

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



**Hodnocení stability nových aroylhydrazonových chelátorů  
železa v biologickém materiálu II.**

Diplomová práce

Hradec Králové 2014

Zdeněk Pečinka

**„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“**

.....

Zdeněk Pečinka

Zde bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce Doc.PharmDr. Petře Kovaříkové, Ph.D. za pomoc a odborné rady při vypracování diplomové práce. Práce byla vypracována na podpory SVV 260 062.

## Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Teoretická část .....</b>	<b>6</b>
2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	8
2.2.1 Význam a využití HPLC.....	8
2.2.2 Součásti HPLC.....	9
<b>2.3 Validace.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Úprava biologických vzorků před HPLC analýzou.....</b>	<b>21</b>
2.4.1. Deproteinace .....	21
2.4.2. Extrakce na pevných fázích (Solid phase extraction-SPE).....	22
2.4.3 Extrakce kapalina – kapalina ( Liquid – Liquid Extraction) .....	23
<b>2.5. Chelátory železa .....</b>	<b>25</b>
2.5.1. Železo v lidském těle .....	25
2.5.2. Využití chelátorů železa.....	26
2.5.3. Aroylhydrazony .....	27
2.5.3.1.Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH).....	28
2.5.4. Nová analoga SIH.....	29
2.5.4.1. <i>N'</i> - [1-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-8-yl)ethyliden]isonikotinoylhydrazid.....	29
(AHC-INH) .....	29
2.5.4.2. <i>N'</i> – [1-(2,6-dihydroxyfenyl)ethyliden]isonikotinoylhydrazid.....	30
(2,6 DHAF-INH) .....	30
<b>3. Cíl diplomové práce .....</b>	<b>31</b>
<b>4. Experimentální část .....</b>	<b>32</b>
4.1 Chemikálie a materiál .....	32
4.2 Přístroje.....	32
4.3 Příprava standardních roztoků .....	33
4.4. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení stability AHC-INH a 2,6DHAF-INH .....	34
4.5. Úprava vzorku plazmy před HPLC analýzou .....	35
4.6. Validace metod .....	36
4.7. Stabilita AHC- INH a 2,6 DHAF v králičí plazmě.....	37
<b>5. Výsledky a diskuse .....</b>	<b>38</b>

5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro metodu hodnocení .....	38
stability AHC-INH a 2,6DHAF v králičí plazmě <i>in vitro</i> .....	38
5.1.1. Stacionární fáze pro analýzu AHC-INH a 2,6DHAF-INH.....	38
5.1.2. Optimalizace složení mobilní fáze pro AHC-INH .....	38
5.1.3. Optimalizace složení mobilní fáze pro 2,6DHAF-INH .....	40
5.2 Validace metody .....	41
5.2.1. Validace metody pro analýzu AHC-INH.....	41
5.2.2. Validace metody pro analýzu 2,6 DHAF-INH .....	46
5.3 Stabilita v plazmě.....	51
<b>6. Závěr .....</b>	<b>57</b>
<b>7. Abstrakt .....</b>	<b>58</b>
<b>8. Abstract.....</b>	<b>59</b>
<b>9. Seznam použité literatury: .....</b>	<b>60</b>

# 1. Úvod

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je vysoce účinná separační metoda, která je schopna vykonávat současně kvantitativní i kvalitativní analýzu léčiv. Uplatnění nachází mimo jiné také v oblasti hodnocení stability léčiv v biologických matricích, kde je možno po vhodné úpravě vzorku hodnotit jak úbytek zkoumaného léčiva, tak i vznikající rozkladné produkty.

Oxidační stres se v lidském těle podílí na vzniku řady kardiovaskulárních, neurodegenerativních a nádorových onemocnění. Reaktivní formy kyslíku (ROS), které způsobují oxidační stres v tkáních, mohou být vytvářeny i prostřednictvím Fentonovy reakce, jejímž katalyzátorem jsou železnaté ionty. Jednou z možností omezení vzniku ROS je proto selektivní chelatce volných iontů železa v organismu.

Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) je chelátor patřící do skupiny aromatických hydrazonů. Vyznačuje se dobrým průnikem do tkání, nízkou toxicitou a selektivitou k volným iontům železa. Avšak jeho hlavním limitujícím faktorem je krátký biologický poločas, způsobený zejména hydrolýzou jeho hydrazonové vazby v plazmě. Proto se další výzkum zaměřuje na cílené obměny struktury SIH, s cílem nasyntetizovat chelátory s lepšími farmakokinetickými vlastnostmi a tak i s lepší perspektivou pro využití v klinické praxi.

Tato práce se zabývá vývojem a částečnou validací HPLC metody pro hodnocení stability, a tak i vlastním provedením stabilitní studie, u dvou nových potencionálních chelátorů *N'*-[1-(2,6-dihydroxyfenyl)ethyliden]isonikotinoylhydrazid (2,6 DHAF-INH) a *N'*-[1-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-8-yl)ethyliden]isonikotinoylhydrazid (AHC-INH).

## 2. Teoretická část

### 2.1. Princip a rozdělení chromatografických metod

Chromatografie je vysoce účinná separační metoda, která nachází stále širší uplatnění v oblastech kvalitativní i kvantitativní analýzy.

Chromatografické metody mají za úkol oddělit od sebe jednotlivé složky obsažené ve vzorku zpravidla za využití dvou nemísitelných fází. Nepohyblivá fáze se označuje jako stacionární fáze a pohyblivá fáze jako mobilní. Analyzovaný vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze je unášen kolem stacionární fáze. Jednotlivé složky analyzovaného vzorku se rozdílou silou zachycují na stacionární fázi a tím se od sebe oddělují. Složky poutající se silněji, zůstávají ve styku se stacionární fází déle, než ty slabě vázané [1][4].

#### **Chromatografii můžeme rozdělit podle mnoha hledisek:**

Podle převládajícího mechanismu separace:

- *Rozdělovací chromatografie* – separace je dosaženo rozdílnou rozpustností jednotlivých složek vzorku ve stacionární fázi a mobilní fázi, které se vzájemně nemísí. Stacionární fází je kapalina, která je zachycená v tenké vrstvě na inertním nosiči (silikagel, křemelina, celulóza, škrob). V případě, že je mobilní fází kapalina, dochází k opakovanému rozdělování (extrakci) dělené směsi mezi obě kapalnou fáze, či v případě plynné mobilní fáze, mezi kapalinu a plyn [1][2][3].
- *Adsorpční chromatografie* – látky jsou unášeny v mobilní fázi a jsou rozdělovány vlivem rozdílné adsorpce na povrch adsorbentu. Skupenství separovaných látek může být plynné nebo kapalnou. Mezi používané adsorbenty patří oxid hlinitý, silikagel, polyamidy, aktivní uhlí či oxid hořečnatý. Mobilní fáze se skládá nejčastěji z čistých rozpouštědel, jejich směsí, či z tzv. eluotropní řady rozpouštědel, které jsou uspořádány podle vzrůstající polarity [1][2].

- *Iontově-výměnná chromatografie* – k separaci dochází na základě rozdílné interakce analyzovaných iontů dělené směsi, které jsou rozpuštěny v kapalně, mobilní fázi, s iontovýměnnými skupinami iontoměničů (katexy či anexy) ve stacionární fázi [1][4].
- *Gelová chromatografie* – tato metoda umožňuje rozdělení analyzovaných látek podle velikosti jejich molekul. Stacionární fázi tvoří nabobtnalý gel, kterým je naplněna kolona, což vytváří různě velké póry, ve kterých jsou následně zadržovány separované molekuly. Molekuly větší než průměr pórů procházejí kolonou bez zdržení, zatímco malé molekuly difundují do všech pórů, což prodlužuje čas jejich eluce [2][3].
- *Afinní chromatografie* – je druh chromatografie, která se používá k izolaci biologicky aktivních látek (enzymů, protilátek), kde využívá jejich schopnosti specificky a vratně vázat jiné látky [44].

#### Podle skupenství mobilní fáze

- *Kapalinová chromatografie* (Liquid Chromatography – LC) – mobilní fáze je v kapalném skupenství
- *Plynová chromatografie* (Gas Chromatography – GC) – mobilní fáze je v plynném skupenství [4]

#### Podle uspořádání stacionární fáze

- *Kolonová chromatografie* – stacionární fáze je zabudovaná do trubice (kolony)
- *Plošné uspořádání:*
  - *Papírová chromatografie* (Paper Chromatography – PC) – stacionární fáze je tvořena chromatografickým papírem
  - *Tenkovrstvá chromatografie* (Thin Layer Chromatography – TLC) – stacionární fáze je rozprostřena na pevném plochem podkladu (např. aluminiová fólie)[4]



## **2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

### **2.2.1 Význam a využití HPLC**

V dnešní době patří vysokoučinná kapalinová chromatografie - High Performance Liquid Chromatography mezi jednu z nejprogresivnějších separačních metod, která se široce uplatňuje v oblasti farmaceutické analýzy.

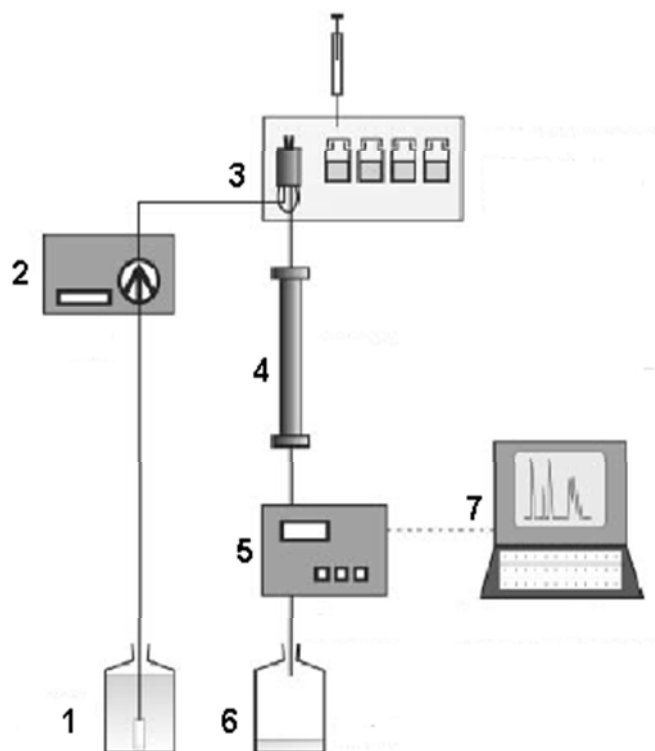
Rozvoj této chromatografické disciplíny se datuje do roku 1967, kdy bylo možno poprvé sestrojít kapalinové chromatografy, které byly schopny dosáhnout dostatečných průtokových rychlostí mobilních fází, hnaných čerpadly pod potřebným tlakem, aby se dalo hovořit o vysokoučinné, či vysokorychlostní kapalinové chromatografii [2].

Samotný princip separace je znám již téměř od vzniku chromatografie. Analyzované látky, které jsou rozptýleny v mobilní fázi, prochází kolonou naplněnou stacionární fází. V koloně dochází k interakci zkoumaných látek s povrchem stacionární fáze. Časový úsek, který každá molekula vzorku setrvá ve styku s povrchem stacionární fáze, je odvislý od míry interakce a stanovuje pořadí, v jakém jednotlivé separované látky opustí kolonu. S rostoucí interakcí mezi analyzovanou látkou a stacionární fází se současně prodlužuje i doba, kterou látka stráví v koloně [1][2][4].

V oblasti analýzy léčiv se HPLC využívá v mnoha disciplínách. V rámci lékopisné kontroly ke kvalitativnímu, kvantitativnímu hodnocení léčiv včetně odhalení přítomnosti nečistot. V problematice stability léčiv, lze hodnotit rozklad léčiv, v čase za současné identifikace a stanovení obsahu, vznikajících rozkladných produktů. V neposlední řadě je důležité zmínit využití HPLC v problematice monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách, která se řadí k nejprogresivnějším směrům v analýze léčiv[3].

## 2.2.2 Součásti HPLC

Současný HPLC systém obsahuje tyto hlavní součásti (Obr. 1):



**Obr. 1 : Schéma kapalinového chromatografu [5]**

- 1 - zásobník mobilní fáze, 2 - čerpadlo, 3 - autosampler,
- 4 - chromatografická kolona, 5 - detektor, 6 - sběrač frakcí
- 7 - počítač

### Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky mobilní fáze slouží k uchování mobilní fáze v takovém objemu, aby byli schopny zajistit neustálý přísun polární či nepolární fáze na kolonu. Měly by být vybaveny speciálními filtry, pro zabránění znečištění rozpouštědel z vnějšího prostředí. Propojení jednotlivých součástí chromatografického systému je nejčastěji řešeno kapilárami z plastu či nerezové oceli [6][13].

## Čerpadla

Čerpadla zajišťují neměnný a nepřetržitý tok mobilní fáze chromatografickým systémem. Používají se pístová nebo membránová čerpadla. Dobrá čerpadla jsou schopna dosáhnout průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu, s méně než 1% kolísáním průtoku, při tlaku v rozmezí 1-60 MPa. Materiál čerpadla (plast, keramika, nerezová ocel) nesmí do mobilní fáze uvolňovat žádné látky a zároveň jí nesmí být narušen. Moderní čerpadla dokáží smíchat jednotlivé složky mobilní fáze v různých poměrech [4][6].

## Dávkovací zařízení

Úkol dávkovacího zařízení spočívá v nástřiku kapalných vzorků v širokém rozsahu objemů, při vysoké reprodukovatelnosti, pod vysokým tlakem a s minimálními poruchami průtoku. Existují injekční dávkovací zařízení, které mohou být ovládány ručně i automaticky. Injekční dávkování přináší nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a především vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Některé tyto nedostatky mohou být odstraněny technikou dávkování při zastavení toku (*stop-flow injection*), kdy se injekční dávkování provádí za běžného tlaku, při přerušení toku mobilní fáze. Další možností je dávkování za použití dávkovacího ventilu, který se vyznačuje vyšší přesností a možností větší variability dávkovaného objemu. Nevýhodou je nutnost výměny ventilu, při změně dávkovaného objemu [4].

## **Předkolony**

Předkolona má za úkol filtrovat nebo eliminovat částice obsažené v mobilní fázi, což přispívá k ochraně a prodloužení životnosti kolony. Jedná se zejména o částice, které by mohly způsobit:

- snížení rozlišení či citlivosti kolony
- ucpání kolony
- tvorbu sraženin při styku se stacionární fází
- vytváření falešných píků
- zkreslení identifikace a kvantifikace hodnocených látek vlivem vzájemné koeluce [7].

