

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE
A KONTROLY LÉČIV

DIPLOMOVÁ PRÁCA

HPLC analýza klinicky užívaného kardioprotektiva – dexrazoxanu

Hradec Králové 2009

Vladimíra Pecuchová

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované.

Na tomto mieste by som rada poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce PharmDr. Petre Kovaříkovej, Ph.D. za pomoc a odborné rady pri vypracovávaní diplomovej práce. Taktiež by som chcela poďakovať za pomoc Mgr. Jánovi Stariatovi.

OBSAH

OBSAH.....	4
1. ÚVOD.....	5
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	7
2.1 História a vývoj kvapalinovej chromatografie.....	8
2.2 Definícia chromatografických metód.....	9
2.3 Rozdelenie chromatografických metód.....	10
2.3.1 Podľa mechanizmu separácie:.....	10
2.3.2 Podľa elúcie:.....	13
2.3.3 Podľa usporiadania stacionárnej fáze:.....	14
2.3.4 Podľa použitej mobilnej fáze:.....	14
2.4 Schéma HPLC.....	15
2.5 Hlavné časti kvapalinového chromatografu:.....	15
2.5.1 Zásobníky mobilnej fáze.....	15
2.5.2 Mobilná fáza.....	15
2.5.3 Čerpadlo (pumpa).....	16
2.5.4 Injektor.....	16
2.5.5 Kolóna.....	16
2.5.6 Detektory v kvapalinovej chromatografii.....	17
2.5.7 Vyhodnocovacie zariadenie.....	21
2.6 Kvalitatívna analýza HPLC chromatogramu.....	22
2.7 Železo v ľudskom organizme.....	22
2.8 Antracyklinové cytostatika a ich kardiotoxicita.....	23
2.9 Chelátory železa.....	24
2.9.1 Klinicky užívané chelátory železa.....	25
2.10 Dexrazoxan, jeho medzi produkty a výsledný metabolit ADR-925, ich vlastnosti a využitie.....	26
2.10.1 Fyzikálne – chemické vlastnosti.....	26
2.10.2 Intracelulárna hydrolýza dexrazoxanu.....	26
2.10.3 Farmakologicke účinky dexrazoxanu, jeho medzi produktov a metabolitu ADR-925.....	27
2.10.4 Farmakokinetika dexrazoxanu.....	27
2.10.5 Dávkovanie.....	28
2.10.1 Nežiadúce účinky.....	28
2.11 Prehľad publikovaných prác zameraných na analýzu dexrazoxanu.....	29
3. CIEĽ PRÁCE.....	30
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	32
4.1 Použitý chromatografický materiál, prístroje, pomôcky a chemikálie.....	33
4.2 Vývoj chromatografických podmienok pre stanovenie dexrazoxanu, jeho medzi produktov a ADR-925 pomocou HPLC s UV detekciou.....	35
5. VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	42
5.1 Vývoj chromatografických podmienok pre HPLC analýzu dexrazoxanu, jeho medzi produktov a ADR - 925.....	43
6. ZÁVER.....	49
7. ABSTRAKT.....	51
8. ABSTRACT.....	52
9. LITERATÚRA.....	53

1. ÚVOD

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia – High performance liquid chromatography (HPLC) patrí k moderným analytickým separačným metódam. Medzi jej najväčšie prednosti patrí citlivosť, selektivita, rýchlosť a malá spotreba analyzovaného vzorku.

HPLC má uplatnenie jak pri kvantitatívnej a kvalitatívnej analýze, tak pri skúmaní stability a čistoty liečiv. Metóda je používaná aj pri analýze liečiv a metabolitov v biologickom materiáli.

Veľké uplatnenie v súčasnosti nadobúda spojenie tejto progresívnej metódy s hmotnostným spektrometrom, ktorý umožňuje detekciu látok za vhodných podmienok po separácii na chromatografických kolónach. Toto spojenie HPLC-MS predstavuje rozvíjajúcu sa metódu, ktorá umožňuje analýzu s vysokou citlivosťou a selektivitou.

Dexrazoxan je v súčasnosti jediným klinicky používaným liečivom na trhu pôsobiacim proti poškodeniu srdca spôsobeného protinádorovou liečbou. Ide o liečivo s významným kardioprotektívnym účinkom, no mechanizmus tohto pôsobenia nebol doposiaľ objasnený.

Predmetom tejto štúdie bolo zamerať sa na vývoj vhodnej kontrolne analytickej metódy, ktorá by bola využiteľná na stanovenie totožnosti, čistoty, kvality a stability dexrazoxanu, jeho rozkladných medziproduktov a aktívneho metabolitu (ADR-925). Získané poznatky budú v budúcnosti využité pri vývoji citlivej HPLC-MS metódy vhodnej pre hodnotenie spomínaných analytov v biologickom materiáli a použité k štúdiu ich farmakokinetického a farmakodynamického pôsobenia v organizme.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 História a vývoj kvapalinovej chromatografie

Začiatky vývoja kvapalinovej chromatografie (Liquid chromatography, LC) siahajú až do roku 1890, kedy bola prvýkrát použitá vo forme tzv. *liquid-solid* chromatografie (LSC) ruským botanikom Tswettom, ktorý pomocou nej delil a izoloval rôzne rastlinné farbivá. Podľa farebných pásov ktoré zanechávali delené látky na sorbente túto metódu ako prvý označil termínom chromatografia („farebné písanie“) (1).

V roku 1913 Willstatter a Stoll opakovali Tswettove experimenty bez ohľadu na jeho upozornenie nepoužívať príliš agresívny adsorbent, ktorý spôsoboval rozklad chlorofylu. Dôsledkom toho bolo, že ich experimenty neboli úspešné, čo viedlo k publikovaniu negatívnych skúseností s novou technikou a odmietnutie diela Tswetta. To zapríčinilo zdržanie vývoja chromatografie ako schopnej separačnej techniky po dobu skoro 20-tich rokov (2).

Koncom 30-tych a začiatkom 40-tych rokov Martin a Synge navrhli formu kvapalinovej chromatografie so zakotvenou stacionárnou fázou, v tomto prípade vody na silikagel, a túto techniku využili na separáciu niektorých acetylovaných aminokyselín. Zároveň navrhli nahradiť tekutú mobilnú fázu vhodným plynom, čím by sa urýchlil transfer medzi dvoma fázami a tak zefektívnila separácia. Takto vznikol koncept plynovej chromatografie. V tom istom roku taktiež navrhli pre zlepšenie separácie v kvapalinovej chromatografii použitie malých čiastočiek a vyšších tlakov, a to sa stalo základom vývoja HPLC. Hlavnou prekážkou vo vývoji LC bol nedostatok vysoko citlivej detekcie, čo sa zmenilo s príchodom refraktometrického detektoru A. Tiseliusom a D. Claessonom v roku 1942 (3).

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, ako ju dnes poznáme, bola vyvinutá v polovici 70-tych rokov minulého storočia a bola postupne vylepšovaná vývojom kolonových náplní s vymoženosťou online detektorov. Koncom 70-tich rokov metóda reverzných fáz umožnila a zlepšila separáciu veľmi podobných látok. Od 80-tich rokov bola HPLC bežne používaná v laboratóriách na separáciu chemických zlúčenín (4).

2.2 Definícia chromatografických metód

Chromatografické metódy sú viacstupňové separačné metódy založené na nerovnomernom rozdeľovaní zložiek zmesi medzi dve navzájom nemiešateľné, alebo veľmi obmedzene miešateľné fáze, z ktorých jedna je stacionárna (nepohyblivá) a druhá je mobilná (pohyblivá).

Pri všetkých chromatografických metódach sa mnohonásobne ustaluje rovnováha súčastí analyzovanej zmesi medzi týmito dvoma fázami. Stacionárna fáza má schopnosť rôznou mierou zadržiavať jednotlivé súčasti analyzovanej zmesi. Mobilná fáza na druhej strane vymýva (eluuje) jednotlivé súčasti zmesi z nepohyblivej fáze a odnáša ju v smere toku rôznou rýchlosťou, čím dôjde k ich oddeleniu. Zložky zmesi sa líšia svojou afinitou k oboj fázam, zároveň majú snahu striedavo vnikáť do oboch fáz a tiež sa líšia vzájomne dobou zotrvania v jednotlivých fázach. Po určitej dobe sa ustáli dynamická rovnováha - pomer látkových množstiev každej látky vo fáze stacionárnej a mobilnej je konštantný - jedná sa o základný princíp chromatografického procesu.

Chromatografické metódy umožňujú oddelenie analyzovaných zložiek zo vzorku a zároveň ich kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu. Prednosti chromatografických metód vyniknú predovšetkým pri analýze zmesi látok, kde sa ostatné neseparačné metódy, ako napr. spektrofotometrické, nedajú principiálne použiť. Keďže väčšina prírodných látok, technických produktov, syntetických preparátov ai. sú zložité zmesi látok, majú chromatografické analytické metódy v praxi prvoradý význam. V zdravotníckych zariadeniach sú bežnou súčasťou pri analýze liečiv, tzv. monitorovania liekových hladín (Therapeutic drug monitoring, TDM) (5,6).

2.3 Rozdelenie chromatografických metód

Chromatografické metódy sa dajú rozdeliť do viacerých skupín, podľa rôznych kritérií, ktorými sa od seba navzájom odlišujú podľa:

- mechanizmu separácie, tj. podstaty separačného deja
- elúcie, tj. spôsobu vyvíjania
- usporiadania stacionárnej fáze
- použitej mobilnej fáze

2.3.1 Podľa mechanizmu separácie:

2.3.1.1 ADSORPČNÁ CHROMATOGRAFIA

K deleniu látok dochádza v dôsledku rôznej adsorbcie z pohyblivej fáze na povrch sorbentu tvoriaceho stacionárnu fázu. Používa sa najmä oxid hlinitý, oxid horečnatý, silikagel, práškovaná celulóza, alebo aktívne uhlie. Mobilnú fázu tvoria buď čisté rozpúšťadla z tzv. eluotropnej rady zostavenej podľa ich elučnej schopnosti, alebo zmesi týchto rozpúšťadiel, ktoré sú často vhodnejšie než samotné čisté rozpúšťadla. V plynovej adsorbčnej chromatografii sa ako mobilná fáza tj. nosný plyn používa dusík alebo hélium.

U adsorpčnej chromatografii sú delené látky v plynnom stave alebo v roztoku. Tento princíp delenia sa uplatňuje u plynovej adsorbčnej chromatografii, plynovej kvapalinovej adsorbčnej chromatografii, v tenkovrstvej chromatografii a prebieha aj u stĺpcovej elučnej chromatografii (5,7).

2.3.1.2 ROZDEĽOVACIA CHROMATOGRAFIA

Je založená na tom, že k deleniu látok dochádza na základe ich rozdielnej rozpustnosti v dvoch rôznych kvapalinách, teda na rozdielnych hodnotách rozdeľovacích koeficientov. Jedna z použitých kvapalín je mobilná fáza, druhá kvapalina tvorí stacionárnu fázu, ktorá je zakotvená na povrchu inertného nosiča. Tým môže byť silikagel, kremelina, celulóza alebo chemicky viazaná fáza na povrchu pevného nosiča.

U rozdeľovacej chromatografie dochádza po vnesení vzorku delenej zmesi pri prechode mobilnej fáze kolónou k opakovanému rozdeľovaniu súčasti zmesi medzi obe kvapalné fáze, v plynovej chromatografii medzi kvapalnú a plynnú fázu. Pričom u kvapalnej chromatografie je organické rozpúšťadlo nemiesiteľné so stacionárnou fázou.

Zakotvená je spravidla vodná fáza, organická býva na druhej strane mobilná, ide o tzv. chromatografiu s normálnymi fázami. V kvapalinovej chromatografii sa často používa systém obrátených fáz (RP - reversed phase), kde stacionárna fáza je tvorená hydrofóbne impregnovaným nosičom organickou fázou a fáza vodná je mobilná (5,8).

2.3.1.3 IÓNOVO VÝMENNÁ CHROMATOGRAFIA

K deleniu dochádza na základe afinity jednotlivých iónov v delenej zmesi k stacionárnej fáze, tj. k výmenným skupinám používaných ionexov. Deliť je možné elektrolyty schopné existencie v iónovej forme.

Stacionárnou fázou sú iontomeniče, ktorými sú obvykle ionexy s kyslou alebo bázickou funkčnou skupinou zakotvené na makromolekulárnom nosiči.

Každá aktívna skupina je pevne viazaný ión kladného alebo záporného náboja, ktorý na seba viaže protiión opačného náboja.

