

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**ANALYTICKÉ A BIOANALYTICKÉ HODNOCENÍ
POTENCIÁLNÍCH LÉČIV ODVOZENÝCH OD
AROYLHYDRAZONU.**

Diplomová práce

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně a veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne 7.3.2013

.....

Jana Kresová

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Petře Kovaříkové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za odborné vedení, cenné rady využité při zpracování této práce a trpělivost, kterou mi věnovala.

Tato práce byla vypracována za podpory SVV 267001.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	9
2.1.1	Princip chromatografie a nejčastější separační mechanismy	9
2.1.2	HPLC instrumentace	11
2.1.3	Kvantitativní analýza HPLC.....	16
2.2	Úprava vzorků před HPLC analýzou.....	19
2.2.1	Extrakce do organického rozpouštědla.....	19
2.2.2	Deproteinace.....	20
2.2.3	Extrakce na pevné fázi.....	20
2.3	Validace bioanalytických metod.....	22
2.3.1	Selektivita.....	23
2.3.2	Správnost, přesnost, výtěžnost	23
2.3.3	Kalibrační křivka	25
2.3.4	Stabilita.....	26
2.4	Aroylhydrazonové chelátory železa.....	27
2.4.1	Analytické hodnocení aromatických hydrazonů.	31
3	CÍL PRÁCE	34
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
4.1	Chemikálie a materiál	36
4.2	Přístroje.....	37
4.2.1	Chromatografický systém.....	37
4.2.2	Další přístroje	37
4.2.3	Pomůcky	38
4.3	Vývoj chromatografických podmínek	39

4.3.1	Stacionární fáze	39
4.3.2	Optimalizace složení mobilní fáze	39
4.3.3	Příprava mobilní fáze	40
4.3.4	Příprava zásobních roztoků a vzorků	41
4.4	Ověření linearity metody	41
4.5	Hodnocení stability BSIH a SIH v králičí plazmě <i>in vitro</i>	42
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	43
5.1	Úprava chromatografických podmínek pro HPLC analýzu BSIH a SIH	44
5.2	Ověření linearity	49
5.3	Stabilita BSIH a SIH v králičí plazmě <i>in vitro</i>	53
6	ZÁVĚR	58
	ABSTRAKT	59
	LITERATURA	61
	SEZNAM OBRÁZKŮ	63
	SEZNAM TABULEK	64

1 ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří v současnosti mezi progresivní, nejčastěji používanou analytickou techniku v oblasti analýzy léčiv. Jedná se o separační metodu, která umožňuje provádět kvalitativní i kvantitativní hodnocení látek obsažených ve složitých směsích, v přítomnosti pomocných látek, nečistot nebo rozkladných produktů. Je využívána i při stanovení léčiv a jejich metabolitů v biologických materiálech.

Bylo prokázáno, že oxidační stres je rizikovým faktorem například pro degenerativní onemocnění jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova nemoc, věkem podmíněná makulární degenerace, kardiovaskulární onemocnění a další. Oxidační stres je způsoben reaktivními kyslíkovými radikály. Ty vznikají mimo jiné Fentonovou reakcí v důsledku nadbytku železa v organismu v přítomnosti peroxidu vodíku. Jednou z možností, jak omezit vznik reaktivních kyslíkových radikálů je chelatace volných iontů železa. Vedle léčby onemocnění, na jejichž vzniku se podílí oxidační stres, by nové chelátory železa mohly najít své uplatnění i u infekčních onemocnění typu malárie nebo tuberkulózy, v léčbě tumorů nebo u antracyklinem indukované kardiomyopatie.

Mezi v současnosti intenzivně studované chelátory železa patří salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH). Byla prokázána jeho účinnost při inhibici Fentonovy reakce, snadný vstup biologickými membránami a velmi nízká toxicita. Jeho velkým nedostatkem je velmi krátký biologický poločas, což je přičítáno hydrolýze hydrazonové vazby v plazmě. Z tohoto důvodu byly syntetizovány jeho analogy, mezi něž patří i prochelátor [2-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzyliden]-hydrazid kyseliny isonikotinové (BSIH), u kterých se předpokládá vyšší stabilita v plazmě a tím i delší biologický poločas.

Teoretická část diplomové práce popisuje princip vysokoúčinné kapalinové chromatografie a nejčastější separační mechanismy, stručný přehled HPLC instrumentace a metod kvantitativní analýzy. Další část je věnována úpravě biologických vzorků před HPLC analýzou a validaci bioanalytických metod. Závěr teoretické části se zabývá obecnou charakteristikou aroylhydrazonových chelátorů železa.

Experimentální část se věnuje optimalizaci chromatografických podmínek pro současné stanovení chelátoru SIH a prochelátoru BSIH v králičí plazmě, ověřením linearity metody a jejím následným využitím k hodnocení jejich stability v plazmě *in vitro*.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. Svou podstatou se jedná o separační metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi (1).

Mezi hlavní přednosti HPLC patří, v porovnání se staršími chromatografickými metodami (hlavně s tenkovrstvou chromatografií), rychlost analýzy, citlivost stanovení (v závislosti na použitém detektoru), možnost automatizace a skutečnost, že pro analýzu postačuje minimální množství vzorku. Prakticky ve všech výše uvedených ukazatelích je HPLC srovnatelná s plynovou chromatografií (GC); avšak vzhledem k tomu, že většina léčiv není těkavá nebo se zvýšenou teplotou rozkládají, je právě v analýze léčiv HPLC mnohem použitelnější technikou než GC (1).

Nejdůležitějšími oblastmi využití HPLC v analýze léčiv jsou stanovení stability léčiv, analýza přírodních léčiv v rostlinném materiálu, kontrolně-analytická problematika identifikace léčiv, stanovení obsahu a čistoty. HPLC se s oblibou využívá především při analýze složených lékových přípravků. Další důležitou oblastí je monitorování léčiv a jejich metabolitů v biologickém materiálu, nejčastěji v krevní plazmě, séru a moči. Na rozdíl od metod imunochemických je velkou předností HPLC skutečnost, že se jedná o selektivní metodu, umožňující kvantifikovat jak původní léčivo, tak i jeho metabolity. Stanovení léčiv v biologickém materiálu lze využít při farmakokinetických a metabolických studiích, řízené terapii, v toxikologii a lékové toxikománii, studiích biologické dostupnosti a bioekvivalenčních studiích. Analýza léčiv v biologickém materiálu je v současné době jeden z nejprogresivnějších směrů v analýze léčiv. (1)

2.1.1 Princip chromatografie a nejčastější separační mechanismy

Chromatografie využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární – nepohyblivá a druhá je mobilní – pohyblivá. Pevná stacionární fáze se nazývá sorbent. V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému,

mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární fází, která je v koloně (HPLC, GC) nebo na hliníkové destičce pokryté sorbentem (TLC), a mobilní fází, která unáší separované látky. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich separaci. K separaci tedy dochází na základě různé afinity dělených látek ke stacionární a mobilní fázi.(1)

Podle hlavní podstaty separačního procesu lze chromatografické metody rozčlenit do několika skupin.

2.1.1.1 Adsorpční chromatografie

Podstatou separace je rozdílná míra adsorpce dělených látek na aktivní povrch adsorbentu. Jako sorbenty se nejčastěji používají silikagel a oxid hlinitý. V kapalinové chromatografii se jedná o separaci pevná fáze – kapalina (LSC – Liquid-Solid Chromatography).(1)

2.1.1.2 Rozdělovací chromatografie

V kapalinové rozdělovací chromatografii je podstatou separace rozdílná rozpustnost dělených látek ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách (LLC – Liquid-Liquid Chromatography), přičemž kapalina použitá jako stacionární fáze je zakotvena na vhodném nosiči.(1)

2.1.1.3 Iontově výměnná chromatografie (IEC)

U této chromatografie jsou stacionární fází iontoměniče (katexy nebo anexy). Podstatou separace je rozdílná afinita dělených látek, které jsou zpravidla v iontové formě, k iontovýměnným skupinám iontoměniče. Rozdílnost afinity separovaných látek je dána rozdílnými hodnotami disociačních konstant ionogenních skupin, různou velikostí iontů a různým mocenstvím iontů. Nejčastějšími skupinami chemicky vázanými na povrchu anexů jsou aminy a kvarterní amoniové báze, na povrchu katexů jsou skupiny kyselá, karboxylová skupina, fosfátová skupina nebo sulfátová skupina.(1)

2.1.1.4 Gelová chromatografie

Jedná se o kapalinovou chromatografii, při níž jsou analyzované látky separovány na základě rozdílné velikosti molekul. Molekuly jsou nesený protékající mobilní fází kolonou naplněnou porézním materiálem (gelem), přičemž pronikají (permeací) do rozpouštědlem naplněných pórů gelu. Malé molekuly pronikají do pórů všech velikostí, rozměrnější molekuly jen do větších pórů a molekuly, které přesahují průměr pórů, vycházejí z kolony bez jakéhokoliv zadržení. Separace molekul je závislá na rozmezí velikosti pórů zvoleného gelu.(1) Ve většině případů se jedná o systém polysacharidových skeletů stacionární fáze a vodných roztoků jako fáze mobilní.

2.1.1.5 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie má v analýze léčiv pouze malé uplatnění. Separace je založena na interakcích ne vazebné povahy mezi donorem ve vzorku a ligandem navázaným na vhodný nosič. Sorbenty s odpovídajícími imobilizovanými ligandy se syntetizují specificky pro analýzu konkrétních analytů. Metoda se využívá hlavně v biochemických a klinických aplikacích, např. pro purifikaci antigenů (antigen-protilátka), enzymů (enzym–substrát), proteinů (imunoglobuliny–protein) nebo hormonů (receptor–hormon).(2)

2.1.2 HPLC instrumentace

Nejjednodušší HPLC systém je složen z vysokotlakého čerpadla, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, detektoru a příslušného počítačového programu pro zpracování dat.

Připravená přefiltrovaná mobilní fáze je ze zásobníku nasávána pomocí vysokotlakého čerpadla, které konstantní průtokovou rychlostí tlačí mobilní fázi nastaveného složení přes kolonu do detektoru. Roztok vzorku je dávkovacím zařízením nastříknut na počátek chromatografické kolony a je unášen mobilní fází. V závislosti na interakcích vzorek – sorbent jsou jednotlivé komponenty analytu rozděleny. Na konci kolony jsou látky v mobilní fázi zaznamenávány pomocí detektoru a jeho odezva je vyhodnocena počítačovým programem. Počítač také řídí chod celého chromatografu.(3)

2.1.2.1 Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky mobilní fáze zajišťují dostatečné množství mobilní fáze pro kontinuální analýzy. Mobilní fáze je nasávána přes filtry zamezující průniku pevných nečistot do systému. Moderní chromatografy provádí odplynění mobilní fáze automaticky pomocí tzv. „degasseru“, ve kterém je mobilní fáze vedena porézní trubicí v evakuovaném prostoru a molekuly plynů póry pronikají do vnějšího prostoru. Odplynění mobilní fáze zásadně přispívá k zajištění kontinuálního toku mobilní fáze, jež je nezbytný pro dosažení vhodných podmínek pro separaci i detekci signálu.(3; 4)

2.1.2.2 Vysokotlaké čerpadlo

Vysokotlaké čerpadlo zaručuje konstantní a kontinuální tok mobilní fáze celým systémem.(3)

HPLC analýzu lze realizovat za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy, tzv. isokratická eluce. Je-li v průběhu analýzy měněno složení mobilní fáze, jedná se o tzv. gradientovou eluci. Při změně složení mobilní fáze jsou daná rozpouštědla dopravována jednotlivými čerpadly k mísící komoře (mixer). Poměr rozpouštědel v mobilní fázi je kontrolován průtokovými rychlostmi jednotlivých pump.(4)

2.1.2.3 Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení umožňuje vpravit dané množství roztoku vzorku do proudu mobilní fáze před začátek kolony. Dnes se využívají téměř výhradně automatické dávkovače, díky kterým lze celý proces zautomatizovat a analyzovat velké množství vzorků bez vnějšího zásahu operátora.(3)

2.1.2.4 Chromatografická kolona

Pro analytické účely jsou nejčastěji dlouhé 3 – 25 cm o vnitřním průměru 3 – 5 mm, velikost částic v průměru se pohybuje od 1,5 – 5 μm . Zpravidla jsou zhotoveny z nerezové oceli nebo výjimečně ze skla. Délka, vnitřní průměr kolony a velikost částic sorbentu jsou důležitými charakteristikami, které přímo ovlivňují rychlost i účinnost separace.(3)

Se snižující se velikostí částic sorbentu dochází ke zvýšení účinnosti separace (rozlišení).(5)

Kolony jsou naplněny vhodnými sorbenty. Buď se jako nosič používá anorganický nosič – silikagel, nebo organický – polymer nebo uhlík. Sorbenty tvořené silikagelem jsou mechanicky poměrně odolné, vykazují vysokou účinnost a možnosti poměrně přesné predikce retence solutů. Jejich nevýhodou je však limitovaný rozsah pH mobilní fáze, chemická nestabilita a chvostování bazických analytů.(5)

Sorbenty založené na polymerní fázi (methylakrylát, akrylamid) mohou pracovat v široké oblasti pH, jsou chemicky stabilní a nedochází na nich k iontovým interakcím. Jejich nevýhodou je jejich nižší mechanická odolnost, nižší účinnost a špatně předvídatelná retence analytů.(5)

V HPLC se nejčastěji používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze. Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelu jsou vhodnou chemickou reakcí navázány různé radikály. Nejčastěji se jedná o uhlovodíkové řetězce obsahující zpravidla 18 (případně 8) uhlíkových atomů. Jde o nepolární chemicky vázané fáze (tzv. reverzní fáze). Další typ radikálu obsahuje tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami – NH₂, -CN, aj. Jde o středně polární fáze.(3)

Komerčně se vyrábějí chemicky vázané stacionární fáze různých typů v širokém sortimentu. Jako nosič, na kterém jsou navázány radikály, se používají kromě silikagelu i oxid hlinitý nebo zirkoničitý, který je na rozdíl od silikagelu stabilnější při vyšším pH mobilní fáze. Pro potřeby iontově výměnné chromatografie se jako sorbenty používají vhodné ionexy. Komerčně dostupné jsou i různé typy chirálních stacionárních fází, umožňující separaci enantiomerů léčiv.(3)

2.1.2.5 Detektor

Detektory v HPLC kontinuálně monitorují mobilní fázi a v ní rozpuštěné analyty opouštějící kolonu. Na základě různých principů poskytují signál, který odpovídá vlastnosti detekované látky.(3)

Citlivost a selektivita chromatografické analýzy závisí velkou měrou na použitém typu detektoru. Nejčastěji používanými detektory ve farmaceutické analýze jsou UV - VIS – detektory, detektory hmotnostní nebo fluorimetrické, ostatní se využívají ve specifických případech.