## **Chromatografické kolony**

Kolony jsou nejdůležitější součástí kapalinového chromatografu. Právě v koloně dochází ke styku analyzovaných látek, unášených mobilní fází se stacionární fází, a probíhá zde vlastní separace.

Kolony jsou trubice vyrobené z nerezové oceli, skla či plastu. Kolony pro analytické použití mají nejčastěji délku 5-15 cm s vnitřním průměrem 3-4,6 mm a velikostí částic o průměru 3, 5  $\mu\text{m}$ . Mezi základní parametry kolony, které ovlivňují účinnost a rychlost separace, patří velikost pórů, plocha kolony, tvar částic, velikost částic, chemická stabilita a distribuce velikosti částic [4][6].

Kolony jsou naplněny vhodnými sorbenty. Mezi základní materiály, které nacházejí uplatnění jako sorbenty v chromatografických kolonách, patří silikagel, uhlík, oxidy kovů (oxid zirkoničitý) a polymery [6].

Pro většinu HPLC aplikací se nejčastěji používá chemicky modifikovaný silikagel. Vhodnou chemickou reakcí lze na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelu navázat různé radikály. V 90 % se jedná o uhlovodíkové řetězce obsahující 18 (8) uhlíkových atomů. V tomto případě se jedná o nepolární chemicky vázané fáze (tzv. reverzní fáze). Další možností je navázání radikálu tvořeného třemi uhlíky, na jehož konci je polární funkční skupina (např.  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CN}$ ), zde se jedná o středně polární fáze [3].

## **Mobilní fáze**

Výběr vhodné mobilní fáze závisí na zvolené stacionární fázi. Při použití normální (nepolární) fáze volíme polární rozpouštědla (pentan, dichlormethan, benzen, isooktan a cyklohexan). U reverzních (nepolárních) fází se používá směs vody a organického rozpouštědla (methanol, tetrahydrofuran a acetonitril).

Můžeme rozlišit dva typy analýzy podle složení mobilní fáze v čase:

*Isokratická* – složení mobilní fáze zůstává po celou dobu analýzy konstantní. Tento typ je vhodný pro analýzu látek s podobnými elučními parametry.

*Gradientová* – během analýzy dochází ke změnám složení mobilní fáze (změna poměru organické a vodné složky) [4].

## **Detektory**

Detektory jsou nedílnou součástí chromatografického systému, jelikož jsou schopny reagovat na změny chemického složení eluátu. Takto získaný signál jsou schopny zaznamenat a poskytnout nám informace o okamžitém zastoupení jednotlivých analytů v mobilní fázi protékající kolonou [8].

Vlastnosti ideálního detektoru by měly být:

- vysoká citlivost, která zajistí schopnost detekovat nízké hladiny látek
- rychlost a reprodukovatelnost
- signál přímo úměrný koncentraci hodnocených látek
- inertní ke změnám teploty a průtoku mobilní fáze
- tvar cely detektoru musí být takový, aby nedocházelo k záchytu vzduchových bublin [9].

## Spektrofotometrické detektory

Tento typ detektoru patří mezi nejrozšířenější. Princip je založen na měření absorpce elektromagnetického záření vlnové délky v rozmezí 190 – 800 nm. Lze ho použít během chromatografie látek, obsahující chromoforní skupiny či struktury. Jeho výhodou je vysoká citlivost, inertnost ke změnám teploty a průtoku eluátu a mají své využití i při gradientové eluci.

Nejpoužívanější spektrofotometrické detektory:

- A) *UV detektor s fixní vlnovou délkou* - pracuje při vlnových délkách nejčastěji 254 nm popř. 280 nm, 334 nm či 436nm. Jako zdroj světla má zabudovanou rtuťovou lampu. Jednoduchý a levný. V současné době se pro analytické účely nepoužívá.
- B) *UV-VIS detektor s volně měnitelnou vlnovou délkou* - zdroj UV a viditelného světla tvoří deuteriová a wolframová lampa. Změnou detekce vlnové délky u probíhají separace, lze dosáhnout zlepšení citlivosti a selektivity.
- C) *Scanning UV detektor* - zachycuje v rozmezí několika sekund absorpční spektrum v nejvyšší hodnotě píku měřeného analytu
- D) *Diode array detektor* - dokáže proměřovat protékající eluát každou 0.1 sekundy i ve více vlnových délkách najednou. Je schopen vytvářet 3D obraz tvořený absorpencí, vlnovou délkou a časem. Pro snadnější identifikaci látek je propojen s knihovnou spekter.

## Fluorimetrické detektory

Tyto detektory jsou citlivější než spektrofotometrické detektory. Mají možnost detekovat fluoreskující látky (steroidy, alkaloidy) nebo látky, které můžeme vhodným derivatizačním činidlem ( např. 5-dimethylaminonafalen-1-sulfonyl chlorid) převést na

deriváty s výskytem fluorescence. Mají uplatnění i při gradientové eluci. Také jsou necitlivé ke změnám teploty a průtoku mobilní fáze.

### Elektrochemické detektory

Elektrochemické detektory jsou založeny na mechanismu měření vodivosti v případě látek iontové povahy nebo vyhodnocují proud vytvářený elektrochemickou oxidací či redukcí přítomných látek. Do této skupiny patří detektory voltmetrické, polarografické a ampérometrické. Vynikají vysokou citlivostí, ale ne všechny se mohou používat během gradientové eluce.

### Refraktometrické detektory

Refraktometrické detektory se vyznačují svou univerzálností, ale i přesto se používají pouze sporadicky zejména kvůli nízké citlivosti a náchylnosti ke změnám teploty. Navíc se nemohou uplatňovat u gradientové eluce [3][9].

### Spojení HPLC s hmotnostní spektrofotometrií

Nezastupitelný význam má spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS). Po výstupu z kolony se odstraní mobilní fáze a molekuly analyzovaného vzorku jsou v plynném stavu ionizovány. Tyto nabité částice jsou následně v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli rozříděny podle hmotnosti a náboje a zaznamenány jako hmotnostní spektrum. Vysoce citlivé a selektivní detektory užívané k identifikaci látek [3].

### Další detektory

Odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD). Princip je vysvětlován tak, že částice vzorku, po předchozím odpaření mobilní fáze, procházejí světelným paprskem fotodetektoru. Získaný signál je přímo úměrný hmotě částic. Univerzální detektor

převážně využívaný u detekce látek bez přítomnosti chromoforů (některé mastné kyseliny, aminokyseliny, sacharidy aj.) [11].

Aerosolový detektor nabitých částic (CAD) jehož princip je založen na měření kladně nabitých částic vzorku lišící se svou mobilitou pomocí vysoce citlivého elektrometru. Lze také použít i u látek bez přítomnosti chromoforů. Univerzální detektor s vysokou citlivostí a na rozdíl od refraktometrických a ELSD detektorů využitelný u gradientové eluce [10].

### **Zařízení pro zpracování dat**

Zařízení pro sběr a zpracování dat je v současných HPLC systémech je plně propojeno s počítačovými systémy a to nám umožňuje pozorovat a zaznamenávat všechny potřebné informace chromatografického procesu [6].



## 2.3 Validace

Jedná se o klíčový proces, sloužící k ověřování vhodnosti, správnosti a spolehlivosti, tedy nejdůležitějších charakteristik vypracované analytické metody [12][15]. Při validaci posuzujeme, zda jsou parametry analytické metody takové, aby bylo možno touto metodou získat výsledky požadované kvality. [19]

Validace je prováděna praktickým přezkoušením a poskytnutím objektivního důkazu, že jsou požadavky na metodu pro zamýšlené použití splněny. Proces musí být aplikován v takové šíři, jaká je třeba pro splnění potřeb pro danou oblast použití. Jedná se o činnost, díky které si laboratoř následně zajišťuje kvalitu dat při každodenním rutinním provozu. Je-li prováděna správně a pravidelně, je pro laboratoř významným přínosem, protože používání řádně validovaných a verifikovaných metod je také základním požadavkem pro formální potvrzení odborné způsobilosti (akreditace) laboratoře [12][14].

Proces validace je prováděn při vývoji nové metody, pokud je metoda z různých důvodů měněna, je přenášena do jiné laboratoře, při změně pracovníka provádějícího analýzu a při nutnosti průkazu rovnocennosti dvou analytických metod. Validační proces je také nutné absolvovat, ukazuje-li kontrola kvality přetrvávající problém (tzn. verifikace). Validaci popisuje několik různých výkonnostních parametrů. Jejich hodnoty (charakteristiky analytického měřicího procesu) jsou pak zpracovány do validačního protokolu. Hodnoty ve validačním protokolu jsou limitní pro každou provedenou analýzu kontrolních a stanovovaných vzorků [12][14][19].

Mezi validační parametry patří:

### *a) Správnost*

Správností se rozumí vyjádření shody mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou, tedy schopnost metody zjistit veškerý přítomný analyt v reálném vzorku. Tento parametr se obvykle ověřuje jinou nezávislou metodou s již ověřenou správností nebo přípravou modelového vzorku ze všech složek přípravku a přesně přidaného standardu (certifikovaného referenčního materiálu). Pokud nemáme k dispozici všechny složky přípravku, musí se přípravek analyzovat se známým přídatkem standardu

v minimálně třech koncentračních úrovních. Pro dostatečnou validaci parametru je zpravidla analýza provedena nejméně u šesti vzorků a správnost je pak vyjádřena jako *rozdíl* správných a získaných hodnot nebo jako *výtěžnost*. Rozmezí výtěžnosti je nejčastěji 85 – 115%. Výtěžnost může být falešně nízká nebo vysoká, pak je třeba faktor výtěžnosti zanést do výpočtu obsahu stanovovaného analytu ve vzorku [12][15][19].

$$\text{Výtěžnost \%} = \frac{100 * \text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

#### *b) Přesnost*

Tento parametr vyjadřuje míru shody nezávislých výsledků analýzy opakovaně získaných u jednoho homogenního vzorku v požadovaných koncentračních úrovních. Počet stanovení na jedné koncentrační úrovni je minimálně šest. Parametr přesnosti *P* je zde vyjádřen jako relativní směrodatná odchylka RSD všech výše zmíněných stanovení. Limit povolené přesnosti (resp. RSD) záleží na typu metody, obecně by neměl překročit 10%.

$$\text{Přesnost \%} = \frac{100 * \text{směrodatná odchylka}}{\text{aritmetický průměr}}$$

Dle podmínek opakování jsou rozlišovány tři úrovně přesnosti:

*Opakovatelnost* – metoda je prováděna na stejném přístroji, se stejnými činidly, totožným pracovníkem

*Mezilehlá přesnost* – provádí se v jediné laboratoři se stejným homogenizovaným vzorkem, přičemž nejsou zachována stejná činidla, přístroje a pracovníci

*Reprodukovatelnost* – metoda probíhá v různých laboratořích, provedení je stejné jako u mezilehlé přesnosti [12][15][17][19].

c) *Selektivita (Specifita)*

Jedná se o schopnost změřit určitou specificky danou látku v přítomnosti jiných látek a vedlejších produktů, jejichž vznik a výskyt lze očekávat během procesu výroby přípravku. Signál odpovídající sledovanému analytu může být ovlivněn maticí a interferentů přítomných v maticí. Parametr selektivity je nutné doložit výsledky analýzy standardu a například vzorků bez dané analyzované látky, jež obsahují všechny složky přípravku, dále rozpouštědla, nečistoty a rozkladné produkty.

Lze předpokládat, že pokud má metoda malou selektivitu, existuje zde velká pravděpodobnost získání falešně pozitivního výsledku měření. Falešně pozitivní výsledek může také vzniknout díky jevu zvanému hystereze. Tento pojem značí paměť systému a jedná se o vliv dřívějších měření na měření současná [12][16][19].

d) *Detekční limit (LOD)*

Tento parametr vyjadřuje citlivost metody, jde o nejnižší detekovatelnou koncentraci látky nestanovovanou kvantitativně. Jedná se o analytický signál, který je statisticky odlišný od šumu. V případě chromatografických metod (za předpokladu, že kalibrační přímka prochází nulovým bodem) můžeme LOD vyjádřit jako množství (koncentraci) analytu, které způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu trojnásobku velikosti šumu: [12][16]

$$LOD = \frac{3 * h}{sm}$$

h.....ustálená hodnota signálu šumu

sm.....směrnice kalibrační závislosti

e) *Kvantitativní limit (LOQ)*

Stejně jako předchozí LOD je kvantitativní limit také parametrem citlivosti metody. Jedná se o nejnižší koncentraci látky, stanovitelnou s přijatelnou správností a přesností. Parametr lze vyjádřit jako koncentraci, při jejíž analýze se dosáhne limitující relativní směrodatné odchylky (považuje se 10%). LOQ obvykle činí trojnásobek LOD a lze ho vyjádřit následujícím způsobem: [12][16]

$$\text{LOQ} = \frac{10 * h}{sm}$$

h.....ustálená hodnota signálu šumu

sm.....směrnice kalibrační závislosti

#### *f) Robustnost*

Parametr robustnosti představuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. V případě HPLC jsou sledovány různé aspekty, ovlivňující chod a výsledky analýzy samotné např. složení mobilních fází, pH vodné složky mobilní fáze, rychlost průtoku, teplota na koloně, stabilita vzorků, atd. Sledováním těchto aspektů jsme schopni upozornit na podmínky, jež mohou ovlivnit výsledky měření. Metoda se potom pro vybrané aspekty hodnotí jako robustní (minimálně ovlivňující hodnotu analytického signálu) nebo nerobustní (daný parametr ovlivňující hodnotu signálu je třeba důsledně sledovat) [12][18][19].

#### *g) Test způsobilosti*

U separačních metod jako je HPLC v podstatě není možné přesně popsat všechny podmínky, za kterých lze metodu použít, aby nám poskytla spolehlivé výsledky. Pro test způsobilosti analytického systému jsou definována určitá kritéria, při jejichž splnění lze brát validaci za potvrzenou [12].

#### *h) Linearita*

Linearita úzce souvisí s kalibrací. Při validaci se stanovuje z minimálně pěti po sobě následujících rostoucích koncentrací látky v rozmezí 50-150% deklarovaného obsahu. Zpravidla se zde pracuje s roztoky standardů. Jestliže je metoda lineární, můžeme s výhodou určit směrnici z jednoho kalibračního bodu. V opačném případě je nutné vyhodnocovat výsledky z celé kalibrační křivky. Hodnoty kalibrační křivky jsou důležité pro vyhodnocení jiných parametrů metody [12][18].

*i) Rozsah*

Tento parametr určuje rozsah koncentrací látky, pro které je metoda užívána. Rozsah je omezen dolní a horní limitní hranicí. Dolním limitem může být například detekční limit, horním pak maximální odezva (při překročení přístroj nepracuje přesně). Nejčastěji je rozsah dán kalibrační křivkou stanovenou při validaci metody [12][18].

