálně - chemické vlastnosti

Dexrazoxan (ICRF-187 [19]) je (+)-(S)-enantiomer racemického razoxanu (ICRF-159), který byl původně vyvinut jako protinádorové léčivo [23]. Jedná se derivát bisdioxopiperazinu [13]. Může být považován za neutrální analog tetrasytné kyseliny chelatující kovy – EDTA. Celý strukturální název je (S)-(+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazin-1-yl)propan [19].



Obr. č. 4: Vzorec dexrazoxanu.

Molekulární vzorec je $C_{11}H_{16}N_4O_4$; molekulární hmotnost je 268,3. Dexrazoxan je bílý až krémově bílý prášek s teplotou tání $194 \pm 3^\circ\text{C}$. Je rozpustný v dioxanu a 0,1 M HCl, mírně rozpustný ve vodě, tetrahydrofuranu, citrátovém pufru při pH 4,0 a fosfátovém pufru při pH 7,0. Disociační konstanty pak jsou 2,5 (pro terciární dusík piperazinu) a 9,7 (pro dusík imidové skupiny). Log P je -2,135 [19].

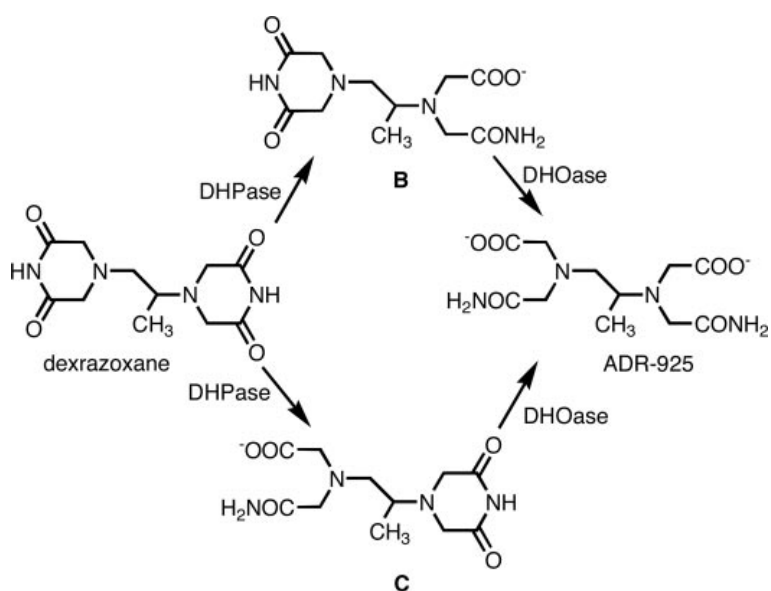
1.4.3. Intracelulární hydrolýza dexrazoxanu

Bylo zjištěno, že je DHPasa zodpovědná za enzymatickou hydrolýzu dexrazoxanu na meziprodukty B a C. Dalším enzymatickým působením (DHOasa) pak dochází k úplné hydrolýze léčiva na ADR-925 (viz obr. 5). Stejným způsobem probíhá také chemická hydrolýza v alkalickém prostředí hydroxidu sodného. Dexrazoxan je schopen pronikat do buněk a tak může být přímo vychytáván tkáněmi. Skutečnost, že ADR-925 se rychle objevuje v plasmě, poukazuje na to, že je dexrazoxan rychle metabolizován ve tkáních a že jeho metabolity nesoucí náboj dostatečně prochází buněčnou stěnou, aby byly rychle uvolněny do krve. Z toho vyplývá, že i když není dexrazoxan metabolizován v srdci, metabolity pravděpodobně dobře pronikají buněčnou membránou do krve, aby byly vychytávány srdeční tkání a vytvořily zde dostatečné koncentrace [24]. Čištěná DHPasa katalyzuje otevření jednoho kruhu dexrazoxanu za vzniku produktů B/C, jejichž poměr je v rozsahu 2,9-6,1 v závislosti na pH. DHOasa, která je přítomná v srdci, játrech, ledvinách a krvi, enzymaticky hydrolyzuje meziprodukty B a C (nikoliv dexrazoxan) na ADR-925 [24].

1.4.4. Mechanismus účinku

I když dosud nebyl mechanismus kardioprotektivního působení dexrazoxanu detailně objasněn, předpokládá se, že jde o proléčivo, které proniká do buňky, kde je hydrolyzováno na své meziprodukty B a C s jedním otevřeným kruhem až na na svoji plně otevřenou formu

vázající kovy – ADR-925, která má strukturu podobnou EDTA (schéma je uvedeno na obrázku č. 5) [23]. Dexrazoxan je tedy možné považovat za bidentátní chelátor bivalentních kationtů [25]. Výsledky řady experimentálních studií poukazují na to, že *anthracyklinová* toxicita může být způsobena na železu závislé tvorbě volných kyslíkových radikálů působících na relativně nechráněný srdeční sval [20]. (Ten obsahuje relativně málo antioxidantních enzymů [24].) Dexrazoxan tedy může prostřednictvím aktivního metabolitu ADR-925 odstraňovat železo z komplexu železo - doxorubicin, nebo vyvazovat volné železo, a tak bránit na železu závislé tvorbě kyslíkových radikálů [20]. ADR-925 je silné chelatační činidlo, které je schopné tvořit stabilní komplexy kromě železa i s mědí a dalšími ionty kovů [19].



Obr. č. 5: Metabolická hydrolýza dexrazoxanu (ICRF-187).

1.5. Přehled použitých metod pro HPLC analýzu dexrazoxanu

Hasinoff a Aoyama použili HPLC analýzu využívající jako stacionární fázi kolonu 10 μm $\mu\text{Bondapak 3,9 x 300mm RP C}_{18}$ (Waters, Mississauga). Mobilní fáze byla složena z 500 μM Na_2EDTA (pH 3,5)/ 20 mM heptansulfonové kyseliny (90/10, v/v) a methanolu, jehož koncentrace se během 10 min lineárně zvyšovala z 0 na 8% (v/v). Toto složení MP (Na_2EDTA /heptansulfonová kyselina/methanol, 82:10:8, v/v/v) bylo udržováno p dalších 14 min do konce analýzy, načež byla kolona reekvilibrována počáteční MP po 8 min. Byla užitá derivatizace založena rychlé deprotonizaci imidové skupiny dexrazoxanu, meziprojektu B nebo C za vzniku imidového aniontu, který má absorpční maximum při 227 nm. K derivatizaci byl použit 30 mM NaOH [23].