Spektrofotometrické detektory

Spektrometrie v ultrafialové (event. viditelné) oblasti má široké využití jak při identifikacích léčiv, tak i v kvantitativní analýze. Je založena na Lambert-Beerově zákonu:

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

kde:	A	absorbance měřeného roztoku
	ε	molární absorpční koeficient (absorbance roztoku látky 1 mol/l, měřená v 10 mm vrstvě při určité vlnové délce)
	c	koncentrace absorbující látky v mol/l
	l	síla měřené vrstvy v cm. (1)

Spektrofotometrické detektory proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektorem. Absorbance je převedena na elektrický signál, který je počítačem zpracován k vytvoření chromatogramu. K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra, mnohem méně oblast viditelná a minimálně infračervená oblast spektra. Mezi užívané UV detektory patří UV detektor s fixní vlnovou délkou, UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou, scanning UV detektor (snímající během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva) a diode array detektor (trojrozměrná projekce, snímá absorpční spektrum, umožňuje hodnocení analytů při několika vlnových délkách současně, dovoluje porovnávat poměry absorbancí při jednotlivých vlnových délkách).(1)

Spektrofotometrické detektory se vyznačují poměrně vysokou citlivostí (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a lze je používat při gradientové eluci.(1)

Fluorimetrické detektory

Fluorimetrické detektory jsou použitelné v případech, kdy analyt vykazuje přirozenou fluorescenci. Látky, které nefluoreskují, lze mnohdy derivatizací s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Fluorimetrické detektory jsou tedy méně univerzální než UV detektory, avšak jsou citlivější (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), selektivnější a jsou rovněž použitelné při gradientové eluci.(1)

Elektrochemické detektory

Elektrochemické detektory nachází uplatnění při hodnocení léčiv, u nichž lze využít dějů, souvisejících s elektrochemickou reakcí probíhající na rozhraní elektroda – eluent. Proměřují elektrochemickou veličinu, jejíž hodnota je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva. Schopnost elektrochemické redukovatelnosti a oxidovatelnosti léčiv využívá voltametrický, ampérometrický a polarografický detektor. Elektrochemické detektory jsou značně citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), ale většinu z nich nelze použít při gradientové eluci.(1)

Refraktometrické detektory

Refraktometrické detektory měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony, obsahujícím analyzovanou látku. Citlivost je tím větší, čím je vyšší rozdíl v indexu lomu analytu a mobilní fáze. I když jsou prakticky univerzální, pro analytické hodnocení léčiv se používají pouze ojediněle. K hlavním nevýhodám patří: menší citlivost (10^{-6} g/ml), nutnost termostatování (odezva detektoru je značně závislá na teplotě) a nelze je použít při gradientové eluci.(6)

Hmotnostní detektory

Spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS) je v poslední době velmi využíváno pro řadu výhod – vysokou selektivitu, vysokou citlivost (10^{-13} g/ml) a zároveň poskytuje hmotnostní spektra využitelná při identifikaci neznámých látek. Jedinou nevýhodou je jejich finanční náročnost.(4)

Hmotnostně – spektrometrický detektor se skládá z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. Detektor zaznamenává ionty v plynné fázi, proto je nutno mobilní fázi po

výstupu z HPLC kolony z eluentu odstranit. Molekuly látky je potřeba převést na ionty iontovým zdrojem. Nabité částice (molekulární a fragmentární ionty) jsou v analyzátoru v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a je zaznamenáváno hmotnostní spektrum (tj. četnost iontů ve vztahu k poměru – hmotnost/počet nábojů).(1)(3)

Mezi dva nejvíce používané iontové zdroje patří elektrosprej (Electrospray Ionization (ESI)) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)).

Princip elektrospraje: Eluát prochází kapilárou, na niž je vloženo vysoké napětí. Intenzivní pole na konci kapiláry tvoří kónický meniskus (Taylorův kužel), ze kterého se uvolňuje sprej vysoce nabitých kapiček. Následným postupným odpařením rozpouštědla vznikají ionty. Pokud je více ionizačních míst v molekule, mohou vznikat vícenásobně nabité ionty.(6)

Elektrosprej je nejčastěji používaný iontový zdroj v LC/MS. Jeho výhodami je široká oblast použití, díky tvorbě vícenásobně nabitých iontů umožňuje analyzovat také velmi velké molekuly. Nevýhodou je omezená použitelnost pro nepolární analyty. Elektrosprej je vhodný pro polární a iontové látky, peptidy, proteiny, sacharidy, nukleové kyseliny, organometalické i anorganické komplexy.(6)

Při chemické ionizaci za atmosférického tlaku je eluát nejdříve rozprašován pomocí zmlžovacího plynu (N_2) do vyhřívané komůrky (přibližně 400 – 500 °C). Poté koronový výboj ionizuje analyt v plynné fázi. Tato technika je využívána u sloučenin, které se nedostatečně ionizují pomocí elektrospreje.(4)

2.1.3 Kvantitativní analýza HPLC

Zatímco základní kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční (eluční) čas t_R , což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku, kvalitativní charakteristikou v HPLC je plocha, event. výška chromatografického píku.

Výška píku je nejjednodušší způsob měření odezvy detektoru a je využívána při stopových analýzách.

Plocha píku je široce používanou metodou pro kvantitativní analýzu v HPLC. Správnost a přesnost závisí na několika faktorech, jako je ustavení základní linie, správné určení začátku a konce píku, dostatečné množství datových bodů nezbytných pro stanovení správné plochy píku.(1)(7)

2.1.3.1 Metody kvantitativní analýzy

Odezva detektoru je vztažena ke koncentraci nebo množství zkoumané látky.

Metoda normalizace

Obsah stanovované látky v procentech se vypočítá z plochy píku jako procento plochy všech píků na chromatogramu, s výjimkou píků menších než je limit zanedbatelnosti. Tato metoda je vhodná pro shodné nebo velmi podobné odezvy detektoru složek vzorku vzhledem k jejich koncentraci (odezvoový faktor).(8)

Metoda vnějšího standardu

Metoda vnějšího standardu spočívá ve dvou dávkováních. V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci chromatografického záznamu se ve druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se registruje jeho chromatogram. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.(8)

$$\frac{A_{vz}}{c_{vz}} = \frac{A_{st}}{c_{st}}$$

kde A_{vz} je plocha píku vzorku

A_{st} je plocha píku standardu

c_{vz} je koncentrace vzorku

c_{st} je koncentrace standardu.

Metoda vnitřního standardu

Metoda vnitřního standardu je prováděna tak, že se ke známému objemu zkoušeného a porovnávacího roztoku přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se roztoky nastříkují na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek a vnitřního standardu se opět vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu.

Výhodou metody je vyšší přesnost, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Nevýhodou je náročnost vybrání vhodného vnitřního standardu, který musí být eluován samostatně v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, musí mít podobnou koncentraci jako látky, jejichž obsah je zjišťován, musí být chemicky inertní, stálý a strukturně podobný stanovované látce.(8)

$$C_{vz} = \frac{\frac{A_{vz}}{(A_{IS})_{vz}}}{\frac{A_{st}}{(A_{IS})_{st}}} \cdot C_{st}$$

kde $(A_{IS})_{vz}$ je plocha vnitřního standardu u zkoušeného roztoku

$(A_{IS})_{st}$ je plocha vnitřního standardu u porovnávacího roztoku.

Metoda kalibrační křivky

Na základě analýzy standardních roztoků o známé koncentraci analytu se sestaví kalibrační křivka a určí se vztah mezi signálem (osa y) a koncentrací roztoku vzorku (osa x). Z rovnice přímky

$$y = kx + q$$

se vypočítá hodnota koncentrace

$$x = \frac{y-q}{k}.$$

Kalibrační závislost může být určena na základě metody vnějšího i vnitřního standardu a měla by být ověřena dostatečným počtem standardních roztoků.(7)

2.2 Úprava vzorků před HPLC analýzou

Úprava vzorků je ve většině případů samozřejmou součástí HPLC analýzy. Jejím cílem je odstranění nečistot, které by mohly způsobit zničení kolony nebo ovlivňovat detekci signálu. Dále je nutné zajistit kompatibilitu nastříkovaného vzorku s používanou HPLC metodou (např. nerozpustnost v mobilní fázi). Úprava vzorků může významně ovlivnit také přesnost, správnost, selektivitu i citlivost metody. (7)

2.2.1 Extrakce do organického rozpouštědla

Extrakce do organického rozpouštědla (LLE – Liquid – Liquid Extraction) separuje analyty na základě jejich relativní rozpustnosti ve dvou rozdílných nemísitelných rozpouštědlech, většinou se jedná o vodu a organická rozpouštědla. Nejčastěji používaná organická rozpouštědla jsou hexan, methylen chlorid, ethyl ester kyseliny octové nebo jejich kombinace.(9)

Úpravou pH vodné fáze lze dosáhnout vyšší selektivity a především výtěžnosti extrakce. Obecně lze říci, že při pH nižším než 4 se méně disociují a lépe extrahují látky kyselého charakteru, naopak při pH vyšším než 7 snáze přecházejí do extrakčního činidla látky bazické.(10)

Vzorek biologického materiálu je smíchán s organickým rozpouštědlem, protřepán a centrifugován pro oddělení organické a vodné fáze. Vodná složka je odpipetována nebo zamrzena (zkumavka je vložena na 1 minutu do suchého ledu, organická fáze nezmrzne a odlije se do jiné zkumavky). Následně je organická fáze zahuštěna plynem, nejčastěji dusíkem. Zahuštěný vzorek se rekonstruuje v malém množství mobilní fáze a může být nastříknut na kolonu.(9)

Výhodou této izolace je univerzálnost a dobrá výtěžnost, nevýhodou je vysoká spotřeba rozpouštědel a zdlouhavost práce.(11)

2.2.2 Deproteinace

Deproteinace (PPE – Protein Precipitation Extraction) je jednou z nejčastěji používaných metod. (9)

Při deproteinaci by mělo být odstraněno co největší množství proteinů. Zvolené deproteinační činidlo nesmí ovlivňovat sledované léčivo ani další pracovní postupy. Dále je potřeba, aby samotný precipitát neadsorboval na svůj povrch sledované léčivo. (10)

Biologický materiál je smíchán s precipitačním činidlem (například metanolem, acetonitrilem, kyselinou trichloroctovou, hydroxidem barnatým, kationty těžkých kovů), které způsobí denaturaci a precipitaci proteinů. Poté je vzorek vložen do centrifugy, kde dojde k oddělení precipitátu od supernatantu, který je nastříknut na kolonu. (9)

Výhodou deproteinace je její jednoduchost a rychlost provedení, nevýhodou je možnost vazby léčiv na precipitát, naředění vzorku a vysoká přítomnost balastních látek. (9)

Deproteinaci lze provést také enzymaticky působením proteolytických enzymů, což je hodně časově náročné. Proteiny je možné odstranit také ultrafiltrací, kdy se vzorek při centrifugaci přefiltruje přes mikrofiltr. Deproteinací ultrafiltrací získáme koncentraci léčiv nevázanou na bílkoviny plazmy. (10)

2.2.3 Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (SPE, Solid-Phase Extraction) patří mezi nejdůležitější techniky v přípravě vzorků pro HPLC analýzu. Využívá extrakční kolonky, které jsou naplněné různými sorbenty. Separace je založena na rozdílné afinitě analytu a ostatních balastních látek k pevné stacionární fázi. Podle změn polaritě a pH mobilní fáze, analyty nebo nečistoty prochází extrakční kolonkou. (9)

Kolonka je před vlastním použitím aktivována dle pokynů výrobce promytím daným rozpouštědlem (po promytí organických rozpouštědlem se ještě promývá většinou vodou). Pro průtok rozpouštědla sorbentem se využívá podtlak nebo přetlak. Poté se na kolonku aplikuje příslušný biologický materiál. Při průtoku kolonkou se analyzované léčivo v biologickém materiálu sorbuje na kolonci. Následný pufr slouží k promytí kolonky a

odstranění balastních látek. Poté je eluován analyt pomocí organického rozpouštědla. Eluát lze přímo nastříknout na kolonu nebo zahustit dusíkem a následně rozpustit ve vhodnějším rozpouštědle a analyzovat.(9)

Výhodou je možnost propojení on-line s HPLC, čistota produktu a možnost snadné automatizace. Nevýhodou je vyšší cena kolonek.(9)

2.3 Validace bioanalytických metod

Smyslem validace je prokázat, že vypracovaná metoda je pro zamýšlený účel vhodná. Cílem validace bioanalytické metody je stanovit vhodné podmínky metody a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo i v různých laboratořích. Zamýšleným účelem je stanovení analytu v biologickém materiálu s přijatelnou přesností a správností.(12)

Úřad pro kontrolu potravin a léků (FDA) vydal dokument „Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation“ shrnující požadavky na validaci bioanalytických metod. Tyto požadavky nejsou závazné, slouží pouze jako doporučení. Informace obsažené v tomto dokumentu platí zejména pro metody používané při studiu bioekvivalence, biologické dostupnosti a farmakokinetických parametrů farmakologických i toxikologických studiích a preklinických studiích. Zabývá se bioanalytickými postupy jako je plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, jejich kombinace s hmotnostní spektrometrií, které jsou využívány ke kvantitativnímu hodnocení léčiv nebo metabolitů v biologických matricích.(12)

Směrnice FDA definovala tři typy validací – úplná, částečná a křížová validace.(12)

Zjištěné hodnoty validačních parametrů se zpracovávají do validačního protokolu, který musí obsahovat též patřičnou dokumentaci (např. chromatogramy).(1)