Podľa charakteru aktívnej skupiny sa rozlišujú ionexy na:

a) **KATEXY** - ich kyslá funkčná skupina (sulfo- alebo karboxylová kyselina) nesie záporný náboj. Sú určené pre delenie kationtov.

b) **ANEXY** - nesú bázickú funkčnú skupinu (aminoskupina, kvartérne amóniové báze) s kladným nábojom a slúžia k deleniu aniontov (5,9).

2.3.1.4 GÉLOVÁ CHROMATOGRAFIA

Ide o kvapalinovú chromatografiu. K deleniu zložiek dochádza na základe rozdielnej priechodnosti otvorov v časticiach stacionárnej fáze pre molekuly v delenej zmesi, a to na základe tzv. molekulového sitového efektu gélu.

Stacionárnu fázou tvorí naboptný gél, napr. dextranový gél Sephadex. Časť mobilnej fáze je pohyblivá a časť nepohyblivá vyplňujúca póry rôznych gélov a má charakter stacionárnej fáze. Zložky sa snažia difundovať do pórov pevného nosiča naplnených mobilnou fázou. Látky sú postupne eluované v poradí podľa klesajúcej molekulovej

hmotnosti. Vhodne zvolená veľkosť pórov bráni difúzii veľkých molekúl, stredné preniknú len z časti.

Ako prvé sú teda eluované z kolóny látky o najväčšej molekulovej hmotnosti, teda najväčšie molekuly. Tie totiž nemôžu difundovať do pórov gélu a preto sú unášané mobilnou fázou rýchlejšie než menšie molekuly. Distribučný koeficient je funkciou geometrie molekúl a je charakteristický pre určitú látku a gél (5,10,11).

2.3.1.5 AFINITNÁ CHROMATOGRFIA

Je založená na špecifických, vysoko selektívnych interakciách, obvykle sa jedná o neväzbové interakcie. Ide o špeciálnu metódu izolácie biologických aktívnych látok (napr. antigén - jeho protilátka, enzým – jeho inhibítor, receptor - jeho hormón apod.

Jeden z partnerov sa pevne chemicky naviaže ako ligand na vhodný nosič a tvorí tak spolu s ním stacionárnu fázu. Druhý z partnerov je obsiahnutý vo vzorku a za vhodných podmienok je na kolóne špecificky naviazaný neväzbovými interakciami práve na tento ligand (12).

2.3.1.6 CHIRÁLNA CHROMATOGRFIA

Idie o enantioselektívnu separačnú metódu. Využíva sa na separáciu, čistenie, kvalitatívne a kvantitatívne stanovenia zlúčenín, ktoré obsahujú chirálny uhlík. Dôvodom potreby rozdelenia optických enantiomérov je fakt, že častokrát býva len jedna z konfigurácií klinicky účinná. K deleniu látok dochádza na základe zloženia a schopnosti stacionárnej fáze zachytávať práve jednu z konfigurácií. Separácia analytov môže nastávať dvoma metódami. U nepriamej metódy ide o derivatizáciu analytu chirálnym činidlom, pričom vznikajú diastereizoméry. Medzi priame metódy patrí separácia na chirálnej stacionárnej fáze alebo metóda prídavku chirálneho selektora do mobilnej fáze. Chirálny stacionárny fázy sú tvorené buď chirálnymi organickými polymérmi, alebo nosičmi modifikovanými chirálnym selektorom (13,14).

2.3.2 Podľa elúcie:

2.3.2.1 FRONTÁLNA CHROMATOGRAFIA

Je založená na stálom privádzaní roztoku delenej zmesi na kolónu až do konca chromatografického procesu. Vzorka je rozpustená v mobilnej fáze. Najprv vychádza z kolóny zložka s najmenšou afinitou, je najmenej zadržovaná. Frontálna chromatografia sa využíva skôr k analytickým účelom, nie je vhodná k preparatívnym účelom, pretože v čistej forme sa dá izolovať len časť zložky, ktorá opúšťa kolónu ako prvá (8).

2.3.2.2 VYTESŇOVACIA CHROMATOGRAFIA

Pri vytesňovacej chromatografickej analýze sa vzorka privádza na kolónu diskontinuálne, jednorázovo. Až do konca chromatografického procesu sa potom privádza roztok ďalšej látky, ktorá má ku stacionárnej fáze vyššiu afinitu a vytesňuje delené zložky zmesi v poradí podľa vzrastajúcej afinity k tejto fázy. Látka s najmenšou afinitou k stacionárnej fáze, opúšťa kolónu ako prvá, posledné vyteká z kolóny vytesňovadlo. Metóda nevedie k úplnému rozdeleniu zložiek. Ak má nasledujúca zložka uvoľňovať predchádzajúcu z interakcie so stacionárnou fázou, musia byť všetky zložky v kontakte a dochádza k ich čiastočnému miešaniu (8).

2.3.2.3 ELUČNÁ CHROMATOGRAFIA

Na chromatografickú kolónu sa vnesie malá časť zmesi látok a kolóna sa premýva mobilnou fázou, ktorá má ku stacionárnej fáze menšiu afinitu než ktorákoľvek zo zložiek zmesi. Pritom dochádza k vývoji a k migrácii elučných zón jednotlivých zložiek zmesi. Látky sú z kolóny vymývané v poradí podľa veľkosti sorpcie na stacionárnej fáze a často od seba rozdelenej mobilnej fázy. Pri izokraticej elúcii sa používa stále rovnaká mobilná fáza. Táto metóda je vhodná v prípadoch, keď sa delené látky od seba nelíšia v afinite ku stacionárnej fáze, takže sa eluujú skoro pri sebe. Gradientová elúcia, pri ktorej postupne rastie elučná schopnosť mobilnej fázy, nachádza svoje hlavné uplatnenie u analýz, kde sa zóny delených látok vymývajú v príliš dlhých intervaloch, alebo sa vytvárajú príliš široké

píky - tzv. chvostovanie. Princíp spočíva v tom, že menej zadržované látky sa eluujú mobilnou fázou s nižšou elučnou silou, zatiaľ čo elúcia látok so silnou afinitou k stacionárnej fáze sa urýchli zvýšením elučnej sily mobilnej fázy v závere elúcie (5,8,15).

2.3.3 Podľa usporiadania stacionárnej fáze:

Ide o spôsob prevedenia a usporiadania jednotlivých častí umožňujúcich chromatografické meranie a uplatňujúcich sa pri chromatografickom procese.

2.3.3.1 KOLÓNOVÉ USPORIADANIE

Umožňuje dosiahnuť kvalitnejšie výsledky, vďaka možnosti nastavenia a kontroly podmienok prebiehajúcich počas celého merania. K separácií látok dochádza v kolóne naplnenej príslušným nosičom.

2.3.3.2 PLOŠNÉ USPORIADANIE

- papierová
- tenkovrstvá (5,10)

2.3.4 Podľa použitej mobilnej fáze:

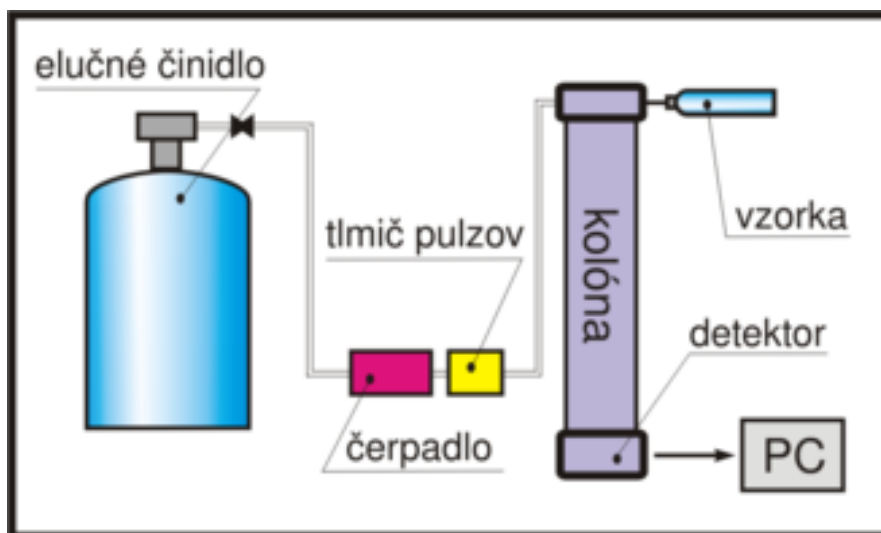
2.3.4.1 KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA

Mobilnou fázou je kvapalina a stacionárnou fázou nemiešateľná kvapalina, alebo pevná látka. Kvapalinová chromatografia sa podľa technického usporiadania delí na stĺpcovú a plošnú. Stĺpcová chromatografia môže byť podľa prevedenia nízkotlaka, alebo vysokoučinná. Plošná tenkovrstvá, alebo papierová.

2.3.4.2 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIA

Mobilnou fázou je plyn a stacionárnou fázou kvapalina, alebo pevná látka. Podľa použitých pevných fáz sa delí na náplňovú a kapilárnu (5,10).

2.4 Schéma HPLC



2.5 Hlavné časti kvapalinového chromatografu:

2.5.1 Zásobníky mobilnej fáze

Slúžia ako zdroje elučného činidla (mobilnej fáze). Elučné činidlo sa v nich zároveň uchováva. Najčastejším konštrukčným materiálom zásobníkov býva sklo, plasty (polypropylen, polyetylen, polytetrafluorethylen), alebo nerezová oceľ. Na prepojenie chromatografických systémov medzi sebou sa často používajú kapiláry z plastu alebo kapiláry z nehrdzavejúcej ocele (16,17).

2.5.2 Mobilná fáza

Úlohou mobilnej fáze je prenos zložiek delenej zmesi cez stacionárnu fázu. V kvapalinovej chromatografii je mobilnou fázou kvapalina, ktorej vlastnosti výrazne ovplyvňujú samotný proces delenia analytov.

Zloženie mobilnej fáze sa upravuje s ohľadom na vlastnosti delenej zmesi a použitej stacionárnej fázy. V prípade že sa jedná o polárnu zmes je vhodné použiť systém normálnych fáz, u nepolárnych zmesí sa zasa volí systém obrátených fáz. Kvapalinová chromatografia v systéme normálnych fáz využíva to, že mobilná fáza má polaritu menšiu ako stacionárna fáza. Ako mobilná fáza sa tu používa pentán, heptán, chloroform a ich zmesi. Chromatografia na obrátených fázach (RP - HPLC) využíva to, že mobilná fáza má väčšiu polaritu ako

stacionárna fáza. Ako mobilná fáza sa tu používa metanol, acetonitril, voda a ich zmesi. Jej vlastnosti sa navyše často upravujú pomocou prídavku aditív, ktoré slúžia k úprave pH, alebo k ovplyvneniu iontovej sily (18).

Zloženie mobilnej fáze môže byť v priebehu celej analýzy menené za účelom ovplyvňovania interakcií analytov so stacionárnou fázou. Ak je jej zloženie konštantné, jedná sa o tzv. isokratickú elúciu, tá sa pre analytické účely používa najčastejšie. Ak je v priebehu celej analýzy programovo menené zloženie mobilnej fáze, ide o tzv. gradientovú elúciu (10).

2.5.3 Čerpadlo (pumpa)

Hlavná úloha pumpy spočíva v zaistení konštantného toku eluentu skrz injektor, kolónu a detektor. Pumpy pracujú buď pri konštantnom tlaku alebo pri konštantnom prietoku. Požiadavky kladené na pumpy sa týkajú prietokového rozmedzia, ktoré má byť od 0,01 do 10 ml/min. Tlakové rozmedzie sa pohybuje od 1 do 15,000 psi (68,95 mbar – 1034,22 bar). Dôraz je kladený aj na pulzácie tlaku, tie by mali mať hodnotu menšiu ako 1% . To je požadované pretože HPLC detektory sú citlivé na zmeny prietoku a chyby v kvantifikácii rezultujú so zmenou prietokovej rýchlosti (19).

2.5.4 Injektor

Injikuje vzorky určené k analýze do prúdu mobilnej fázy pred vstupom na kolónu s vysokou presnosťou a správnosťou. Bežne používané dávkovacie objemy sú v rozmedzí od 1 µl do 100 µl. Dávkovanie môže byť automatické alebo ručné. Automatické dávkovanie sa využíva hlavne pri spracovaní väčšieho množstva vzoriek bez zásahu operátora (19).

2.5.5 Kolóna

Je miestom samotnej separácie analytov. V praxi je to oceľová, plastová alebo sklenená trubica, ktorá je naplnená stacionárnou fázou, čiže sorbentom. Najčastejšie dĺžky chromatografických kolón, ktoré sú komerčne dodávané sú 50 až 300 mm a vnútorné priemery 2 až 5 mm. Častice sorbentu, ktorými sú naplnené kolóny majú najčastejšie veľkosť 3-10 µm, vyrábajú sa aj kolóny s menšími časticami.