Stejní autoři použili isokratickou eluci pro separaci dexrazoxanu a jeho enantiomeru razoxanu. Mobilní fáze byla složena z 85% (v/v) alkoholu (90% ethanolu, 5% methanolu, a 5% isopropanolu (v/v)) a 15% (v/v) hexanu (>95% n-hexanu). Detekce byla prováděna při 207 nm, průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Jako stacionární fáze byla použita kolona Chiracel OD chirální celulóza tris(3,5-dimethylfenylkarbamát) (10 μm , 4,6 x 250 mm) (Chiral Technologies Exton, PA) [26].

Schroeder a Hasinoff použili fluorescenční metodu využívající chelatační indikátor kalcein k detekci ADR-925 v krevní plasmě. Dexrazoxan a jeho metabolity s jedním otevřeným kruhem byly stanoveny pomocí HPLC (C18-reverzní fáze; viz [23]). Fluorescence kalceinu je silně zhasena Co^{2+} ionty, se kterými vytváří pevný 1:1 komplex. Stanovení zahrnuje zpětnou titraci Co^{2+} ionty. Při této analýze dochází nejprve k navázání Co^{2+} na ADR-925 a nezreagované Co^{2+} ionty pak reagují s kalceinem. Zbytek volného kalceinu byl stanoven fluorimetricky průtokovou injekční analýzou. Limit detekce ADR-925 v plasmě byl odhadnut na 1 μM [24, 27].

Schroeder et al. použili stejnou metodu s tím, že množství ADR-925 v plasmě jednoho pacienta bylo stanoveno pomocí HPLC na koloně C_{18} za isokratických podmínek (500 μM Na_2EDTA /10 mM oktansulfonová kyselina, pH 2,8, 1 ml/min) Detekce probíhala při 207 nm [24].

Marry L. et al. pro účely farmakokinetické studie použili gradientovou eluci na koloně C₁₈ (150 x 4,6 mm; Phenomenex, Torrance, CA) a UV detekce při 209 nm. Mobilní fázi A byl 0,01 M fosfátový pufr (pH 4,7) s 0,1 mM EDTA a mobilní fázi B byl 100% methanol. Gradientový program byl následující: lineární nárůst z 2 na 7% B během 8 min, dále 7% B do 18 min; lineární nárůst ze 7 na 15% B během 22 min, udržováno na 15% B do 31 min; lineární pokles z 15 na 2% B do 33 min; a ekvilibrace při 2% B do 40. min. Průtok byl 1,2 ml/min. Za použití těchto podmínek byly retenční časy dexrazoxanu a vnitřního standardu 15,4 a 28,8 min. Spodní limit detekce byl 10 ng/ml a spodní limit kvantifikace byl 20 ng/ml [25].

Rosing et al. vyvinuli metodu pro kvantifikaci dexrazoxanu v lidské plasmě a moči pro účely farmakokinetické studie. Příprava vzorku plasmy zahrnovala precipitaci bílkovin s acetonitrilem následovanou extrakcí s 10% 2- methyl-2-propanolem v chloroformu (v/v). Vzorky moči byly zředěny destilovanou vodou a následně extrahovány s 10% 2-methyl-2-propanolem v chloroformu (v/v). Chromatografické separace bylo dosaženo po odpaření organického rozpouštědla na koloně μ Bondapak Phenyl column (s vnitřním průměrem 4,6 mm a délkou 300 mm; velikost částic 10 μ m (Waters Assoc. Inc., Milford, MA) při laboratorní teplotě s mobilní fází složenou z 0,01 M fosforečnanem draselným o pH 4,7 a methanolu (8:2, v/v). Průtok byl udržován při 1,0 mL/min, nastříkován byl objem 50 μ L a detekce probíhala při 208 nm. Touto metodou je možné stanovit koncentraci dexrazoxanu v plazmě v rozsahu od 0,1 do 100 μ g/ml a v moči od 10 do 1000 μ g/ ml při užití 1000 μ l objemů vzorku [28].

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo studovat možnosti analýzy kardioprotektivního léčiva dexrazoxanu a jeho rozkladných produktů/metabolitů na stacionární fázi Ascentis HILIC za podmínek kompatibilních s hmotnostní detekcí.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použitý chromatografický materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie

Chromatografický materiál:

Chromatografická kolona Ascentis Express 15cmx3mm; 2,7 μ m, Supelco, Německo.

Přístroje:

Analytické váhy, Sartorius Analytic, Německo.

pH – meter, pH 510, Eutech Instruments, Singapur.

Ultrazvuková lázeň K 10, Krainte, Slovenská Republika.

Zařízení na mobilní fáze, Supelco, Německo.

Chromatografická sestava Shimadzu,- LC 20 (Shimadzu, Duisburg, Německo) složená z: DGU degasser-20A3, dvou LC-20 AD pump, SIL-20 AC autosampleru, CTO-20AC kolonového termostatu, SPD-20AC UV-VIS detektoru a CBM-20AC komunikační jednotky.

Pomůcky:

Laboratorní sklo.

Mikropipety.

Chemikálie:

Dexrazoxan-získaný z léčivého přípravku Cardioxane inj. sicc. (Novartis).

Aqua purificata- čišění reverzní osmózou.

Acetonitril- Merck, Darmstadt, Německo (deklarovaná čistota umožňovala přímé použití na kolonu jakožto součást mobilní fáze).

Mravenčan amonný – Sigma Aldrich, Německo.

Hydroxid sodný - Riechel- de Haen, Německo.