Mezi základní parametry validace bioanalytických metod je podle doporučení FDA zahrnována správnost (accuracy), přesnost (precision), selektivita (selectivity), senzitivita (sensitivity), reprodukovatelnost (reproducibility) a stabilita (stability). Měření každého analytu v biologickém materiálu by mělo být validováno. Navíc by měla být určena stabilita analytu v nastříknutém vzorku. Při vývoji bioanalytické metody je důležité stanovení selektivity, správnosti, přesnosti, výtěžnosti, kalibrační křivky a stability analytu.(12)

2.3.1 Selektivita

Selektivita (selectivity) je schopnost analytické metody rozlišit a změřit množství analytu v přítomnosti jiných složek ve vzorku. Pro analýzu vzorků matrice (blank samples) by měl být získán příslušný biologický materiál alespoň ze šesti zdrojů. Každý vzorek matrice by měl být testován pro zjištění případné interference s testovanou látkou. Selektivita by měla být zajištěna v dolním limitu kvantifikace (LLOQ – Lower Limit Of Quantification).(12)

Potenciální rušivé látky v biologickém materiálu zahrnují metabolity, rozkladné produkty, další xenobiotika. Pokud je metoda zamýšlená k měření více než jednoho analytu, každý analyt by měl být testován k zajištění skutečnosti, že k interferenci mezi sebou nedochází.(12)

2.3.2 Správnost, přesnost, výtěžnost

Správnost (accuracy) vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a skutečnou hodnotou (koncentrací) analytu ve vzorku. Správnost se obvykle určí analýzou minimálně pěti samostatně připravených vzorků pro každou testovanou koncentrační hladinu. Je doporučeno ověřit správnost na minimálně třech koncentracích v rozsahu koncentrace vzorku. Střední hodnota správnosti by se neměla lišit o více než 15% od skutečné hodnoty, kromě LLOQ, kde by se neměla odchýlit o více než 20%. Odchylka získané od skutečné hodnoty slouží k měření správnosti.(12)

Přesnost (precision) je míra shody mezi jednotlivými výsledky měření opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Přesnost se obvykle stanoví analýzou minimálně pěti samostatně připravených vzorků pro každou koncentraci vzorku. Je doporučeno stanovit minimálně tři koncentrace v rozsahu očekávané koncentrace vzorku. Přesnost zjištěná pro každou koncentraci by neměla přesáhnout 15% variačního koeficientu (CV - coefficient of variation) kromě LLOQ, kde by neměla přesáhnout 20% CV.(12)

Variační koeficient, nebo také relativní směrodatná odchylka (RSD), je charakteristikou variability rozdělení pravděpodobnosti náhodné veličiny. Je definovaný jako podíl směrodatné odchylky a absolutní hodnoty ze střední hodnoty.

$$RSD(\%) = \frac{100 \cdot SD}{x},$$

kde x je průměr naměřených hodnot a SD je směrodatná odchylka. SD pro počet jednotlivých měření n a jejich jednotlivé výsledky x_i je definována jako

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

Podle podmínek opakování se rozlišují tři úrovně přesnosti:

Opakovatelnost (repeatability) – metoda se opakuje stejným způsobem jedním pracovníkem se stejnými činidly na tomtéž přístroji.

Mezilehlá přesnost (intermediate precision) – metoda se provádí s různými činidly, analytiky i přístroji, v různý den, ale v jedné laboratoři a se stejným zhomogenizovaným vzorkem.

Reprodukovatelnost (reproducibility) – provedení je stejné jako u mezilehlé přesnosti s tím rozdílem, že probíhá v různých laboratořích.(1)(7)

Výtěžnost (recovery) stanovuje efektivitu metody extrakce analytu z biologického materiálu. Získá se porovnáním odezev detektoru extrahovaných vzorků na třech úrovních koncentrace analytu a standardů, které byly připraveny přidáním dostatečného množství analytu do extrahovaného vzorku prázdné matrice a představují 100% výtěžnost. Výtěžnost analytu nemusí dosahovat hodnot 100%, ale rozsah výtěžnosti analytu a vnitřního standardu by měl být stálý, přesný a reprodukovatelný.(12)

$$\text{výtěžnost (recovery)} = \frac{100 \cdot \text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

2.3.3 Kalibrační křivka

Kalibrační křivka popisuje vztah mezi odezvou detektoru a známou koncentrací analytu ve vzorku. Kalibrační křivka je sestrojena pro každý analyt ve vzorku. Kalibrační vzorky jsou připraveny v tom samém biologickém materiálu, ve kterém budou měřeny vzorky v zamýšlené studii.(12)

Pro vhodnou definici vztahů mezi koncentrací a odezvou je potřeba mít dostatečné množství kalibračních bodů. Je třeba dokázat, že vztah mezi odezvou a koncentrací je plynulý a opakovatelný. Počet kalibračních bodů i koncentrační rozmezí závisí na předpokládaném koncentračním rozsahu analytů v reálných vzorcích.(12)

Kalibrační křivka je sestavena ze vzorku matrice (biologický materiál bez vnitřního standardu), nulového vzorku (biologický materiál s vnitřním standardem) a šesti až osmi nenulových vzorků zahrnujících očekávaný rozsah koncentrací, včetně LLOQ. Vyšší počet koncentrací standardů je doporučen při nelineárním vztahu.(12)

Při sestrovování kalibrační křivky je důležité, aby alespoň čtyři ze šesti nenulových kalibračních standardů splňovaly parametry správnosti, tj. 15% odchylky od skutečné koncentrace analytu ve vzorku a odchylku 20% pro LLOQ. Zároveň by vynechání standardů, které těmito kritériím nevyhovují, nemělo změnit model závislosti odezva-koncentrace. Výsledky nulového vzorku a vzorku matrice se do kalibrační křivky nezahrnují, slouží pouze k vizuálnímu ověření. (12)

Dolní limit kvantifikace (LLOQ) – charakterizuje nejnižší množství analytu ve vzorku, které je možno kvantitativně stanovit s vhodnou přesností a správností. Dolní limit kvantifikace je stanoven alespoň pěti vzorky nezávislých standardů a určením variačního koeficientu. Limit kvantifikace může být zvolen jako spodní hodnota na kalibrační křivce, pokud jsou dodrženy následující podmínky:

- Odezva analytu při LLOQ by měla být alespoň pětinasobná vůči odezvě prázdného (blankového) vzorku.
- Pík (odezva) analytu by měl být rozpoznatelný, oddělený a opakovatelný s přesností 20% a správností 80-120%.

Doporučuje se použít nejjednodušší model, který odpovídajícím způsobem popíše vztah koncentrace – odezva. (12)

Možnost ředit vzorky analytů, které mají koncentraci přesahující horní mez kalibrační křivky, je potřeba během validace prokázat validačními parametry správnosti a přesnosti.(12)

2.3.4 Stabilita

Stabilita léčiva v biologickém prostředí je funkcí skladovacích podmínek, chemických vlastností léčiva, biologického prostředí a obalového materiálu. Stabilita analytu může být ovlivněna během přípravy a zacházení se vzorkem, při dlouhodobém skladování (ve zmrzlém stavu při konkrétní skladovací teplotě) a při krátkodobém skladování (doba, po kterou se předpokládá uchovávání vzorku při pokojové teplotě nebo v obalovém materiálu), během zmrazovacích a rozmrazovacích cyklů a při procesech analýzy. Podmínky stabilitních testů by měly odrážet skutečné podmínky, kterým je léčivo vystaveno v reálném vzorku. Tyto testy mohou zahrnovat také hodnocení stability analytu v zásobním roztoku.(12)

2.4 Aroylhydrazonové chelátory železa

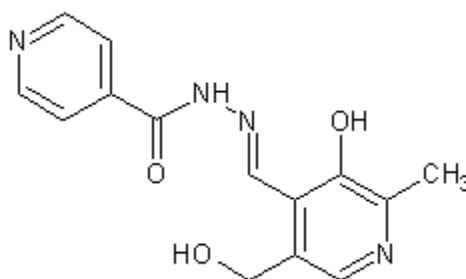
Železo je nejvíce zastoupený přechodný kov v lidském těle a je potřebným kofaktorem pro esenciální životní procesy jako je transport kyslíku, DNA syntéza a buněčné dýchání. Železo ovšem hraje významnou roli ve Fentonově reakci, ve které železnatý ion reaguje s peroxidem vodíku a produkuje vysoce reaktivní hydroxylový radikál. Téměř veškeré železo je za fyziologických podmínek vázáno na proteiny, které ho buď využijí, transportují nebo uloží do zásoby. Při některých patologických stavech, jež jsou spojeny s přítomností vysokých koncentrací superoxidu a peroxidu v buňce, nebo nízkým pH (např. během ischemie), může dojít k uvolnění železa z jeho skladovacích proteinů. Tento jev pak napomáhá cyklické produkci reaktivních kyslíkových radikálů, jež vedou k oxidačnímu stresu.(13)(14)

Léčba u systémových onemocnění způsobených nadměrným množstvím železa zahrnuje dietu bez železa a v některých případech terapii chelátory železa. Bakteriální siderofor desferrioxamin (DFO) je klinicky používán od roku 1970 k léčbě přetížení organismu železem, které bylo navozeno transfuzemi při léčbě β - thalasemie. Jeho nevýhodou je krátký biologický poločas, a díky vysoké hydrofilite také špatná absorpce z GIT, což vyžaduje dlouhodobé subkutánní infuze. Z perorálních přípravků jsou k dispozici hydroxypyridinon deferipron (L1, CP20) a triazol deferasirox (ICL670A). (15) Deferipron má kratší biologický poločas než deferasirox, který se podává pouze jednou denně. Prvotním cílem těchto léků je železo v plazmě, které není navázáno na transferin, následně intracelulární zásoby železa v játrech, srdci a endokrinních tkáních.(14)(16) Jejich značnou nevýhodou je jejich nízká selektivita k tzv. škodlivému železu a kompetice chelátorů s enzymy, které pro svoji funkci vyžadují přítomnost železa nebo jiných kovů. (14) (17)

Mnoho *in vitro* i *in vivo* studií odhalily široké možnosti využití chelátorů železa v terapii dalších patologických stavů, které nejsou způsobeny přetížením organismu železem. Chelátory mohou vazbou železa blokovat enzym účastnící se syntézy DNA a tak bránit proliferaci nádorových buněk (např. di-2pyridylketon isonikotinoyl hydrazon). Analogicky inhibují nedostatkem železa růst plasmodií, čehož by mohlo být využito při terapii malárie. Analogy odvozené od isonikotinoyl hydrazidů byly patentovány jako

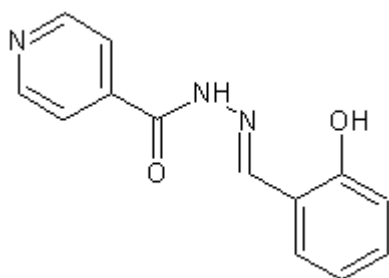
antituberkulotika. Je prokázána také jejich účinnost u onemocnění spojených s oxidačním stresem nebo neurodegenerativních onemocnění.(18)(19)

Mateřskou látkou aroylhydrazonových chelátorů železa je pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) (Obr. 1). V *in vitro*, i v preklinických *in vivo* studiích PIH vykazoval schopnost tvořit komplexy se železem a relativně nízkou toxicitu. Nicméně v první fázi klinického zkoušení byla pozorována výrazně nižší schopnost této látky mobilizovat železo z organismu, než byla na základě preklinických dat očekávána. Obměnou jeho struktury byla získána řada analogů rozdílných fyzikálně-chemických vlastností a farmakologického účinku. (18)

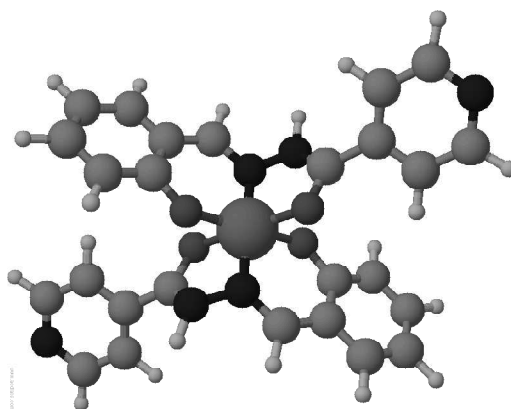


Obr. 1 Strukturální vzorec PIH

Mezi intenzivně zkoumané patří salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH). (Obr. 2) SIH je krystalická látka světlé až nažloutlé barvy, která je snadno syntetizována pomocí Schiffovy reakce z komerčně dostupných prekurzorů – isoniazidu a salicylaldehydu. SIH je špatně rozpustný ve vodných roztocích o neutrálním pH, avšak jeho sůl (SIH . HCl) je ve vodě lépe rozpustná. SIH tvoří komplexy přednostně s volným nebo slabě vázaným železem (Fe^{3+}) ve stechiometrickém poměru 2:1 vazbou přes karbonylový kyslík, iminový dusík a deprotonovaný fenolátový kyslík.(19)(20) (Obr. 3)



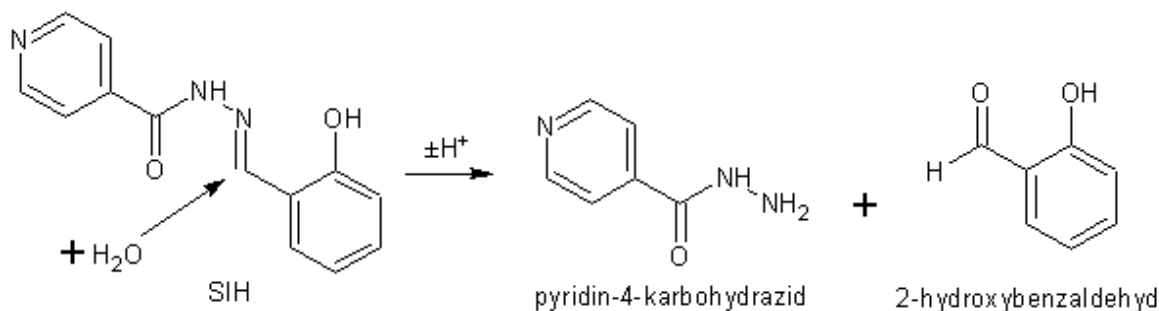
Obr. 2 Strukturální vzorec SIH



Obr. 3 3D zobrazení komplexu Fe(SIH)₂

Díky nízké molekulární hmotnosti a optimální lipofilitě, může být SIH podáván perorálně. Snadno proniká membránou do buněk, pevně chelatuje intracelulární železo, a proto je schopný velmi efektivně blokovat Fentonovu reakci. SIH byl účinný v protekci křeččích a krysích kardiomyocytů a H9c2 buněk před poškozením způsobeným peroxidem vodíku *in vitro*. Také účinně chránil H9c2 buňky před oxidačním stresem vyvolaným *tert*-butyl hydroperoxidem. Navíc SIH vykazoval kardioprotektivní působení na modelu antracyklinové kardiotoxicity jak *in vitro* (u neonatálních potkaních kardiomyocytů), tak *in vivo*. Nejnovější studie také prokazují značnou účinnost SIH proti buněčnému poškození způsobeného gama zářením. Nízká *in vivo* toxicita a dobrá tolerance SIH byla dokázána desetitýdenním opakovaným podáváním králíkům.(13)(14)(19)

