

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Diplomová práce

**Vývoj bioanalytické metody pro stanovení
nových potenciálních léčiv odvozených od
thiosemikarbazonu v biologickém materiálu**

Hradec Králové 2014

Vlasta Suprunová

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny použité informační zdroje jsem v práci řádně citovala. Dále prohlašuji, že jsem tuto práci nepoužila k získání jiného či stejného titulu.

V Čelechovicích dne 5. 5. 2014

.....
Vlasta Suprunová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli PharmDr. Jánů Stariatovi, PhD. a Doc. PharmDr. Petře Kovaříkové, PhD. za cenné rady, pomoc a trpělivost při vypracování diplomové práce a v neposlední řadě také mým rodičům za jejich podporu po dobu mého studia.

Tento projekt byl financován z grantu IGA MZ (NT 12403-3/2011) a grantů Univerzity Karlovy (GAUK - FaF/B-CH/85510 a FaF/B-CH/903113, SVV 260 062).

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	7
ÚVOD	9
TEORETICKÁ ČÁST	10
1. Chromatografické metody	10
2. Kapalinová chromatografie.....	11
2.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	11
2.1.1. Chromatografie na normální fázi	12
2.1.2. Chromatografie na reverzní fázi.....	12
2.1.3. Iontovýmienná chromatografie	13
2.1.4. Gelová permeační chromatografie	13
2.2. Schéma HPLC a charakteristika základních součástí HPLC	14
2.3. Kvalitativní analýza s využitím HPLC.....	16
2.4. Kvantitativní analýza s využitím HPLC.....	17
2.4.1. Metoda vnějšího standardu	17
2.4.2. Metoda vnitřního standardu	17
2.4.3. Kalibrační metoda	18
3. Hmotnostní spektrometrie.....	19
3.1. Schéma a charakteristika jednotlivých součástí MS	19
3.1.1. Iontový zdroj	19
3.1.2. Hmotnostní analyzátor	20
3.1.3. Detektor.....	23
3.2. Využití MS v analýze léčiv	24
4. Metody úpravy vzorků biologického materiálu.....	25
4.1. Extrakce.....	25
4.1.1. Extrakce kapalina-kapalina	25
4.1.2. Extrakce na pevné fázi	26

4.1.3.	Mikroextrakce	27
4.1.4.	Superkritická fluidní extrakce (SFE)	28
4.2.	Deproteinace.....	28
4.2.1.	Deproteinace chemickými činidly.....	29
4.2.2.	Deproteinace ultrafiltrací	29
5.	Železo v lidském organismu	30
5.1.	Význam železa v lidském organismu	30
5.2.	Homeostáza železa v normálních buňkách.....	30
5.3.	Homeostáza železa v nádorových buňkách.....	32
6.	Chelátory železa.....	33
6.1.	Charakteristika thiosemikarbazonů	34
6.2.	Thiosemikarbazony odvozené od DpT.....	35
6.3.	Thiosemikarbazony odvozené od BpT.....	35
	CÍL PRÁCE	37
	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
7.	Použité chemikálie, přístroje, chromatografický materiál, další pomůcky....	38
7.1.	Chemikálie.....	38
7.2.	Přístroje a chromatografický materiál	39
7.3.	Další pomůcky.....	39
8.	Příprava roztoků a úprava vzorků.....	40
8.1.	Příprava zásobních a pracovních roztoků.....	40
8.2.	Příprava vzorků s biologickým materiálem.....	40
8.3.	Úprava vzorků před HPLC analýzou	40
9.	Vývoj HPLC-MS/MS metody	41
10.	Prevalidace HPLC-MS/MS metody.....	43
10.1.	Linearita v plazmě	43
10.2.	Efekt matrice.....	43

10.3. <i>E/Z</i> přechody Bp4eT	43
11. Farmakokinetická studie	45
VÝSLEDKY A DISKUZE	46
ZÁVĚR	62
Abstrakt.....	63
Abstract	64
Seznam citací	65
Seznam příloh.....	68

Seznam použitých zkratek

ACNacetonitril
AmFmravenčan amonný
APCIchemická ionizace za atmosférického tlaku
APPIfotoionizace za atmosférického tlaku
BpT2-benzoylpyridin-3-thiosemikarbazon
Bp4eT2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazon
DMT1transportní protein pro železo na luminální straně enterocytu
Dp4pTdi-2-pyridylketon-4-fenyl-3-thiosemikarbazon
Dp44mTdi-2-pyridylketon-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon
DpCdi-2-pyridylketon-4-cyklohexyl-4-methyl-3-thiosemikarbazon
DpTdi-2-pyridylketon-3-thiosemikarbazon
EIelektronová ionizace
EMAEvropská léková agentura
ESIionizace elektrosprejem
FT-ICRiontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GCplynová chromatografie
GC-MSspojení hmotnostní spektrometrie s GC
GPCgelová permeační chromatografie
HPLCvysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS/MS	...spojení hmotnostní spektrometrie s HPLC
IEXiontovýměnná chromatografie