Kyselina chlorovodíková – Riedel-de Haen, Německo.

Příprava mobilní fáze:

Acetonitril byl přímo použit jako organická součást mobilní fáze. Vodná složka pak byla tvořena vodným roztokem pufru.

Vodný roztok pufru byl připraven rozpuštěním příslušného množství mravenčanu amonného v destilované vodě s následnou úpravou na požadované pH přidavkem zředěné kyseliny mravenčí nebo amoniaku. Roztok byl nakonec přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm .

Příprava zásobních roztoků analytů:

Zásobní roztok dexrazoxanu: Rozpuštěním příslušného množství lyofilizované soli dexrazoxan-hydrochloridu získané z léčivého přípravku Cardioxane inj. plv. sol. v destilované vodě byl získán zásobní roztok dexrazoxanu o koncentraci 10 mg/ml.

Zásobní roztok meziproduktů: Částečnou hydrolýzou tohoto zásobního roztoku dexrazoxanu byly získány meziprodukty B a C s jedním otevřeným kruhem. Částečné hydrolýzy bylo dosaženo přidavkem 50 μl 5 M roztoku NaOH na ml do 10 mg/ml zásobního roztoku dexrazoxan hydrochloridu. Hydrolýza byla zastavena po 45 minutách při 25°C přidavkem 45 μl 5 M roztoku HCl na ml.

Zásobní roztok ADR-925: ADR-925 bylo připraveno podle dříve publikovaného postupu[20]. ADR-925 byl připraven rovněž hydrolýzou zásobního roztoku dexrazoxan-hydrochloridu (10 mg/ml) při 25°C přidavkem 50 μl 5 M roztoku NaOH na ml zásobního roztoku. Hydrolýza byla zastavena po 48 hodinách přidavkem 45 μl 5 M roztoku HCl/ml.

Příprava vzorků pro analýzu:

50 μl každého zásobního roztoku spolu s 950 μl 60% acetonitrilu bylo napipetováno do viálky. Takto připravené roztoky – roztok dexrazoxanu, roztok meziproduktů a roztok ADR-925 byly označené uchovávány při teplotě 4 °C. Na kolonu byl nastřikován objem 1 μl .

3.2. Vývoj chromatografických podmínek pro stanovení dexrazoxanu, jeho meziproduktů a ADR-925 pomocí HILIC s UV detekcí

HPLC analýza dexrazoxanu a jeho rozkladných produktů/metabolitů probíhala na chromatografické koloně HILIC Ascentis Express (15 cm x 3 mm; 2,7 μm).

Výběr mobilní fáze

Pro separaci analytů byly vyzkoušené následující chromatografické podmínky:

Průtok mobilní fáze 0,3 ml/min, teplota na koloně 25 °C a detekce při 205 nm byly použity u všech následně jmenovaných mobilních fází.

1. mobilní fáze o pH 7 -složka A: 5 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 78 : 22 (v/v)
75 : 25 (v/v)
70 : 30 (v/v)

2. mobilní fáze o pH 6 -složka A: 5 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 78 : 22 (v/v)
75 : 25 (v/v)
70 : 30 (v/v)

3. mobilní fáze o pH 5 -složka A: 5 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 80 : 20 (v/v)
78 : 22 (v/v)
75 : 25 (v/v)
70 : 30 (v/v)

4. mobilní fáze o pH 4 -složka A: 5 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 78 : 22 (v/v)
75 : 25 (v/v)
70 : 30 (v/v)

5. mobilní fáze o pH 7 -složka A: 10 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 78 : 22 (v/v)

75 : 25 (v/v)

70 : 30 (v/v)

6. mobilní fáze o pH 6 -složka A: 10 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 78 : 22 (v/v)

75 : 25 (v/v)

73 : 27 (v/v)

70 : 30 (v/v)

7. mobilní fáze o pH 5 -složka A: 10 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 78 : 22 (v/v)

75 : 25 (v/v)

70 : 30 (v/v)

8. mobilní fáze o pH 4 -složka A: 10 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 78 : 22 (v/v)

75 : 25 (v/v)

70 : 30 (v/v)

9. mobilní fáze o pH 7 -složka A: 2,5 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 78 : 22 (v/v)

75 : 25 (v/v)

73 : 27 (v/v)

70 : 30 (v/v)

10. mobilní fáze o pH 6 -složka A: 2,5 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 78 : 22 (v/v)

75 : 25 (v/v)

70 : 30 (v/v)

11. mobilní fáze o pH 5 -složka A: 2,5 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 78 : 22 (v/v)

75 : 25 (v/v)

70 : 30 (v/v)

12. mobilní fáze o pH 4 -složka A: 2,5 mM mravenčanový pufr

-složka B: acetonitril

-poměr A/B: 78 : 22 (v/v)

75 : 25 (v/v)

70 : 30 (v/v)

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Snahou bylo nalézt optimální podmínky pro současnou HPLC analýzu dexrazoxanu, všech jeho rozkladných produktů/metabolitů (meziprodukty B, C a ADR-925) - a to především složení mobilní fáze, které by bylo kompatibilní s MS detekcí.

HPLC kolona určená pro HILIC byla vybrána s ohledem na to, že dexrazoxan a především jeho metabolity jsou díky své chemické struktuře vysoce hydrofilní, a tak jsou na běžných reverzních stacionárních fázích velmi málo retinovány. Proto je pro analýzu tohoto léčiva na reverzních fázích potřeba použít mobilní fázi s vysokým procentem vodné složky, což není s ohledem na zamýšlené užití MS detekce žádoucí. Užití moderní kolony pro tzv. HILIC chromatografii umožňuje dosáhnout akceptovatelnou retenci hydrofilních látek za použití mobilní fáze o poměrně vysokém procentu organické složky. Mobilní fáze obsahující vysoké procento organického rozpouštědla jsou obvykle výhodné pro HPLC/MS analýzy.