Navzdory slibným farmakologickým účinkům, pilotní farmakokinetická studie odhalila relativně krátký biologický poločas po intravenózním podání SIH králíkovi (cca 17 min pro SIH), což může být limitujícím faktorem pro jeho další vývoj. Podobné výsledky byly získány také v *in vivo* studii s dalším aroylhydrazonovým chelátorem pyridoxal-2-chlorbenzoyl hydrazonem (*o*-108). Krátký biologický poločas by mohl být zapříčiněn labilní hydrazonovou vazbou, která je náchylná k hydrolýze. (Obr. 4) Bylo prokázáno, že rychlý rozklad v plazmě není typický pouze pro SIH, ale objevuje se i u aroylhydrazonů vytvořených spojením isoniazidu s aromatickým aldehydem. S cílem zvýšení plazmatické stability a tím i zlepšení možného terapeutického potenciálu této skupiny látek byla provedena cílená modifikace chemické struktury.(13)(18)



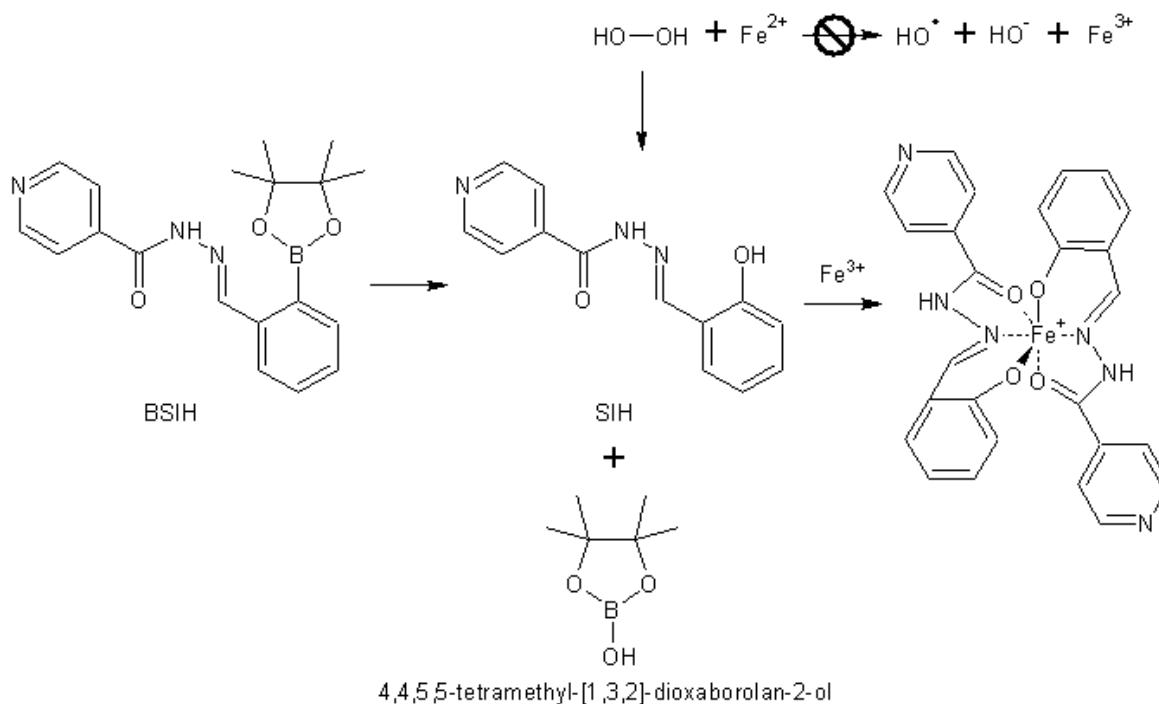
Obr. 4 Hydrolýza SIH

Cílenou obměnou struktury aroylhydrazonů byly připraveny také prochelátory, které obsahují chemicky maskované Fe-vázající skupiny, a aktivní chelátor je tvořen jen v přítomnosti produkce reaktivních kyslíkových radikálů. Na rozdíl od typických chelátorů, které reagují se všemi kovovými ionty nebo inhibují metaloenzymy neselektivní vazbou, tyto prochelátory jsou navrženy tak, aby byly aktivovány jen v místě oxidačního stresu.(14)(20)

První generací prochelátorů je [2-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzyliden]-hydrazid kyseliny isonikotinové (BSIH), (Obr. 5) jenž obsahuje ester kyseliny borité namísto fenolového kyslíku, který je klíčovým donorem u chelátoru SIH.(14)(20)

BSIH lze snadno připravit kondenzací hydrazidu kyseliny isonikotinové s pinakol esterem (2-formylfenyl)borité kyseliny. Reakcí s peroxidem vodíku se BSIH aktivuje na chelatačně účinný SIH. (Obr. 5)

Bylo prokázáno, že je BSIH v buněčném médiu mnohem stabilnější než SIH a také lépe chrání buňky proti oxidačnímu stresu i během dlouhotrvajících experimentů. Kromě toho byl BSIH (100 μM) prokazatelně méně toxický v porovnání se SIH (100 μM) a desferrioxaminem (1mM). Díky nízké toxicitě, významnému antioxidantnímu působení a selektivní bioaktivaci v místě účinku se teda BSIH jeví jako slibný kandidát pro ochranu buněk a tkání před oxidačním stresem.(14)



Obr. 5 Mechanismus účinku prochelátoru BSIH

2.4.1 Analytické hodnocení aromatických hydrazonů.

Navzdory skutečnosti, že byly nasyntetizovány desítky chelátorů charakteru aromatických hydrazonů, dlouhou dobu nebyla věnována pozornost jejich analytickému hodnocení. Ve většině případů byla hodnocena pouze jejich účinnost, případně byly v odborné literatuře publikovány analytické metody založené na UV/VIS spektrofotometrii a tenkovrstvé chromatografii (TLC).(20)(14) Až v průběhu posledních let byly publikovány HPLC metody pro hodnocení čistoty a stability vybraných chelátorů železa ze skupiny aromatických hydrazonů. S využitím HPLC bylo dále možno stanovit také základní farmakokinetické parametry vybraných chelátorů této skupiny.(13)(18)(19)

Pozornost byla věnována zejména analýze SIH a *o-108*. Pro izolaci SIH z plazmy byly testovány různé metody úpravy vzorku. SPE (Solid-phase extraction) byla díky svým výhodám (jednoduchost provedení, reprodukovatelnost, schopnost dát relativně čistý vzorek) zvolena jako první možnost. Nejvyšší, avšak nedostačující extrakční výtěžnost SIH o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ byla dosažena pomocí C4 kolony (69%).(19) V případě *o-108* byla plazma upravena pomocí SPE použitím kolony C8. Nejvyšší výtěžnost byla

dosažena s fosfátovým pufrům a malým množstvím EDTA (2mM), konečný analyt byl eluován nejlépe methanolem.(21)

Precipitace proteinů plazmy byla prováděna jako druhá v pořadí. Precipitačními činidly první volby se staly metanol, acetonitril nebo jejich kombinace. Optimální výtěžnost analytu by měla dosáhnout 95 – 100%.(19) Nejvyšší extrakční výtěžnost SIH byla dosažena použitím acetonitrilu (80%), ve třikrát větším objemu než byl objem precipitované plazmy. Přidáním 10 μ l HClO₄ do vzorku před smísením s 900 μ l acetonitrilu dosáhla extrakční výtěžnost hodnot 85% a objem precipitačního činidla tak klesl na poloviční množství oproti předchozímu případu.(18)(19)

V porovnání s precipitační technikou a SPE byla L-L extrakce (liquid-liquid extraction) ještě méně účinná, protože umožnila dosáhnout maximální výtěžnosti menší než 60%.(19)

Pro analýzu SIH a *o-108* v králičí plazmě byly publikovány validované analytické metody, které byly poté úspěšně uplatněné v *in vivo* farmakokinetických studiích. Vhodných separačních podmínek při analýze SIH a *o-108* bylo dosaženo použitím chromatografické kolony (250 x 4,6 mm) s LiChrospher[®] RP – 18,5 μ m s předkolonou Purospher[®] RP - 18,5 μ m (Merck, Německo). Jako mobilní fáze pro analýzu SIH byla použita směs methanolu a fosfátového pufru (0,01 M dihydrogenfosforečnan sodný; pH 6,0 upraveno 1 M hydroxidem sodným) v poměru 47:53 (v/v). Roztok EDTA (2mM) byl přidán do vodné fáze, aby se předešlo případné tvorbě komplexů chelátoru se železem v chromatografickém systému.(18) Mobilní fáze pro *o-108* byla složena z fosfátového pufru (0,01M dihydrogenfosforečnan sodný s příslušným množstvím EDTA k vytvoření koncentrace 2mM), methanolu a acetonitrilu v poměru 42:24:14 (v/v/v).(21) Průtok byl nastaven na 0,9 ml/min, nebo 1,0 ml/min, detektor na 288 a 254 nm.(18)(19) Při analýze SIH byl *o-108* použit jako vnitřní standard a naopak. Retenční čas SIH byl 11,6 min, *o-108* 14,3min. (18)(21)

Stabilita vybraných aroylhydrazonů (SIH, *o-108*, PIH) v plazmě a dalším biologickém materiálu byla studována *in vitro* za fyziologicky relevantní teploty. Bylo zjištěno, že SIH a *o-108* jsou relativně stabilní v PBS za fyziologického pH a teploty 37 °C, jejich původní koncentrace (100 μ M) po třech hodinách poklesla o méně než 5%. Naproti tomu podléhaly

rozkladu v králičí plazmě, kde jejich koncentrace poměrně rychle klesla. Vzorek SIH obsahoval po 240 min inkubace méně než 10% z původního množství, v případě *o-108* měl vzorek pouze 47% z původní hodnoty. Uvedené aroylhydrazonové chelátory byly v porovnání s plazmou stabilnější v ultrafiltrátu králičí plazmy (poločas SIH: 1,21hod, *o-108*: 4,99 hod. ultrafiltrát) a poločas SIH: 0,52 hod., *o-108*: 3,83 hod. pro plazmu. Následující poločasy rozkladu byly zjištěny pro roztok BSA a buněčné médium RPMI (poločas 3,59 hod. pro SIH a 6,54 hod. pro *o-108* v BSA; poločas 7,24 hod. pro SIH a 12,19 hod. pro *o-108* v RPMI). (18)

Během měření stability analytů v králičí plazmě byl objeven zajímavý fenomén. Rozklad SIH i *o-108* při koncentraci 10 μ M byl značně pomalejší než při koncentraci 100 μ M, přesný opak byl zaznamenán u PIH, což by mohlo být způsobeno vyšší lipofilitou SIH a *o-108* oproti PIH. Také různá vazba na proteiny by mohla vést k rozdílnému množství degradovaného chelátoru.(18)

V případě SIH byla studována stabilita v plazmě dalších živočišných druhů (prase, kráva) s cílem zjistit případnou mezidruhovou variabilitu. Ačkoliv byl rozklad látky v prasečí plazmě pomalejší, celkový pokles koncentrace byl významný v obou případech. Poločas v prasečí plazmě byl 1,47 hod., v hovězí 1,30 hod.(18)

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo modifikovat chromatografické podmínky dříve vyvinuté HPLC metody pro stanovení BSIH a SIH v králičí plazmě. Hlavním cílem byla snaha o zlepšení citlivosti metody, zkrácení doby analýzy pod 20 minut při zachování dostatečné separace BSIH, SIH a vnitřního standardu *o-108*, a zlepšení symetrie píků. Poté ověřit linearitu metody a metodu využít pro hodnocení stability BSIH a SIH v králičí plazmě *in vitro*.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a materiál

Boronyl salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (BSIH), Department of Chemistry, Duke University, Durham, USA – totožnost ověřena NMR

Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH), syntetizovaný na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK, Hradec Králové, Česká republika – totožnost ověřena NMR

Pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (o-108), syntetizovaný na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK, Hradec Králové, Česká republika – totožnost ověřena NMR

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Chemifarm s.r.o., Česká republika

Acetonitril gradient grade HPLC, Merck, Německo

Methanol gradient grade HPLC, Merck, Německo

Mravenčan amonný, Sigma-Aldrich, Velká Británie

Hydroxid sodný, Sigma-Aldrich, Velká Británie

Kyselina chlorovodíková, Sigma-Aldrich, Velká Británie

Dimethyl sulfoxid pro HPLC, Sigma-Aldrich, Velká Británie

Čištěná voda, připravena reverzní osmózou, FaF UK, Hradec Králové, Česká republika

Byly použity chemikálie analytické čistoty s výjimkou methanolu, acetonitrilu a DMSO.