IR zářeníinfračervené záření

ISvnitřní standard

LC-MSspojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií

LLEextrakce kapalina-kapalina

LLOQdolní limit kvantifikace

LPMEkapalinová mikroextrakce

MALDIionizace laserem za účasti matrice

MEmikroextrakce

MShmotnostní spektrometrie

NMRnukleární magnetická rezonance

NP HPLCHPLC na normální fázi

RP HPLC.....HPLC na reverzní fázi

RRribonukleotidreduktáza

SFEsuperkritická fluidní extrakce

SPE.....extrakce na pevné fázi

SPMEmikroextrakce tuhou fází

SRMmonitorování vybraných reakcí

TfR receptory pro transferin

TOFanalyzátor doby letu

UV zářeníultrafialové záření

Úvod

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří v současné době mezi nejvyužívanější separační metody v oblasti analýzy léčiv. Její výhodou je v první řadě vysoká citlivost, selektivita a rychlost analýzy. K hojnému využití přispívá i možnost automatizace celého procesu analýzy, která usnadňuje každodenní činnost v laboratořích.

Velký rozkvět v oblasti analýzy léčiv zažívá HPLC především ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Toto spojení umožňuje díky vyšší citlivosti analyzovat složitější směsi, kam se bezesporu řadí biologický materiál, který neodmyslitelně patří k výzkumu nových léčiv.

I přes obrovský pokrok na poli protinádorové terapie patří nádorová onemocnění mezi nejčastější příčiny úmrtí v Evropě i na celém světě. Stále existují nádorová onemocnění, která jsou rezistentní vůči konvenční terapii. Proto se výzkum zaměřuje na nové skupiny protinádorových léčiv, kam patří i chelátory železa. V současné době je pro svou vysokou antiproliferativní aktivitu intenzivně studována skupina thiosemikarbazonů řadící se mezi chelátory železa, ačkoliv mohou mít i jiné terapeutické využití (léčba neurodegenerativních onemocnění, infekčních onemocnění aj.). Tato práce se zabývá právě jedním ze zástupců thiosemikarbazonů, 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazonem (Bp4eT).

Navzdory intenzivnímu studiu těchto látek není k dispozici vhodná bioanalytická metoda pro kvantifikaci Bp4eT v biologickém materiálu a nejsou prozatím k dispozici žádná validní data o metabolismu Bp4eT *in vivo*. Proto bylo cílem práce vyvinout a ověřit základní validační parametry HPLC-MS/MS metody pro stanovení Bp4eT a jeho hlavních metabolitů v plazmě potkana a následně ji využít k analýze vzorků z pilotního *in vivo* experimentu na potkanech a získat tak vůbec první farmakokinetická data o Bp4eT.

Teoretická část

1. Chromatografické metody

Chromatografie je řazena mezi fyzikálně-chemické separační metody. Jednotlivé složky směsi se při ní distribuují mezi dvě fáze, které se od sebe liší některou z fyzikálně-chemických vlastností (např. polaritou). Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá a svým tokem unáší samotný vzorek. Složky směsi, které jsou pevněji poutány ke stacionární fázi, se pohybují pomaleji a jsou déle zadržovány než složky, které jsou ke stacionární fázi vázány slaběji. Na tomto principu jsou založeny všechny chromatografické metody.

Chromatografické metody klasifikujeme podle několika různých hledisek:

- a) **principu dělení složek směsi** na *adsorpční* (rozdílná adsorpce na povrch stacionární fáze), *rozdělovací* (rozdílná rozpustnost ve dvou nemísitelných kapalinách), *gelovou* (rozdílná průchodnost otvory a výklenky stacionární fáze), *iontově výměnnou* (rozdílná přitažlivost odlišně nabitých iontů a *afinitní* chromatografii (rozdílná afinita k ligandu navázaného na stacionární fázi)(1)
- b) **uspořádání stacionární fáze** na chromatografii *kolonovou*, *kapilární*, *tenkovrstvou* a chromatografii *na papíře*(1)
- c) **účelu použití** na chromatografii *preparativní* (separuje od sebe složky vzorku, které se dále zpracovávají a využívají, pracuje s větším množstvím vzorku) a *analytickou* (využívá se k identifikaci a kvantifikaci složek směsi, pracuje s minimálním množstvím vzorku)(1)
- d) **pracovního způsobu** na chromatografii *eluční* (eluční činidlo promývá kolonu a vymývá ze stacionární fáze zachycené analyty; je to nejčastější pracovní způsob), *frontální* (elučním činidlem je vzorek, na stacionární fázi se zadržují nežádoucí příměsi obsažené ve vzorku) a *vytěšňovací* (např. afinitní chromatografie)(1)
- e) **skupenství mobilní fáze** na chromatografii *kapalinovou*, *plynovou*, *fluidní* (mobilní fází je superkritická kapalina) a *plazmovou* (mobilní fází je proud iontů)(1)

2. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie patří mezi chromatografické metody, kde mobilní fáze tvoří kapalina. Je založena na principu rozdílných interakcí složek analyzované směsi s mobilní a stacionární fází. Látky s nižší afinitou k povrchu stacionární fáze jsou méně zadržovány a rychleji vymývány než složky s vyšší afinitou. Stejně tak složky s vyšší afinitou k mobilní fázi jsou méně zadržovány na povrchu stacionární fáze než složky s nižší afinitou k mobilní fázi. Tato afinita ke stacionární fázi závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech analyzovaných látek, stacionární fáze a mobilní fáze, na složení, polaritě a pH mobilní fáze. (2)

První zmínky o kapalinové chromatografii pochází již z roku 1903, kdy ruský botanik M.S. Tswett uskutečnil experiment, v němž se mu podařilo pomocí rozdílné adsorpce složek směsi na uhličitán vápenatý ve skleněné koloně separovat směs barevných pigmentů z rostlinných chloroplastů. Později tuto metodu nazval právě podle tohoto experimentu: „chromatografie“. I přes velmi působivé výsledky se metoda neujala a na dalších několik desítek let zůstala zapomenuta. Až ve 40. letech 20. století byla kapalinová chromatografie znovu objevena a blíže studována v několika významných analytických experimentech, za jejichž výsledky autoři získali Nobelovu cenu. V 60. letech 20. století se začaly vyvíjet nové typy kolon tak, aby došlo ke snížení odporu kolony kladeného vůči toku mobilní fáze a aby byl umožněn nepřetržitý průtok mobilní fáze přes fázi stacionární. Tím byl položen základní kámen vzniku vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). (2)

2.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se od běžné sloupcové kapalinové chromatografie odlišuje vysokotlakým čerpadlem, které umožňuje průtok mobilní fáze kolonou malého průměru. HPLC patří v 21. století i přes neustálý vývoj v oblasti analytických metod mezi nejvyužívanější a nejúčinnější separační metody v oblasti farmaceutického výzkumu i analýzy. Přispívá k tomu hned několik faktorů: vysoká separační účinnost, rychlost, specifita, selektivita a především možnost jak kvalitativní analýzy (identifikace), tak kvantitativní analýzy (stanovení obsahu), a vývoj nových speciálních typů stacionárních fází,

kteře dále rozšiřují možnosti využití HPLC. Podle převládajících molekulárních interakcí analyzovaných látek se stacionární a mobilní fáze rozlišujeme čtyři základní typy HPLC: (2)

- *Chromatografie na normální fázi* (Normal-Phase Chromatography, NP)
- *Chromatografie na reverzní fázi* (Reversed-Phase Chromatography, RP)
- *Iontovyměnná chromatografie* (Ion Exchange Chromatography, IEX)
- *Gelová permeační chromatografie* (Gel Permeation Chromatography, GPC)

2.1.1. Chromatografie na normální fázi

První experimenty s kapalinovou chromatografií byly založeny právě na tomto uspořádání, které se označuje jako tzv. „normální fáze“. Platí zde obecný princip kapalinové chromatografie: čím jsou interakce mezi mobilní a stacionární fází silnější, tím jsou analyty méně zadržovány a rychleji eluovány. V případě chromatografie na normální fázi se jedná o kompetitivní proces, při němž molekuly analytu soupeří s molekulami mobilní fáze o adsorpci na povrch stacionární fáze. (2)

Mobilní fázi tvoří hydrofobní nepolární rozpouštědla, nejčastěji uhlovodíky se středně dlouhým řetězcem (hexan, heptan) s minimálním přídavkem polárních látek (některé nízkomolekulární alkoholy – např. methanol). Za stacionární fázi je většinou volen silikagel nebo jeho hliníkatý analog, což jsou porézní zesítené molekuly oxidu křemíku a hliníku. Povrch stacionární fáze je hustě pokrytý polárními hydroxylovými skupinami. Pro NP HPLC lze také využít chemicky modifikované silikagely s navázanými dvou až tříuhlíkatými řetězci zakončenými polárními funkčními skupinami. Takové uspořádání se úspěšně využívá k separaci vysoce hydrofobních sloučenin, které jsou dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech a nerozpustné ve vodných a polárních rozpouštědlech. Příkladem může být separace směsi lipidů. (1)