Hlavným sorbentom používaným u HPLC je silikagel (oxid kremičitý, $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$). Nemodifikovaný silikagel má polárne vlastnosti, ktoré sa využívajú v systéme normálnych fáz. Druhým typom je modifikovaný silikagel, na ktorého povrchu sú vhodnou chemickou reakciou naviazané rôzne radikály. Najčastejšie sa jedná o uhl'ovodíkové reťazce obsahujúce

spravidla 18, prípadne 8 uhlíkových atómov. Ide o nepolárne chemické viazané fáze - tzv. reverzné fáze. Radikály viazané na silikagel môžu byť navyše zakončené skupinami – NH₂, -CN a inými. V tomto prípade sa jedná o stredne polárne fáze (10).

2.5.6 Detektory v kvapalinovej chromatografii

Detektor je zariadenie, ktoré dokáže snímať zmeny v zložení mobilnej fázy a jeho úlohou je identifikácia analytu, ktorý opúšťa kolónu. Princíp spočíva v detekcii elúátu za pomoci vhodného snímača. Premieňa analytický signál (elúciu zložiek zmesi) na elektrický signál, ktorý je po zosilení ďalej spracovaný a vyhodnotený.

Detektory sa delia na univerzálne a selektívne. U univerzálnych je odozva priamo úmerná danej celkovej vlastnosti zložiek mobilnej fázy no u selektívnych iba koncentrácií samotnej detegovanej látky. V analýze liečiv sú vďaka svojmu širokému spektru uplatnenia používané hlavne univerzálne detektory. Voľba detektoru závisí od povahy separovanej zmesi a od povahy mobilnej fázy. Základné typy detektorov používaných v kvapalinovej chromatografii sú:

- spektrofotometrické detektory
- elektrochemické detektory:
 - ampérometrické detektory
 - coulometrické detektory
- fluorescenčné detektory
- refraktometrické detektory
- hmotnostné detektory

2.5.6.1 SPEKTROFOTOMETRICKÉ DETEKTORY (UV/VIS DETEKTORY)

Spektrofotometrické detektory sú založené na princípe absorpcie elektromagnetického žiarenia v oblasti vlnových dĺžok od 190 do 800 nm. Podľa absorbovanej časti spektra sa ďalej rozdeľujú na UV detektory (190 – 400 nm) a VIS detektory (400 – 800 nm). V súčasnosti patria k univerzálnym a v praxi k najčastejšie používaným detektorom.

Univerzálnosť spektrofotometrických detektorov je založená na fakte, že veľká časť chemických zlúčenín má schopnosť interagovať s elektromagnetickým vlnením, pričom sa zmenia jeho vlastnosti. Dôležitá časť molekuly, ktorá je schopná meniť vlastnosti elektromagnetického vlnenia sa nazýva chromofor (19).

Kvantitatívne vyhodnotenie je založené na Lambert - Beerovom zákone, ktorý vyjadruje vzájomný vzťah medzi hrúbkou absorbujúcej vrstvy (l), koncentráciou absorbujúcej zložky (c) a vlastnou veľkosťou absorpcie, vyjadrenou ako absorbancia (A):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

ε - molárny absorpčný koeficient, ktorý je charakteristický pre danú látku

Delenie spektrofotometrických detektorov podľa konštrukčného typu:

Detektory s fixnou vlnovou dĺžkou

Patria medzi staršie typy detektorov. Najčastejšie ide o vlnovú dĺžku 253,7 nm. Ako zdroje žiarenia používajú nízkotlakú ortuťovú výbojku. Majú dvojpraprskové usporiadanie a merajú rozdiel absorbancie medzi mernou a porovnávanou celou.

Detektory s meniteľnou vlnovou dĺžkou

Umožňujú nastaviť rôzne hodnoty vlnových dĺžok. Zdrojom polychromatického žiarenia je deutériová lamp a požadovaná vlnová dĺžka sa nastavuje pomocou monochromátora.

Detektory s programovateľnou vlnovou dĺžkou (tzv. Scanning UV detektory)

Vlnovú dĺžku je možné nastavovať v určitom rozmedzí, najčastejšie od 190 do 700 nm. Vlnová dĺžka je meniteľná v priebehu analýzy, umožňuje počas niekoľkých sekúnd snímať celé absorpčné spektrum v maxime píku hodnoteného liečiva.

Detektory diodového poľa (photodiode array, PDA, DAD)

Snímajú celé spektrum v reálnom čase bez prerušenia chromatografickej separácie. Tieto detektory umožňujú v spolupráci s riadiacou jednotkou (počítačom) detekciu látky pri akejkoľvek zvolenej vlnovej dĺžke, umožňujú porovnávať snímané spektra s knihovňou spektier a vypočítajú čistotu píku (identifikácia látky) (20).

2.5.6.2 ELEKTROCHEMICKÉ HPLC DETEKTORY

Elektrochemické detektory sa používajú k detekcii látok, ktoré sú schopné elektrochemickej reakcie, prebiehajúcej na fázovom rozhraní elektróda - roztok (mobilná fáza). Podmienkou pre využitie elektrochemickej detekcie je elektrická vodivosť mobilnej fáze, preto sa nedá použiť v systémoch s normálnymi fázami. Možnosť využitia týchto detektorov nie je príliš široká, ale látky, na ktoré sa elektrochemická detekcia využíva, reprezentujú veľké množstvo dôležitých liečiv, polutantov a prírodných produktov. Citlivosť sa pohybuje v rozmedzí 10^{-9} až 10^{-12} g/ml (10,19).

Rozdelenie elektrochemických detektorov:

1. Amperometrické detektory

Amperometrické (polarografické) detektory merajú prúd vyvolaný priechodom redukovanej alebo oxidovanej látky prietokovou celou detektoru. Ako merné elektródy sa používajú tuhé elektródy zhotovené z skelného uhlíku, grafitových vlákien, zlata, platiny, medi či iného kovu. Ako porovnávacia sa používa kalomelová alebo argentochloridová elektróda.

2. Coulometrické detektory

Coulometrické detektory merajú náboj potrebný k oxidácii či redukcii celkového množstva látky pri jej prietoku mernou celou detektoru. Dosahuje sa tak vyššej citlivosti detekcie než u amperometrických detektoroch. Výhodou coulometrickej elektródy je možnosť zvýšenia selektivity zapojením dvoch a viacerých elektród v sérii, na ktoré je vložené rôzne napätie. Zapojením štyroch až šestnástich coulometrických elektród je možné získať detektor obdobný detektoru diodového poľa tzv. CoulArray (ESA, Inc., USA).

2.5.6.3 FLUORESCENČNÉ DETEKTORY

Princípom fluorescenčných detektorov je absorpcia krátkovlnného žiarenia špecifickými funkčnými skupinami analytu a následne emitovanie žiarenia o vyššej vlnovej dĺžke. Ide o jav nazývaný fluorescencia. Prírodnú fluorescenciu vykazuje len 15% všetkých látok, preto sa často krát využíva derivatizácia, pri ktorej sa na analyt naviaže funkčná skupina vykazujúca

fluorescenciu, a tým sa následne umožní detekcia látky. Fluorescenčne detektory patria medzi najcitlivejšie detektory v modernej HPLC analýze, pričom citlivosť je asi 10 až 1000krát vyššia ako pri UV detektoroch. Moderné detektory umožňujú aj rýchle prepínanie medzi excitačnými a emitačnými vlnovými dĺžkami, čo sa využíva pri detekcii rôznych zložiek zmesi (19).

2.5.6.4 REFRAKTOMETRICKÉ DETEKTORY

Sú to univerzálne detektory s nízkou citlivosťou (10^{-6} g/ml), čo výrazne ovplyvňuje ich uplatnenie v praxi. Princíp detekcie je založený na meraní rozdielu indexu lomu eluátu a čistej mobilnej fázy. Citlivosť je tým väčšia, čím vyšší je rozdiel. Každá zmena v mobilnej fáze vyžaduje kalibráciu, preto sú nepoužiteľné pri gradientovej elúcii. Pri ich použití je nutné termostatovať zariadenie, kvôli výraznej závislosti medzi teplotou a indexom lomu (10,19).

2.5.6.5 HMOTNOSTNÉ DETEKTORY

Patria k vysoko citlivým a selektívnym univerzálnym detektorom, ktoré sú v poslednej dobe často využívané v analýze liečiv, a to hlavne v spojení s HPLC. Umožňujú jak kvantitatívne, tak kvalitatívne hodnotenie. To zahŕňa identifikáciu neznámej zlúčeniny, určenie izotopového zastúpenia prvkov v molekule a v niektorých prípadoch aj jej štruktúry.

Každý hmotnostný detektor sa skladá z troch častí: z iontového zdroja, hmotnostného analyzátora a detektora. Po výstupe z kolóny sa v iontovom zdroji z eluátu odstráni mobilná fáza a molekuly analytov sa ionizujú v plynnom stave. Následne sú nabité častice (molekulárne a fragmentové ióny) v magnetickom alebo vysokofrekvenčnom poli separované podľa hmotnosti a náboja (hodnôt m/z) a zaznamenané na detektory. Najčastejšie sa používa ionizácia elektrosprejom, chemická ionizácia za atmosferického tlaku a fotoionizácia za atmosferického tlaku. Najbežnejším hmotnostným analyzátorom je quadrupól, prípadne iónová past.

Spojenie HPLC-MS kladie vzhľadom na potrebu prechodu separovaných analytov z kvapalnej do plynnej fázy určité požiadavky na vlastnosti mobilnej fázy. Optimálne zloženie vyžaduje čo najvyšší podiel organickej, čiže ľahko prchavej zložky. Takisto sú preferované ľahko prchavé aditíva, a vzhľadom na znižovanie citlivosti odozvy, v čo najnižšej koncentrácii. Medzi bežne používané purfy patrí octan amónny a mravenčan amónny, ako

ióno - párové činidla sa používajú di- a trialkylamonium acetáty, prípadne perfluorované karboxylové kyseliny (10,21).

2.5.7 Vyhodnocovacie zariadenie

Slúži na vyhodnotenie, spracovanie a uloženie dát z chromatografu. Väčšinou je to osobný počítač s príslušným softvérovým vybavením špeciálne vyvinutým výrobcom. Pomocou počítača operátor pohodlne ovláda celý analytický postup (zloženie mobilnej fáze, prietok, tlak a teplotu na kolóne, gradient atď.). V súčasnej dobe je už samozrejmosťou možnosť vopred naprogramovať celé série meraní bez prítomnosti operátora (20).

2.6 Kvalitatívna analýza HPLC chromatogramu

Na určenie kvalitatívnych, ako aj na určenie kvantitatívnych parametrov v HPLC analýze slúži chromatografická krivka. Základnou kvalitatívnou charakteristikou je retenčný (elučný) čas t_R , čo je doba od nastreknutia vzorku na kolónu k maximu chromatografického píku. Ďalšou kvalitatívnou metódou používanou v praxi je porovnanie kompletných UV/VIS spektier získaných DAD alebo využitím techniky on-line analýzy píku hmotnostnej spektrometrie (HPLC-MS) (22).

2.7 Železo v ľudskom organizme

V tele človeka sa nachádza za normálnych okolností 3-5 gramov železa. Je súčasťou dôležitých zložiek v červených krvinkách, v svaloch (myoglobíne) ale aj mnohých enzýmov potrebných pre rast a vývoj orgánov. Železo sa v podstatnej miere nachádza v červenom krvnom farbive-hemoglobíne (66 - 70%), 30% je uložených v hemosiderine, feritine a transferine, ten sa podieľa na prenose železa v organizme. V ľudskom tele sa železo zúčastňuje na prenose kyslíka, stojí aj v pozadí tvorby energie. Ovplyvňuje látkovú premenu glukózy v bunkách, produkciu protilátok, detoxikáciu liekov v pečeni, premenu karoténu na vitamín A, tvorbu kolagénu a purínov, metabolizmus vitamínov skupiny B.

Pri oxidatívnom strese sa však uplatňuje jeho toxický účinok. Za patologických stavov (napr. pri intracelulárnej acidóze, ktorá sprevádza ischemicko - reperfúzny syndróm) dochádza k nefyziologickému uvoľneniu iontov železa z väzby na transferin a feritin. Voľné železo má schopnosť ľahko prechádzať medzi svojou oxidovanou a redukovanou formou, a tak pôsobiť ako katalyzátor pri následnom vzniku vysoko toxických hydroxylových radikálov (prostredníctvom Haber - Weissovej reakcie), tie predstavujú najtoxickjšiu a najreaktívnejšiu známu formu kyslíka a okamžite reagujú s akoukoľvek susednou molekulou. Následkom je nevratné poškodenie lipidov, proteínov a nukleových kyselín (23). Jedným z najviac poškodených orgánov býva teda srdce, pretože obsahuje veľmi malé množstvo prirodzených antioxydantov a zároveň v ňom prebieha intenzívny aeróbnny mechanizmus (23,24,25,26,27,28,29).