Biologický materiál

- Králičí plasma, ZOO servis, Dvůr Králové, Česká republika
- Buněčné médium RPMI 1640, Sigma-Aldrich, Velká Británie

4.2 Pístroje

4.2.1 Chromatografický systém

- Chromatografická sestava LC 20A Prominence, skládající se ze dvou pump, degasseru, autosampleru, termostatového prostoru pro kolonu, komunikačního modulu a Diode Array detektor, Shimadzu, Německo
- LC Solution Software, verze 1.21 SP1, Shimadzu, Německo
- Předkolona Zorbax Bonus-RP 20 mm x 3 mm, částice 3,5 µm, Agilent Technologies, USA
- Chromatografická kolona Zorbax Bonus-RP, 150 mm x 3,0 mm, částice 3,5 µm, Agilent Technologies, USA
- Chromatografická kolona Discovery HS F5, 150 mm x 3,0 mm, částice 5 µm, Sigma-Aldrich, Velká Británie
- Chromatografická kolona Kinetex, 150 mm x 3,0 mm, částice 2,6 µm, Phenomenex, USA
- Chromatografická kolona Kinetex, 100 mm x 2,1 mm, částice 1,7 µm, Phenomenex, USA
- Chromatografická kolona Ascentis C18, 100 mm x 3,0 mm, částice 3 µm, Sigma-Aldrich, Velká Británie

4.2.2 Další přístroje

- Analytické váhy CPA225D-OCE, Sartorius AG, Německo
- Acidimetr CyberScan pH510, Eutech instruments, Singapur
- Centrifuga IEC CL31R Multispeed, Thermo electron corporation, USA
- Thermomixer comfort, Eppendorf, Německo
- Vortex mixer, VELP scientifica, Itálie
- Ultrazvuková lázeň K10, Kraitex, Slovenská republika

4.2.3 Pomůcky

- Laboratorní sklo
- Mikropipety, Eppendorf, Německo
- Nylonové filtry 0,45 μm , Sigma-Aldrich, Velká Británie

4.3 Vývoj chromatografických podmínek

4.3.1 Stacionární fáze

Jako stacionární fáze byly použity různé kolony, všechny termostatované na teplotu 25°C. Průtok mobilní fáze byl přizpůsobován jednotlivým kolonám od 0,1 ml/min po 0,3 ml/min.

Byly testovány následující stacionární fáze: Zorbax Bonus-RP, Discovery HS F5, Kinetex a Ascentis C18.

Nejvhodnější kolonou byla zvolena chromatografická kolona Zorbax Bonus-RP (150 mm x 3,0 mm, částice 3,5 μ m, Agilent) s předkolonou se stejnou náplní a s průtokem 0,3 ml/min. Nastříkovaný objem vzorku byl nastaven na 20 μ l, vlnová délka 297 nm.

Jako vnitřní standard byl vybrán chelátor *o*-108 (pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon).

4.3.2 Optimalizace složení mobilní fáze

Při optimalizaci složení mobilní fáze byly použity následující pufrы:

1. dihydrogen fosforečnan sodný (10 mM, pH 6, upraveno hydroxidem sodným zředěným RS)
2. dihydrogen fosforečnan sodný (10 mM, pH 4,1, upraveno kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS)
3. dihydrogen fosforečnan sodný (10 mM, pH 3,1, upraveno kyselinou chlorovodíkovou zředěnou RS)
4. dihydrogen fosforečnan sodný (20 mM, pH 6, upraveno hydroxidem sodným zředěným RS)
5. mravenčan amonný (10 mM, pH neupravováno)
6. mravenčan amonný (5 mM, pH neupravováno), jako zástupci vodné fáze.

Všechny pufrы byly filtrovány přes 0,45 μm filtr.

Jako organická složka byl použit methanol, acetonitril nebo jejich směsi v poměrech acetonitril/methanol (60:40, 40:60, 50:50, 45:55, 43:57, 35:65) (v/v).

Separace a délka analýzy byla testována při isokratické eluci v různých vzájemných poměrech vodné a organické složky od 35 % do 60 % objemového podílu organické fáze.

Konečné složení mobilní fáze:

Vodná složka: dihydrogen fosforečnan sodný (10 mM, pH 6,0, upraveno hydroxidem sodným zředěným RS) : organická složka: acetonitril : methanol (60:40 (v/v)), podíl vodné a organické složky 60:40 (v/v).

4.3.3 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze používané pro hodnocení linearity a studium stability:

Fosfátový pufr 10 mM byl připraven rozpuštěním navážky 0,30 g dihydrogenfosforečnanu sodného v čištěné vodě, doplněn do celkového objemu 250 ml, upraven na pH 6 postupným přidáváním hydroxidu sodného zředěného RS a následnou filtrací přes 0,45 μm filtr.

Mobilní fáze pro úpravu chromatografických podmínek:

Fosfátový pufr byl modifikován zvýšením jeho síly na 20 mM větší navážkou 0,60 g dihydrogenfosforečnanu sodného a 250 ml čištěné vody; dále pak úpravou pH na 3,1 a 4,1 pomocí kyseliny chlorovodíkové zředěné RS nebo hydroxidu sodného zředěného RS a s následnou filtrací přes 0,45 μm filtr.

Pufr mravenčanu amonného o koncentraci 10 mM a 5 mM byl připraven rozpuštěním navážky 0,063 g a 0,0315 g NH_4COOH v čištěné vodě a doplněn do objemu 100 ml, následovala filtrace přes 0,45 μm filtr. Hodnota pH nebyla neupravována.

4.3.4 Příprava zásobních roztoků a vzorků

Zásobní roztoky SIH i vnitřního standardu byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním příslušných substancí v methanolu, zásobní roztok BSIH o stejné koncentraci byl připraven rozpuštěním látky v DMSO.

Pro HPLC analýzu byly zásobní roztoky dále upravovány následujícím způsobem: K 20 μ l zásobního roztoku SIH, BSIH nebo IS bylo přidáno 980 μ l 50% methanolu, nebo 20 μ l zásobního roztoku jedné látky bylo ředěno 980 μ l 35% methanolu.

Vzorky plazmy používané při optimalizaci chromatografických podmínek byly připraveny následujícím způsobem: Ke 200 μ l prázdné králičí plazmy bylo přidáno 10 μ l zásobních roztoků jednotlivých látek, včetně IS, a poté byly vzorky precipitovány za použití 400 μ l methanolu. Vzorky byly důkladně protřepány na třepacím zařízení a centrifugovány 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl odebrán supernatant, který byl poté přímo nastříknut na kolonu.

Vzorky buněčného média (1:1) byly připraveny následovně: Ke 235 μ l buněčného média bylo přidáno 10 μ l zásobních roztoků jednotlivých látek, včetně IS, a poté byly vzorky zředěny za použití 235 μ l methanolu.

Vzorky buněčného média (1:9) byly připraveny následovně: K 85 μ l buněčného média bylo přidáno 10 μ l zásobních roztoků jednotlivých látek, včetně IS, a poté byly vzorky zředěny za použití 885 μ l methanolu.

4.4 Ověření linearity metody

Validační parametr linearita byl hodnocen pomocí šesti různě koncentrovaných kalibračních vzorků v rozmezí 10 až 100 μ M BSIH a SIH. Na kalibrační vzorky bylo použito 50 μ l čisté králičí plazmy, 0,8 μ l vnitřního standardu a odpovídající množství zásobních roztoků BSIH a SIH. Dále bylo přidáno 100 μ l methanolu, vše bylo důkladně protřepáno a centrifugováno 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Supernatant byl přímo nastříknut na kolonu a byla provedena analýza.

Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost poměru ploch píku analytu a vnitřního standardu na koncentraci analytu v plazmě. Výsledek byl vypočten pomocí regresní přímky metodou nejmenších čtverců.

4.5 Hodnocení stability BSIH a SIH v králičí plazmě *in vitro*

Do 800 μl čisté králičí plazmy bylo přidáno 19 μl zásobního roztoku SIH nebo 28 μl zásobního roztoku BSIH. Vzorke plazmy byly inkubovány v inkubátoru při 37°C za mírného protřepávání. V přesně definovaných časových intervalech (0, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540 a 600 min) bylo odebíráno 50 μl plazmy. Poté bylo ke vzorku přidáno 0,8 μl vnitřního standardu a 100 μl methanolu a vzorek byl dále upraven stejným způsobem jako v případě hodnocení linearity. Celý test by proveden pro obě látky čtyřikrát.

Stabilita BSIH a SIH v králičí plazmě *in vitro* byla vyjádřena grafem závislosti koncentrace na čase.

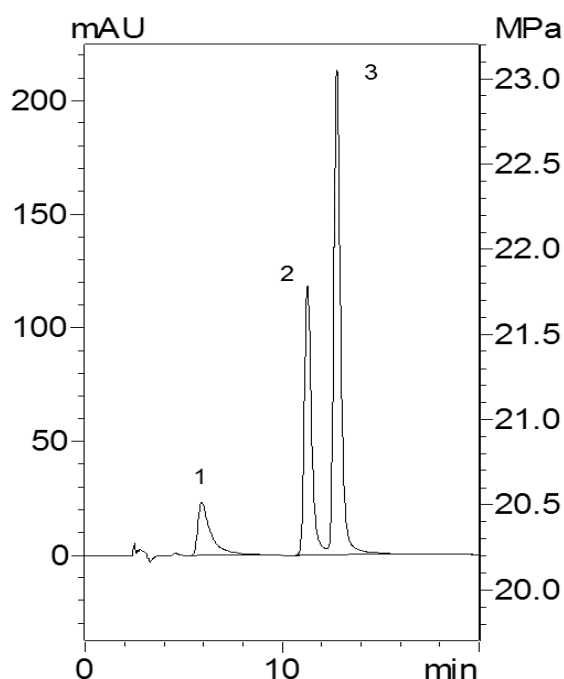
5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Úprava chromatografických podmínek pro HPLC analýzu BSIH a SIH

Při optimalizaci chromatografických podmínek pro HPLC analýzu BSIH a SIH, bylo vycházeno z vyvinutých a validovaných analytických metod pro stanovení chelátorů železa ze skupiny aroylhydrazonů v krevní plazmě a ze studií prováděných na katedře (Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, FaF v HK, UK v Praze) v předchozích letech.(22)

Cílem optimalizace bylo zvýšit citlivost detekce, zlepšit symetrii píků, při zachování dostatečné separace všech analytů a délky analýzy do 20 minut.

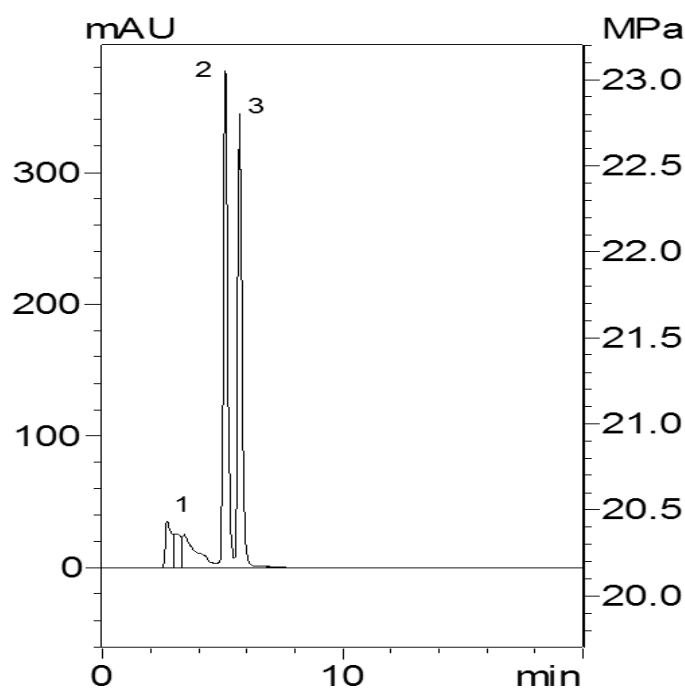
Na základě této metody (22) jsme nejdříve vyzkoušeli původní podmínky (chromatografická kolona Zorbax Bonus-RP (150 mm x 3,0 mm, částice 3,5 μm) s předkolonou Zorax Bonus-RP (20 mm x 3 mm, částice 3,5 μm); průtok 0,3 ml/min – fosfátový pufr (10 mM, pH 6) : acetonitril s methanolem (60:40) (v/v) v poměru 60:40 (v/v)), ze kterých bylo následně vycházeno. Analyty byly dobře separovány i v plazmě s hodnotami retenčních časů v minutách pro BSIH 5,9, IS 11,3 a SIH 12,8. (Obr. 6)



Obr. 6 Chromatogram BSIH a SIH na koloně Zorbax Bonus-RP.

BSIH – 1, $t_R = 5,9$ min; IS – 2, $t_R = 11,3$ min; SIH – 3, $t_R = 12,8$ min

První volbou nové kolony byla chromatografická kolona Discovery HS F5 (150 mm x 3,0 mm, částice 5 μm) s průtokem 0,3 ml/min. V mobilní fázi bylo oproti výchozím podmínkám pozměněno pH vodné složky z pH 6 na pH 4,1. Cílem změny byla snaha zlepšit tvar píku BSIH. Tato změna však vedla ke koeluci píků SIH a vnitřního standardu. Další snižování pH na 3,1 nevedlo ke zlepšení. Při změně organické složky za samotný methanol nedošlo vůbec k rozdělení jednotlivých analytů a byl prodloužen čas analýzy na 16,2 min. Použitím fosfátového pufru (20 mM, pH 6) v kombinaci methanolu s acetonitrilem (60:40) (v/v) v poměru 40:60 (v/v) se rozdělily všechny analyty (s retenčními časy v minutách BSIH : IS : SIH – 3,4 : 5,1 : 5,7), ale kvůli nesymetrickému píku BSIH byla zvolena jiná kolona. (Obr. 7)



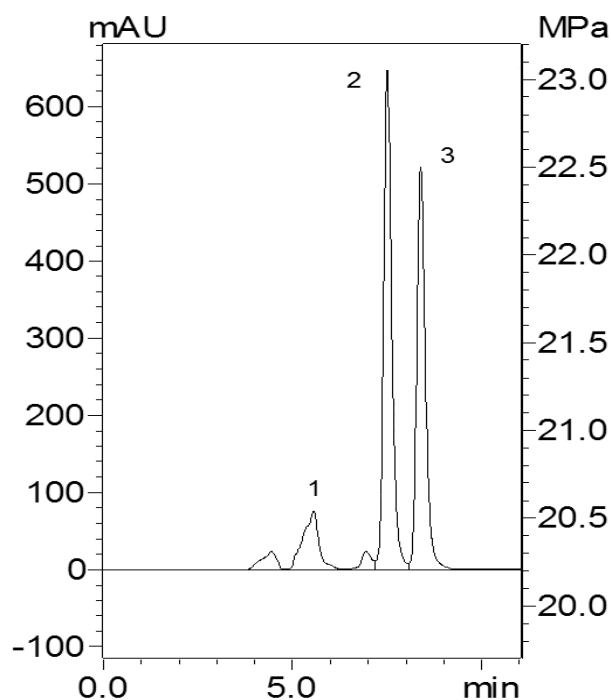
Obr. 7 Chromatogram BSIH a SIH na koloně Discovery HS F5.