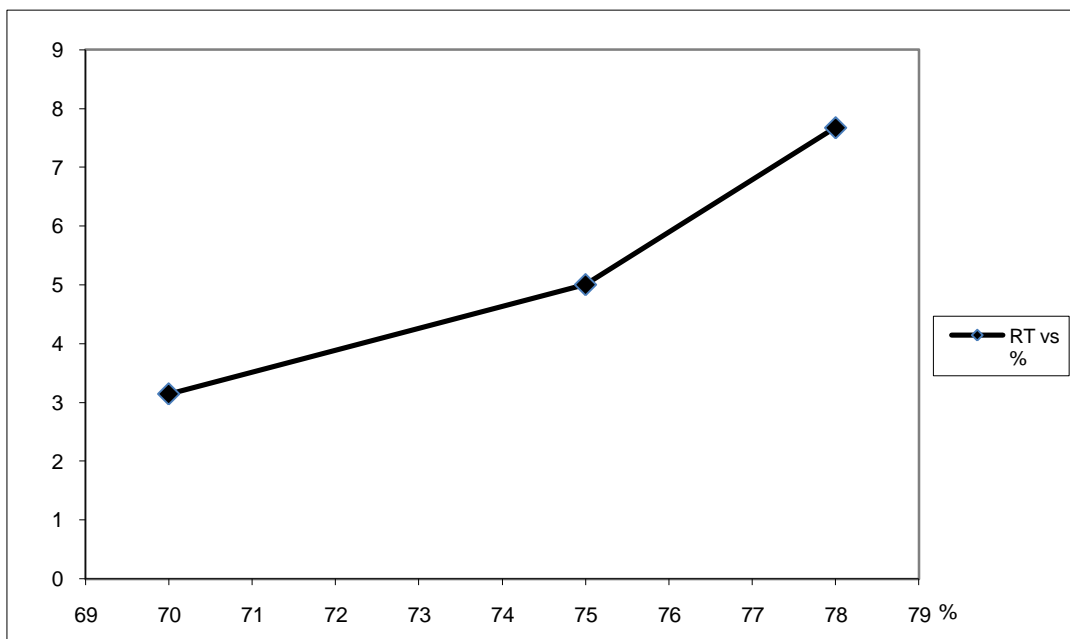
Na koloně Ascentis Express HILIC 15x3, 2,7 μm byla používaná mobilní fáze složená z acetonitrilu a mravenčanu amonného jakožto vodné složky za podmínek isokratické eluce. Testovány byly mobilní fáze s postupně snižovaným obsahem organické složky při síle pufru 5 mM pro jednotlivé hodnoty pH 7, 6, 5 a 4 při průtoku 0,3 ml/min. Teplota na koloně byla 25 °C a detekce probíhala při 205 nm.

Vliv složení mobilní fáze na retenci analytů:

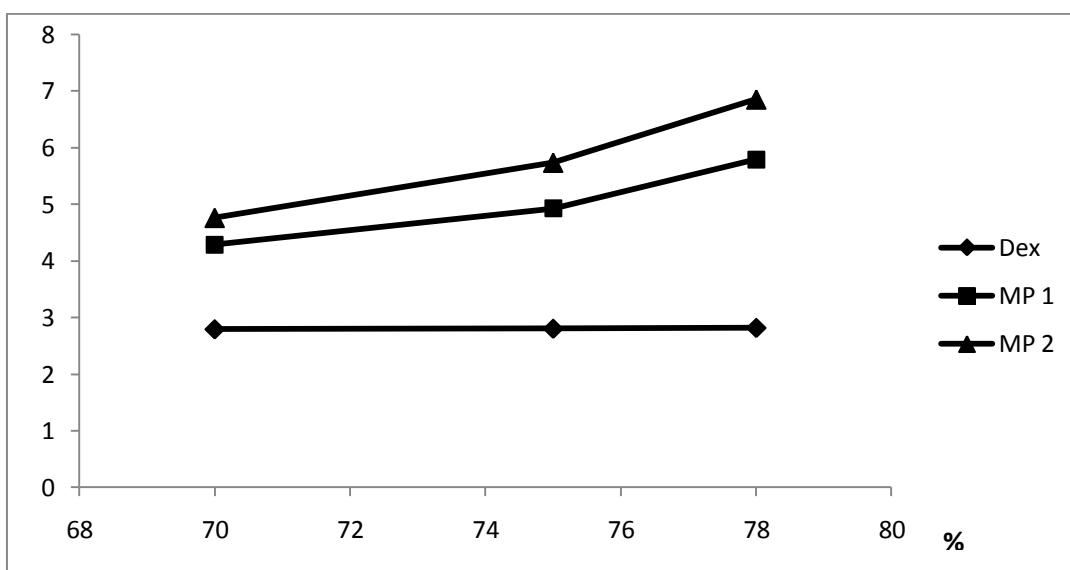
Retence byla sledována v poměrně úzkém rozmezí 70-78% acetonitrilu případně 70-80% (pro mobilní fázi o pH 5), ve kterém bylo dosaženo jinak poměrně problematické separace meziproduktů a současně bylo možné analyzovat také ADR-925. Při vyšším procentu organické složky docházelo k silné retenci ADR-925 na koloně, která se projevila velmi nesymetrickým tvarem píku. Naopak, při nižším procentu docházelo ke koeluci meziproduktů.

Píky se eluovaly v pořadí dexrazoxan, meziprodukty B a C a ADR-925 podle snižující se lipofility těchto analytů.

Při stoupajícím procentu organické složky v mobilní fázi se zvyšoval retenční čas analytů při všech pH. Závislost byla výraznější u meziproduktů a u ADR-925, nežli u dexrazoxanu (viz obrázek 6 a 7). Rozlišení píků meziproduktu B a C, které měli tendenci ke koeluci, rovněž rostlo se zvyšujícím se procentem acetonitrilu v mobilní fázi.



Obr. č. 6: Závislost retenčního času ADR-925 na procentu organické složky v mobilní fázi (5mM mravenčanový pufr o pH 7).