2.8 **Antracyklinové cytostatika a ich kardiotoxicita**

Antracyklíny patria medzi často užívané cytostatika v liečbe hematologických malignít u rôznych solídnych nádorov v detskom veku i v dospelosti.

Mechanizmus ich účinku spočíva v tom, že v nádorových tkanivách vyvolávajú interkaláciu. Sú tvorené trojčlenným až štvorčlenným planárnym systémom, ktorý sa zabuduje do vlákien DNA a tým vyvolá ich zlomy. Je možné, že pri tom má význam aj ovplyvnenie topoizomerázy II. Podávajú sa i.v. infúziou, rýchlo sa distribuujú do väčšiny tkanív, vylučujú sa predovšetkým žlčou. Je známe, že antracyklinové cytostatika tvoria v srdečných bunkách (kardiomyocytoch) komplexy s iónmi železa, ktoré sú z redoxného hľadiska veľmi aktívne a cyklickým mechanizmom produkujú veľké množstvo vysoko reaktívnych cytotoxických hydroxylových radikálov (30). Ďalším mechanizmom, ktorý sa podieľa na vzniku antracyklinovej kardiotoxicity je vlastná redoxná cyklizácia agkykonu antracyklinu (31,32). Ióny železa sa tiež katalyticky zúčastňujú v tzv. Haber-Weissovej reakcii, pri ktorej z relatívne málo toxických superoxidových radikálov vznikajú omnoho cytotoxickéjšie radikály hydroxylové (33). Vysoko reaktívne formy kyslíka tak závažne poškodzujú bunčné štruktúry, čo následne vedie ku kardiotoxicite, ktorá sa stala klinickým problémom, lebo obmedzuje výšku podávanej dávky cytostatika (34).

2.9 Chelátory železa

Biokompatibilné chelátory železa sú v súčasnosti ako potenciálne liečiva pomerne intenzívne študovanou skupinou látok. Pôvodne boli tieto látky vyvíjané skoro výhradne pre liečbu pacientov trpiacich preťažením železom (deferoxamin a novšie liečiva deferipron a deferasirox). S rastúcim poznaním mechanizmov zapojených do fyziologickej a predovšetkým patofyziologickej úlohy iónov železa, sa však indikačné spektrum pre tieto látky značne rozšírilo i do oblasti bežných epidemiologicky významných chorôb (35). Príkladom môže byť thiosemikarbazonový chelátor železa Triapin (3-AP), ktorý sa ukázal ako klinicky účinným protinádorovým liečivom pôsobiacim prostredníctvom inhibície enzýmu ribonukleotidreduktázy (podjednotka tohto enzýmu obsahuje ióny železa) (36).

Samostatnú kapitolu však tvorí výskum zameraný na chelatáciu železa a sprostredkovanú ochranu buniek pred oxidačným stresom. Princípom tohto účinku je dočasné vyviazanie voľných iónov železa v cytoplazme, čím sa zabráni cyklickej produkcii extrémne toxických hydroxylových radikálov prostredníctvom železom katalyzovanej Haber-Weissovej reakcie. Predpokláda sa, že sa tento všeobecný patofyziologický mechanizmus podieľa na rozvoji celej rady závažných chorôb od ischemicko-reperfúzneho poškodenia (napr. infarkt myokardu, mozgová mŕtvica) cez neurodegeneratívne choroby (Parkinsonova a Alzheimerova choroba) až po toxické orgánové poškodenia (napr. kardiotoxicita antracyklinových cytostatik) (25,26,27).

Vychytávanie železa, pomocou chelatačných vlastností používaných látok je doposiaľ jedinou klinicky úspešnou stratégiou kardioprotekcie proti srdečnému poškodeniu indukovanému antracyklinmi.

V dnešnej dobe je k dispozícii len veľmi obmedzené množstvo terapeuticky použiteľných chelatórov železa. Dôvodom je predovšetkým fakt, že v súčasnosti existuje malé množstvo látok so selektívnym železo - chelatujúcim účinkom a nízkou toxicitou. Väčšina chelatórov, ktoré sa používajú napr. laboratórne, je pre svoju nízku špecificitu chelatačného účinku nevhodná pre podanie živým organizmom. Je to preto, lebo by významnou mierou tvorili komplexy s množstvom biogénnych prvkov (Ca^{2+} , Zn^{2+} atď.) a tým by zasahovali do dôležitých fyziologických funkcií.

2.9.1 Klinicky užívané chelátory železa

Deferoxamin (Desferal inj. plv. sol.; Novartis) je prirodzene sa vyskytujúci šesťväzňý (hexadentálny) chelátor železa, ktorý tvorí komplexy s Fe v pomere 1:1. DFO patrí do skupiny tzv. sideroforov, čo sú nízkomolekulárne zlúčeniny produkované aeróbnymi a fakultatívne aeróbnymi mikroorganizmami. Používa sa pri liečbe preťaženia železom a hliníkom (37).

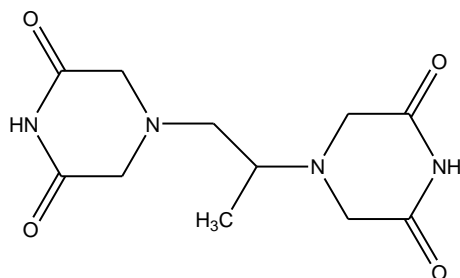
Deferipron (Ferriprox por. tbl. flm, Chiesi Farmaceutici S.p.A.) je syntetické liečivo, ktoré bolo prvýkrát pripravené Hiderom a následne patentované (1982) ako potenciálna alternatíva k DFO v liečbe ochorení spojených s preťažením organizmu železom (Faa 1999). Deferipron je doposiaľ jediný perorálne účinný chelátor železa. Táto látka patrí medzi dvojväzňe (bidentálne) chelátory a tvorí s Fe komplexy 3:1. Kvôli relatívne nízkej molekulovej hmotnosti ($M_r=139$) a dostatočnej lipofilite preniká deferipron intracelulárne a môže tam uplatňovať svoje chelatačné vlastnosti. Využíva sa pri liečbe u pacientov s thalassaemia major, u ktorých je liečba deferoxaminom kontraindikovaná alebo nedostatočná (37).

ICL 670, tzv. Deferasirox (Exjade tbl., Novartis), je chelatačne účinná látka zo skupiny bis-hydroxyfenyl-triazolov, ktorá je schopná selektívne viazať železo. Používa sa perorálne k liečbe chronického preťaženia železom spôsobeného transfúziami krvi u ľudí s hemolytickou anémiou a u chorých vo veku 2-5 rokov, u ktorých je nevhodná, alebo kontraindikovaná chelatačná liečba deferoxaminom (38).

Dexrazoxan (Cardioxane inj. plv. sol, Chiron Corporation Limited) je považovaný za hlavného predstaviteľa skupiny bisdioxopiperazínových derivátov štruktúrne príbuzných EDTA (ethylendiamintetraoctovej kyseliny). Je doposiaľ jediným klinicky užívaným liečivom, u ktorého bol preukázaný významný protektívny účinok proti chronickej kardiotoxicite antracyklinov. Klinicky sa používa na redukciu doxorubicínom indukovanej kardiotoxicity (29). Je proliečivom (pro-drug), ktoré má dostatočnú lipofilitu pre prienik do intracelulárneho priestoru, kde postupným otváraním heterocyklov vzniká cez medziprodukty B a C chelatačne vysoko účinný aktívny metabolit ADR-925 (37,39).

2.10 Dexrazoxan, jeho medziprodukty a výsledný metabolit ADR-925, ich vlastnosti a využitie

Štruktúrny vzorec:



Sumárny vzorec: C₁₁ H₁₆ N₄ O₄

Chemický vzorec: (+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)-propan

M_R : 268,27

2.10.1 Fyzikálne – chemické vlastnosti

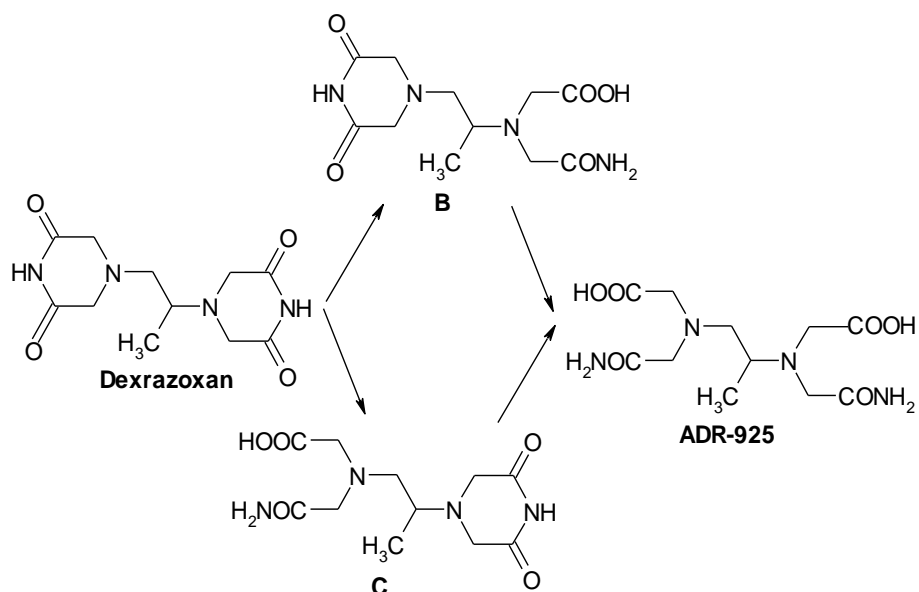
Dexrazoxan (ICRF-187) je pravotočivý optický izomér, tj. (+)-(S)-enantiomer razoxanu (ICRF-159). Má dobrú rozpustnosť vo vode, asi 4× vyššiu ako razoxan, vďaka čomu ho je možné aplikovať vo forme i.v. injekcií. (39,40).

2.10.2 Intracelulárna hydrolýza dexrazoxanu

Hydrolýza dexrazoxanu prebieha cez medziprodukty B a C s jedným otvoreným cyklom ($t_{1/2}$ 9,3 hod pri 37°C a pH 7,4) a končí v oboch prípadoch u úplne hydrolyzovanej štruktúry ADR-925 ($t_{1/2}$ 23 hod pri 37°C a pH 7,4). ADR-925 je štruktúrne a svojou schopnosťou chelatovať ióny železa veľmi blízka EDTA (41).

Vo vnútri buniek, hlavne kardiomyocytov, dochádza k enzymatickej hydrolýze oboch heterocyklov dexrazoxanu s katalytickou účasťou enzýmov dihydropyrimidinamidohydrolázy a dihydroorotázy (40).

Dexrazoxan je v porovnaní s jeho metabolitmi lipofilnejší, za fyziologických podmienok sa teda vyskytuje bez náboja a to umožňuje jeho dobrý prestup cez biologické membrány. Metabolity dexrazoxanu sú kvôli svojej štruktúre pomerne hydrofilné.



2.10.3 Farmakologické účinky dexrazoxanu, jeho medziproduktov a metabolitu ADR-925

Okrem hlavného kardioprotektívneho účinku, bol na predklinických modeloch študovaný aj extrakardialný protektívny účinok dexrazoxanu. Bolo pozorované významné zmiernenie nefrotoxicity indukovanej chronickým podávaním doxorubicínu (42).

Dexrazoxan tiež významne chráni tkané zasiahnuté nechceným únikom antracyklinov mimo krvné riečište pri infúznej aplikácii (tzv. extravazácia). Skorá systémová (i.v.) aplikácia dexrazoxanu zásadne obmedzuje nekrotické a zápalové zmeny, spôsobené prítomnosťou značného množstva cytostatika v okolí cievy. Následky extravazácie antracyklinových cytostatik sú inak veľmi vážne a obtiažne liečiteľné, a tak celkovo zhoršujú vážny stav pacienta s nádorovým ochorením. (47).