## 2.4 Úprava biologických vzorků před HPLC analýzou

Před větší částí prováděných HPLC analýz biologických vzorků je nutné provést vhodnou úpravu. Zpravidla se jedná o manuální proces vyžadující zručnost a časovou náročnost. Podstata této činnosti spočívá v odstranění balastních látek, které by snižovaly analytickou výtěžnost či by mohly zapříčinit ucpání chromatografické kolony. Mezi nejčastěji používané biologické materiály patří krev, plazma, sérum, moč, v menším zastoupení pak pot, sliny, kůže či vlasy [20].

K nejrozšířenějším metodám úpravy biologických vzorků patří deproteinace, extrakce kapalina-kapalina a extrakce na pevných fázích. Existují také i novější techniky úpravy jako mikroextrakce na pevných fázích (SPME, solid-phase microextraction), mikroextrakce kapalina-kapalina (Liquid – Liquid microextraction) či membránové metody (MBE, membrane-based extraction) a další [21].

### 2.4.1. Deproteinace

Deproteinace je jednoduchá a rychlá metoda založená na vysrážení proteinů ve vzorku. Při jejím správném provedení získáme supernatant zbavený veškerých proteinů a hodnocená látka se neváže na povrch vzniklé sraženiny. Srážecí reagens by nemělo neinterferovat s analyzovanou látkou ani jinak ovlivňovat detekci a analytickou výtěžnost.

Deproteinaci lze uskutečnit různými metodami, např. srážecími činidly, enzymaticky, ultrafiltrací na membránách [20].

#### **Deproteinace srážecími činidly (precipitační deproteinace)**

Tato technika je založena na přidáváním vhodného srážecího činidla k hodnocenému vzorku, díky čemuž je dosaženo vysrážení proteinů.

K deproteinaci se mohou použít silné kyseliny (kyselina chloristá, chlorovodíková, fosforečná atd.), organická rozpouštědla (etanol, acetonitril, metanol). Již méně často jsou používány soli těžkých kovů (síran zinečnatý, hydroxid litný). Po

použití srážecího činidla může získaný supernatant stále obsahovat malé množství nevysrážených bílkovin, proto se volí následná centrifugace [20].

### **Enzymová deproteinace**

Eliminace proteinů probíhá za použití proteolytických enzymů (např. ketodasa, papain, trypsin, glukuronidáza) [20].

### **Ultrafiltrace**

Ultrafiltrace za využití pórů polopropustné membrány odděluje volné molekuly analytu od bílkovin. Podle zvolené velikosti pórů (1-10 nm) dokáže zachytit sloučeniny o molekulové hmotnosti 500 až 1 000 000 molekulové hmotnosti. Pro zrychlení analýzy je spojena s centrifugou. Ultrafiltrace je vhodná metoda pro stavovení léčiv, které nejsou vázané na bílkoviny plazmy, případně se využívá pro stanovení volné frakce léčiv [20].

#### **2.4.2. Extrakce na pevných fázích (Solid phase extraction-SPE)**

Tato metoda je založená na separaci analytu z biologické matrice za využití pevné fáze (sorbentu).

Ve srovnání s extrakcí kapalina-kapalina (viz níže) přináší řadu výhod ve formě menší spotřeby rozpouštědel, rychlejšího a jednoduššího provedení, vysoké účinnosti i u silně polárních látek a možností snadnější automatizace.

Princip metody je obdobný jako u HPLC a využívá adsorpcí analyzované látky na sorbent, který je v dalším kroku vymýván (eluován) selektivním rozpouštědlem. Hnací silou eluce může být přetlak s využitím injekční stříkačky nebo podtlak vytvořený vývěvou. Používané sorbenty mohou být nepolární, středně polární, polární či iontově výměnné povahy. Mezi separovanými látkami a povrchem sorbentu se uplatňují Van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, výměny iontů nebo interace dipól-dipól.

Sorbenty se nejčastěji plní do kolonek ve tvaru injekčních stříkaček (existují ještě disky a kartridže) [23].

Při této metodě se zpravidla uplatňují tyto kroky:

Příprava vzorku před extrakcí – snaha o vytvoření vzorku takových fyzikální a chemických vlastností, aby došlo k zadržení analytů v extrakční kolonce.

Solvatace kolonky – extrakční kolonka se promývá methanolem, acetonitrilem nebo jiným organickým rozpouštědlem.

Předrovnovážná úprava kolonky – zahrnuje nasycení kolonky čistým rozpouštědlem analyzované látky. V kolonce se mezi sorbentem a rozpouštědlem ustaví rovnováha.

Aplikace vzorku – vzorek se aplikuje na kolonku a nechá se dostatečný čas protékat.

Promývání kolonky – selektivní vymývají nežádoucí sloučenin. Sledované analyty zůstávají zadrženy na kolonce.

Eluce analytu z kolony – Poslední krok zahrnuje znovuzískání analytů z extrakční kolonky. Provádí se promytím kolonky vhodným rozpouštědlem. Získané analyty se sbírají do vhodné jímací nádoby [11].

### 2.4.3 Extrakce kapalina – kapalina ( Liquid – Liquid Extraction)

Tato separační metoda slouží k rozdělení analyzovaných složek vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné kapalně fáze. Jedna fáze je polární (vodná) a druhá fáze nepolární (organická). Biologické vzorky jsou obvykle vodné roztoky, z nichž musíme analyzovanou látku převést do organického rozpouštědla.

Pro hodnocení účinnosti extrakce se používá Nernstova rovnice, která vyjadřuje pomocí distribuční konstanty  $K_D$  poměr koncentrací extrahované látky rozdělené mezi dvě nemísitelné fáze:

$$K_D = \frac{C_o}{C_v}$$

$C_o$  – koncentrace látky v organické fázi

$C_v$  – koncentrace látky ve vodné fázi



Podíl analytu extrahovaného do organické fáze (E) můžeme vyjádřit rovnicí:

$$E = \frac{C_o V_o}{C_o V_o + C_v V_v} = \frac{K_D V}{1 + K_D V}$$

$K_D$  – distribuční konstanta

$V_o$  – objem organické fáze

$V_v$  – objem vodné fáze

$V$  – poměr  $V_o/V_v$

Analyzovaná léčiva jsou nejčastěji slabé kyseliny nebo slabé báze. Pro zvýšení selektivity reakce je potřeba, aby se léčivo nacházelo v nedisociované formě, toho lze dosáhnout snížením pH vodné fáze u kyselin či zvýšením pH v případě zásad [20][22].

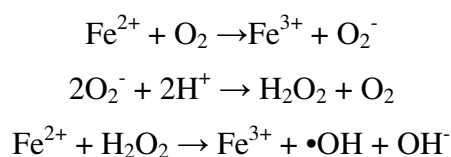
## 2.5. Chelátory železa

### 2.5.1. Železo v lidském těle

Význam železa pro lidský organismus je nesporný. Jedná se o mikrobiogenní prvek, jenž má hlavní uplatnění jako součást hemu v molekulách hemoglobinu. Železo najdeme také v myoglobinu, cytochromu P450, v enzymech katalase či peroxidase a nebo v cytochromech dýchacího řetězce. Své uplatnění také nachází v přenosu elektronů a kyslíku v procesu buněčného dýchání, a to jako akonitáza, klíčový enzym citrátového cyklu. Železo je také významným prvkem pro proliferaci a diferenciaci buněk, regulaci genové exprese, či správnou funkci imunitního systému. Při nedostatku železa v organismu je vhodné, v některých případech dokonce nezbytné, tento prvek suplementovat [24][26].

Železo je v potravě zastoupeno především v oxidované formě jako  $\text{Fe}^{3+}$ . Pro jeho následný transport přes kartáčový lem enterocytů je nutné, aby bylo redukováno na  $\text{Fe}^{2+}$ , který je již biodostupný. Do buňky je pak transportován pomocí DMT1 (divalent metal transporter 1), který do buněk přenáší další ionty kovů jako měď, zinek, kobalt, olovo a jiné [24][25].

Tento esenciální prvek však může působit i toxicky. Tím, že se vyskytuje ve více mocenstvích (poslední slupku nemá plně obsazenou elektrony), působí jako volný radikál. Železnaté ionty se uplatňují v tzv. Haber-Weiss-Fentonově reakci (Obr. 2). Zde podporují tvorbu peroxidu vodíku, který následně oxiduje ion přechodného kovu v nižším mocenství. Touto reakcí vzniká extrémně reaktivní hydroxylový radikál. Volné radikály pak hrají roli ve vzniku nebo rozvoji řady onemocnění jako je například ateroskleróza, Alzheimerova choroba, revmatoidní artritida a také nebezpečné nádorové bujení, které je zapříčiněno poškozením DNA. Lidský organismus se poškozením volnými radikály snaží všemožně zabránit. Řešením je eliminace peroxidu vodíku pomocí glutathionperoxidázy nebo oxidace  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$  ceruloplasminem a jeho inaktivace na specifické proteiny ferritin (skladovací molekula), transferin (transportní molekula), laktoferin. Dalším významným protektivním mechanismem před vznikem volných radikálů je chelatace volného železa [24][26][27].



**Obr. 2: Haber-Weiss-Fentonova reakce**

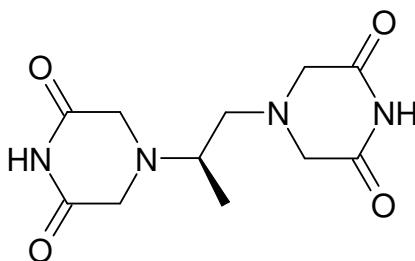
### 2.5.2. Využití chelátorů železa

Chelátory železa jsou látky, které se vyznačují schopností vázat ionty volného železa v těle. Ideální chelátor, který by byl co nejvíce využitelný v lékařské praxi, by se měl vyznačovat vlastnostmi, které by co nejvíce zvyšovaly jeho účinnost a naopak snižovaly jeho možnou toxicitu. Mezi takové vlastnosti patří selektivita k volným iontům železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ), dobrý průnik do tkání, vysoká stabilita a zároveň nízká redoxní aktivita vzniklých komplexů. Dalším požadavkem je nízká afinita k jiným biogenním prvkům ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  atd.) a iontům železa vázaného v metaloenzýmech [28].

Chelátory železa se nejprve začaly používat v indikaci přetížení organismu železem (iron overload), způsobeným zejména častými krevními infuzemi užívanými při léčbě  $\beta$ -thalasemie či při stavech zvýšeného vstřebávání železa ze zažívacího traktu vyvolané hemochromatózou. Nejdéle používaným chelátorem v této indikaci, který však nesplňuje výše uvedené požadavky ideálního chelátoru je deferoxamin (DFO). Díky nízké lipofilitě DFO, musí být podáván k dosažení dostatečné exkrece železa subkutánně či intravenózně po dobu 8 – 12 hodin denně, 5 až 7 dní v týdnu. Častá frekvence podávání, podpořená nezřídka se objevujícími nežádoucími účinky jako je např. neurotoxicita nebo bolestivost v místě injekce, vede často k non-compliance pacientů [28][29]. Dalším chelátorem používaným při léčbě přetížení organismu železem je deferipron. Tento perorálně účinný chelátor se snadno vstřebává ze zažívacího traktu a užívá se v 8 hodinových intervalech. Lepšího účinku bylo dosaženo při jeho podání v kombinaci s DFO. V některých zemích není dodnes schválen z důvodu kontroverze mezi účinností a bezpečností [29][30][31]. Deferasirox (ICL 670) je prvním klinicky užívaným perorálním léčivem při terapii přetížení železem v USA.

Podává perorálně jedenkrát denně ve formě tablet. V provedených studiích vykazoval nízkou toxicitu [32].

Z významu železa pro lidský organismus je zřejmé, že chelátory železa mohou nalézt uplatnění nejen v indikaci přetížení organismu železem, ale i v léčbě onemocnění způsobených oxidačním stresem, který se podílí na mnoha závažných kardiovaskulárních onemocnění. Mezi takové chelátory patří dexrazoxan (ICRF-187) (Obr. 3). Jedná se o proléčivo, které se hydrolyzou přeměňuje na vlastní účinnou formu označovanou jako ADR -925, která se svou strukturou podobá ethylendiamintetraoctové kyselině (EDTA). Užívá se zejména při léčbě kardiotoxicity, způsobené antracykliny [33]. Své místo mají chelátory železa i při léčbě nádorových onemocnění, důkazem je inhibitor ribonukleotidreduktázy Triapin<sup>®</sup>, který je ve fázi klinického zkoušení [34][35].

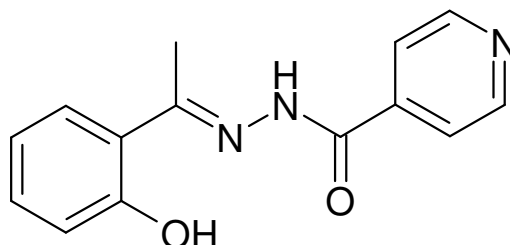


**Obr. 3: Chemická struktura dexrazoxanu (ICRF-187)**

### 2.5.3. Aroylhydrazony

První látkou ze skupiny aroylhydrazonů s prokázaným chelatačním účinkem je pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) objevený v roce 1979 [36]. Jedná se o perorálně účinný trojvazný chelátor vykazující vysokou afinitu k iontům železa ( $\text{Fe}^{3+}$ ), se kterými následně tvoří komplex pomocí vazby zprostředkované přes karbonylový kyslík, iminový dusík a fenylový kyslík v poměru PIH/železo 2:1. Byla provedena řada *in vitro* a *in vivo* studií, ve kterých byl prokázán i antiproliferativní a antioxidační účinek, nicméně první fáze klinických zkoušek nepotvrdila očekávanou účinnost [37].

### 2.5.3.1. Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH)



**Obr. 4: Chemická struktura SIH**

Výměnou pyridoxalu za salicylaldehyd v molekule PIH, byl připraven analog SIH (Obr. 4), vyznačující se vyšší lipofilitou oproti mateřské látce. Tato změna v chemické struktuře také přinesla zvýšenou vazebnou afinitu k  $\text{Fe}^{3+}$  [38].

Jeho výrazné protektivní působení proti reaktivním formám kyslíku (ROS) se prokázalo při inkubaci buněčných linií H9c2 s peroxidem vodíku, kdy po přidání SIH v koncentracích  $\geq 3 \mu\text{M}$  došlo k zabránění nárůstu zanikajících buněk následkem nekrózy či apoptózy [39].

Ve studii prováděné *in vivo*, kdy byl SIH podáván v dávce 50 mg/kg králíkům po dobu 10 týdnů, byla demonstrována nízká toxicita této sloučeniny [40].