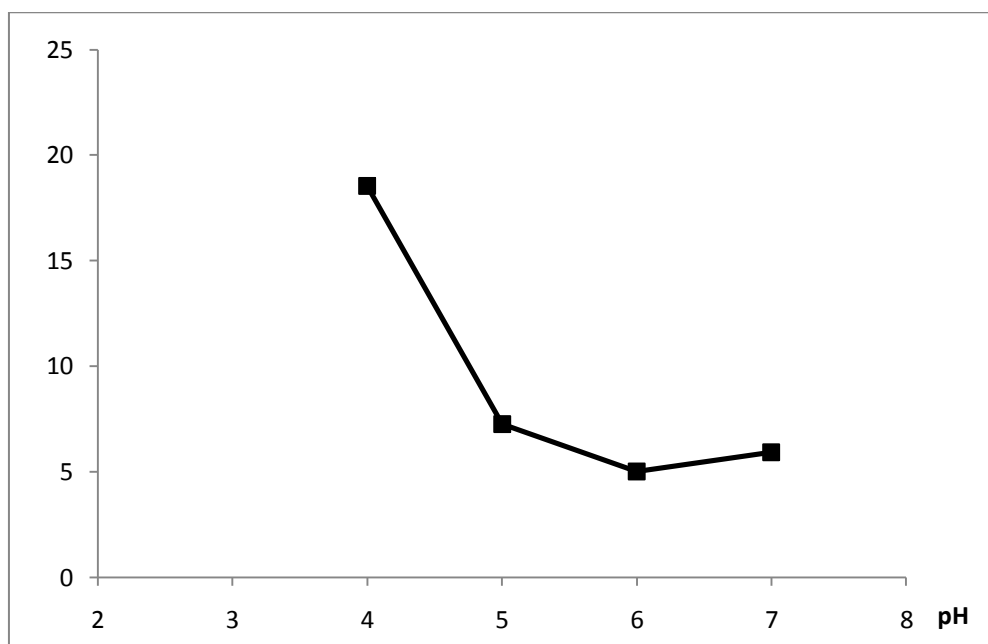


Obr. č. 7: 5mM mravenčanový pufr o pH7; závislost retence dexrazoxanu a meziproduktů na procentu organické složky.

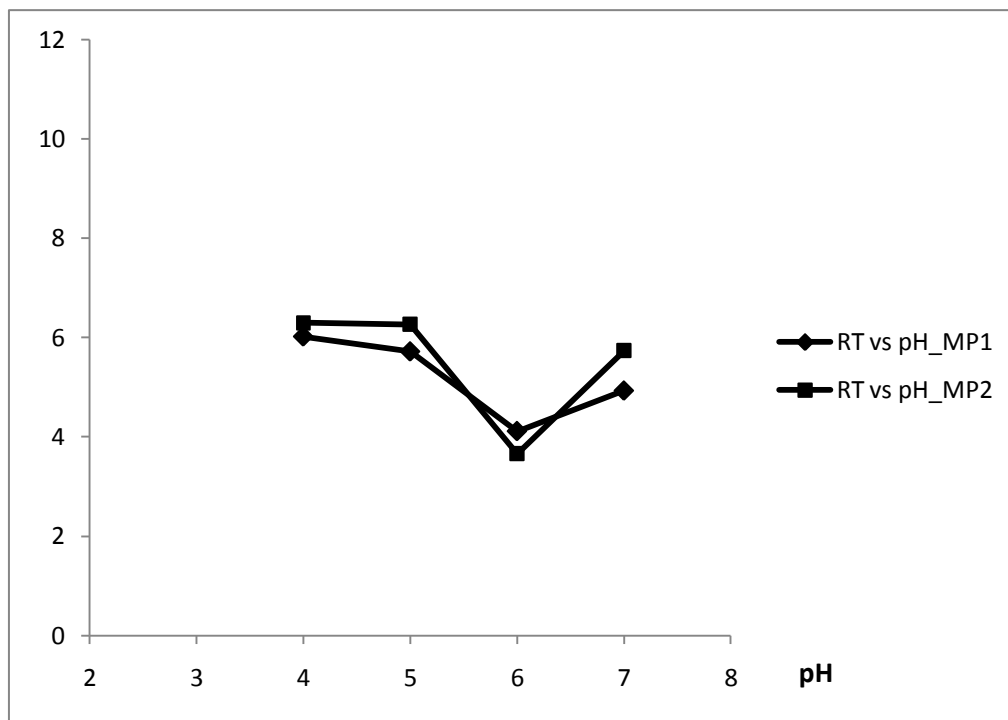
Vliv pH a síly pufru:

Vliv pH mobilní fáze na retenci analytů byl sledován v rozmezí 4-7, nejprve za použití pufru o síle 5mM. Závislost byla opět výraznější u ADR-925, zatímco retence dexrazoxanu byla ovlivněna minimálně. Při rostoucím pH vodné složky v rozmezí 4 až 6 se retenční čas všech analytů zkracoval. Závislost retence ADR-925 na pH je znázorněna na obrázku 8, pro meziprodukty je stejná závislost uvedena na obrázku 9. Další zvyšování pH mobilní fáze (od pH 6 do pH 7) pak naopak vedlo ke zvýšení retence.