2.10.4 Farmakokinetika dexrazoxanu

Po intravenóznom podaní sa dexrazoxan rýchle distribuuje do tkanív pričom najvyššie koncentrácie boli zistené v pečeni, obličkách a v srdci. Podľa dostupných informácií dexrazoxan nepreniká hematoencefalickou bariérou. Väzba liečiva na plazmatické bielkoviny

je minimálna (menej než 2%). Pokles plazmatických koncentrácií dexrazoxanu je bifazický a je charakterizovaný biologickými polčasmi eliminácie $t_{1/2\alpha} = 15$ min., $t_{1/2\beta} = 140$ min (udávané je i rozmedzie 120-240 min). Látka je metabolizovaná pomocou enzýmov dihydropyrimidinamidohydrolázy a dihydroorotázy. Materská látka je rovnako ako hydrolytické produkty významnou mierou eliminovaná obličkami (48).

V klinických podmienkach bolo overené, že dexrazoxan signifikantne nemodifikuje farmakokinetiku antracyklinov (49,50).

2.10.5 Dávkovanie

Pri štúdiách rôznych dávkovacích schém bolo zistené, že optimálne je podať dexrazoxan pred, poprípade zároveň s antracyklinom. Čím neskôr bol dexrazoxan aplikovaný po doxorubicíne, tým menej bol patrný protektívny efekt.

Dexrazoxan je obvykle podávaný v dávke 1000 mg/m^2 pol hodiny pred antracyklinom (51).

2.10.1 Nežiadúce účinky

Významným obmedzením použitia dexrazoxanu v profylaxii antracyklinovej kardiomyopatie môžu byť jeho toxické účinky. Klinicky významná je predovšetkým myelosupresia, ktorá je tiež faktorom limitujúcim dávku. Tento toxický účinok sa vyskytuje až pri relatívne vysokých dávkach liečiva. Vznik myelosupresie po padaní dexrazoxanu je vysvetľovaný inhibíciou topoizomerázy II alebo inhibíciou ribonukleotidreduktázy (enzým so zásadným významom pre syntézu DNA). Podanie dexrazoxanu môže mať za následok synergizmus, pretože myelosupresia je jedným z typických toxických účinkov väčšiny chemoterapeutických režimov (48).

2.11 Prehľad publikovaných prác zameraných na analýzu dexrazoxanu.

Bežná analýza tohto liečiva a hlavne jeho metabolitov a rozkladných produktov je komplikovaná absenciou absorpcie UV žiarenia v oblastiach vlnových dĺžok bežne používaných pre detekciu analytov (nad 220 nm) (52). V prípade HPLC analýzy sa priama detekcia ukázala byť možná v oblastiach nízkych vlnových dĺžok (205 nm), je však veľmi problematická vzhľadom k absorpcii zložiek mobilnej fázy a zvlášť potom matrice vzorku (53).

Autori Hasinoff B.B. a Aoyama R.G. navrhli HPLC-UV metódu využívajúcu ako stacionárnu fázu chromatografickú kolónu μ Bondapak RP C18(10 μ m); 3,9 \times 300 mm (Waters, Mississauga) a mobilnú fázu zloženú z vodného roztoku 500 μ M EDTA (pH 3,5), 20 mM heptansufónovej kyseliny a metanolu (90:10), (v/v). Táto metóda bola použitá k stanoveniu hladiny dexrazoxanu a jeho dvoch aktívnych metabolitov v plazme potkanov (54). Pokúsili sa o posun absorpčných maxim analyzovaných látok do vyšších vlnových dĺžok a to pomocou derivatizácie založenej na deprotonácii imidových dusíkov pomocou NaOH. S ohľadom na acidobázickú nestabilitu dexrazoxanu, sa však tento prístup nejaví ako príliš vhodný. Okrem toho tento postup principiálne neumožňuje detekovať aktívny metabolit ADR-927 a pri analýze (227 nm) je stále veľmi patrný vplyv analytického pozadia (54).

HPLC metódou, pri ktorej bol ADR-925 detekovaný po derivatizačnej reakcii ako fluoreskujúci komplex s terbiom sa zaoberal Hasinoff B.B. Táto metóda je však pomerne komplikovaná, málo robustná a logicky neumožňuje súčasnú detekciu parentnej látky – dexrazoxanu (55).

Princíp prepínania kolón s elektrochemickou detekciou sa snažil uplatniť Lewis R.C. a kol. Metóda je vhodná na stanovenie koncentrácie ADR-925 v moči a v plasme (56).

Štúdia autorov Schroedera P.E. a Hasinoffa B.B. sa zaoberala vývojom metódy založenej na nepriamom stanovení ADR-925 pomocou prietokovej analýzy (flow injection analysis). Toto stanovenie je založené na reakcii ADR-925 s Co^{2+} iónmi za tvorby príslušných komplexov a následnej reakcii nadbytočného Co^{2+} s fluorescenčným indikátorom calceinom a fluorimetrickému stanoveniu nezreagovaného calceinu. Na základe stechiometrie reakcie bolo z výsledkov tohto stanovenia vypočítané množstvo ADR-925 vo vzorku (57).

3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo vypracovanie optimálnych chromatografických podmienok HPLC separácie dexrazoxanu, jeho dvoch medziproduktov hydrolýzy a účinného metabolitu ADR-925, ktoré by boli kompatibilné s hmotnostnou detekciou.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použitý chromatografický materiál, prístroje, pomôcky a chemikálie

Chromatografický materiál:

1. Chromatografická kolóna 250×4 mm I.D. s náplňou LiChrospher 100 RP-18 (5µm), Merck, Nemecko.
2. Chromatografická kolóna 50×3 mm I.D. s náplňou Ascentis™ C18 (5µm), Supelco, USA.
3. Chromatografická kolóna 150×4,6 mm I.D. s náplňou Synergi 4u Hydro-RP 80 A (4µm), Phenomenex, USA.
4. Chromatografická kolóna 125×4 mm I.D. s náplňou Discovery® Cyano (5µm), Supelco, USA.
5. Chromatografická kolóna 150×3 mm I.D. s náplňou Luna 5u Phenyl-Hexyl (5µm), Phenomenex, USA.
6. Chromatografická kolóna 150×3 mm I.D. s náplňou Discovery® HS F5 (5µm), Supelco, USA.

Prístroje:

Analytické váhy, Sartorius Analytic, Nemecko.

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

Ultrazvuková kúpeľ K10, Krainte, Slovenská Republika.

Zariadenie na filtrovanie vody, Supelco, Nemecko.

Chromatografická zostava Shimadzu – LC 20 v nasledujúcom zložení: degasser DGU-20A₃, 2×pumpa LC-20AD, autosampler SIL-20AC, komunikačná jednotka CBM-20A, UV detektor SPD-20A, kolónový priestor CTO-20AC. Pri spracovaní výsledkov bol použitý analytický software LC Solution, verzia 1.22 SP 1.

Pomôcky:

Laboratórne sklo.

Mikrostriekačka - 25 µl, Hamilton, Švajčiarsko.

Pipety a mikropipety.

Chemikálie:

Dexrazoxan vo forme soli s kyselinou chlorovodíkovou bol získaný z hromadne vyrábaného liečivého prípravku CARDIOXANE inj.plv.sol. 1×500mg, šarža 07A24-7 (Chiron Corporation Limited, Uxbridge, UB8 2AD, Veľká Británia).

Čistená voda

Methanol - Merck, Nemecko

Acetonitril - Merck, Nemecko

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

Hydroxid sodný - Riedel-de Haën, Nemecko

Kyselina chlorovodíková – Riedel - de Haën, Nemecko

Kyselina mravčia - Riedel-de Haën, Nemecko

Sodná soľ hexansulfónovej kyseliny - Fluka, Švajčiarsko

4.2 Vývoj chromatografických podmienok pre stanovenie dexrazoxanu, jeho medziproduktov a ADR-925 pomocou HPLC s UV detekciou

Pre HPLC analýzu klinicky používaného kardioprotektíva dexrazoxanu, jeho dvoch medziproduktov a výsledného metabolitu ADR-925 bolo nutné nájsť optimálne chromatografické podmienky, ktoré zahŕňajú výber vhodnej stacionárnej fázy, mobilnej fázy, prietokovej rýchlosti mobilnej fázy a vhodnej vlnovej dĺžky pre UV detekciu. Cieľom bolo vyvinúť metódu, ktorá by umožňovala separáciu všetkých analytov na základnú líniu za podmienok, ktoré by boli čo najviac kompatibilné s hmotnostnou detekciou. Pri vývoji vhodných podmienok sa vychádzalo z doposiaľ publikovaných poznatkov v odbornej literatúre.

Výber stacionárnej a mobilnej fázy

Pre separáciu analytov bolo otestovaných niekoľko typov stacionárnych fázy, na ktorých boli vyskúšané rôzne chromatografické podmienky:

- **1. stacionárna fáza:** Chromatografická kolóna s náplňou LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m), 250 \times 40 mm I.D.

Boli na nej vyskúšané chromatografické podmienky podobné podmienkam z publikovaných prác za použitia ion-párového činidla, ktoré nie je kompatibilné s MS. Cieľom bolo otestovať účinnosť hydrolýzy dexrazoxanu a prítomnosť požadovaných analytov vo vzorku (medziprodukty B, C a ADR-925). Taktiež bolo snahou otestovať možnosť separácie bez použitia aditív nekompatibilných s hmotnostnou detekciou.

Vyskúšané boli nasledujúce podmienky:

1. mobilná fáza - metanol : vodný roztok EDTA (500 μ M) s prídavkom kyseliny hexansulfónovej (20 mM) (pH 3,5; upravené kyselinou mravčou) 10 : 90 (v/v), prietok 1ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

2. mobilná fáza - zložka A: vodný roztok EDTA (500 μ M) s prídavkom kyseliny hexansulfónovej (20 mM) (pH 3,5; upravené kyselinou mravčou),

- zložka B: metanol,

prietok 1ml/min, teplota na kolóne 25 °C , detekcia 205 a 215 nm,

gradient:

0 – 10 min. (10 – 20 % B); 10 – 20 min. (20 – 50 % B); 20 – 21 min. (50 – 10 % B);
21,01 – 30 min. (10 % B), (v/v)

0 – 10 min. (15 % B); 10 – 20 min. (15 – 40 % B); 20 – 21 min. (40 – 15 % B); 21,01
– 30 min. (15 % B), (v/v)

0 – 10 min. (10 % B); 10 – 15 min. (10 – 30 % B); 15 – 16 min. (30 – 10 % B); 16,01 -
20 min. (10 % B), (v/v)

0 – 10 min. (10 % B); 10 – 15 min. (10 – 20 % B); 15 – 16 min. (20 – 10 % B), 16,01 -
20 min. (10 % B), (v/v)

0 – 5 min. (10 % B); 5 – 15 min. (10 – 20 % B); 15 – 16 min. (20 – 10 % B); 16,01- 20
min. (10 % B), (v/v)

0 – 5 min. (10 % B); 5 – 15 min. (10 – 15 % B); 15 – 16 min. (15 – 10 % B); 16,01 –
20 min. (10 % B), (v/v)

3. mobilná fáza – methanol : voda 10 : 90 (v/v), prietok 1 ml/min, detekcia 205 a 215
nm

- **2. stacionárna fáza:** Chromatografická kolóna s náplňou Ascentis™ C18 (5µm),
50×3 mm I.D., na ktorej boli vyskúšané nasledujúce podmienky:

1. mobilná fáza – methanol : voda 10 : 90 (v/v), prietok 1 ml/min, teplota na kolóne 25
°C, detekcia 205 a 215 nm.