I přes všechny pozitivní farmakodynamické účinky se ukázal být hlavním limitujícím faktorem molekuly SIH krátký biologický poločas (17 minut), odhalený během intravenózního podání králíkům. Tento fenomén, způsobený zřejmě hydrolýzou hydrazonové vazby, byl následně prokázán v *in vitro* stabilitní studii, prováděné i u další látek odvozených od aromatických hydrazonů [41][42].

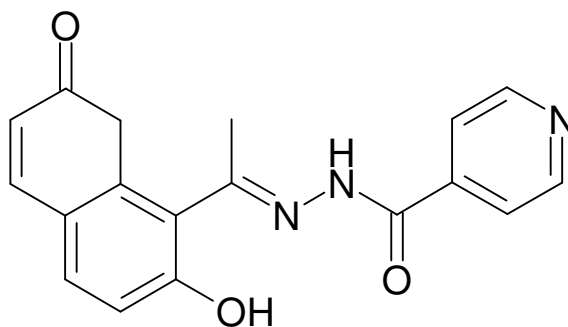
Ve snaze dosáhnout zvýšení stability hydrazonové vazby v plazmě při zachování farmakodynamických vlastností a tím i lepšího potenciálu při užití v klinické praxi, byla připravena celá řada analogů SIH. První zásah do struktury SIH spočíval zejména v náhradě aldehydického vodíku objemnější a elektrony poskytující alkylovou skupinou, ve snaze zabránit nukleofilnímu ataku  $\text{H}_2\text{O}$  na hydrazonovou vazbu. Druhá změna ve struktuře zahrnovala záměnu substituentů na fenolovém jádře [43].

## 2.5.4. Nová analoga SIH

Předmětem této diplomové práce jsou dva potencionální chelátory železa, získané cílenou obměnou v chemické struktuře SIH, se záměrem ukázat vliv provedených změn na stabilitu hydrazonové vazby v plazmě. Obě látky byly nesyntetizovány na Katedře anorganické a organické chemie FaF.

### 2.5.4.1. *N'*- [1-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-8-yl)ethyliden]isonikotinoylhydrazid (AHC-INH)

Molekula AHC –INH (Obr. 5) byla připravená syntézou 8-acetyl-7-hydroxykumarinu a isoniazidu v prostředí 96% etanolu. Jedná se o žlutou krystalickou látku o sumárním vzorci a s teplotou tání v rozmezí 327 - 330°C. Změna struktury oproti molekule SIH zahrnuje přítomnost methylové skupiny na uhlíku hydrazonové vazby a záměna fenylu hydroxykumarinovým uskupením. Obě provedené změny by měly zvýšit stabilitu hydrazonové vazby.

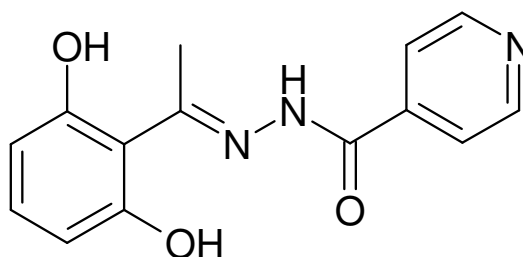


Mr 321,10

**Obr. 5: Chemická struktura AHC-INH**

#### 2.5.4.2. *N'* – [1-(2,6-dihydroxyfenyl)ethyliden]isonikotinoylhydrazid (2,6 DHAF-INH)

Druhá molekula 2,6 DHAF-INH (Obr. 6) byla připravená syntézou 2,6-dihydroxyacetofenonu, kyseliny octové a isoniazidu v prostředí 96 % etanolu. Jedná se o žlutou krystalickou látku o sumárním vzorci  $C_{14}H_{13}N_3O_3$  s teplotou tání 245-247°C. I zde změna struktury oproti molekule SIH zahrnuje jako u AHC-INH přítomnost methylové skupiny na uhlíku hydrazonové vazby, zatímco druhá změna se týká přítomnosti hydroxylové skupiny v poloze 6 na fenylu. I v tomto případě se očekává, že způsobené obměny struktury zvýší stabilitu hydrazonové vazby.



Mr 271,27

**Obr. 6: Chemická struktura 2,6 DHAF-INH**

### 3. Cíl diplomové práce

1. Vyvinout optimální chromatografické podmínky pro HPLC analýzu stability 2,6 DHAF-INH a AHC-INH.
2. Částečná validace vyvinutých HPLC metod (linearita, přesnost, správnost, selektivita).
3. Hodnocení stability 2,6 DHAF-INH a AHC-INH v králičí plazmě *in vitro* při 37° C.



## 4. Experimentální část

### 4.1 Chemikálie a materiál

(E)-*N'* - [1-(2,6-dihydroxyfenyl)ethyliden]isonikotinoylhydrazid (2,6DHAF-INH), připravený na Katedře anorganické a organické chemie Faf UK, Hradec Králové.

(E)-*N'* - [1-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromen-8-yl)ethyliden]isonikotinoylhydrazid (AHC-INH), připravený na Katedře anorganické a organické chemie Faf UK, Hradec Králové.

Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon hydrochlorid (SIH.HCl), připravený na Katedře anorganické a organické chemie Faf UK, Hradec Králové.

2,6-dihydroxyacetofenon (rozkladný produkt 2,6 DHAF-INH), syntetizovaný na Katedře anorganické a organické chemie Faf UK, Hradec Králové.

8-acetyl-7-hydroxykumarin (rozkladný produkt AHC-INH), syntetizovaný na Katedře anorganické a organické chemie Faf UK, Hradec Králové.

Isoniazid, Sigma.

Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), Lachema, Česká republika.

Methanol, Penta, Česká republika.

Acetonitril, Merk, Darmstadt, Německo.

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Lachema, Česká republika.

Dimethyl sulfoxid (DMSO), Merk, Darmstadt, Německo.

### 4.2 Přístroje

#### Chromatografický systém

Chromatografický systém Shimadzu (Duisburg, Německo) – sestavený z dvou LC-20 pump, SIL-20 AC autosampleru, DGU-20A3 degasseru, CTO-20 AC termostatu, UV detektoru a CMB-20 komunikačního modulu.

Data získaná chromatografickým systémem byla vyhodnocována programem LC solution software, verze 1.21 SPI.

### **Chromatografická kolona a předkolona**

LiChroCART® HPLC- cartridge LiChrospher® 100 RP- 18e (5µm) 250x4,6 mm, Merk, Darmstadt, Německo

Předkolona LiChroCART® 4-4 Purospher® RP- 18 (5µm) – Merk, Darmstadt, Německo

### **Další přístroje**

Ultrazvuková lázeň K10, Kranitek, Slovenská republika

Analytické váhy, Helago, Česká republika

Centrifuga CL 31R Multispeed, Thermo, USA

Vodní lázeň, Ingos, Česká republika

Vortex, Velp scientifica, Itálie

Acidimetr 333, Drupta, Česká republika

### **Pomůcky**

Mikropipety, laboratorní sklo, vialky, inzerty.

## **4.3 Příprava standardních roztoků**

Standardní roztoky byly připraveny vhodným zředěním zásobních roztoků analyzovaných derivátů.

Zásobní roztok AHC-INH (1mg/ml) byl připraven rozpuštěním 2 mg AHC-INH v 2 ml DMSO.

Zásobní roztok 2,6 DHAF-INH (1mg/ml) byl připraven rozpuštěním 2 mg 2,6 DHAF-INH v 2 ml DMSO.

Zásobní roztok SIH (1 mg/ml) byl připraven rozpuštěním 4 mg SIH v 4 ml DMSO.

Standardní roztok AHC-INH (0,32mg/ml), byl získán přidáním 3,2 ml DMSO k 1 ml zásobního roztoku AHC-INH (1mg/ml).

Standardní roztok 2,6 DHAF (0,27mg/ml), byl získán přidáním 2,7ml DMSO k 1 ml zásobního roztoku 2,6 DHAF (1mg/ml).

Standardní roztok SIH (0,24mg/ml), byl získán přidáním 2,4ml DMSO k 1 ml zásobního roztoku SIH (1mg/ml).

Standardní roztoky byly použity během testování validačních parametrů a stability.

#### **4.4. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení stability AHC-INH a 2,6DHAF-INH**

Před vlastním hodnocením stability, bylo nejdříve nutné vyvinout takové chromatografické podmínky, aby se dosáhlo dostatečné separace píků stanovovaných derivátů, rozkladných produktů, vnitřního standardu a čela. Dále bylo důležité nalézt vhodnou vlnovou délku pro UV detekci. Vycházelo se z podmínek již dříve vyvinutých a ověřených analytických metod pro hodnocení stability jiných derivátů ze skupiny aroyhydrazonů.

Vzorky se připravovaly smícháním 0,5 ml methanolu, 0,5ml vody a 10 $\mu$ l zásobního roztoku (1mg/ml) hodnocených derivátů. Takto připravené vzorky byly nastříkované na kolonu v objemu 20 $\mu$ l.

#### **Stacionární fáze pro analýzu AHC-INH a 2,6 DHAF**

Pro oba chelátory byla zvolena stejná stacionární fáze. Jednalo se o chromatografickou kolonu LiChroCART® HPLC- cartridge LiChrospher® 100 RP- 18e (15 $\mu$ m) 250x4,6 mm s předkolonou LiChroCART® 4-4 Purospher® RP- 18 (5 $\mu$ m). Kolona byla termostatována na 25°C.

### **Mobilní fáze pro analýzu AHC-INH**

Pro analýzu AHC-INH byla zvolena mobilní fáze složená z fosfátového pufru (0,01 M vodný roztok dihydrogenfosforečnanu sodného s přídatkem 2 mM EDTA) o pH 6 (upraveno 0,1 M NaOH) a metanolu. Byl použit poměr vodná fáze: organická fáze 50:50 (v/v).

Fosfátový pufr byl připraven navážením dihydrogenfosforečnanu sodného s přídatkem EDTA, jejich následným rozpuštěním v čistěné H<sub>2</sub>O a doplněním do požadovaného objemu. Vodný roztok byl poté upraven na vhodné pH hydroxidem sodným a přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm za pomoci vývěvy.

### **Mobilní fáze pro analýzu 2,6 DHAF-INH**

Pro analýzu 2,6-DHAF-INH byla vybrána mobilní fáze složená z fosfátového pufru (0,01 M vodný roztok dihydrogenfosforečnanu sodného a 2mM EDTA) o pH 6 (upraveno 0,1 M NaOH) a methanolu. Byl použit poměr vodná fáze: organická fáze 47:53 (v/v).

Fosfátový pufr byl připraven stejným způsobem jako u AHC-INH.

### **Ostatní chromatografické podmínky**

Pro analýzu AHC-INH byla zvolena vlnová délka 325 nm, 2,6 DHAF-INH byl proměřován při vlnové délce 300 nm. Průtok mobilní fáze kolonou byl zvolen 1,0 ml/min.

## **4.5. Úprava vzorku plazmy před HPLC analýzou**

Analyzované vzorky byly upraveny metodou deproteinace pomocí acetonitrilu, kdy bylo k 0,1 ml králičí plazmy bylo přidáno 0,2 ml acetonitrilu, poté se vzorek promíchal a byl ostředěň pomocí centrifugy (10000 otáček/min) po dobu 5 minut. Supernatant byl odebrán a nastříknut na kolonu.

## 4.6. Validace metod

Před samotným provedením stabilitní studie, byla provedena částečná validace vyvinutých metod s ohledem na linearitu, přesnost, správnost a selektivitu. Zjištěné validační parametry byly hodnoceny dle doporučení FDA.

### Linearita

Linearita byla testována v rozsahu 10-100  $\mu\text{M}$ . Byla sestrojena kalibrační křivka, kde jednotlivé body přímky byly vytvořeny ze 6 kalibračních vzorků plazmy, které obsahovaly 6 různých koncentrací analyzovaných látek (10, 20, 50, 70, 80, 100  $\mu\text{M}$ ). Kalibrační vzorky byly složeny z 0,1 ml králičí plazmy, ke které bylo přidáno 1 – 2 – 5 – 7 – 8 – 10  $\mu\text{l}$  standardního roztoku AHC- INH či 2,6 DHAF-INH. Následně bylo ještě přidáno 5  $\mu\text{l}$  standardního roztoku vnitřního standardu SIH.

Takto připravené vzorky byly upraveny precipitační metodou pomocí acetonitrilu. Linearita byla vyhodnocena jako závislost poměru ploch pík analytu a vnitřního standardu na koncentraci analytu v plasmě.

### Přesnost

Přesnost byla testována na 3 koncentračních hladinách (10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) na úrovni opakovatelnosti. Na každé koncentrační hladině bylo měřeno 5 vzorků.

Jednotlivé vzorky se skládaly ze 0,1 ml králičí plazmy a 1, 5 či 10  $\mu\text{l}$  standardního roztoku AHC – INH respektive 2,6 DHAF- INH. K takto připraveným vzorkům bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  vnitřního standardu SIH. Nakonec byly upraveny precipitační metodou pomocí acetonitrilu.

Přesnost metody byla na každé koncentrační úrovni vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou R.S.D.

## Správnost

Správnost metody byla hodnocena ve 3 rozdílných koncentračních úrovních (10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M), přičemž na každé z nich bylo testováno 5 vzorků. Jednotlivé vzorky obsahovaly 0,1 ml králičí plazmy, standardní roztok AHC-INH či 2,6 DHAF-INH o objemu 1, 5 nebo 10 $\mu$ l. Dále byl k vzorkům přidán vnitřní standart SIH v objemu 5 $\mu$ l a následovala úprava precipitační metodou pomocí acetonitrilu.

Hodnoty pro ověření správnosti, byly získané výpočtem z rovnice kalibrační křivky a vyjádřené jako procento výtěžnosti.

## Selektivita

Selektivita byla ověřena srovnáním chromatografickým záznamem analýz vzorků prázdné králičí plazmy se vzorky s obsahem analyzovaných látek.

## 4.7. Stabilita AHC- INH a 2,6 DHAF v králičí plazmě

Stabilita AHC- INH a 2,6 DHAF byla hodnocena při 37°C v koncentraci 100 $\mu$ M. Celková doba analýzy stabilitní studie u obou derivátů čítala 10 hodin.

Nejprve bylo 1,7 ml prázdné králičí plazmy preinkubováno při 37°C po dobu 15 minut. Poté bylo k prázdné plazmě přidáno 54 $\mu$ l zásobního roztoku AHC- INH respektive 46 $\mu$ l zásobního roztoku 2,6 DHAF. Během hodnocení stability byl vzorek inkubován za konstantního míchání pomocí magnetického míchadla na vodní lázni. V časových intervalech 0, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600 minut byl proveden odběr 0,1 ml plazmy do Ependorf zkumavky. Pak následovalo přidání 5 $\mu$ l zásobního roztoku SIH jako vnitřního standardu. V dalším kroku byly vzorky precipitovány acetonitrem a nastříknuty na kolonu HPLC. Celé hodnocení stability bylo provedeno se čtyřmi vzorky od každého měřeného chelátoru.