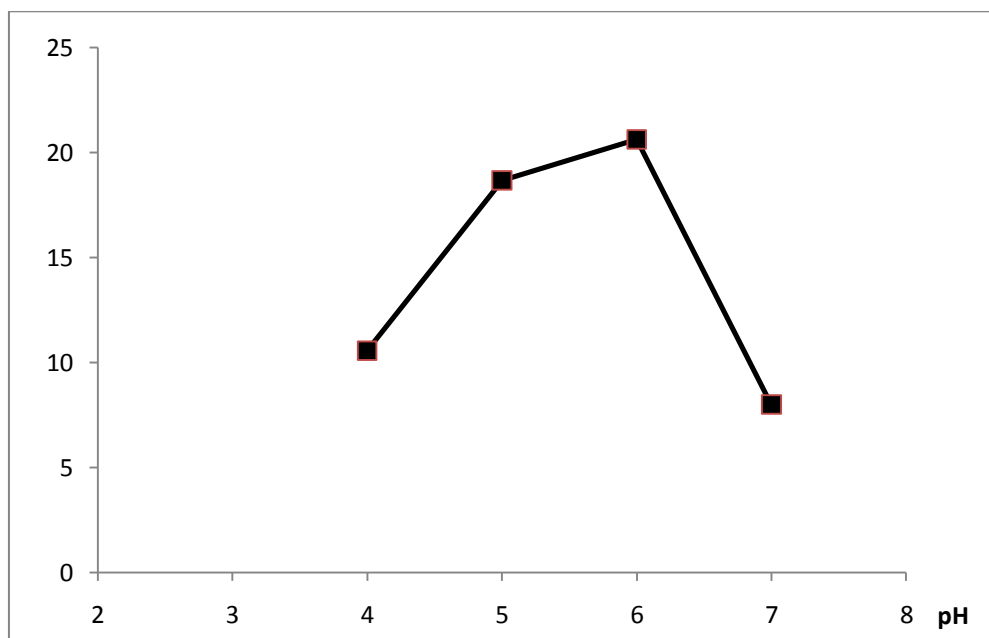
Stejným způsobem byly testovány mobilní fáze, kde vodná složka obsahovala mravenčan amonný o koncentraci 2,5 mM a 10 mM. Použitím mobilní fáze s 2,5 mM puftrem nebylo dosaženo dostatečné separace. U mobilních fází s 10 mM puftrem se projevila v případě ADR-925 opačná závislost retence na pH než u mobilních fází s 5 mM puftrem (viz obrázek 10).



Obr. č. 8: Závislost retenčního času na pH (ADR-925; mobilní fáze s obsahem 75% ACN a 25% 5mM mravenčanového pufru).

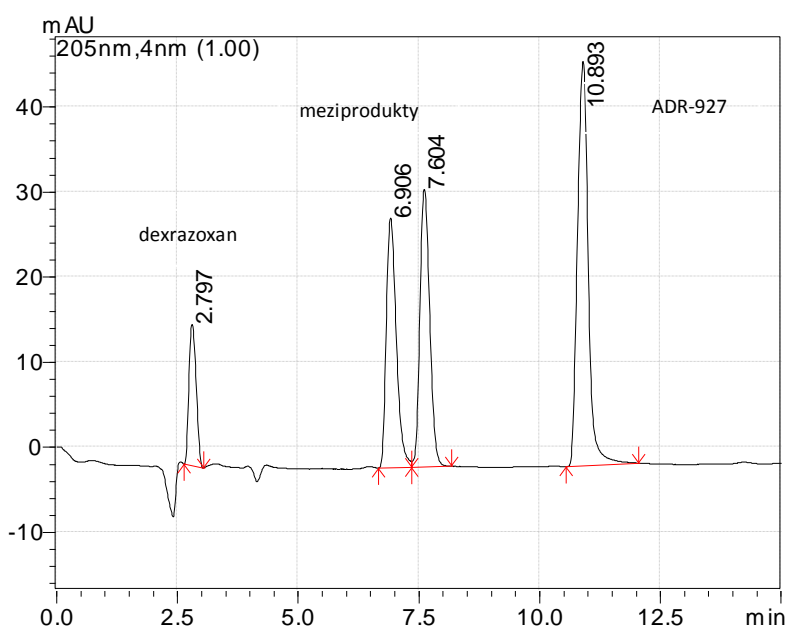


Obr. č. 9: Závislost retenčního času na pH (meziprodukty B a C; mobilní fáze s obsahem 75% ACN a 25% 5 mM mravenčanu amonného).



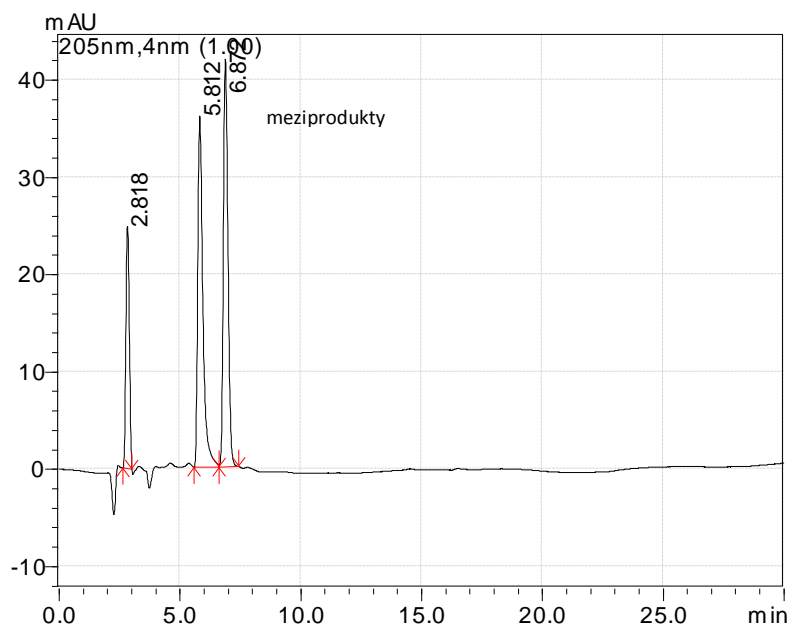
Obr. č. 10: Závislost retenčního času na pH (ADR-925; mobilní fáze s obsahem 75% ACN a 25% 10 mM mravenčanu amonného).