2.1.2. Chromatografie na reverzní fázi

Reverzní fáze (RP) jsou nejčastěji volenými stacionárními fázemi. Až 90% všech HPLC analýz vzorků s nízkou molekulární hmotností probíhá právě na reverzní fázi. Princip rozdělování zde probíhá stejně jako u NP HPLC, jedná se o rozdílnou

adsorpci analytu a mobilní fáze na povrch stacionární fáze. Srovnáme-li RP HPLC s NP-HPLC, její rozložení je přesně opačné. Mobilní fáze je polární, tvořena převážně vodnými roztoky, naopak povrch stacionární fáze je hydrofobní. Mezi analyzovanou látkou, mobilní fází a stacionární fází vznikají slabší hydrofobní interakce nebo van der Waalsovy síly. (2)

Jako mobilní fáze se využívá nejčastěji alkoholů (methanol), acetonitrilu a jejich směsí s vodou. Stacionární fáze využívané v RP HPLC jsou porózní pevné materiály s hydrofobním povrchem, často to bývají chemicky modifikované silikagely s navázanými hydrofobními zbytky: od lineárních uhlíkatých řetězců (C8, C18) přes aromatické kruhy až po heterocykly. Čím je větší povrch stacionární fáze, tím delší je retenční analytů na koloně a účinnější separace. Největší výhodou reverzních fází je jejich schopnost separovat strukturně velmi podobné sloučeniny. (1)

2.1.3. Iontovýmienná chromatografie

Princip iontovýmienné chromatografie (IEX) spočívá ve vzájemné afinitě jednotlivých iontů analytu k opačně nabitým iontům na stacionární fázi, kterou tvoří buď určitý typ pryskyřice s iontovými centry, nebo protiionty adsorbované na hydrofobní stacionární fázi. Typickou stacionární fází typu pryskyřice je zesítený styren-divinylbenzen a nejčastějšími centry bývá karbonát, sulfát nebo terciární či kvartérní amin. (2)

Selektivita a retenční analytů při IEX HPLC striktně závisí na pH a iontové síle mobilní fáze, proto je důležité udržovat během celé analýzy konstantní hodnotu pH a správně zvolit mobilní fází tak, aby nedošlo k nežádoucímu ovlivnění analýzy. (2)

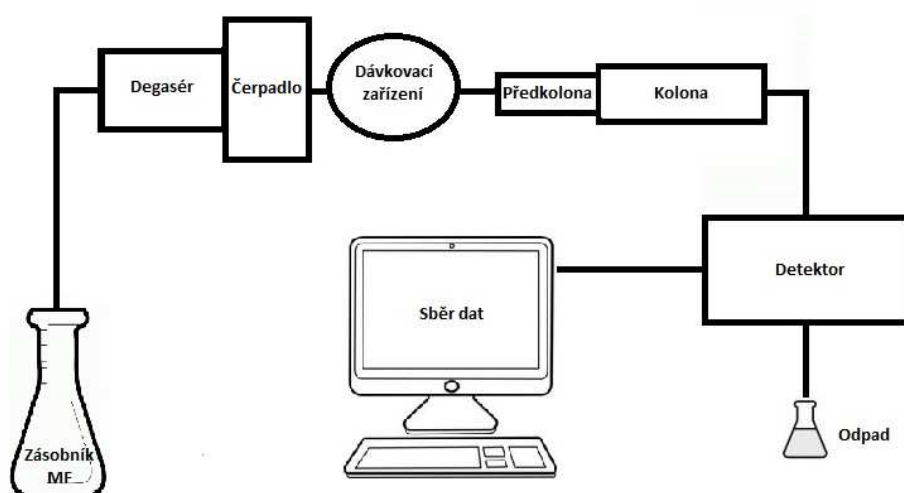
2.1.4. Gelová permeační chromatografie

Při gelové permeační chromatografii (GPC) dochází k separaci molekul analyzované směsi v závislosti na jejich velikosti a v některých případech i na jejich molekulové hmotnosti. Je to jediná chromatografická metoda, kde jsou vzájemné interakce mezi stacionární fází a analytem nežádoucí, neboť mohou negativně ovlivnit průběh celé analýzy. Aby se předešlo nežádoucí retenci analytu na stacionární fázi, je potřeba pečlivě vybírat mobilní a stacionární fází tak, aby se

molekuly mobilní fáze silněji vázaly na stacionární fázi a znemožnily tak vazbu molekul analytu. GPC se využívá k separaci velkých molekul a makromolekul, jako jsou bílkoviny nebo polymerní látky. (2)