Hodnocení stability bylo vyjádřeno jako pokles koncentrace stanovovaných analytů v králičí plazmě *in vitro* za daný čas.

## 5. Výsledky a diskuse

### 5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro metodu hodnocení stability AHC-INH a 2,6DHAF v králičí plazmě *in vitro*

#### 5.1.1. Stacionární fáze pro analýzu AHC-INH a 2,6DHAF-INH

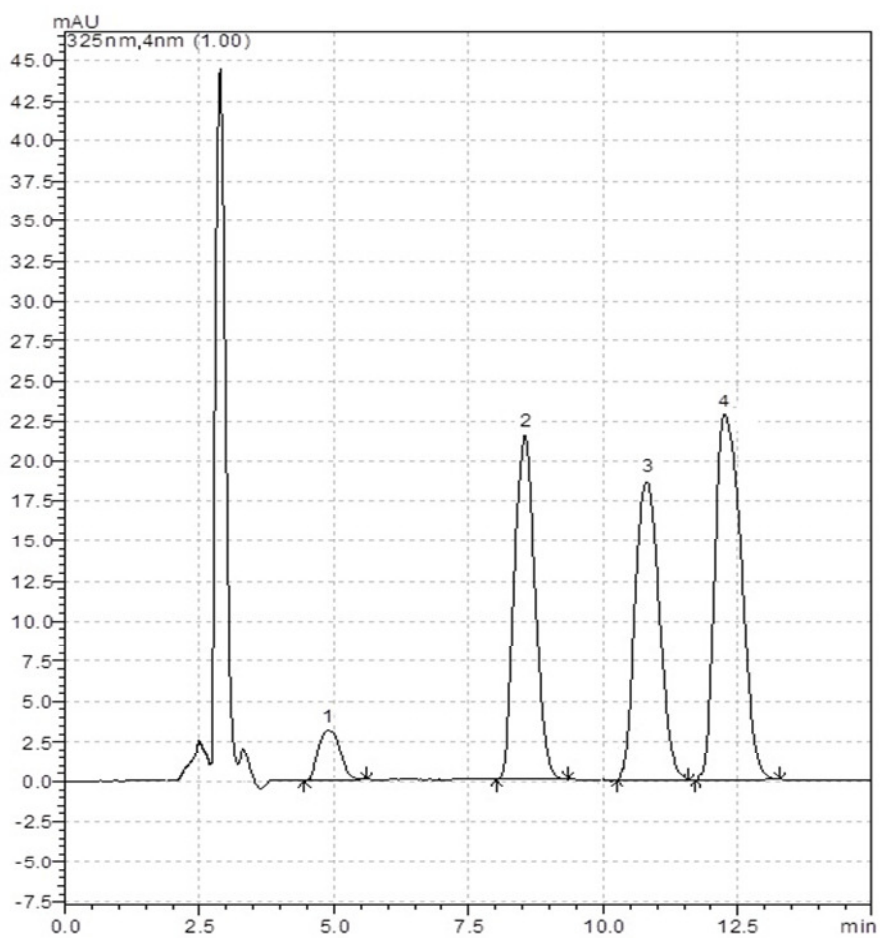
Výběr stacionární fáze se opíral o poznatky z předchozích stabilitních studií SIH[41]. Pro oba hodnocené deriváty byla proto vybrána kolona s reverzní stacionární fází LiChroCART® HPLC- cartridge LiChrospher® 100 RP- 18e (15µm) 250x4,6 mm s předkolonou LiChroCART® 4-4 Purospher® RP- 18 (5µm).

#### 5.1.2. Optimalizace složení mobilní fáze pro AHC-INH

Výběr mobilní fáze se řídil požadavky, aby došlo k separaci jednotlivých píků hodnoceného chelátoru AHC-INH, jejich rozkladných produktů (isoniazid a 8-acetyl-7-hydroxykumarin), vnitřního standardu SIH a délka analýzy byla v maximálním trvání dvaceti minut. Počáteční chromatografické podmínky vycházely ze dřívějších stabilitních studií SIH [41].

U derivátu AHC-INH se zkoušely různé poměry vodné a organické fáze a to v rozmezí 35:65 až 50:50 (v/v). Při nižším poměru vodné fáze docházelo ke koeluci píků AHC- INH a 8-acetyl-7-hydroxykumarinu, retenční čas isoniazidu byl příliš krátký. Poměr 50:50 se ukázal být jako nejvíce vhodný (Obr. 7).

Během dalších analýz byl na chromatografickém záznamu objeven nový menší pík. Díky poznatkům předešlých stabilitních studií látek z serié analogů SIH[45], byl označen jako geometrický izomer AHC-INH. Tento poznatek nebyl ověřen hmotnostní spektrofotometrií, ale můžeme jej považovat za prokázaný vzhledem k ověřené přítomnosti geometrických izomerů i u dalších látek ze skupiny analogů SIH.



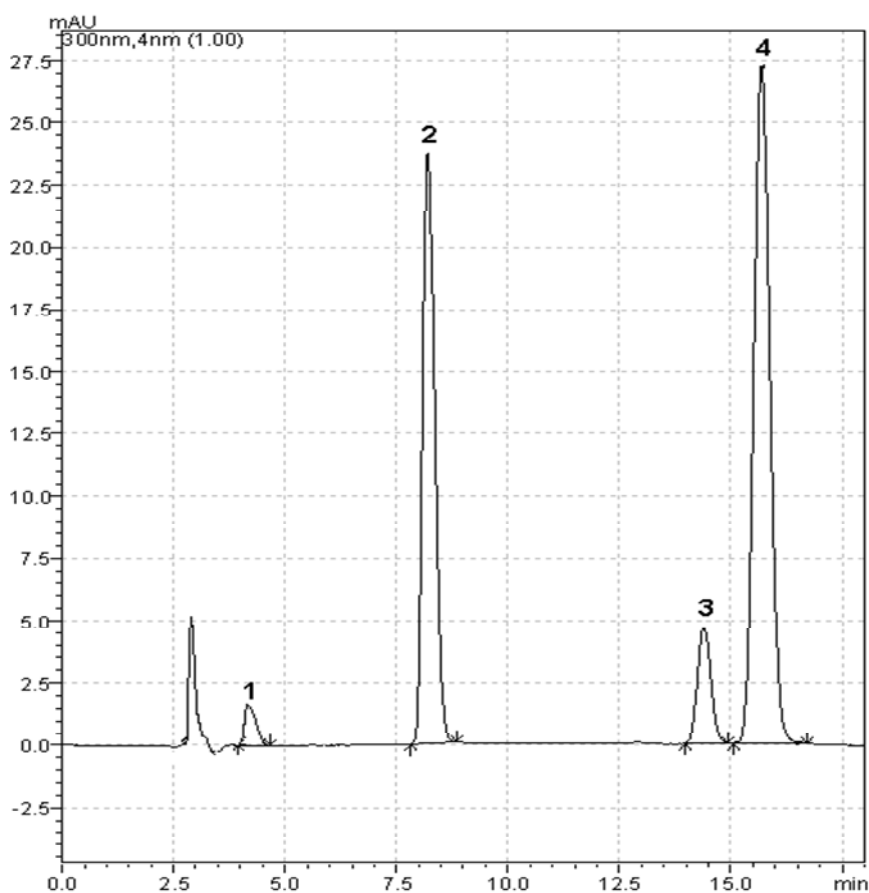
**Obr. 7 Chromatogram separace směsi AHC-INH, SIH, 8-acetyl-7-hydroxykumarin, isoniazid**

1 - Isoniazid ,  $t_R=4,9$  min; 2 - AHC-INH ,  $t_R = 8,5$  min; 3 - SIH ,  $t_R= 10,8$  min;  
4 - 8-acetyl-7-hydroxykumarin,  $t_R= 12,3$  min.



### 5.1.3. Optimalizace složení mobilní fáze pro 2,6DHAF-INH

Derivát 2,6DHAF-INH byl měřen jako druhý v pořadí, proto byl nejprve zvolen poměr vodné a organické fáze 50:50(v/v), jako u prvního hodnoceného derivátu. Při tomto poměru nedocházelo k dostatečnému oddělení píků SIH a rozkladného produktu 2,6-dihydroxyacetofenu, proto nemohl být tento poměr použit, a tak se postupně zvyšoval podíl vodné složky na výsledný poměr 47:53 (v/v) (Obr. 8), kde už byla separace dostatečná.



**Obr. 8 Chromatogram separace směsi 2,6DHAF-INH, SIH, 2,6-dihydroxyacetofenon, isoniazid**

1 - Isoniazid,  $t_R = 4,17$  min; 2 - 2,6DHAF,  $t_R = 8,20$  min;

3 - 2,6-dihydroxyacetofenon,  $t_R = 14,39$  min; 4 - SIH,  $t_R = 15,683$  min.

## 5.2 Validace metody

Pro oba potencionální chelátory AHC-INH a 2,6 DHAF-INH byla provedena validace vyvíjené analytické metody se zaměřením na linearitu, přesnost (opakovatelnost), správnost a selektivitu.

### 5.2.1. Validace metody pro analýzu AHC-INH

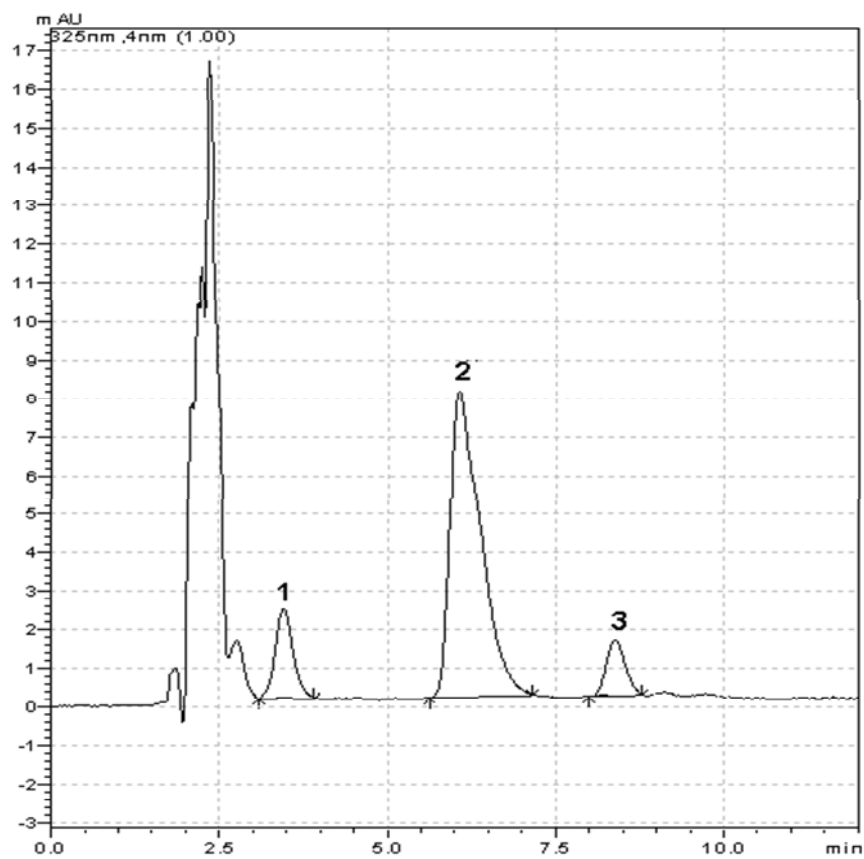
#### Linearita

Linearita metody byla proměřena v rozmezí koncentrací AHC-INH v plazmě 10-100 $\mu$ M.

Získaná data, která byla použita pro hodnocení linearity, jsou uvedena v tabulce (tabulka 2). Chromatografický záznam z měření linearity při koncentrační úrovni AHC-INH 50  $\mu$ M je na (Obr. 9).

Tabulka 2 Linearita AHC-INH.

Teoretická koncentrace AHC-INH ( $\mu$ M)	Měření číslo	Plocha píku AHC-INH +izomer	Plocha píku I.S.	Poměr ploch AHC-INH /I.S.	Průměr poměrů AHC-INH /I.S.
101,12	1	916793	63722	14,3874	14,5137
	2	923962	63107	14,6411	
80,90	1	776854	61894	12,5513	12,5728
	2	776191	61630	12,5944	
70,78	1	648184	59325	10,9260	11,0012
	2	651552	58820	11,0770	
50,56	1	462426	56810	8,1399	8,2559
	2	464836	55505	8,3747	
20,22	1	211093	59761	3,5323	3,4916
	2	207592	60151	3,4512	
10,11	1	113462	58786	1,9301	1,8936
	2	109759	59096	1,8573	

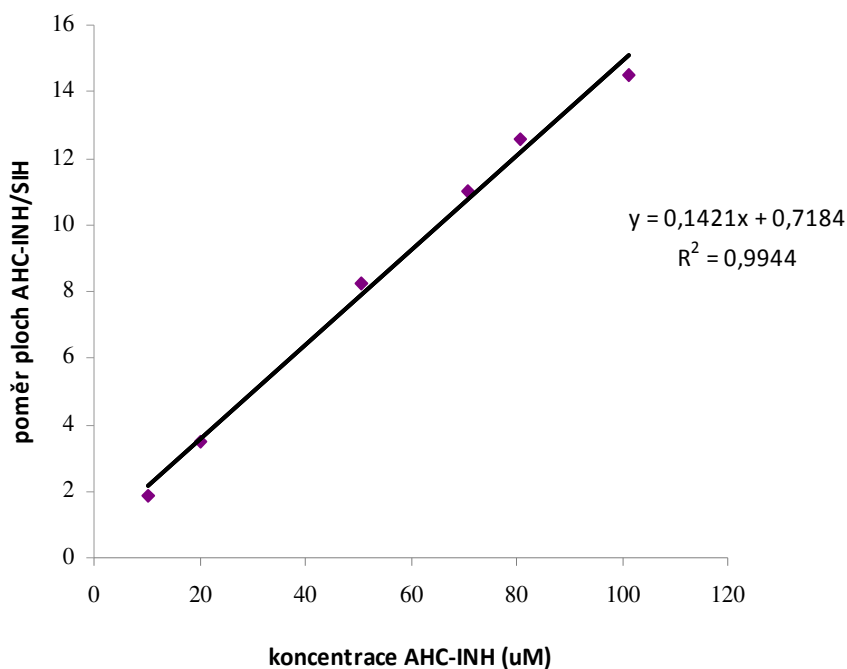


**Obr. 9 Chromatogram, linearita AHC-INH 50  $\mu$ M**

1 - izomer AHC-INH ,  $t_R=3,452$  min; 2 - AHC-INH,  $t_R=6,062$ min;

3 - SIH,  $t_R=8,388$  min

Na základě získaných údajů z poměrů ploch píků AHC-INH včetně jeho izomeru a vnitřního standartu v závislosti na koncentraci, byla vytvořena kalibrační křivka s rovnicí  $y = 0,1421x + 0,7184$  a korelačním koeficientem  $R^2 = 0,9944$  (Obr. 10).