BSIH – 1, $t_R = 3,4$ min; IS – 2, $t_R = 5,1$ min; SIH – 3, $t_R = 5,7$ min

Mobilní fáze: 20mM NaH_2PO_4 (pH6) : ACN/MeOH (60:40) (v/v) v poměru 40:60 (v/v)

Další volbou byla kolona Kinetex (150 mm x 3,0 mm, částice 2,6 μm); průtok 0,15 ml/min. Jako mobilní fáze byla zvolena kombinace fosfátového pufru (10 mM, pH 6) se samotným acetonitrilem v poměru vodné a organické složky 60:40 (v/v). Výsledkem bylo rozdělení BSIH, SIH i vnitřního standardu se zkrácením retenčního času, bohužel pík BSIH opět nebyl symetrický. (Obr. 8) Byla změněna organická složka mobilní fáze na

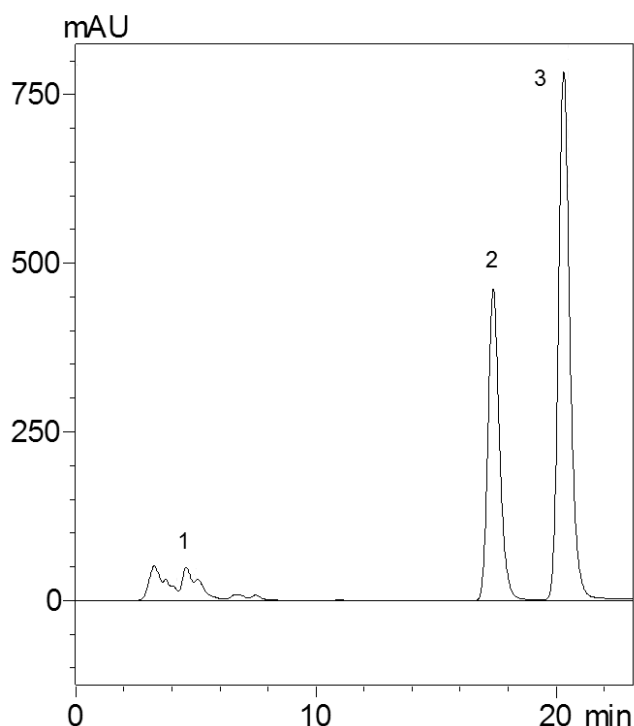
acetonitril s methanolem v poměru 60:40 (v/v) při zachování ostatních parametrů. Na chromatogramu však docházelo ke koeluci píků vnitřního standardu a SIH. Změnou průtoku z 0,15 ml/min na 0,1 ml/min a změnou poměru acetonitrilu s methanolem na 40:60 (v/v) bylo dosaženo rozdělení analytů avšak za cenu prodloužení délky analýzy na 34 minut.



Obr. 8 Chromatogram BSIH a SIH na koloně Kinetex (3x150mm).

BSIH – 1, $t_R = 3,4$ min; IS – 2, $t_R = 5,1$ min; SIH – 3, $t_R = 5,7$ min
 Mobilní fáze: 10 mM NaH_2PO_4 (pH6) : ACN v poměru 60:40 (v/v)

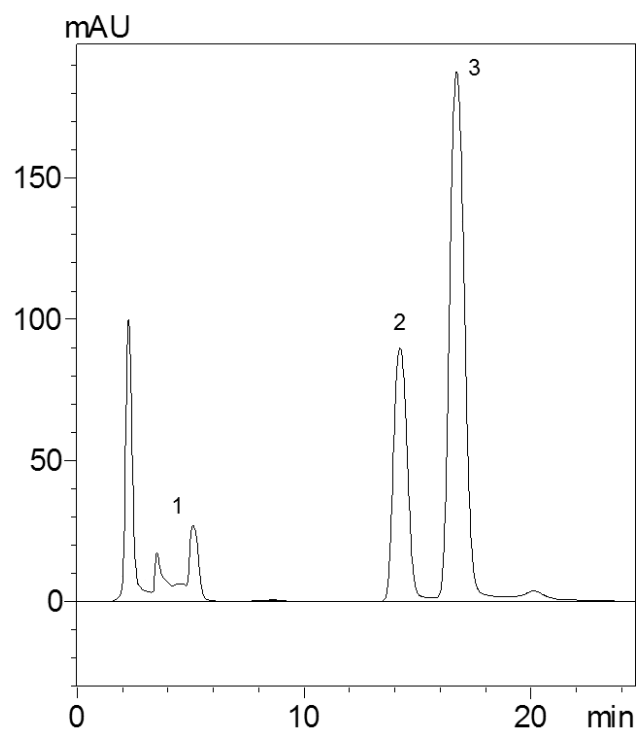
Na další analýzu byla použita chromatografická kolona Kinetex (100 mm x 2,1 mm, částice 1,7 μm); průtok 0,1 ml/min. Při použití podmínek jako u předcházející kolony jen s rozdílem podílu vodné a organické fáze 65:35 (v/v) nedošlo k separaci píků vnitřního standardu od SIH. Záměnou poměrů v organické složce acetonitril : methanol (40:60) (v/v) byly eluovány neostře oddělené píky a v retenčním čase do dvaceti minut. Poté byly měněny podíly acetonitrilu a methanolu, které však nezlepšily tvar výsledných píků. Nakonec byl fosfátový pufr zaměněn za pufr z mravenčanu amonného (5 mM), organická složka obsahovala acetonitril : methanol v poměru 45:55 (v/v). Výsledkem byly ostré píky jednotlivých analytů, avšak při nástřiku vzorku plazmy byl BSIH eluován spolu s balastními látkami z plazmy. (Obr. 9)



Obr. 9 Chromatogram BSIH a SIH v králičí plazmě na koloně Kinetex (2,1x100mm).

BSIH – 1, $t_R = 4,6$ min; IS – 2, $t_R = 17,4$ min; SIH – 3, $t_R = 20,3$ min
 Mobilní fáze: 5 mM HCOOH : ACN/MeOH (45:55) (v/v) v poměru 65:35 (v/v)

Analýza na v pořadí páté koloně (Ascentis C18, 100 mm x 3,0 mm, částice 3 μ m; průtok 0,3 ml/min) byla provedena při použití mobilní fáze složené z pufru z mravenčanu amonného (5 mM) a acetonitrilu s methanolem v poměru 60 : 40 (v/v), poměr vodné a organické složky 60 : 40 (v/v). Na chromatogramu byl pozorován velký pík v desáté minutě, patřící nerozdělenému vnitřnímu standardu a SIH. Záměnou acetonitrilu s methanolem za samotný methanol bylo docíleno separace, avšak za cenu délky analýzy kolem třiceti minut. Při změně složení organické složky mobilní fáze z kombinace acetonitrilu s methanolem v poměru 35 : 65 (v/v) se retenční časy posunuly pod hranici dvaceti minut. Píky SIH a vnitřního standardu byly i ve vzorku plazmy symetrické, bohužel pík BSIH byl ve vzorku plazmy znovu neostrý. (Obr. 10)



Obr. 10 Chromatogram BSIH a SIH v králičí plazmě na koloně Ascentis C18.

BSIH – 1, $t_R = 5,1$ min; IS – 2, $t_R = 14,2$ min; SIH – 3, $t_R = 16,7$ min
Mobilní fáze: 5 mM HCOOH: ACN/MeOH (35:65) (v/v) v poměru 60:40 (v/v)

Na základě výsledů těchto analýz jsme byli nuceni konstatovat, že ani jedna z testovaných kolon nedovolila významně zlepšit parametry separace, a proto jsme se vrátili k původní metodě.

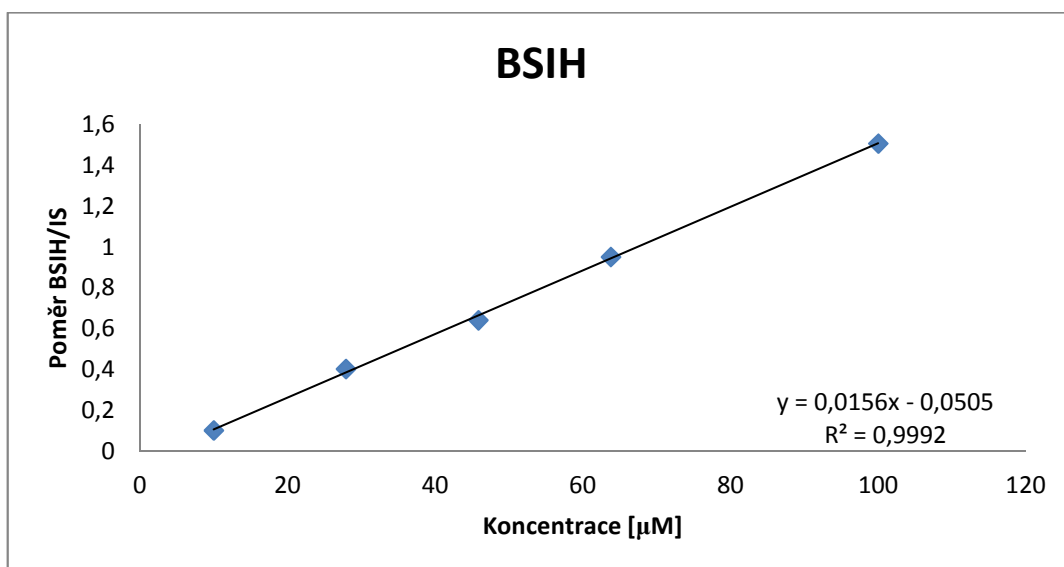
5.2 Ověření linearity

Metoda pro současné stanovení BSIH a SIH v králičí plazmě byla již validována v předchozí práci (22). Před jejím opětovným použitím pro potřeby stabilitní studie jsme ověřili linearitu odezvy.

Způsob úpravy vzorků plazmy byl určen na základě předchozí práce. (22) Byla zvolena precipitační deproteinace metanolem.

Linearita metody byla ověřena u BSIH a SIH v plazmě v rozsahu koncentrací 10 μM až 100 μM . Po sestrojení grafu závislosti poměru ploch píků BSIH k vnitřnímu standardu na koncentraci byla získána regresní přímka s rovnicí $y = 0,0156x - 0,0505$ a koeficientem determinace $R^2 = 0,9992$. (Obr. 11)

Při hodnocení bioanalytických metod podle doporučení FDA je rozhodující stanovení odchylek hodnot koncentrace odečtených z kalibrační přímky od hodnot teoretických.(12) Číselné hodnoty koncentrací BSIH teoretických a odečtených z kalibrační křivky jsou uvedeny v následující tabulce. (Tab. 1) Jelikož pět ze šesti kalibračních vzorků splňuje požadované podmínky (maximální odchylka 15%, resp. 20% na dolním limitu kvantifikace), lze kalibrační přímku použít pro kvantifikaci analytu a metodu považovat za lineární.

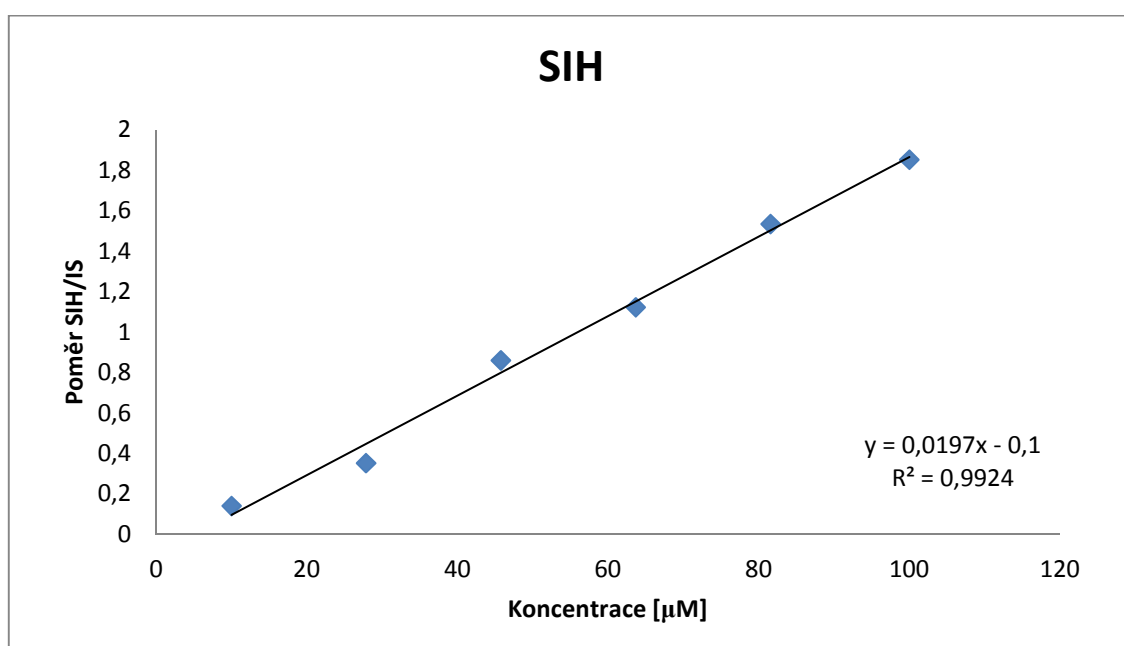


Obr. 11 Kalibrační křivka pro stanovení BSIH v králičí plazmě.

Tab. 1 Přehled koncentrací BSIH odečtených z kalibrační křivky, procenta teoretické koncentrace.