2. mobilná fáza – methanol : voda 10 : 90 (v/v), prietok 0,30 ml/min, teplota na kolóne
25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

3. mobilná fáza – methanol : voda 10 : 90 (v/v), prietok 0,15 ml/min, teplota na kolóne
25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

- **3. stacionárna fáza:** Chromatografická kolóna s náplňou Synergi 4u Hydro-RP 80 A
(4µm), 150×4,6 mm I.D., na ktorej boli vyskúšané nasledujúce podmienky:

1. mobilná fáza – methanol : voda 70 : 30 (v/v), prietok 1 ml/min, teplota na kolóne
25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

2. mobilná fáza – methanol : voda 50 : 50 (v/v), prietok 1 ml/min, teplota na kolóne
25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

3. mobilná fáza – methanol : voda 25 : 75 (v/v), prietok 1 ml/min, teplota na kolóne
25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

4. mobilná fáza – methanol : voda 10 : 90 (v/v), prietok 1 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

5. mobilná fáza – methanol : voda 50 : 50 (v/v), prietok 0,5 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

- **4. stacionárna fáza:** Chromatografická kolóna s náplňou Discovery® Cyano (5µm), 125×4 mm I.D., na ktorej boli vyskúšané nasledujúce podmienky:

1. mobilná fáza – methanol : voda 70 : 30 (v/v), prietok 0,4 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

2. mobilná fáza – methanol : voda 50 : 50 (v/v), prietok 0,4 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

3. mobilná fáza – methanol : voda 25 : 75 (v/v), prietok 0,4 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

4. mobilná fáza – methanol : voda 10 : 90 (v/v), prietok 0,4 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

- **5. stacionárna fáza:** Chromatografická kolóna s náplňou Luna 5u Phenyl-Hexyl (5µm), 150×3 mm I.D., na ktorej boli vyskúšané nasledujúce podmienky:

1. mobilná fáza – methanol : voda 10 : 90 (v/v), prietok 0,3 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

2. mobilná fáza – methanol : voda 30 : 90 (v/v), prietok 0,3 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

3. mobilná fáza – methanol : voda 50 : 90 (v/v), prietok 0,3 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

- **6. stacionárna fáza:** Chromatografická kolóna s náplňou Discovery® HS F5 (5µm), 150×3 mm I.D., na ktorej boli vyskúšané nasledujúce podmienky:

1. mobilná fáza – acetonitril : voda 60 : 40 (v/v), prietok 0,5 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

2. mobilná fáza – acetonitril : voda 20 : 80 (v/v), prietok 0,5 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

3. mobilná fáza – acetonitril : voda 10 : 90 (v/v), prietok 0,5 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

4. mobilná fáza – methanol : voda 10 : 90 (v/v), prietok 0,5 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm.

5. mobilná fáza - zložka A: voda,

- zložka B: methanol,

prietok 0,5 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm, gradient:

0 – 5 min. (5 – 10 % B); 5 – 5,01 min. (10 – 5 % B); 5,01 – 10 min. (5 % B), (v/v)

6. mobilná fáza - zložka A: voda,

- zložka B: methanol,

prietok 0,4 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm, gradient:

0 – 5 min. (5 – 10 % B); 5 – 5,01 min. (10 – 5 % B); 5,01 – 10 min. (5 % B), (v/v)

7. mobilná fáza - zložka A: voda,

- zložka B: methanol,

prietok 0,5 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm, gradient:

0 – 4 min. (5% B); 4 – 8 min. (5 – 20 % B); 8 – 15 min. (20 % B); 15 - 15,01 (20 - 5 % B); 15,01 – 25 min. (5 % B), (v/v)

8. mobilná fáza - zložka A: voda,

- zložka B: methanol,

prietok 0,4 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm, gradient:

0 – 4 min. (5 % B); 4 – 8 min. (5 – 20 % B); 8 – 15 min. (20 % B); 15 - 15,01 min. (20 – 5 % B); 15,01 – 25 min. (5 % B), (v/v)

9. mobilná fáza -zložka A: voda,

-zložka B: methanol,

prietok 0,3 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm, gradient:

0 – 4 min. (5 % B); 4 – 8 min. (5 – 20 % B); 8 – 15 min. (20 % B); 15 - 15,01 min. (20 – 5 % B); 15,01 – 25 min. (5 % B), (v/v)

10. mobilná fáza- zložka A: vodný roztok HCOOH 0,05%,

- zložka B: methanol,

prietok 0,4 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm, gradient:

0 – 4 min. (5 % B); 4 – 8 min. (5 – 20 % B); 8 – 15 min. (20 % B); 15 - 15,01 min. (20 – 5 % B); 15,01 – 25 min. (5 % B), (v/v)

11. mobilná fáza - zložka A : vodný roztok HCOOH 0,05%,

- zložka B : methanol,

prietok 0,4 ml/min, teplota na kolóne 40 ° C, detekcia 205 a 215 nm, gradient:

0 – 4 min. (5 % B); 4 – 8 min. (5 – 20 % B); 8 – 15 min. (20 % B) ;15 - 15,01 min. (20 – 5 % B); 15,01 – 25 min. (5 % B), (v/v)

Príprava mobilnej fáze:

Destilovaná voda využívaná ako súčasť v mobilnej fáze mala po výrobe vyhovujúcu čistotu, a preto mohla byť použitá bez ďalšej úpravy.

Methanol a acetonitril používané v mobilnej fáze mali vyhovujúcu čistotu deklarovanú výrobcom, preto boli priamo použité na HPLC analýzu.

Vodný roztok EDTA (500 μ M) s prídavkom kyseliny hexansulfónovej (20 mM) o pH 3,5 bol pripravený rozpustením príslušného množstva EDTA a kyseliny hexansulfónovej vo vode. Následne bolo pH upravené prídavkom kyseliny mravčej a roztok bol nakoniec zfiltrovaný pomocou filtra o veľkosti pórov 0,45 μ m.

Vodný roztok 0,05% kyseliny mravčej, bol pripravený pridaním požadovaného množstva kyseliny mravčej do vody.

Príprava zásobných roztokov

Roztok dexrazoxanu o koncentrácii 1 mg/ml bol pripravený rozpustením príslušného množstva lyofilizovanej soli dexrazoxanu s kyselinou chlorovodíkovou z komerčne vyrábaného liečivého prípravku Cardioxane inj.plv.sol. Roztok bol uchovávaný pri teplote 2 - 8 °C.

Medziprodukty čiastočnej hydrolyzy s jedným otvoreným cyklom (B a C) boli pripravené podľa postupu publikovaného v odbornej literatúre. K 500 μ l roztoku dexrazoxanu o koncentrácii 5 mg/ml bolo pridaných 40 μ l 1 M roztoku NaOH. Po 40 minútach hydrolyzy pri 25 °C bola reakcia zastavená prídavkom 40 μ l 1M roztoku HCl. Tento hydrolyzát sa uchovával pri 4 °C (58).

Aktívny metabolit s dvoma otvorenými cyklami, ADR-925, bol taktiež pripravený hydrolyzou dexrazoxanu podľa publikovaného postupu. K 1 ml roztoku dexrazoxanu o koncentrácii 10 mg/ml bolo pridaných 50 μ l 5 M roztoku NaOH. Hydrolyza prebiehajúca pri teplote 25 °C bola po 48 hodinách zastavená prídavkom 45 μ l 5 M HCl, pH roztoku bolo upravené na 7 a roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C (59).

Príprava analyzovaných roztokov

Jednotlivé analyzované roztoky boli pripravené tak, že z každého zásobného roztoku bolo napipetovaných 50 μ l do 950 μ l 50% acetonitrilu vo vialke. Celkovo boli pripravené 3

analyzované roztoky: dexrazoxan, medziprodukty hydrolýzy a ADR-925. Takto pripravené vzorky boli potrebné označené a uchovávané pri teplote 4 °C. Pri každom meraní bol na kolónu nastrekovaný objem 2 μ l.

5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Vývoj chromatografických podmienok pre HPLC analýzu dexrazoxanu, jeho medziproduktov a ADR - 925

Pri vývoji chromatografických podmienok pre HPLC separáciu dexrazoxanu, jeho hydrolytických medziproduktov a aktívneho metabolitu ADR-925, bola pozornosť venovaná tomu, aby novo vyvinutá metóda bola kompatibilná s hmotnostnou detekciou. Vzhľadom na to, že sa jedná o pomerne hydrofilné analyty, ktoré sú slabo zadržované na klasických C18 kolónach sa dalo predpokladať, že bude nutné použiť vysoké percento vodnej zložky v mobilnej fáze na získanie potrebnej retencie. Bolo potrebné nájsť také podmienky separácie, ktoré zahrňovali čo najvyšší percentuálny obsah organického podielu v mobilnej fáze a nízky prietok za účelom čo najlepšieho odparovania mobilnej fáze pri ionizácii v hmotnostnom detektore. Taktiež bola snaha vyhnúť sa neprchavým zložkám v mobilnej fáze.

Stacionárna fáza a mobilná fáza

Pri výbere stacionárnej a mobilnej fáze sa vychádzalo z chromatografických podmienok publikovaných v odbornej literatúre (54).

Preto bola ako prvá použitá kolóna s náplňou LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m), 250 \times 4 mm I.D. Najlepšia separácia dosahujúca symetrické píky oddelené na základnú líniu bola zaznamenaná pomocou isokratickej elúcie, pri použití mobilnej fázy zloženej z metanolu a vodného roztoku EDTA (500 μ M) s prídavkom kyseliny hexansulfónovej (20 mM) (pH 3,5; upravené kyselinou mravčou) v pomere 10 : 90 (v/v). Úlohou EDTA bolo chelatovať prítomné ióny v mobilnej fáze, ktoré by skresľovali výsledky analýzy. Kyselina hexansulfónová zasa slúžila ako ión - párové činidlo, a tým zvyšovala retenciu hydrofilných analytov a prispievala k rozdeleniu medziproduktov B a C. Tieto podmienky síce umožnili rozdelenie všetkých analytov, avšak neboli vzhľadom na prítomnosť neprchavých aditív v mobilnej fáze (EDTA, kyselina hexansulfónová) vhodné pre následne použitie metódy pri spojení s hmotnostným spektrometrom. Separácia analytov je znázornená na obrázku 1 a 2.

Za týmto účelom boli vyskúšané rôzne podmienky s vylúčením týchto aditív. Dexrazoxan bol dostatočne zachytávaný na kolóne, no medziprodukty B a C, vrátane ADR-925, eluovali vpredu tesne za sebou. Nevýhodou však bola nutnosť použiť veľkého percenta vody (90 %) a vysokého prietoku (1 ml/min) mobilnej fázy, čo by komplikovalo použitie metódy s hmotnostným detektorom.

Preto bola vyskúšaná kratšia chromatografická kolóna s náplňou Ascentis™ C18 (5µm), 50×3 mm I.D. s cieľom previesť metódu z dlhšej C18 kolóny na kratšiu, no s nižšími prietokmi a tiež s vylúčením neprchavých aditív. Vzhľadom na menšie rozmery kolóny a tiež neprítomnosť ión – párového činidla však analyty neboli dostatočne separované.

Následne bola pozornosť zameraná na výber vhodnejšej stacionárnej fáze, ktorá by bola schopná v dostatočnej miere zadržiavať hydrofilné analyty. Bola použitá chromatografická kolóna s náplňou Synergi 4u Hydro-RP 80 A (4µm), 150×4,6 mm I.D. Použitím rôznych mobilných fáz však nedošlo k predpokladanému zvýšeniu retencie hydrofilných analytov, ktoré navyše neboli od seba vôbec separované.

Ďalšou testovanou hydrofilnou stacionárnou fázou bola chromatografická kolóna s náplňou Discovery® Cyano (5µm), 125×4mm I.D. Boli odskúšané rôzne pomery vodnej a organickej zložky v mobilnej fáze. Nebolo však dosiahnuté žiadne rozdelenie medziproduktov čiastočnej hydrolyzy dexazoxanu.

Ďalšia v poradí bola chromatografická kolóna s náplňou Luna 5u Phenyl-Hexyl (5µm), 150×3mm I.D. Nedochovalo na nej k dostatočnému oddeleniu jednotlivých látok na základnú líniu a navyše píky nemali požadovaný tvar

Poslednou testovanou stacionárnou fázou bola chromatografická kolóna s náplňou Discovery® HS F5 (5µm), 150×3mm I.D. Na tejto kolóne bola na začiatku vyskúšaná isokratická elúcia a ako organická časť v mobilnej fáze bol použitý výrobcom odporúčaný acetonitril. Za týchto podmienok boli pozorovateľné náznaky vhodnej separácie no tvary píkov boli neprijateľné. Preto bol namiesto acetonitrilu vyskúšaný methanol. Za týchto podmienok dochádzalo k dostatočnej separácii medziproduktov B, C a ADR-925 pri vyššom obsahu vodnej zložky v mobilnej fáze a takisto k prijateľnej separácii dexrazoxanu, kde nemuselo byť percento vody až také vysoké. Preto bola následne otestovaná gradientová elúcia, pri ktorej sa zloženie mobilnej fázy postupne menilo za účelom dostatočnej separácie všetkých analytov a čo najvyššieho možného obsahu organickej časti v mobilnej fáze. Chromatografické podmienky boli následne upravené optimalizáciou pH mobilnej fáze, čo však nemalo vplyv na samotné zlepšenie separácie analytov, ďalej úpravou jej prietoku a teploty na kolóne. K úplnému deleniu všetkých analytov až na základnú líniu dochádzalo pri týchto chromatografických podmienkach:

mobilná fáza - zložka A : voda,

- zložka B : methanol,

prietok 0,3 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm, gradient:

0 – 4 min. (5 % B); 4 – 8 min. (5 – 20 % B); 8 – 15 min. (20 % B); 15 - 15,01 min. (20 – 5 % B); 15,01 – 25 min. (5 % B), (v/v)

Analýza dexrazoxanu, medziproduktov a ADR-925 na kolone Discovery® HS F5 je uvedená na obrázku 3,4,5.