**Obr. 10 Kalibrační křivka pro hodnocení linearity pro stanovení AHC-INH v plazmě**

Metodu lze považovat za lineární, protože všech šest kalibračních vzorků splňuje podmínku dle doporučení FDA[46] o výši maximální odchylky koncentrace odečtené z kalibrační přímky od hodnoty koncentrace teoretické (Tabulka 3) (povolená maximální odchylka je 15 %, na limitu kvantifikace 20 %).

**Tabulka 3 Přehled hodnot koncentrací AHC-INH odečtených z kalibrační křivky vyjádření procent teoretické koncentrace**

Koncentrace teoretická (µM)	Koncentrace odečtená (µM)	%
101,12	97,08	96,00
80,90	83,40	103,09
70,78	72,36	102,23
50,56	53,04	104,90
20,22	19,50	96,44
10,11	8,27	81,80

## Přesnost a správnost

Výsledky pro přesnost a správnost pro analýzu AHC-INH jsou shrnuty v tabulce (tabulka 1). Zjištěná data jsou v rozmezí hodnot uváděných v doporučeních FDA[46] (průměrná hodnota správnosti v rozmezí 85 – 115%, v případě limitu kvantifikace 80-120%; přesnost vyjádřená R.S.D maximálně 15%, s výjimkou limitu kvantifikace, kde je možná hodnota odchylky 0%). Metoda proto vyhovuje s ohledem na přesnost a správnost.

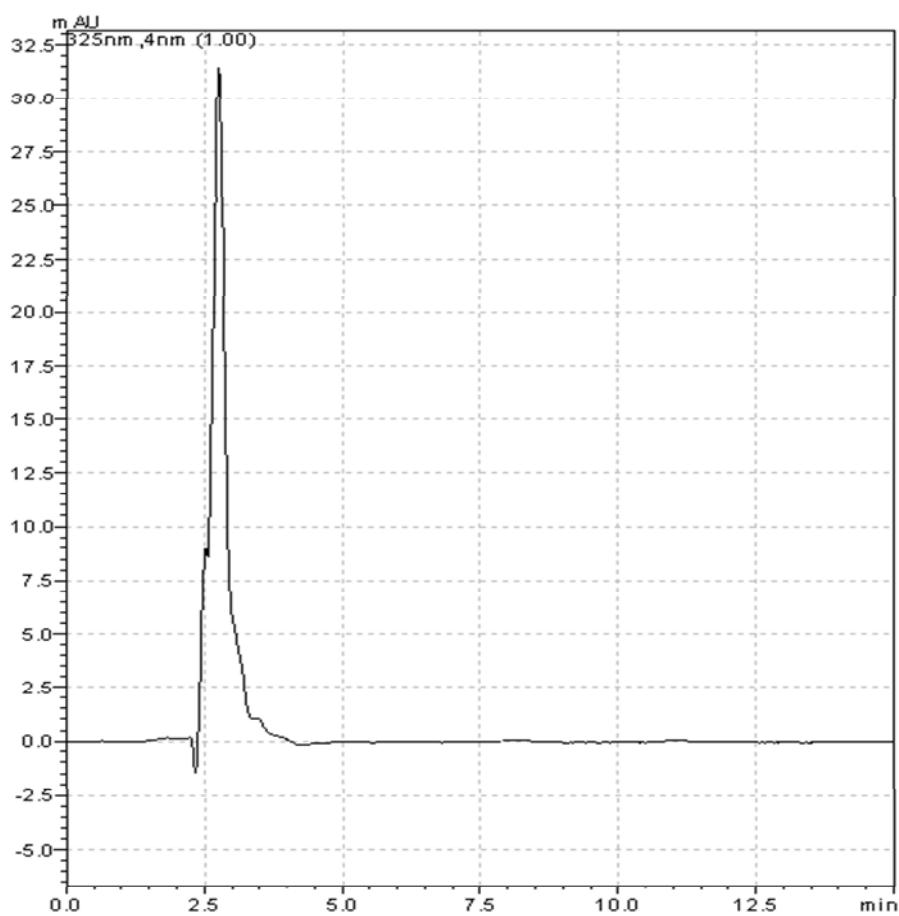
**Tabulka 1 Přesnost a správnost pro hodnocení stability AHC-INH**

Teoretická koncentrace AHC-INH ( $\mu\text{M}$ )	Průměr naměřené koncentrace* AHC-INH ( $\mu\text{M}$ )	Průměrná správnost (%)	S.D.	Přesnost R.S.D. (%)
101,12	107,03	105,85	10,90	10,14
50,56	56,75	112,25	3,89	6,85
10,11	8,62	85,24	0,98	11,34

\* průměr z pěti samostatně připravených vzorků pro každou koncentrační úroveň

## Selektivita

Selektivita metody pro hodnocení stability AHC-INH v plazmě byla ověřena analýzou prázdné králičí plazmy. Z chromatografického záznamu(Obr. 11) je patrné, že nedochází k interferenci endogenních látek králičí plazmy s píkem AHC-INH.



Obr. 11 Chromatogram prázdné králičí plazmy z analýzy AHC-INH

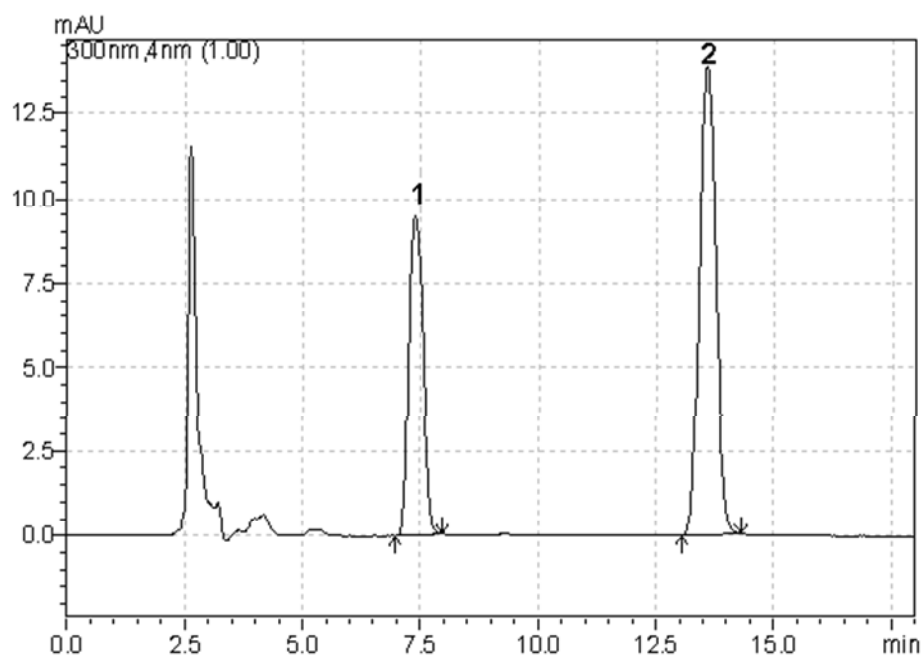
## 5.2.2. Validace metody pro analýzu 2,6 DHAF-INH

### Linearita

Linearita metody byla proměřena v koncentračních rozmezích 10-100  $\mu\text{M}$  2,6 DHAF-INH v plazmě. Získaná data, která byla použita pro hodnocení linearitu, jsou uvedena v tabulce (tabulka 5). Chromatografický záznam z měření linearitu při koncentrační úrovni 2,6 DHAF-INH 50  $\mu\text{M}$  je na (Obr. 12).

**Tabulka 5** Linearita 2,6 DHAF-INH

Teoretická koncentrace 2,6 DHAF-INH ( $\mu\text{M}$ )	Měření číslo	Plocha píku 2,6 DHAF-INH	Plocha píku I.S.	Poměr ploch 2,6 DHAF-INH /I.S.
104,85	1	386907	326913	1,1835
73,40	1	268055	322761	0,8305
52,43	1	197700	337548	0,5856
20,97	1	85967	338142	0,2542
10,49	1	49185	344976	0,1425

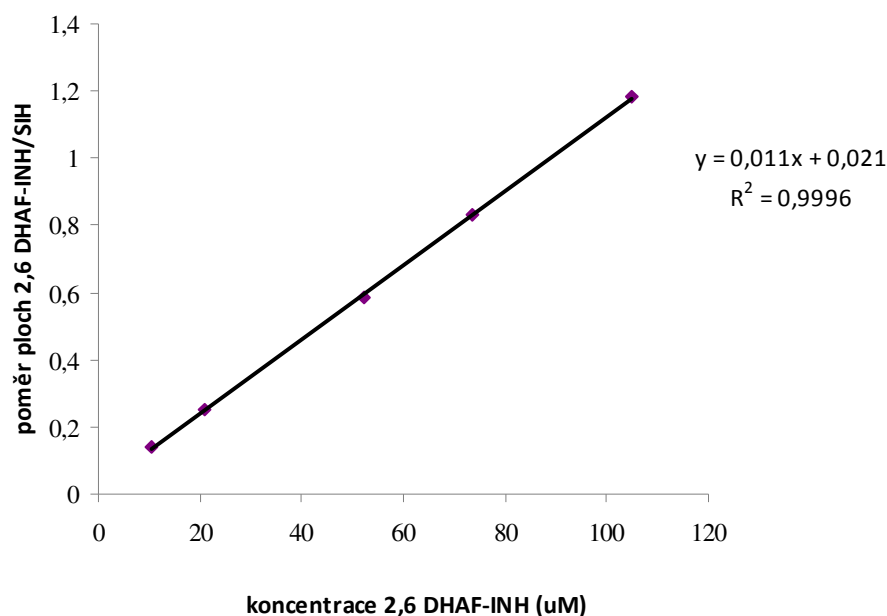


**Obr. 12 Chromatogram, linearita 2,6 DHAF-INH 50 $\mu$ M**

1 - 2,6 DHAF , $t_R$  =7,365 min; 2 - SIH ,  $t_R$ = 13,564 min

Na základě získaných údajů z poměrů ploch píků 2,6 DHAF-INH a vnitřního standartu v závislosti na koncentraci, byla vytvořena kalibrační křivka s rovnicí  $y = 0,011x + 0,0021$  a korelačním koeficientem  $R^2 = 0,9996$  (Obr. 13).





**Obr. 13 Kalibrační křivka pro hodnocení linearity pro stanovení 2,6 DHAF-INH v plazmě**

Metodu lze považovat za lineární, protože pět ze šesti kalibračních vzorků splňuje podmínku dle doporučení FDA o výši maximální odchylky koncentrace odečtené z kalibrační přímky od hodnoty koncentrace teoretické (Tabulka 6) (povolená maximální odchylka je 15 %, na limitu kvantifikace 20 %).

**Tabulka 6 Přehled hodnot koncentrací 2,6 DHAF-INH odečtených z kalibrační křivky a vyjádření procent teoretické koncentrace**

Koncentrace teoretická (μM)	Koncentrace odečtená (μM)	%
104,85	105,68	100,79
73,40	73,59	100,26
52,43	51,34	97,92
20,97	21,20	101,10
10,49	11,05	105,34

## Přesnost a správnost

Výsledky pro přesnost a správnost pro analýzu 2,6 DHAF-INH jsou shrnuty v tabulce (tabulka 4). Zjištěná data jsou v rozmezí hodnot uváděných v doporučeních FDA [46] ( průměrná hodnota správnosti v rozmezí 85 – 115%, v případě limitu kvantifikace 80-120%; přesnost vyjádřená R.S.D maximálně 15%, s výjimkou limitu kvantifikace, kde je možná hodnota odchylky 20%). Metoda proto vyhovuje s ohledem na přesnost a správnost.

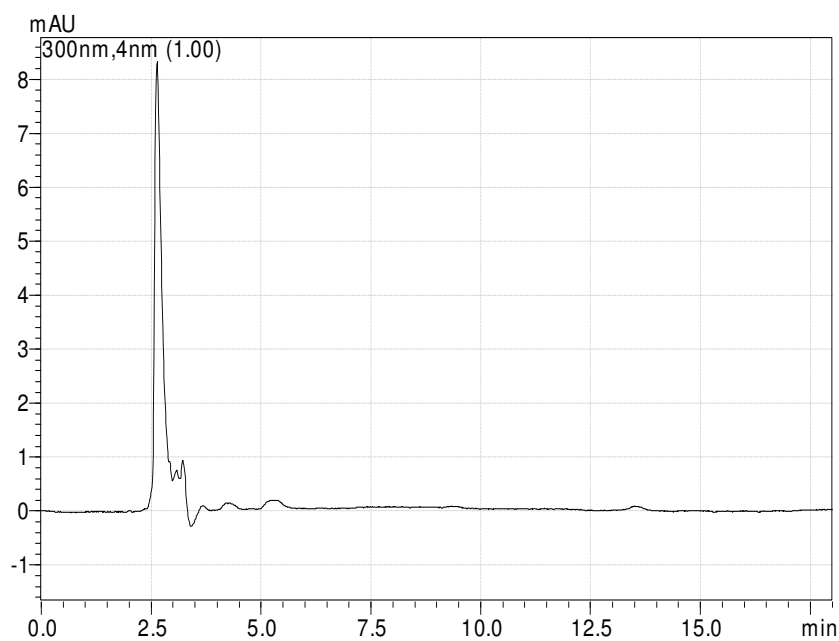
**Tabulka 4 Přesnost a správnost pro hodnocení stability 2,6 DHAF-INH**

Teoretická koncentrace 2,6 DHAF-INH ( $\mu\text{M}$ )	Průměr naměřené koncentrace* 2,6 DHAF-INH ( $\mu\text{M}$ )	Průměrná správnost (%)	S.D.	Přesnost R.S.D. (%)
104,85	100,63	95,98	3,81	3,78
52,43	48,71	92,90	0,35	0,71
10,49	11,24	107,15	1,20	10,70

\* průměr z pěti samostatně připravených vzorků pro každou koncentrační úroveň

## Selektivita

Selektivita metody pro hodnocení stability 2,6 DHAF-INH v plazmě byla ověřena analýzou prázdné králíčí plazmy. Z chromatografického záznamu (Obr. 14) je patrné, že nedochází k interferenci endogenních látek králíčí plazmy s píkem 2,6 DHAF-INH.