Chromatografické záznamy separace dexrazoxanu, meziproduktů B a C a ADR-925 – systematickým vývojem chromatografických podmínek, že je možné dosáhnout dostatečné separace všech analytů za použití mobilní fáze s 5mM mravenčanovým pufrům o pH 5 nebo 7 a acetonitrilu. V obou případech bylo separace všech analytů dosaženo při poměru složek 22:78 (pufr/acetonitril). Separace za použití mobilní fáze o pH 5 je demonstrována na chromatografickém záznamu vzorku zatíženého alkalickou hydrolyzou po dobu 1,5 hod. (obr. 11)

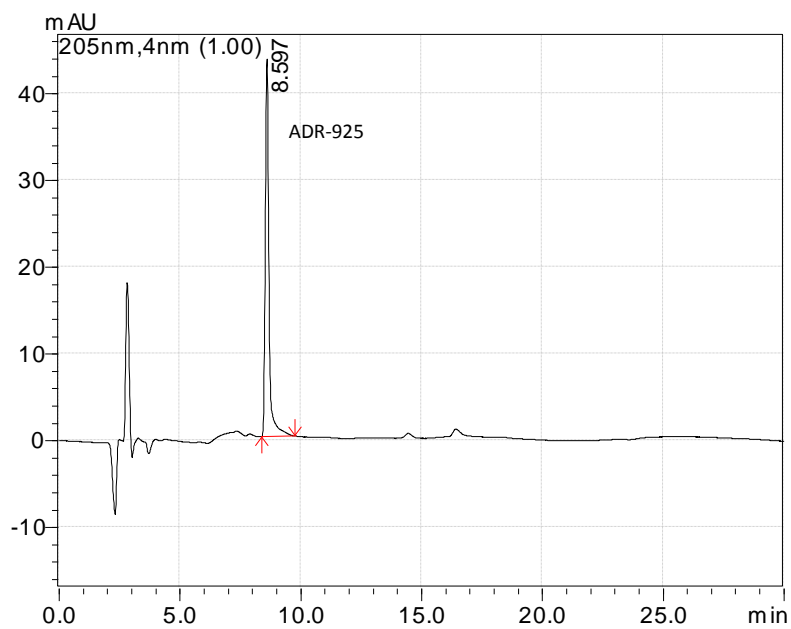


Obr. č. 11: Mobilní fáze se 78% ACN a 22% 5mM mravenčanu amonného o pH 5; píky dexrazoxanu, meziproduktů B a C a ADR-925.

Analýza dexrazoxanu a jeho rozkladných produktů s použitím mobilní fáze o pH 7 je znázorněna na obrázcích 12 a 13. Vzorek obsahující dexrazoxan a meziprodukty byl připraven částečnou hydrolyzou dexrazoxanu (obr. 12). Analýza vzorku ADR-925 za použití stejných chromatografických podmínek je znázorněna na obrázku 13.



Obr. č. 12: Mobilní fáze s obsahem 78% ACN a 22% 5 mM mravenčanu amonného o pH 7; pík dexrazoxanu a píky meziproduktů.



Obr. č. 13: Mobilní fáze s obsahem 78% ACN a 22% 5 mM mravenčanu amonného o pH 7; pík ADR-925.

5. ZÁVĚR

V diplomové práci byly vypracované chromatografické podmínky umožňující separaci dexrazoxanu a jeho tří rozkladných produktů/metabolitů na chromatografické koloně Ascentis Express HILIC 15cmx3mm; 2,7μm za podmínek kompatibilních s MS detekcí.

Bylo otestováno více jak 39 různých mobilních fází. Systematicky bylo měněno složení mobilní fáze, zejména pak procento acetonitrilu, pH a síla pufru.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití mobilní fáze tvořené 5 mM mravenčanem amonným o pH 5 nebo pH 7 a acetonitrilem v poměru 22:78 (v/v). Mobilní fáze protékala kolonou rychlostí 0,3ml/min, kolona byla temperována na 25 °C. Detekce byla prováděna v UV oblasti při vlnové délce 205 nm. Za těchto podmínek při isokratické eluci docházelo k dělení píků až na základní linii (včetně píků strukturně velmi podobných meziproduktů B a C). Při použití mobilní fáze o pH 7 došlo k separaci všech analytů do deseti minut. Výhodou této analýzy je rychlost separace spolu s vysokým procentem organické složky, která je těkavá, což je preferováno pro později zamýšlené využití MS detekce.

Separace všech analytů bylo rovněž dosaženo s použitím mobilní fáze stejného složení, pouze s pH 5. Retenční časy analytů však byly v tomto případě o něco delší, což prodlužuje celkový čas analýzy.

6. ABSTRAKT

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejpoužívanějších separačních metod instrumentální analýzy umožňující zároveň jak kvalitativní tak kvantitativní analýzu látek.

Anthracykliny jsou cytotoxická léčiva široce používaná v klinické praxi při léčbě hematologických malignit (leukémií, lymfomů) a solidních nádorů (žaludku, prsu a vaječníků). Léčba těmito léčivy však má svůj závažný limitující faktor. Tímto faktorem je anhracykliny indukovaná kardiotoxicita, která je způsobena hydroxylovými radikály a dalšími reaktivními formami kyslíku. V jejich tvorbě mají klíčovou úlohu komplexy anthracyklinů se železem.

Dexrazoxan je derivát bisdioxopiperazinu, který se používá ke snížení kardiotoxického účinku anthracyklinů. Předpokládá se, že působí prostřednictvím svého aktivního metabolitu ADR-925, který působí jako chelátor vyvazující železo, a tak brání na železu závislé tvorbě kyslíkových radikálů.

Tato práce se zabývá možnostmi analýzy dexrazoxanu a jeho rozkladných produktů/metabolitů na stacionární fázi Ascentis HILIC za podmínek kompatibilních s hmotnostní detekcí (MS).

Nejllepších výsledků bylo dosaženo za podmínek izokratické eluce při použití mobilní fáze tvořené 5mM mravenčanem amonným o pH 5 nebo 7 a acetonitrilem v poměru 22:78 (v/v). Mobilní fáze protékala kolonou rychlostí 0,3 ml/min, kolona byla temperována na 25 °C. Detekce byla prováděna v UV oblasti při vlnové délce 205 nm.

Výsledky této práce budou využity při vývoji HPLC-MS metody pro hodnocení dexrazoxanu a jeho rozkladných produktů/metabolitů a to i v komplikovaném biologickém materiálu.

7. ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most used separating methods of instrumental analysis enabling both qualitative and quantitative analysis of substances.