Tieto chromatografické podmienky síce zahrňovali vyšší obsah vodnej zložky počas analýzy, no vzhľadom na nižší prietok boli prijateľné pre následné použitie v spojení s hmotnostnou detekciou.

Detekcia

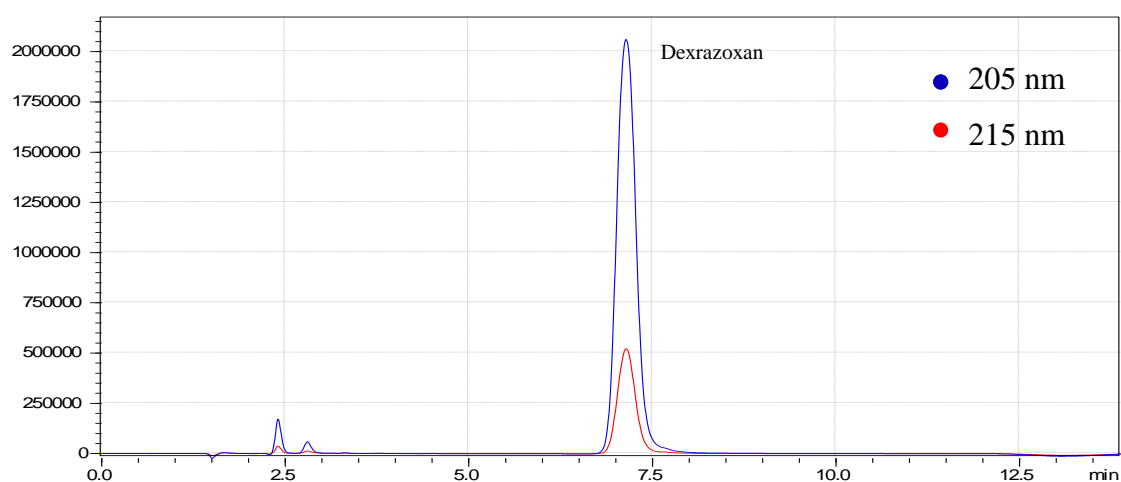
Na začiatku vývoja metódy bola zvolená UV detekcia z dostupnej literatúry (58), podľa ktorej bol dexrazoxan hodnotený pri 205 nm, medziprodukty B a C, vrátane ADR-925, zase pri 215 nm. Vzhľadom na to, že používaný UV detektor umožňoval detekciu pri dvoch voliteľných vlnových dĺžkach súčasne, boli všetky analýzy hodnotené pri 205 aj 215 nm.

Záznamy separácie

Chromatografická kolóna s náplňou LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m), 250 \times 40 mm I.D.
Chromatografické podmienky: mobilná fáza - metanol : vodný roztok EDTA (500 μ M) s prídavkom kyseliny hexansulfónovej (20 mM) (pH 3,5; upravené kyselinou mravčou) v pomere 10 : 90 (v/v), prietok 1ml/min, teplota na kolóne 25 $^{\circ}$ C, detekcia 205 a 215 nm (obr č. 1 a 2).

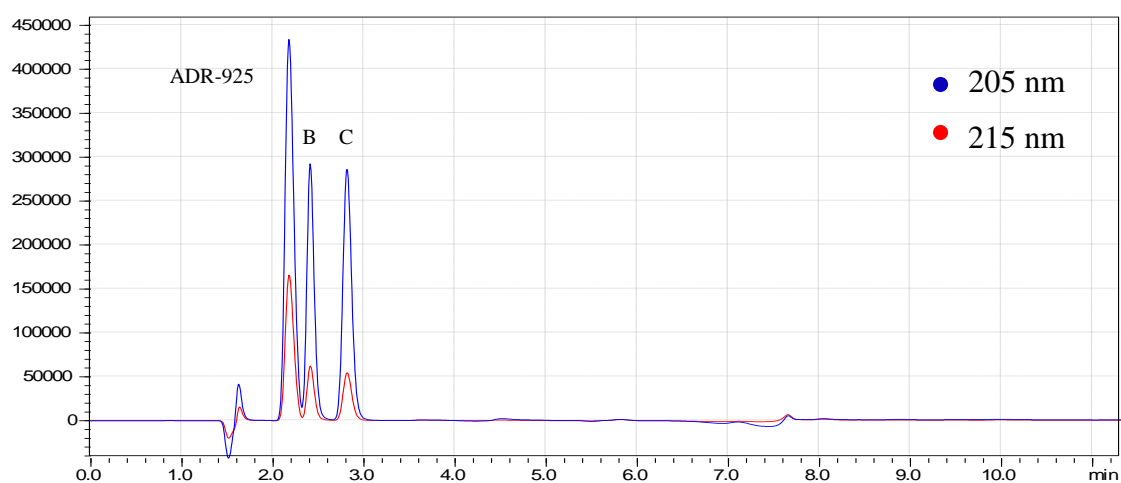
Obrázok č.1:

Chromatogram separácie roztoku dexrazoxanu.



Obrázok č.2:

Chromatogram separácie roztoku vzorku dexrazoxanu zaťaženého 4 hodinovou hydrolyzou.



Chromatografická kolóna s náplňou Discovery® HS F5 (5µm), 150×3mm I.D.

Chromatografické podmienky:

mobilná fáza - zložka A : voda,

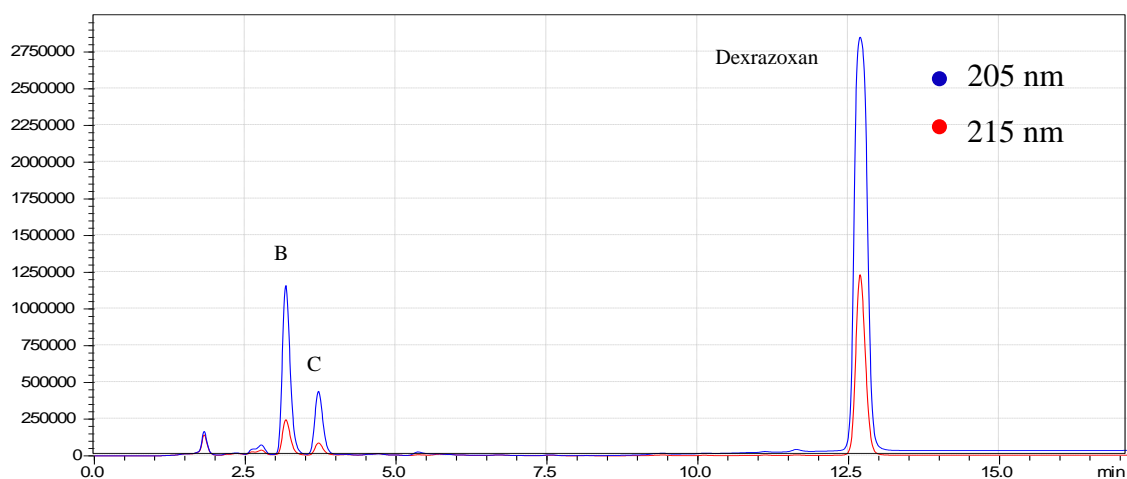
- zložka B : metanol,

prietok 0,3 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm, gradient:

0 – 4 min. (5 % B); 4 – 8 min. (5 – 20 % B); 8 – 15 min. (20 % B); 15 - 15,01 min. (20 – 5 % B); 15,01 – 25 min. (5 % B), (v/v)

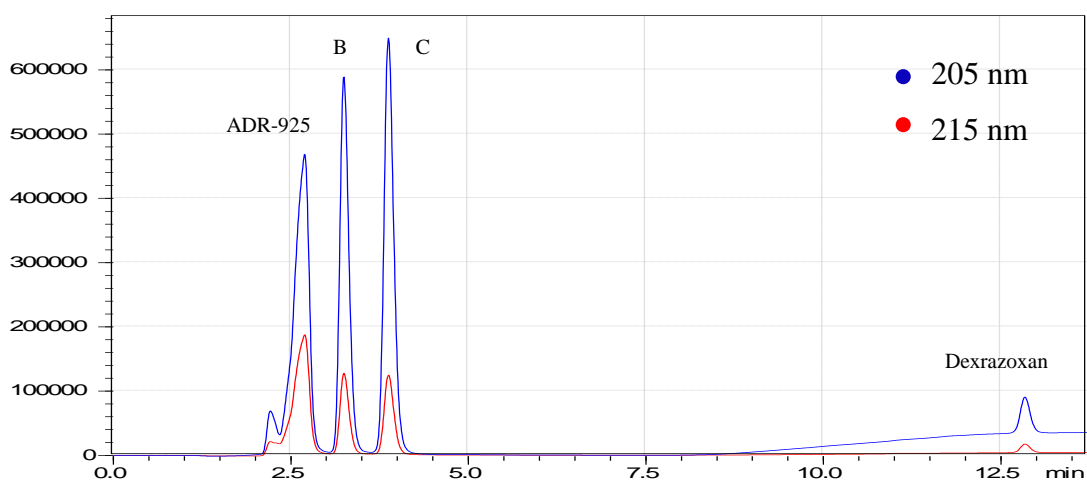
Obrázok č.3:

Chromatogram separácie vzorku dexrazoxanu ponechaného 12 hodín vo vialke.



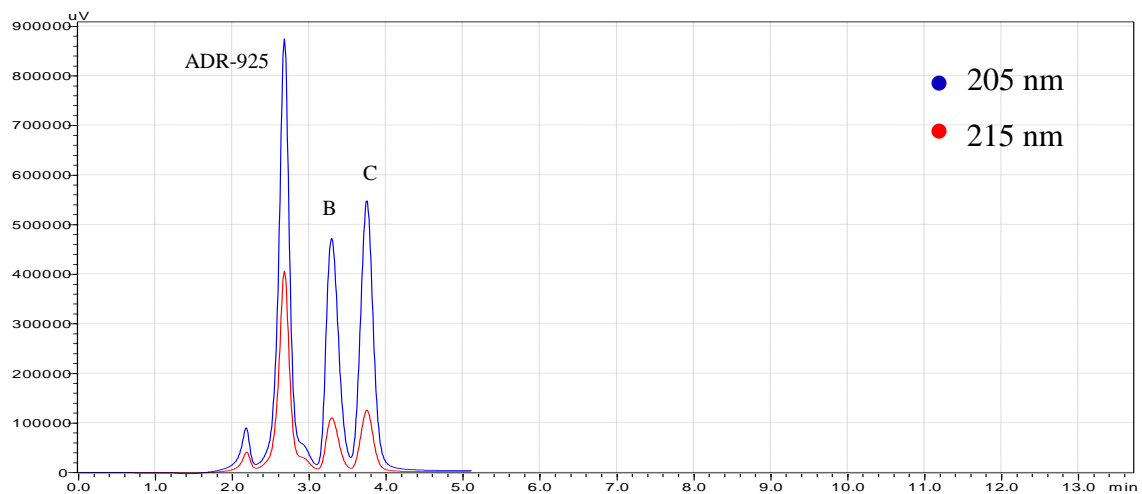
Obrázok č.4:

Chromatogram separácie roztoku vzorku dexrazoxanu zaťaženého 2,5 hodinovou hydrolyzou (použitou pri príprave ADR-925).



Obrázok č.5:

Chromatogram separácie roztoku vzorku dexrazoxanu zaťaženého 4 hodinovou hydrolýzou (použitou pri príprave ADR-925).



6. ZÁVER

V diplomovej práci boli vypracované chromatografické podmienky pre stanovenie dexrazoxanu, jeho dvoch medziproduktov hydrolýzy a zároveň výsledného aktívneho metabolitu ADR-925.

Pri vývoji metódy sa pozornosť sústredila na to, aby novo vyvinuté chromatografické podmienky boli čo najviac kompatibilné so zamýšľanou hmotnostnou detekciou.

Celkovo bolo otestovaných šesť chromatografických kolón s rôznym mechanizmom retencie. Najlepšie výsledky separácie boli dosiahnuté na chromatografickej kolóne s náplňou Discovery® HS F5 (5µm), 150×3mm I.D., použitím nasledujúcich podmienok:

mobilná fáza - zložka A : voda,

- zložka B : methanol,

prietok 0,3 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia 205 a 215 nm, gradient:

0 – 4 min. (5 % B); 4 – 8 min. (5 – 20 % B); 8 – 15 min. (20 % B); 15 - 15,01 min. (20 – 5 % B); 15,01 – 25 min. (5 % B), (v/v).

Vyvinutá metóda poskytovala prijateľnú separáciu všetkých analytov za chromatografických podmienok, ktoré sú kompatibilné s hmotnostným detektorom.