**Obr. 14** Chromatogram prázdné králíčí plazmy z analýzy 2,6 DHAF-INH

### 5.3 Stabilita v plazmě

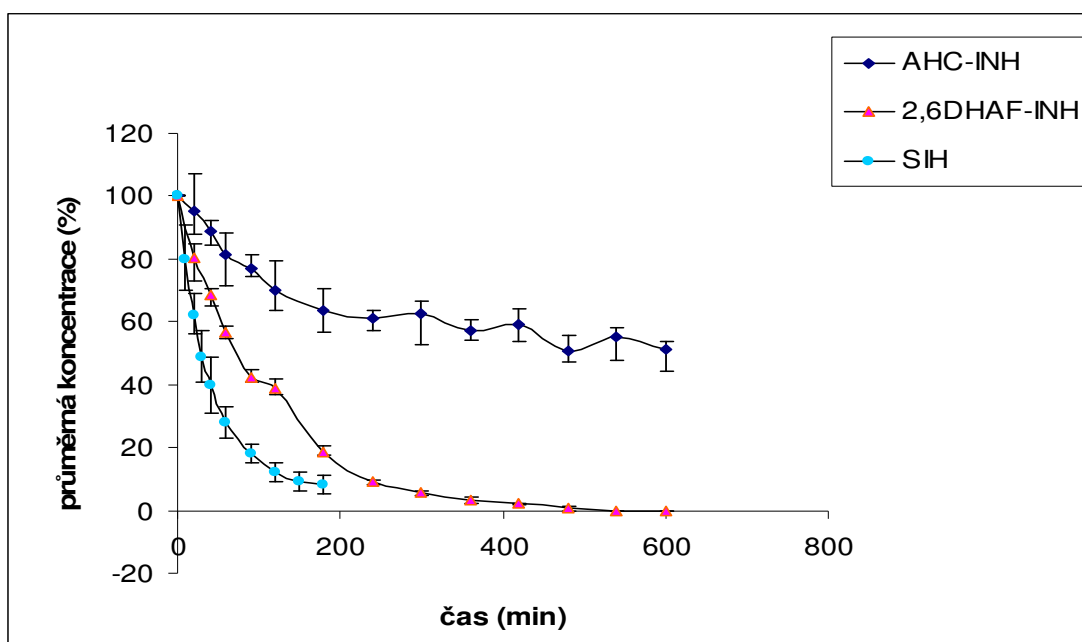
Stabilita obou derivátů byla zaznamenána jako pokles plochy píku v závislosti na čase. Chelátor AHC-INH byl přítomen i ve formě izomeru, jehož plocha píku byla připočítána k ploše hlavního píku AHC-INH. Počáteční koncentrace byla nastavena na 100 $\mu$ M. Tato hodnota vycházela z maximální koncentrace SIH, která byla dosažena po i.v. podání látky králíkům. Výsledky hodnocení stability obou měřených chelátorů jsou uvedeny v tabulce č.7 a 8. Pro porovnání byly použity hodnoty stability SIH publikované dříve [41]

**Tabulka 7 Stabilita AHC – INH v králíčí plazmě *in vitro***

Čas (min)	Koncentrace AHC-INH (%)				Průměrná koncentrace AHC-INH (%)
	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	Vzorek č.4	
0	100	100	100	100	<b>100</b>
20	90,87	96,17	88,03	106,91	<b>95,50</b>
40	84,32	86,94	92,48	91,30	<b>88,76</b>
60	71,58	79,60	86,03	88,58	<b>81,45</b>
90	76,77	75,09	81,35	74,67	<b>76,98</b>
120	68,32	69,58	63,75	79,44	<b>70,27</b>
180	56,52	64,78	70,47	61,90	<b>63,42</b>
240	57,10	63,05	63,57	60,93	<b>61,16</b>
300	52,80	65,83	65,16	66,76	<b>62,64</b>
360	54,37	60,70	58,03	55,69	<b>57,20</b>
420	53,72	60,48	64,06	58,58	<b>59,21</b>
480	47,15	55,53	50,24	50,59	<b>50,88</b>
540	47,91	55,12	58,37	58,38	<b>54,95</b>
600	44,44	53,71	53,04	52,97	<b>51,04</b>

**Tabulka 8** Stabilita 2,6DHAF-INH v králičí plazmě *in vitro*

Čas (min)	Koncentrace 2,6DHAF-INH (%)				Průměrná koncentrace 2,6DHAF- INH (%)
	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	Vzorek č.4	
0	100	100	100	100	<b>100</b>
20	83,42	84,74	73,08	80,40	<b>80,41</b>
40	65,04	70,31	68,13	70,01	<b>68,37</b>
60	55,39	58,62	54,52	57,48	<b>56,50</b>
90	40,89	44,63	40,71	42,84	<b>42,27</b>
120	40,30	41,71	37,07	36,97	<b>39,01</b>
180	17,71	20,54	18,13	18,48	<b>18,72</b>
240	8,92	9,68	8,35	9,11	<b>9,06</b>
300	5,78	6,04	4,84	5,39	<b>5,52</b>
360	4,05	3,38	2,39	3,23	<b>3,26</b>
420	2,38	2,35	1,68	1,80	<b>2,05</b>
480	1,10	1,17	0	1,23	<b>0,87</b>
540	0	0	0	0	<b>0</b>
600	0	0	0	0	<b>0</b>

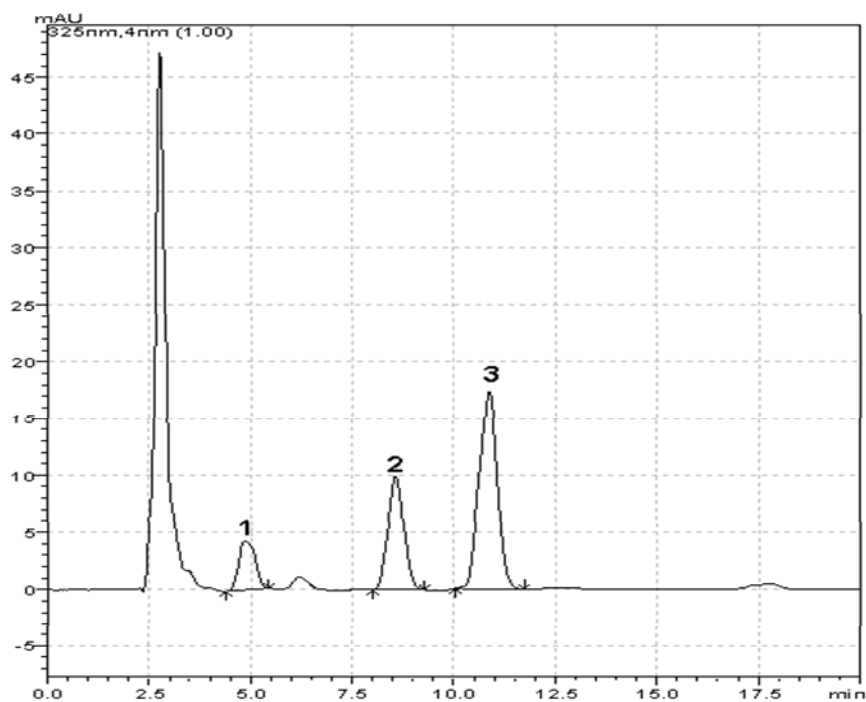


**Obr. 15** Závislost koncentrace AHC-INH, 2,6DHAF a SIH na čase v králičí plazmě *in vitro*.

Na (Obr. 15) je patrné, že koncentrace AHC-INH klesla po třech hodinách na 63% původního množství a po deseti hodinách na 51%. Zatímco v případě 2,6 DHAF-INH došlo k rychlejšímu rozkladu, kdy po třech hodinách klesla hodnota koncentrace na 18,7% z původního množství a po deseti hodinách až na 0%. Z výše uvedených hodnot je patrné, že chelátor AHC-INH je výrazně stabilnější než mateřská látka SIH, kde došlo k rozkladu po třech hodinách na 7,64% z počátečního množství. Druhý hodnocený derivát 2,6 DHAF-INH ukázal podobnou rychlost rozkladu jako SIH. Chromatografické záznamy z hodnocení stability po 20 minutách a na konci experimentu jsou uvedeny na obrázcích č. 16, 17, 18, 19.

Z výsledků je patrné, že náhrada výchozího aldehydu v molekule SIH za keton (2,6-dihydroxyacetofenon) v molekule 2,6 DHAF-INH nevedla k očekávanému zvýšení stability hydrazonové vazby v plazmě. Tento jev může být způsoben vzájemným bráněním mezi methylovou skupinou navázanou na uhlík hydrazonové vazby a jednou z hydroxylových skupin substituované v *ortho* poloze fenylu, což může vyvolávat narušení koplánárního postavení aromatického kruhu a hydrazonové vazby. Tato změna prostorového uspořádání může mít za následek snížení elektronové hustoty na C=N vazbě, což zrychluje její hydrolýzu [43].

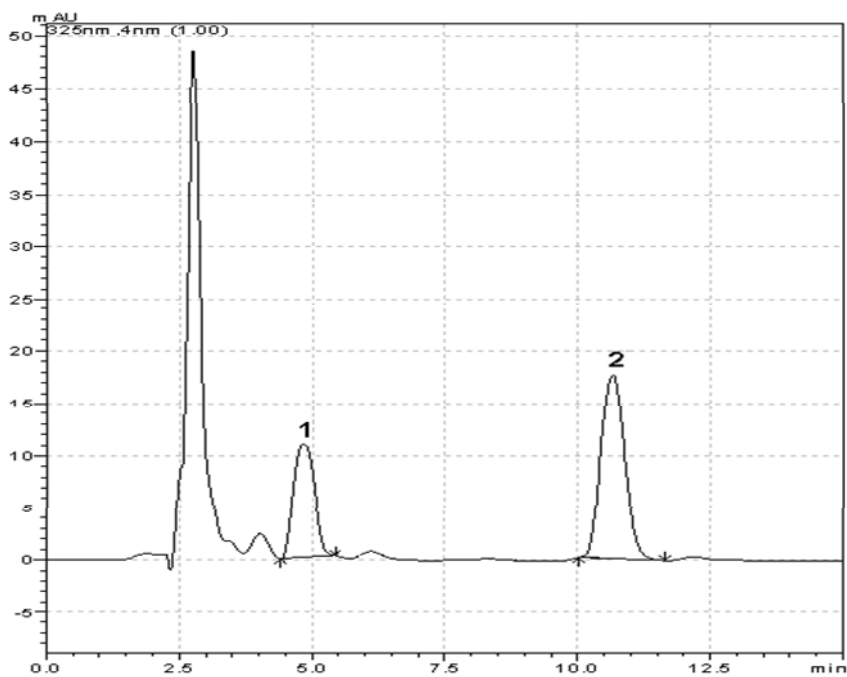
Naopak molekula AHC-INH prokázala zvýšenou stabilitu v plazmě oproti mateřské látce SIH, což je patrně způsobeno přítomností hydroxykumarinu, který stericky brání hydrazonovou vazbu a zpomaluje tak její degradaci.



**Obr. 16** Chromatogram hodnocení stability AHC-INH v čase 20 min.

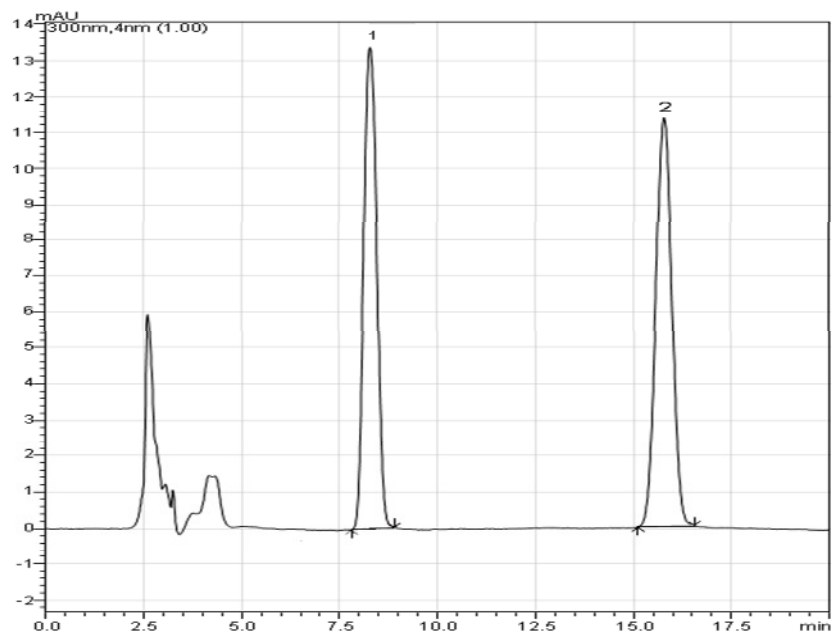
1 - Izomer AHC-INH,  $t_R = 4,83$  min; 2 - AHC- INH,  $t_R = 8,56$  min;

3 - SIH,  $t_R = 10, 86$  min



**Obr. 17 Chromatogram hodnocení stability AHC-INH v čase 600 min.**

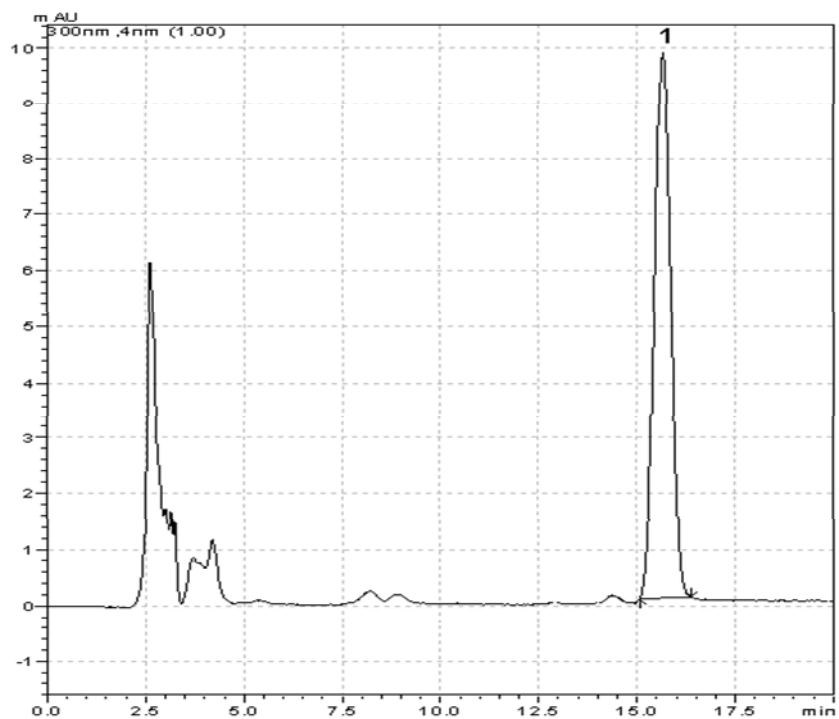
1 - Izomer AHC-INH,  $t_R = 4,83$  min; 2 - SIH,  $t_R = 10,66$  min.