Koncentrace BSIH [μM]		%
teoretická	odečtená	
100	99,909	99,91
81,72	145,67	178,26
63,78	64,229	100,70
45,84	44,346	96,74
27,9	29,030	104,05
10	9,711	97,11

Při určování linearitu SIH bylo změřeno rozmezí koncentrací od 10 μM až 100 μM . Z grafu sestrojeného podobně jako u BSIH byla získána rovnice přímky SIH $y = 0,0197x - 0,10$ s koeficientem determinace $R^2 = 0,9924$. (Obr. 12) Číselné hodnoty koncentrací SIH teoretických a odečtených z kalibrační křivky jsou uvedeny v následující tabulce. (Tab. 2)

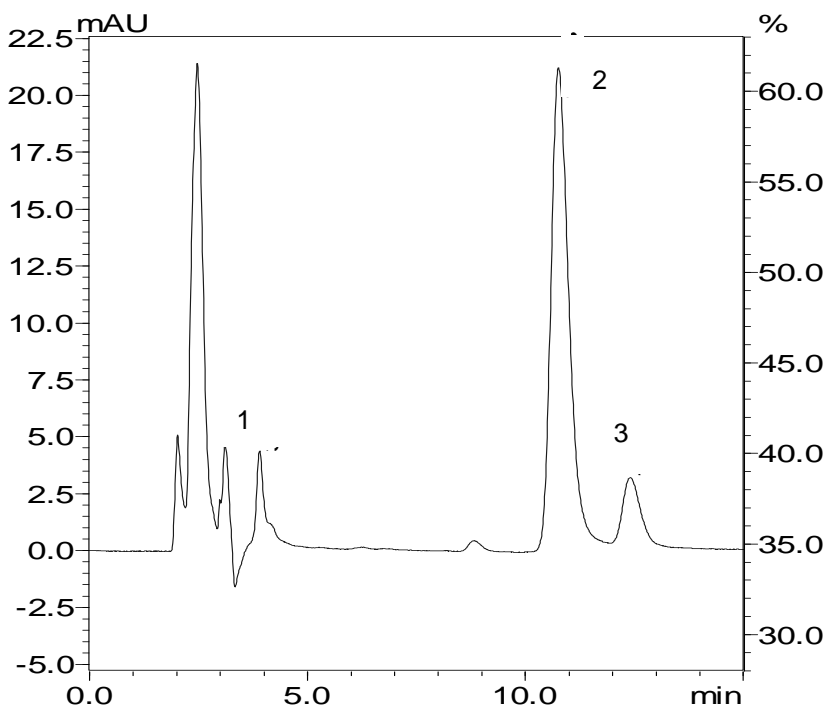


Obr. 12 Kalibrační křivka pro stanovení SIH v králičí plazmě.

Tab. 2 Přehled koncentrací SIH odečtených z kalibrační křivky, procenta teoretické koncentrace.

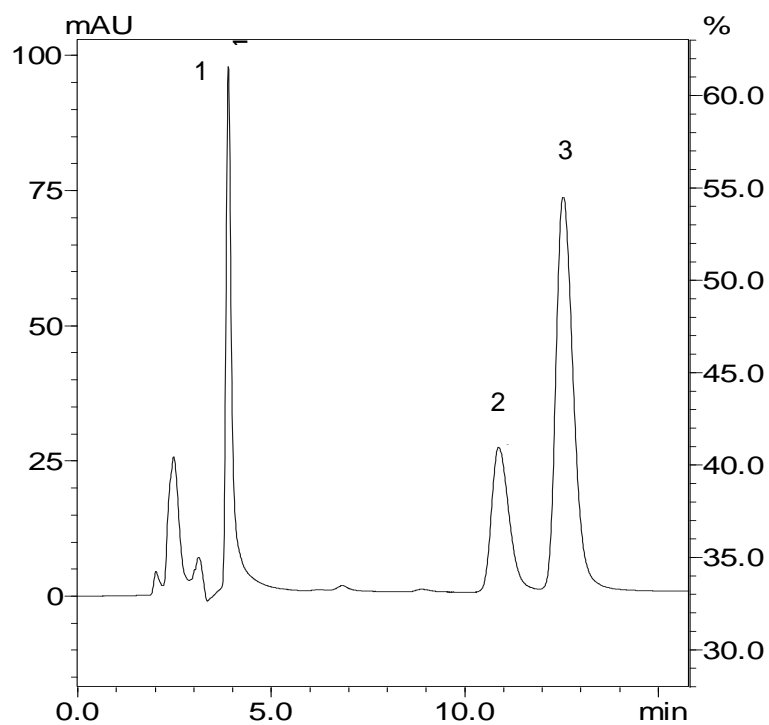
Koncentrace SIH [μM]		%
teoretická	odečtená	
100,00	99,16	99,16
81,58	83,02	101,78
63,67	62,12	97,57
45,76	48,79	106,61
27,86	22,98	82,50
10,00	12,25	122,45

Na následujících chromatogramech je záznam separace BSIH, SIH a IS při koncentracích 10 μM a 100 μM pro SIH a BSIH a 100 μM pro IS (Obr. 13, Obr. 14). Záznam blanku použité čisté králičí plazmy je demonstrován na Obr. 15.



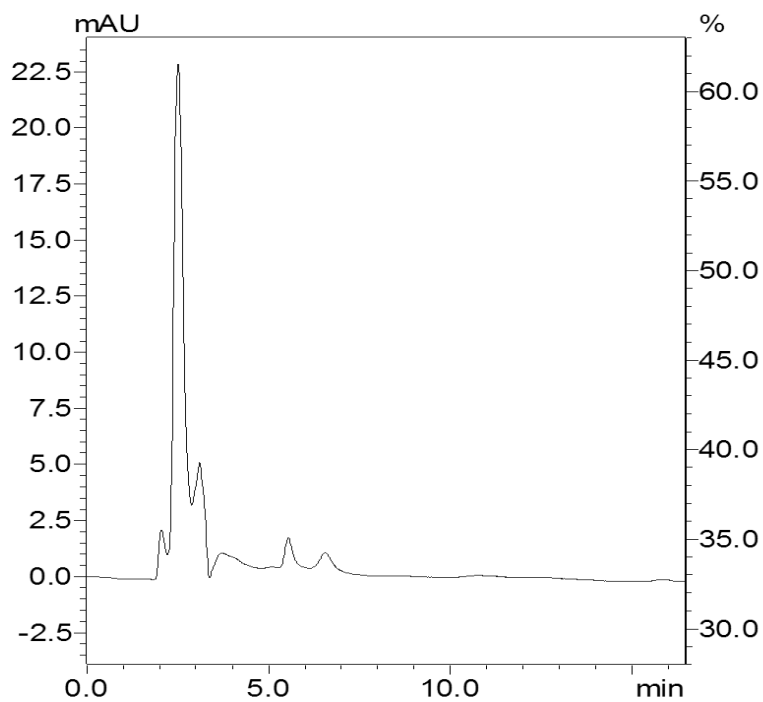
Obr. 13 Chromatogram BSIH a SIH při koncentraci 10 μM , IS 100 μM .

BSIH – 1, $t_R = 3,9$ min; IS – 2, $t_R = 10,8$ min; SIH – 3, $t_R = 12,4$ min



Obr. 14 Chromatogram separace BSIH a SIH při koncentraci 100 μ M, IS 100 μ M.

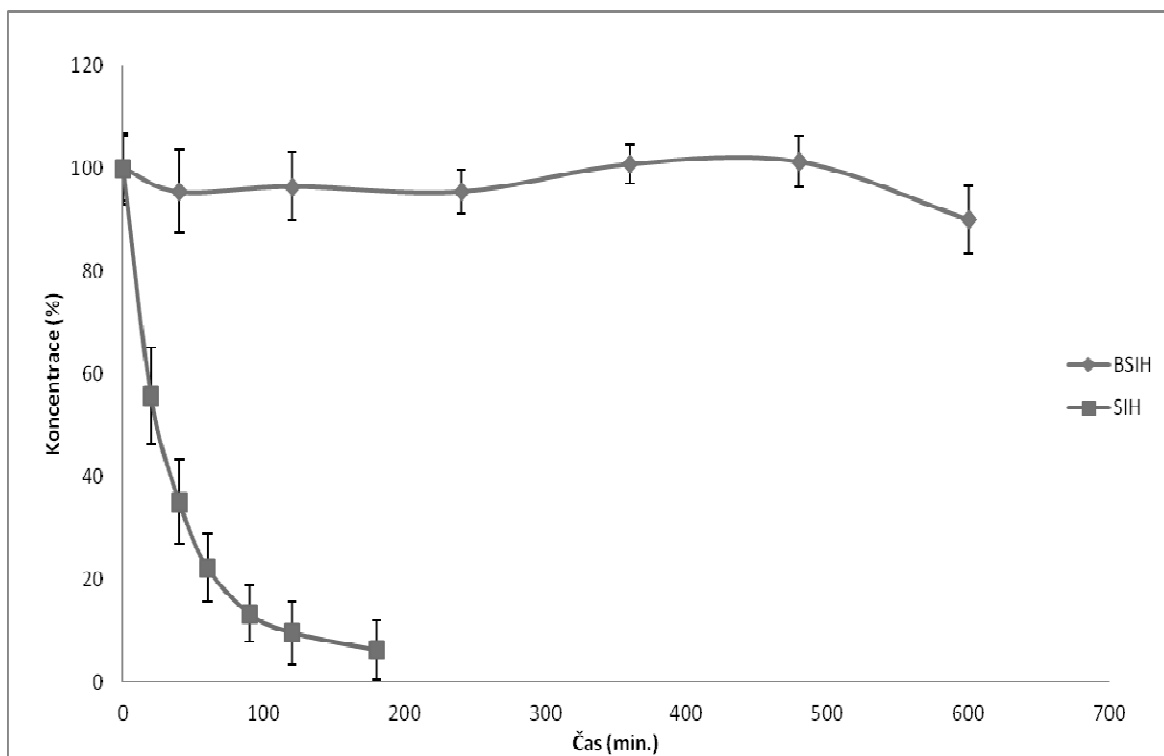
BSIH – 1, $t_R = 3,9$ min; IS – 2, $t_R = 10,9$ min; SIH – 3, $t_R = 12,5$ min



Obr. 15 Chromatografický záznam analýzy prázdné králičí plazmy

5.3 Stabilita BSIH a SIH v králičí plazmě *in vitro*

V dříve provedených studiích byla hodnocena stabilita vybraných chelátorů v čisté plazmě při 37°C *in vitro* po dobu deseti hodin.(22) Chromatografické podmínky byly totožné jako u linearity. Hodnocená koncentrace byla 100µM SIH a BSIH. Na následujícím grafu (Obr. 16) byl patrný pokles koncentrace v závislosti na čase u SIH, zatímco jeho derivát BSIH byl během experimentu poměrně stabilní. Průměrné číselné hodnoty koncentrací SIH a BSIH v čase je uveden v následujících tabulkách, RSD vyjadřuje relativní směrodatnou odchylku naměřených koncentrací. (Tab. 3, Tab. 4). Chromatografické záznamy na začátku a na konci prováděné zkoušky jsou uvedeny na Obr. 17, Obr. 18, Obr. 19 a Obr. 20.



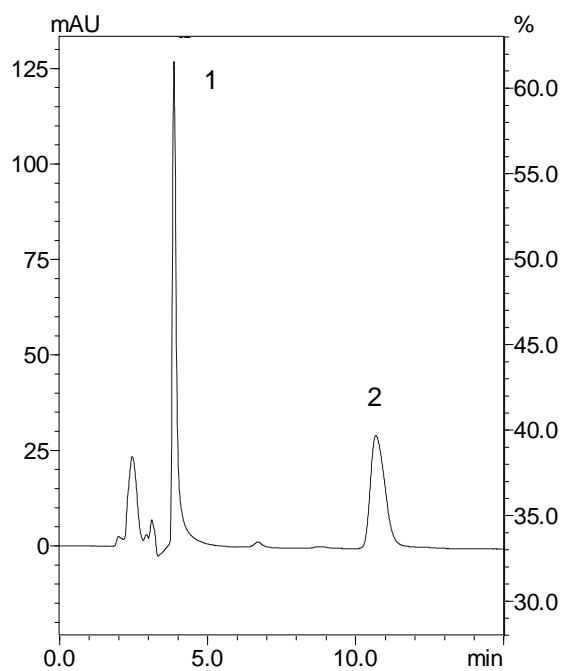
Obr. 16 Závislost koncentrace BSIH a SIH na čase v čisté králičí plazmě při inkubaci 37°C *in vitro*.

Tab. 3 Stabilita BSIH v králičí plazmě *in vitro*.

ČAS (min)	Průměrná koncentrace (n=4) (%)	RSD (c) (%)
0	100,00	6,99
20	93,90	8,15
40	95,37	6,64
60	87,96	4,27
90	91,46	3,84
120	96,39	4,94
180	87,01	6,59
240	95,40	6,70
300	91,94	7,94
360	100,76	7,67
420	95,34	6,97
480	101,22	6,88
540	98,80	3,63
600	89,99	6,90

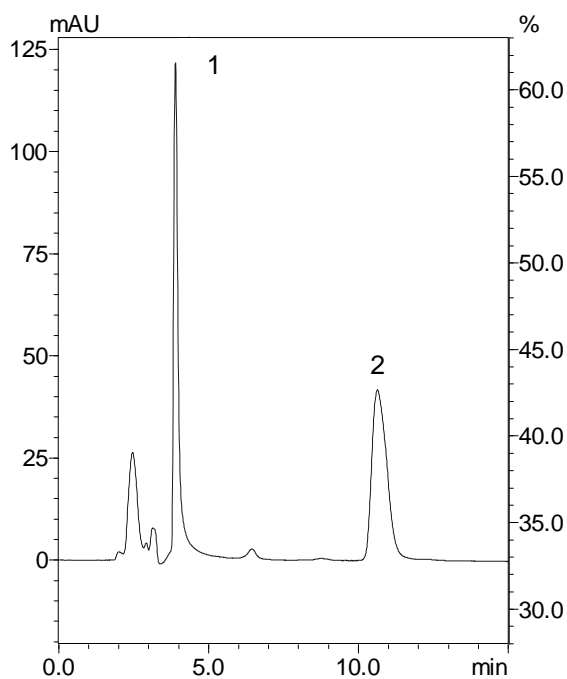
Tab. 4 Stabilita SIH v králičí plazmě *in vitro*.