7. ABSTRAKT

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) je progresívna analytická metóda, ktorá patrí medzi najpoužívanejšie separačné techniky.

Železo je nenahraditeľným biogénnym prvkom, ktorý sa v tele človeka zúčastňuje mnohých dôležitých biochemických pochodoch. No aj napriek tomu sa za určitých patofyziologických podmienok môžu prejaviť jeho výrazné toxické účinky.

Antracyklinové cytostatika patria do skupiny liečiv často využívaných pri liečbe rôznych hematologických malignít a solidných nádorov. Ich hlavným nežiaducim účinkom je kardiotoxicita, ktorá sa vysvetľuje tvorbou komplexov cytostatika s iónmi železa v srdečných bunkách (kardiomyocytoch), ktoré sú z redoxneho hľadiska veľmi aktívne a cyklickým mechanizmom produkujú veľké množstvo vysoko reaktívnych cytotoxických hydroxylových radikálov. Ďalším mechanizmom, ktorý sa podieľa na kardiotoxicite antracyklinových cytostatik je redoxná cyklizácia aglykonu.

Dexrazoxan, derivát bisdioxypiperazínu, je jediným klinicky užívaným liečivom voči antracyklinmi vyvolanej kardiotoxicite. Predpokladá sa, že za jeho kardioprotektívny účinok je zodpovedný aktívny metabolit ADR-925, ktorý vzniká hydrolýzou dexrazoxanu vnútri kardiomyocytov a ktorý vychytáva železo z komplexov s antracyklinmi.

Táto práca sa zaoberá vypracovaním optimálnych chromatografických podmienok HPLC separácie dexrazoxanu, jeho dvoch medziproduktov hydrolýzy a účinného metabolitu ADR-925, ktoré by boli kompatibilné s hmotnostnou detekciou.

Najlepšia separácia bola dosiahnutá použitím chromatografickej kolóny s náplňou Discovery® HS F5 150×3mm, 5µm I.D., (Supelco, USA). Použitá mobilná fáza: zložka A: voda, zložka B: methanol, za využitia gradientu: 0 – 4 min. (5 % B); 4 – 8 min. (5 - 20 % B); 8 – 15 min. (20 % B); 15 - 15,01 min. (20 – 5 % B); 15,01 – 25 min. (5 % B), (v/v).

Prietoková rýchlosť bola 0,3 ml/min, teplota na kolóne 25 °C, detekcia bola pri 205 a 215 nm.

Výsledky tejto práce budú ďalej použité pri vývoji LC-MS metódy pre hodnotenie dexrazoxanu v biologickom materiále.

8. ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) is a progressive analytic method which belongs among the most frequently used separation techniques.

Iron is an irreplaceable biogenous element, which is involved in many important biochemical processes in human body. However, under specific pathophysiological conditions its severe effects may occur.

Anthracycline cytostatics belong to the frequently used drugs for the treatment of various hematologic malignancy and solid tumors. Their most important toxic effect is cardiotoxicity. Anthracyclines are able to form complexes with iron that are very redox active. They produce by the cyclic mechanism the high amount of cytotoxic hydroxyl radicals. This mechanism is believed together with own redox ability of anthracyclines molecule to be responsible for the drugs cardiotoxicity.

Dexrazoxane, bisdioxopiperazine derivative, is the only clinically used drug for the treatment of anthracycline induced cardiotoxicity. It is supposed, that dexrazoxane is bioactivated inside the cardiomyocytes to active metabolite - ADR-925. Iron chelating ability of ADR-925 is believed to be responsible for the cardioprotective effect of dexrazoxane.

This work is aimed at development of the optimal mass spectrometry compatible chromatographic conditions for the separation of dexrazoxane, its hydrolytic intermediates as well as the active metabolite - ADR-925. The best separation was achieved using the chromatographic column Discovery® HS F5 150×3mm, 5µm I.D., (Supelco, USA). The mobile phase was composed of water (component A) and methanol (component B). Following gradient profile was employed: 0 – 4 min. (5 % B); 4 – 8 min. (5 – 20 % B); 8 -15 min. (20 % B); 15 - 15,01 min. (20 – 5 % B); 15,01 – 25 min. (5 % B), (v/v).

A flow rate of 0.3 mL/min, a column temperature of 25 °C and detection at 205 and 215 nm were used for the analysis.

The results of this work will be utilized for further development of LC-MS method for determination of dexrazoxane in biological material.

9. LITERATÚRA

1. Tsweet M.S., Tr. Protok. Varshav. Obshch. Estestvoispyt Otd. Biol. 14, 1905.
2. Willstatterand R., Stoll A., Utersuchungenuber Chlorophy., Springer, Berlin 1913.
3. Martin A.J.P., Syngé R.L.M., Biochem. J. 35, 1358, 1941.
4. Brown P.R., Anal.Chem. 62, 995-1008, 1990.
5. Karlíček R. a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2001.
6. Klimeš J. a kol., Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2004.
7. Motl O., Novotný L., Adsorpční a rozdělovací kolonová chromatografie, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.
8. Mikeš O., Základní typy chromatografie, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody SNTL, Praha 1980.
9. Mikeš O. a kol., Iontově výměnná chromatografie, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.
10. Klimeš J. a kol. Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002.
11. Tomášek V., Gelová chromatografie, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.
12. Turková J., Afinitní chromatografie, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.
13. Francotte E., Chiral stationary phases for preparative enantioselective chromatography, Preparative Enantioselective Chromatography, 48-77, 2005.
14. Pirkle W.H. et al., Separation of some enantiomeric di- and tripeptides on chiral stationary phases, J. Chromatogr. 10, 203-209, 1987.
15. Churáček J., Jandera P., Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha 1993.
16. Meloun B., Automatizace a mechanizace kolonových operací v kolonovej chromatografii, in: Mikeš O. a kol., Laboratorní chromatografické metody, SNTL, Praha 1980.
17. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Fundamentals of analytical chemistry-Seventh Edition, Florida, USA, Orlando 1997.
18. Snyder L.R., Stadalius M.A., Predicting bandwidth in high-performance liquid chromatographic separation of large biomolecules. II. A general for the four common high-performance liquid chromatography methods, J. Chromatogr. 387, 21-40, 1987.

19. <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>, 20.01.2009.
20. Jandera P., Pokroky v instrumentaci kapalinové chromatografie, in.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod., Academia, Praha 1993.
21. Havliš J., Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF, Vesmír 78, 448, 1999.
22. Slovenský liekopis, Vydanie prvé, Herba, Bratislava 1997.
23. Ponka P., Richardson D.R., Tran E.H., The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, Blood 86, 4295-4306, 1995.
24. Doroshov J.H., Locker G.Y., Myers C.E.J., Clin. Invest. 65, 128-135, 1980.
25. Liachenko S. a kol. Deferoxamine improves early postresuscitation reperfusion after prolonged cardiac arrest in rats, Blood Flow. Metab. 23, 574-581, 2003.
26. Youdim M.B., Stephenson G., Ben Shachar D., Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28, Ann N.Y., Acad. Sci. 1012, 306-325, 2004.
27. Kwok J.C., Richardson D.R., The cardioprotective effect of the iron chelator dexrazoxane (ICRF-187) on anthracycline-mediated cardiotoxicity, Redox Rep. 5, 317-324, 2000.
28. Cvetkovic R.S., Scott L.J., Dexrazoxane : a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy, Drugs 65, 1005-1024, 2005.
29. Ramu, E. et al., Dexrazoxane prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in the rat heart, Cardiovasc. Drugs Ther. 20, 343-348, 2006.
30. Hershko C. a kol., The role of iron and iron chelators in antracycline cardiotoxicity, Leuk. Lymphoma 11, 207-214, 1993.
31. Robert T., Cyrtoprotective agents for antracyclines, Seminar in Oncology 23, 23-34, 1996.
32. Doroshov J.H., Davies K.J., Redox cycling of antracyclines by cardiac mitochondia. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical, J. biol. chem. 261, 3068-3074, 1986.
33. Schroeder P.E., Hasinoff B.B., The doxorubicin-cardioprotective drug dexrazoxane undergoes metabolism in the rat to its metal iron chelating form ADR-925, Cancer. Chemother. Pharmacol. 50, 509-513, 2002.
34. Elbl Lubomír a kol., Diagnostické možnosti pozdních následků kardiotoxické chemoterapie antracykliny, Vnitřní lékařství 48, 981-988, 2003.
35. Tam T.H. a kol., Iron chelators research: past, present, and future. Curr. Med. Chem. 10, 983-995, 2003.

36. Low J.A., Schoenfeldt M., Clinical trials referral resource, current clinical trials investigating 3-AP., *Oncology* 19, 357-358, 2005.
37. Skop B., Mikro-verze AISLP - ČR, 2008.3 pro MS Windows.
38. Nick H. a kol., Development of tridentate iron chelators: from desferrithiocin to ICL670. *Curr. Med. Chem.* 10, 1065, 2003.
39. Herman E.H. et al., Comparison of the protective effects against chronic doxorubicin cardiotoxicity and the rates of iron (III) displacement reactions of ICRF-187 and other bisdiketopiperazines, *Canc. Chemother. Pharmacol.* 40, 400-408, 1997.
40. Schroeder P.E., Davidson J.N., Hasinoff B.B., Dihydroorotase catalyzes the ring opening of the hydrolysis intermediates of the cardioprotective drug dexrazoxane (ICRF-187), *Drug Metab. Dispos.* 30, 1431-1435, 2002.
41. Schroeder P.E. et al., Metabolism of dexrazoxane (ICRF-187) used as a rescue agent in cancer patients treated with high-dose etoposide. *Canc. Chemother. Pharmacol.* 52, 167-74, 2003.
42. Herman E.H. et al., Comparison of the protective effects of amifostine and dexrazoxane against the toxicity of doxorubicin in spontaneously hypertensive rats. *Canc. Chemother. Pharmacol.* 45, 329-334, 2000.
43. Zima T. et al., ICRF-187 (dexrazoxan) protects from adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats, *Nephrol. Dial. Transplant.* 13, 1975-1979, 1998.
44. Langer S.W., Sehested M., Jensen P.B., Treatment of anthracycline extravasation with dexrazoxane, *Clin. Canc. Res* 9, 3680-3686, 2000.
45. Jensen J.N. et al., Dexrazoxane promising antidote in the treatment of accidental extravasation of anthracyclines, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg.* 37, 174-175, 2003.
46. Šimůnek T. et al., Rabbit model for in vivo study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents, *Eur. J. Heart Fail.* 6, 377-387, 2004.
47. Kane R.C. et al., Dexrazoxane (Totect): FDA review and approval for the treatment of accidental extravasation following intravenous anthracycline chemotherapy, *Oncologist* 13, 445-450, 2008.
48. Wiseman L.R., Spencer C.M., Dexrazoxane. A review of its use as a cardioprotective agent in patients receiving anthracycline-based chemotherapy, *Drugs.* 56, 385-403, 1998.
49. Bassar R.L. a kol., Comparative study of the pharmacokinetics and toxicity of high-dose epirubicin with or without dexrazoxane in patients with advanced malignancy, *J. Clin. Oncol.* 12, 1659-1666, 1994.

50. Hochster H. a kol., Pharmacokinetics of the cardioprotector ADR-529 (ICR-187) in escalating doses combined with fixed-dose doxorubicin, *J. Nat. Cancer. Inst.* 18, 1725-1730, 1992.
51. Herman E.H., Ferrans V.J., Timing of treatment with ICRF-187 and its effect on chronic doxorubicin cardiotoxicity, *Canc. Chemother. Pharmacol.* 32, 445-449, 1993.
52. Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L., *Practical HPLC method development 2nd edition.*, John Wiley & Sons, Inc., New York 1997.
53. Burke T.G. et al., Characterization of the aqueous decomposition products of (+)1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)-propane (ICRF-187) by liquid chromatographic and mass spectral analysis. *J. Pharm. Sci.* 80, 338-340, 1991.
54. 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.
55. Hasinoff B.B., Quantitation of the dexrazoxane hydrolysis product ADR-925 by fluorescence detection of its terbium(III) complex after high-performance liquid chromatographic separation, *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 656, 451-455, 1994.
56. Lewis R.C. et al., A sensitive and specific procedure for quantitation of ADR-529 in biological fluids by high-performance liquid chromatography (HPLC) with column switching and amperometric detection, *Pharm. Res.* 9, 101-108, 1992.
57. 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.
58. Hasinoff B.B., An HPLC and spectrophotometric study of the hydrolysis of ICRF-187 dexrazoxane, ((+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane) and its one-ring opened intermediates, *Inter. J. Pharm.* 107, 67-76, 1994.