**Obr. 18 Chromatogram hodnocení stability 2,6 DHAF-INH v čase 20 min.**

1 - 2,6 DHAF-INH,  $t_R = 8,27$  min; 2 - SIH,  $t_R = 15,78$  min





**Obr. 19** Chromatogram hodnocení stability 2,6 DHAF-INH v čase 600 min.

1 - SIH,  $t_R = 15,655$  min.

## 6. Závěr

V diplomové práci byly vypracovány optimální chromatografické podmínky pro analytické hodnocení dvou chelátorů 2,6 DHAF-INH a AHC-INH odvozených od SIH. Dále byla provedena částečná validace metod a následně hodnocení stability uvedených chelátorů v králičí plazmě.

U obou hodnocených chelátorů byla použita chromatografická kolona s reverzní fází LiChroCART<sup>®</sup> HPLC – cartridge LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP – 18e (5 $\mu$ m).

Jako nejvhodnější mobilní fázi při hodnocení chelátoru 2,6DHAF- INH byla zvolena směs fosfátového pufru o pH 6 s přídavkem EDTA a methanolu ve vzájemném poměru 47:53 (v/v). Detekce probíhala při vlnové délce 300 nm.

U chelátoru AHC-INH byla jako mobilní fáze zvolena směs fosfátového pufru o pH 6 s přídavkem EDTA a metanolu ve vzájemném poměru 50:50 (v/v).

Pro oba hodnocené chelátory byl zvolen průtok mobilní fáze kolonou na 1,0 ml/min a kolona byla nastavena na teplotu 25°C. Jako vnitřní standart byl zvolen SIH.

Vzorky plazmy byly před nástřikem na kolonu HPLC upraveny precipitační deproteinací acetonitrilem. U obou chelátorů byla také provedena validace metody s ohledem na linearitu, selektivitu, přesnost a správnost. Výsledky všech hodnocených validačních parametrů byly v rozmezí požadovaných limitů.

Studie stability byla prováděna po dobu 10 hodin a u chelátoru AHC-INH ukázala výrazně pomalejší rozklad oproti mateřské látce SIH. Druhý hodnocený chelátor 2,6 DHAF- INH byl v plazmě rozkládán obdobně jako SIH.

## 7. Abstrakt

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) se řadí mezi nejužívanější separační metody při kvantitativním a kvalitativním hodnocení léčiv. Tato práce se zabývá optimalizací chromatografické metody a její aplikaci při hodnocení stability dvou nových chelátorů železa 2,6 DHAF-INH a AHC-INH v králičí plazmě. Tyto deriváty byly nasyntetizovány z důvodu zvýšení stability jejich hydrazonové vazby oproti jejich mateřské látce salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH).

Nejlepšího rozlišení u obou hodnocených derivátů, jejich rozkladných produktů a vnitřního standartu (SIH) bylo dosaženo použitím chromatografické kolony s reverzní stacionární fází LiChroCART® HPLC – cartridge LiChrospher® 100 RP – 18e (5µm) s předkolonou. Mobilní fází při analyzování 2,6DHAF-INH byla vybrána směs fosfátového pufru (0,01 M vodný roztok NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O s 2 mM EDTA; pH 6.0) a methanolu v poměru 47:53(v/v). Detekce při vlnové délce 300 nm, průtok 1,0 ml/min, teplota na koloně 25°C. Mobilní fází pro AHC-INH byla zvolena směs fosfátového pufru (0,01 M vodný roztok NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O s 2mM EDTA; pH 6.0) a metanolu v poměru 50:50 (v/v). Detekce při vlnové délce 325 nm, průtok 1,0 ml/min, teplota na koloně 25°C.

Stabilita obou chelátorů prováděná po dobu 10 hodin v králičí plazmě při teplotě 37°C ukázala rozdílné výsledky. U AHC-INH byl zaznamenán po třech hodinách pokles koncentrace na 63% původního množství a po deseti hodinách na 51%, zatímco u 2,6 DHAF-INH došlo k rychlejší degradaci, kdy po třech hodinách klesla hodnota na 18,7% z původního množství a po deseti hodinách dokonce na 0%. Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že chelátor AHC-INH je výrazně stabilnější než mateřská látka SIH, u které došlo k rozkladu po třech hodinách na 7,64% z počátečního množství. Druhý hodnocený derivát 2,6DHAF-INH ukázal podobnou rychlost rozkladu jako SIH.

## 8. Abstract

High-performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most frequently used separation technique for quantitative and qualitative evaluation of drugs. The present paper deals with optimization of the chromatographic conditions and its application to evaluating the stability of two novel iron chelators 2,6DHAF-INH and AHC-INH in rabbit plasma. The derivatives were synthesized so as to increase stability of their hydrazone bond compared to their mother compound of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH).

The best differentiation of the two evaluated derivatives, products of their decomposition and internal standard (SIH) was achieved by means of a chromatographic column with a reverse stationary phase LiChroCART<sup>®</sup> HPLC – cartridge LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP – 18e (15 $\mu$ m) with a precolumn. The mobile phase for analysis of 2,6DHAF-INH was selected to be a mix of phosphate buffer (0.01 M aqueous solution NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O s 2 mM EDTA; pH 6.0) and methanol in 47:53(v/v) ratio. Detection at 300 nm wave length, flow 1.0 ml/min, column temperature 25 °C were used. The mobile phase for analysis of AHC-INH was selected to be a mix of phosphate buffer (0.01 M aqueous solution NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O s 2mM EDTA; pH 6.0) and methanol in 50:50(v/v) ratio. Detection at 325 nm wave length, flow 1.0 ml/min, column temperature 25 °C were used.

The stability of the two chelators pursued during 10 hours in rabbit plasma s at the temperature of 37 °C showed different results. A drop in concentration down to 63 % of the original amount was observed in AHC-INH in three hours and further down to 51 % in ten hours, while 2,6 DHAF-INH showed a more rapid degradation decreasing to as low as 18.7 % of the original quantity in three hours and falling down to 0 % in 10 hours. The results demonstrate that the AHC-INH chelator displays stability markedly superior to the maternal substance of SIH which decayed to 7.64 % of the original quantity in three hours. The other evaluated derivate 2,6DHAF-INH showed a similar rate of decay as SIH did.

## 9. Seznam použité literatury:

- [1] KARLÍČEK, R.; et al. *Analytická chemie pro farmaceuty*, Praha, Karolinum, 1995. ISBN 80-7184-095-5
- [2] CHURÁČEK, J.; JANDERA, P. *Separace látek - Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. 2.vyd., Praha, SNTL, 1986.
- [3] KLIMEŠ, J. et al.; *Kontrola léčiv I*. Praha 2006, Karolinum. s. 149. ISBN 80-2460-419-1
- [4] KLOUDA, P.; *Moderní analytické metody*, 2 vyd., Ostrava, Pavel Klouda, 2003, s. 9-25. ISBN 80-86369-07-2.
- [5] MAYER, V. R.; *Pitfalls and errors of HPLC in Picture*. New York, Wiley, 2013, s. 33. ISBN 978-35-2733-293-9
- [6] KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTO, R.; *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Wiley, 2007, ISBN 978-0-471-68162-5
- [7] SAGAR, G. V.; *Instrumental Methods of Drug Analysis*. Hyderabad, Global Media, 2009, s.106-136. ISBN 978-81-8844-976-8
- [8] KATZ, E.E.; SCHOENMAKERS, P.R.; *Handbook of HPLC*. CRC Press. New York USA, 1998, s. 1009. ISBN 9780824794446
- [9] GURDEEP, R.CH; MADHU, A.; *Analytical chromatography*. Mumbai, Global Media, 2006, s. 194. ISBN 978-81-8318-525-7.
- [10] SWARTZ, M.; Seeing in believing: Detectors for HPLC, *LC-GC North America*. 2010, vol. 28, no 10, s. 880-889. ISSN 1527-5949
- [11] DOUŠA, M.; <http://www.hplc.cz/Teorie/ELSD.htm>. ELSD - detektor. [cit. 2014-08-04]
- [12] KLIMEŠ, J.; et al.; *Kontrola chemických Léčiv II*. 1. vyd., Praha, Karolinum, 2004, s. 79 – 82. ISBN 80-246-0818-9.
- [13] SKOOG, A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; *Fundamentals of analytical chemistry*, 7.vyd. Orlando, USA, 1997.

- [14] FRIEDECKÝ, B.; ŠPRONGL, L.; KRATOCHVÍLA, J.; PLZÁK, Z.; Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. 2010.
- [15] JOINT COMMITTEE FOR GUIDES IN METROLOGY. International vocabulary of basic and general terms in metrology. 2008
- [16] POHANKA, M.; Základy statistiky laboratorních experimentů, *Vojenské zdravotnické listy*. 2010, vol.74, no 2, s. 60- 63.
- [17] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). 1994
- [18] HUBER, L. ; *Validation of Analytical Methods*. Německo, Alingent Technologies, 2010, s. 13- 41.
- [19] SUCHÁNEK, M.; *Kvalimetrie*, 10. Jakost v analytické laboratoři , EURACHEM-ČR, Praha 2000.
- [20] BABJUK, J.; PERLÍK, F.; ŠÍDLO, Z ; *Bioanalytika léků*, Praha, Avicenum, 1990, s. 28-67.
- [21] NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H.; A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Analytica Chimica Acta*, 2009, vol. 656 s. 8-35.
- [22] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L.; *Practical HPLC method development*. 2. vydání, New York, John Wiley & Sons, Inc., 1997, s. 110 -139.
- [23] THURMAN, E. M.; MILLS, M. S.; *Solid-Phase Extraction: Principles and Practise*, John Wiley & Sons, Inc., New York 1998. s. 1 -12.
- [24] SEDLÁČKOVÁ, T.; RACEK, J.; Metabolismus železa a jeho regulace, *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 2009, vol. 17, s.17-23.
- [25] SIAH, CH.W.; TRINDER, D.; OLYNYK, J. K.; Iron overload, *Clinica Chimica Acta*, 2005, vol. 358, s. 24-36. ISSN
- [26] FONTECAVE M.; PIERRE J.L.; Iron: Metabolism, toxicity and therapy. *Biochemie*. 1993, vol.75, s.767-773

- [27] PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K.; Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, vol.202, s.199-211.
- [28] ZHOU, T.; MA, Y.; KONG, X.; et al. Design of iron chelators with therapeutic application. *Dalton Transaction*. 2012, vol. 41, s. 6371–6389.
- [28] FLATEN, T.P.; AASETH, J.; ANDERSEN, O.; KONTOGHIOGHES, G.J. ; Iron mobilization using chelation and phlebotomy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2012, vol. 26, s. 127 – 130.
- [30] RICHARDSON, D.R.; The controversial role of deferiprone in the treatment of thalassemia. *The Journal of Laboratory and Clinical medicine*. 2001, vol.137, no.5, s.324–329.
- [31] CHASTON, T. B.; RICHARDSON, D. R.; Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease: Relationship Between Structure, Redox Activity, and Toxicity. *American Journal of Hematology*. 2003, vol. 73, s. 200–210.
- [32] LINDSEY, W. T.; OLINB, R.; Deferasirox for Transfusion-Related Iron Overload: A Clinical Review. *Clinical Therapeutics*. 2007, Vol. 29, No. 10, s. 2154-2166.
- [33] TAM, T. F.; LEUNG – TOUNG, R.; LI, W. at kol.; Iron chelator research: Past, Present and Future. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, vol. 10, s. 983 – 995.
- [34] LI, J.; ZHENG, L. M.; KING, I.; et al.; Syntheses and antitumor activities of potent inhibitors of ribonucleotide reductase: 3-amino-4-methylpyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone (3-AMP), 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone (3-AP) and its water-soluble prodrugs, *Current Medicinal Chemistry*. 2001, vol. 8, s. 121–133.
- [35] LE, N. T. V.; RICHARDSON, D. R.; The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, vol. 1603, s. 31–46.

- [36] PONKA, P.; BOROVA, J.; NEUWIRT, J.; FUCHS, O.; Mobilization of iron reticulocytes, Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. *FEBS Lett.* 1979, vol 97, s. 317.
- [37] KALINOWSKI, D.S.; RICHARDSON, R.; The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer. *Pharmacology Reviews.* 2005, vol.57, s. 547-583.
- [38] VITOLO, L. M. W.; HEFTER, G. T.; CLARE, B. W; WEBB, J.; Iron chelators of the pyridoxalisonictinoyl hydrazone class, Part II. Formation constants with iron(III) and iron(II), *Inorganica Chimica Acta.* 1990 vol. 170, s. 171–176.
- [39] LANGE, J. J.; GERŠL, V.; PONKA, P. et al.; SIH--a novel lipophilic iron chelator-protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2005, vol. 39, s. 345-354.
- [40] KLIMTOVÁ, I.; ŠIMŮNEK, T.; MAZUROVÁ, Y. et al.; A study of potential toxic effects after repeated 10-week administration of a new iron chelator—salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) to rabbits, *Acta Medica,* 2003, vol. 46, s.163–170.
- [41] KOVAŘÍKOVÁ, P.; KLIMEŠ, J.; ŠTĚRBA, M. et al.; Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehydeisonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an in vivo study. *Journal of Separation Science.* 2005, vol. 28, s. 1300-1306.
- [42] KOVAŘÍKOVÁ, P.; KLIMEŠ, J.; MRKVIČKOVÁ, Z.; Investigation of the stability of aromatic hydrazones in plasma and related biological material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedicinal Analysis.* 2008, vol. 47, s. 360-370.
- [43] HRUŠKOVÁ, K.; KOVAŘÍKOVÁ, P.; BENDOVÁ, P. et al.; Synthesis and Initial in Vitro Evaluations of Novel Antioxidant Aroylhydrazone Iron Chelators with Increased Stability against Plasma Hydrolysis. *Chemical Research in Toxicology.* 2011, vol. 24, s. 290-302.



- [44] VAVŘILOVÁ, T.; Stacionární fáze v afinitní chromatografii. *Chemické Listy*. 2005, vol. 99, s. 570 – 577.
- [45] KOVAŘÍKOVÁ, P.; VÁVROVÁ, K.; TOMALOVÁ, K. et al.; HPLC-DAD and MS/MS analysis of novel drug candidates from the group of aromatic hydrazones revealing the presence of geometric isomers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedicinal Analysis*. 2008, vol. 48, s. 295-302.
- [46] U.S.FDA;  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. [cit. 2014-9-18].