Čas (min.)	Průměrná koncentrace (n=4) (%)	RSD (c) (%)
0	100,00	6,50
20	55,61	9,35
40	35,03	8,22
60	22,24	6,59
90	13,24	5,59
120	9,52	6,11
180	6,10	5,82



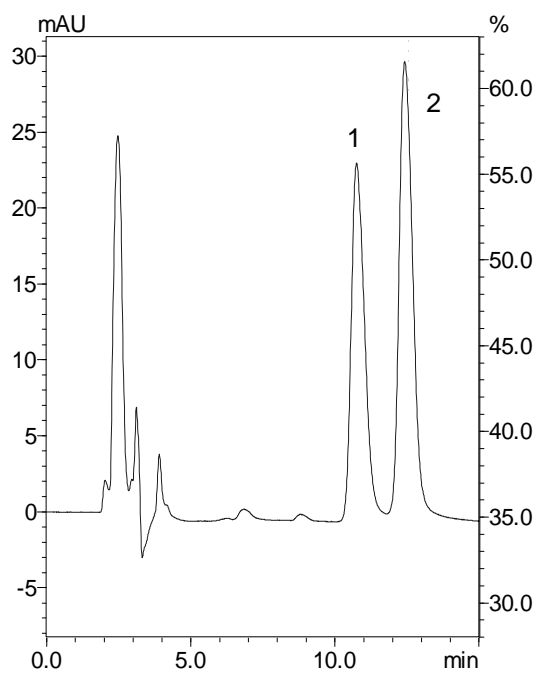
Obr. 17 Chromatografický záznam vzorku stabilitní studie s BSIH (čas 0 min.)

BSIH – 1, $t_R = 3,9$ min; IS – 2, $t_R = 10,7$ min



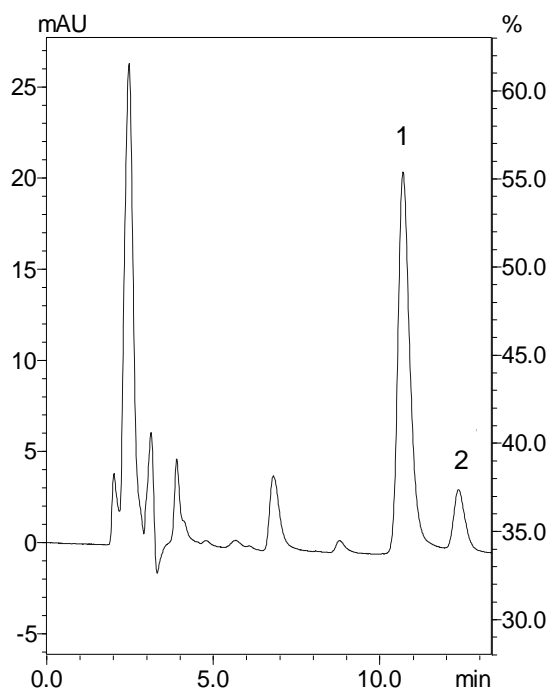
Obr. 18 Chromatografický záznam vzorku stabilitní studie BSIH (čas 600 min.)

BSIH – 1, $t_R = 3,9$ min; IS – 2, $t_R = 10,6$ min



Obr. 19 Chromatografický záznam vzorku stabilitní studie SIH (čas 0 min.)

IS – 1, $t_R = 10,7$ min; SIH – 2, $t_R = 12,4$ min



Obr. 20 Chromatografický záznam vzorku stabilitní studie SIH (čas 180 min.)

IS – 1, $t_R = 10,7$ min; SIH – 2, $t_R = 12,4$ min

Na Obr. 16 je patrný rychlý pokles koncentrace chelátoru SIH, jeho množství v plazmě po hodinové inkubaci kleslo na méně než 35% z původní hodnoty, zatímco plazma s BSIH obsahovala ve stejnou dobu kolem 90% původní látky. Na konci studie stability byla koncentrace SIH pod 10%, u BSIH se pohybovala stále kolem 90%. Z uvedeného rozboru vyplývá vyšší stabilita BSIH v plazmě *in vitro* než je tomu u SIH.

Tento pokles koncentrace SIH je způsoben hydrolytickým štěpením hydrazonové vazby v plazmě, vzniklými rozkladnými produkty jsou isoniazid a salicylaldehyd. Zvýšená stabilita BSIH je pravděpodobně získána sterickým stíněním karbonylového uhlíku pomocí ochranné skupiny fenolového kyslíku (4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-ol).(14)

Díky zlepšené stabilitě BSIH v plazmě by mohla být umožněna aplikace v delších časových intervalech a nižších dávkách. Také díky jeho nízké toxicitě při opakovaném podávání se zdá být tento prochelátor slibným kandidátem pro ochranu tkání před oxidačním stresem.

6 ZÁVĚR

V diplomové práci jsou popsány možné modifikace chromatografických podmínek, které byly již dříve vyvinuty pro stanovení BSIH a SIH v králičí plazmě. Tyto úpravy však nevedly k významnému zvýšení citlivosti, zlepšení symetrie píků nebo zkrácení metody. Proto byla pro hodnocení stability BSIH a SIH v králičí plazmě v další práci využívána původní metoda.

Separace byla provedena na koloně s reverzní fází, která má polární amidovou skupinu zakotvenou v dlouhém alkylovém řetězci (Zorbax bonus – RP). Mobilní fáze byla složena ze směsi fosfátového pufru (10mM, pH6) a acetonitrilu s methanolem (60:40) (v/v) v poměru 60:40 (v/v). Odezva detektoru byla zaznamenána při vlnové délce 297 nm.

Pro úpravu vzorků plazmy před HPLC analýzou byla použita precipitační deproteinace methanolem. Před použitím pro hodnocení stability SIH a BSIH v plazmě byla ověřena linearita metody v rozmezí 10 – 100 μ M pro oba analyty.

Studie stability BSIH a SIH v králičí plazmě *in vitro* prokázala, že je BSIH v plazmě významně stabilnější v porovnání se SIH.

ABSTRAKT

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi progresivní analytické metody používané pro kvalitativní i kvantitativní analýzu léčiv.

Tato práce popisuje různé možnosti upravení chromatografické metody pro stanovení BSIH ([2-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzyliden]-hydrazid kyseliny isonikotinové) a SIH (salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon) v králičí plazmě. BSIH se řadí mezi prochelátory, které se selektivně aktivují v přítomnosti peroxidu vodíku na chelátor železa SIH. Výhodou BSIH je vyšší stabilita v plazmě a nízká toxicita i při opakovaném podání.

Separace BSIH, SIH a vnitřního standardu (o-108) byla zkoušena na několika kolonách za různých chromatografických podmínek. Žádná z vyzkoušených modifikací však nebyla vhodnější než ta, ze které se vycházelo. Analýza probíhala na chromatografické koloně Zorbax Bonus-RP (150 mm x 3,0 mm, částice 3,5 μm ,) s předkolonou se stejným sorbentem; průtok 0,3 ml/min. Jako mobilní fáze sloužil fosfátový pufr (10mM dihydrogenfosforečnan sodný, pH6, upraveno hydroxidem sodným) : acetonitril s methanolem (60:40) (v/v) v poměru 60:40 (v/v). Odezva detektoru byla zaznamenána při vlnové délce 297 nm. Byla ověřena linearita metody v rozmezí koncentrací od 10 μM do 100 μM pro BSIH a SIH.

Stabilita BSIH a SIH v králičí plazmě byla sledována během desetihodinové inkubace při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby bylo naměřeno u SIH pod 10 % z původní koncentrace, hodnoty u BSIH se pohybovaly kolem 90 % z původní koncentrace. Z těchto výsledků vyplývá, že je BSIH v plazmě významně stabilnější v porovnání se SIH.

ABSTRACT

High-performance liquid chromatography (HPLC) is a progressive analytical method used for qualitative and quantitative drug analysis.

This work describes various modifications of the chromatographic method for determining of BSIH (isonicotinic acid [2-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzylidene]-hydrazide) and SIH (salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone) in rabbit plasma. BSIH belongs to prochelators which convert to iron chelator SIH in the presence of hydrogen peroxide. Increased stability in plasma and lower toxicity even during repetitive administration is the advantage of BSIH.

Separation of BSIH, SIH and internal standard (o-108) was tested on various stationary phases using different chromatographic conditions. However, none of them provided better results than the initial one. The analysis was performed on chromatographic column Zorbax Bonus-RP (150 mm x 3,0 mm, particle size 3,5 μm ,) with guard column using identical sorbent at a flow rate of 0,3 ml/min. Phosphate buffer (10 mM monosodium phosphate, pH6, adjusted with sodium hydroxide) : acetonitrile with methanol (60:40) (v/v) with the ratio of 60:40 (v/v)) as the mobile phase. Detector response was registered at 297 nm. Linearity of the method was verified in the concentration range of 10 μM to 100 μM for both BSIH and SIH.

Stability of BSIH and SIH in rabbit plasma was tested during 10-hour incubation period at a temperature of 37 °C. Less than 10 % of the original concentration of SIH was determined after this period, whereas BSIH values fluctuated around 90 % of the original concentration. These results imply that BSIH is significantly more stable in plasma compared to SIH.

LITERATURA

1. **Klimeš, J. a kol.** *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, 1. vydání, 268 s.* Hradec Králové : Nucleus HK, 2011.
2. **Zachariou, M. a Bailon, P.** *Affinity chromatography: methods and protocols, 2. vydání, 343 s.* London : Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, 2008.
3. **Kazakevich, Y.V. a LoBrutto, R.** *HPLC for Pharmaceutical Scientists, 2. vydání.* New York : John Wiley & Sons, Inc., 2007.
4. **Snyder, L.R., Kirkland, J.J. a Dolan, J.W.** *Introduction To Modern Liquid Chromatography, 3. vydání.* New Jersey : A John Wiley & Sons, Inc., 2010.
5. **Douša, M.** <http://www.hplc.cz>. [Online] Creative Commons 3,0 Česko, 11 2012.
6. **Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.** <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>. [Online] 11. 2012.
7. **Snyder, L.R. a Kirkland, J.J.** *Practical HPLC method development, 2. vydání.* New York : John Wiley & Sons, Inc., 1997.
8. **Beesley, T.E., Buglio, B. a Wcott, R.P.W.** *Quantitative Chromatographic Analysis, 378 s.* New York : CRC Press, Marcel Dekker, 2001.
9. **Xu, Q.A. a Madden, T.L.** *LC-MS in drug bioanalysis.* New York : Springer, 2012.
10. **Babjuk, J., Perlík, F. a Šídlo, Z.** *Bioanalytika léků, 1. vydání, 272 s.* Praha : Avicenum, 1990.
11. **Chromý, V., a další.** *Bioanalytika, Analytická chemie v laboratorní medicíně, 1. vydání, 267 s.* Brno : Masarykova univerzita v Brně, 2002.
12. **FDA.** *Guidance for industry, Bioanalytical Method Validation,* May : FDA, 2001.
13. **Hrušková, K., a další.** *Chemical Research in Toxicology, 290-302.* 2011, 24.
14. **Charkoudian, L.K., a další.** *Journal of Inorganic Biochemistry, 2130-2135.* 2008, 102.

15. **Lüllmann, H., Mohr, K. a Wehling, M.** *Farmakologie a toxikologie*, 15. vydání. Praha : Grada, 2004.
16. **Marek, J. a kol.** *Farmakoterapie vnitřních nemocí*, 4. vydání. Praha : Grada, 2010.
17. **Vokurka, M, Hugo, J. a kol.** *Velký lékařský slovník*, 8. vydání, 1144 s. - : Maxdorf, 2008.
18. **Kovaříková, P., Mrkvičková, Z. a Klimeš, J.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 360-370. 2008, 47.
19. **Kovaříková, P., a další.** *Journal of Separation Science*, 1300-1306. 2005, 28.
20. **Charkoudian, L.K., Pham, D.M. a Franz, K.J.** *Journal of the American Chemical Society*, 12424 - 12425. 2006, 128.
21. **Kovaříková, P., a další.** *Journal of chromatography B*, 838 (2006), 107-112. 2006.
22. **Bureš, J.** *Diplomová práce, Vývoj analytické metody pro hodnocení proléčiva - boronyl salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu v biologickém materiálu.* Hradec Králové : -, 2012.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1	Strukturní vzorec PIH.....	28
Obr. 2	Strukturní vzorec SIH.....	29
Obr. 3	3D zobrazení komplexu Fe(SIH) ₂	29
Obr. 4	Hydrolýza SIH.....	30
Obr. 5	Mechanismus účinku prochelátoru BSIH.....	31
Obr. 6	Chromatogram BSIH a SIH na koloně Zorbax Bonus-RP.....	44
Obr. 7	Chromatogram BSIH a SIH na koloně Discovery HS F5.....	45
Obr. 8	Chromatogram BSIH a SIH na koloně Kinetex (3x150mm).....	46
Obr. 9	Chromatogram BSIH a SIH v králičí plazmě na koloně Kinetex (2,1x100mm).....	47
Obr. 10	Chromatogram BSIH a SIH v králičí plazmě na koloně Ascentis C18.....	48
Obr. 11	Kalibrační křivka pro stanovení BSIH v králičí plazmě.....	49
Obr. 12	Kalibrační křivka pro stanovení SIH v králičí plazmě.....	50
Obr. 13	Chromatogram BSIH a SIH při koncentraci 10 μM, IS 100 μM.....	51
Obr. 14	Chromatogram separace BSIH a SIH při koncentraci 100 μM, IS 100 μM.....	52
Obr. 15	Chromatografický záznam analýzy prázdné králičí plazmy.....	52
Obr. 16	Závislost koncentrace BSIH a SIH na čase v čisté králičí plazmě při inkubaci 37°C <i>in vitro</i>	53
Obr. 17	Chromatografický záznam vzorku stabilitní studie s BSIH (čas 0 min.).....	55
Obr. 18	Chromatografický záznam vzorku stabilitní studie BSIH (čas 600 min.).....	55
Obr. 19	Chromatografický záznam vzorku stabilitní studie SIH (čas 0 min.).....	56
Obr. 20	Chromatografický záznam vzorku stabilitní studie SIH (čas 180 min.).....	56

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Přehled koncentrací BSIH odečtených z kalibrační křivky, procenta teoretické koncentrace.....	50
Tab. 2 Přehled koncentrací SIH odečtených z kalibrační křivky, procenta teoretické koncentrace.....	51
Tab. 3 Stabilita BSIH v králičí plazmě <i>in vitro</i>	54
Tab. 4 Stabilita SIH v králičí plazmě <i>in vitro</i>	54