Anthracyclines are cytotoxic drugs widely used in clinical practice for treatment of hematological malignancies (leucaemias, lymphoms) and solid tumours (stomach, breast, ovarian cancer). Treatment by these drugs has a serious limiting factor, however. This factor is an anthracycline induced cardiotoxicity, which is caused by hydroxyl radicals and other reactive oxygen forms. The main role in their formation play the complexes with iron.

Dexrazoxane is a derivate of bisdioxopiperazine, which is used to reduce the cardiotoxic effect of anthracyclines. It is supposed that it takes effect by the means of its active metabolite ADR-925, which works as a substance chelating iron. This mechanism hinders the iron dependant formation of oxygen radicals.

This thesis deals with analysis options of dexrazoxane and its hydrolysis products/metabolites on the stationary phase Ascentis HILIC in conditions compatible with mass spectrometric detection (MS).

The best results were achieved in conditions of isocratic elution using mobile phases containing 5 mM ammonium formiate with pH 5 or 7 and acetonitrile in ratio 22:78 (v/v). Mobile phase flowed through the colony at speed 0,3 ml/min; the colony was temperate at 25 °C. Detection was performed in UV area at the wavelength of 205 nm.

The results of this thesis will be utilized for further development HPLC-MS method for determination of dexrazoxane and its hydrolysis products/metabolites even in complicated biological material.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Hemström P., Irgum K., Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 29, 1784-1821, 2006.
2. Wu J. Y., Bicker W., Lindner W., Separation properties of novel and commercial polar stationary phases in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography mode, *J. Sep. Sci.* 31, 1492-1503, 2008.
3. Evans G., *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*, CRC Press, USA 2004.
4. Scott R. P. W., *Liquid chromatography*, Library4science, LLC, World Wide Web, 2003, <http://www.library4science.com/>, 22. 1. 2010.
5. Ho C. S., Electrospray ionization mass spectrometry: Principles and clinical applications, *Clin. Biochem. Rev.* 24, 3-12, 2003.
6. Dejaegher B. et al., Method development for HILIC assay, *J. Sep. Sci.* 31, 1438-1448, 2008.
7. Jandera P., Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts, *J. Sep.Sci.* 31, 1421-1437, 2008.
8. Hsieh Y., Potential of HILIC-MS in quantitative bioanalysis of drugs and drugs metabolites, *J. Sep. Sci.* 31, 1481-1491, 2008.
9. Nguyen H. P., Schug K. A., The advantages of ESI-MS detection in conjunction with HILIC mode separations: Fundamentals and applications, *J. Sep. Sci.* 31, 1465-1480, 2008.
10. Tam T. F. et al., Iron chelator research: past, present, and future, *Curr. Med. Chem.* 10, 983-995, 2003.
11. Childs A. C. et al., Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome c release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and bcl-2: Bax ratio., *Cancer Res.* 62, 4592-4598, 2002.
12. Langer S. W., Treatment of anthracycline extravasation with dexrazoxane, *Clin. Cans. Res.* 6, 3680-3686, 2000.
13. Hasinoff B. B., Herman E. H., Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug?, *Cardiovasc. Toxicol.* 7, 140-144, 2007.

14. Kang Y. J. et al., Suppression by Metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases, *J. Biol. Chem.* 275, 13690-13698, 2000.
15. Swain S. M., Vici P., The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130, 1-7, 2003.
16. Sawyer D. B. et al., Daunorubicin-induced apoptosis in rat myocytes is inhibited by dexrazoxane, *Circ. Res.* 84, 257-265, 1999.
17. Hasinoff B.B. et al., Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against doxorubicin by preventing damage to mitochondria, *Cardiovasc. toxicol.* 3, 89-99, 2003.
18. Kotamraju S. et al., Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen, *J. Biol. Chem.* 275, 33585-33592, 2000.
19. Jordan K. et al., Anthracycline extravasation injuries: management with dexrazoxane, *Therapeutics and Clinical Risk Management* 5, 361-366, 2009.
20. Schroeder P. E., Hasinoff B. B., Metabolism of the one-ring open metabolites of the cardioprotective drug dexrazoxane to its active metal-chelating form in the rat, *Drug Metab. Dispos.* 33, 1367-1372, 2005.
21. Hasinoff B. B. et al., Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against doxorubicin by preventing damage to mitochondria, *Cardiovasc. Toxicol.* 3, 89-99, 2003.
22. Suchopár J. a kol., *Remedia compendium*, Panax, Praha 2009.
23. Hasinoff B.B., Aoyama R. G., Relative plasma levels of the cardioprotective drug dexrazoxane and its two active ring-opened metabolites in the rat, *Drug Metab. Dispos.* 27, 265-268, 1999.
24. Schroeder P. E. et al., Metabolism of dexrazoxane (ICRF-187) used as a rescue agent in cancer patients treated with high-dose etoposide, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 52, 167-174, 2003.
25. Tetef M. L. et al., Phase I of 96-hour continuous infusion of dexrazoxane in patients with advanced malignancies, *Clin. Canc. Res.* 7, 1569-1576, 2001.

26. Hasinoff B.B, Aoyama R. G., Stereoselective metabolism of dexrazoxane (ICRF-187) and levrazoxane (ICFR-186), *Chirality* 11, 286-290, 1999.
27. Schroeder P. E., Hasinoff B. B., The doxorubicin-cardioprotective drug dexrazoxane undergoes metabolism in the rat to its metal ion-chelating form ADR-925, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 50, 509-513, 2002.
28. Rosing H. et al., High performance liquid chromatographic analysis of the cardioprotective agent dexrazoxane in human plasma and urine, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 20(4), 583-601, 1997.
29. Appelblad P. et al., A practical guide to HILIC, World Wide Web edition, Published online by Merk SeQuant, 2009,
<http://viewer.zmags.com/publication/95db93bd#/95db93bd/1>, 16.3.2010.
30. Ikegami T., Tomomatsu K., Takubo H., Horie K., Tanaka N., Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1184, 474–503, 2008.