2.2. Schéma HPLC a charakteristika základních součástí HPLC

HPLC sestava se obvykle skládá z těchto hlavních součástí: zásobníky mobilní fáze, degasér, čerpadla, dávkovací ventil, kolona, detektor, zařízení pro sběr a ukládání dat a kontrolu systému.(3)Podrobné schéma HPLC soustavy je zachyceno a popsáno na Obr. 1.



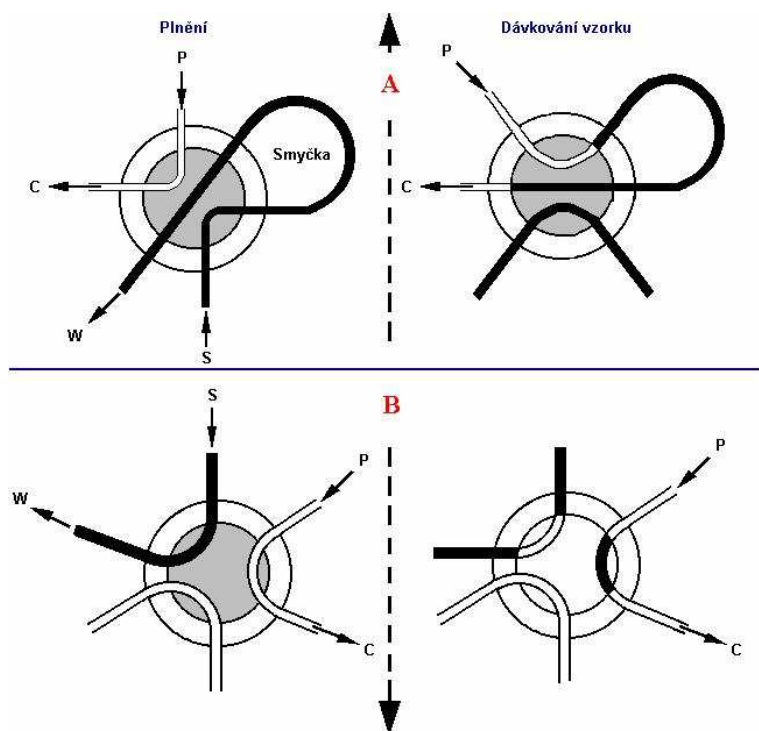
Obr.1 Schéma HPLC systému

Zásobníky mobilní fáze slouží k zabezpečení dostatečného množství mobilní fáze pro danou analýzu. Nejčastěji jsou součástí HPLC sestavy alespoň tři zásobníky mobilní fáze. Mobilní fáze je vedena ze zásobníku do dalších částí HPLC přes tzv. degasér. Je to zařízení, které slouží k odstranění plynu obsaženého v mobilní fázi ve formě bublin. Obsah plynu v mobilní fázi by mohl narušit správný průběh analýzy a poškodit analytickou kolonu. K odplynění mobilní fáze se zpravidla využívá vakuum. (3)

Vysokotlaká čerpadla jsou výrobně nejnáročnější součástí HPLC sestavy. Pohání mobilní fázi ze zásobníku směrem ke koloně a k detektoru. Zaručí plynulý a kontinuální průběh analýzy, který je nezbytný k zajištění přesnosti a reprodukovatelnosti analýzy. Ta nejmodernější čerpadla umožňují také smíchání více různých složek mobilní fáze z odlišných zásobníků. Mimo jiné čerpadla umožňují tzv. gradientovou eluci. To znamená, že se v průběhu jedné analýzy

plynule mění poměr složek mobilní fáze. Gradientová eluce se využívá k urychlení separace látek silně zadržovaných na koloně. Pokud složení mobilní fáze v průběhu jedné analýzy zůstává neměnné, jedná se o izokratickou eluci. (3)

Dávkovací ventil zajišťuje vstřikování vzorku do proudu mobilní fáze těsně před vstupem do kolony. Nejpoužívanějšími dávkovacími ventily jsou šesticestný a smyčkový ventil, jejichž princip je znázorněn na Obr. 2. Hojně se využívá také tzv. „autosamplerů“, automatických dávkovačů, které lze naprogramovat tak, aby vstříkovaly na kolonu různé objemy vzorků, které automaticky odebírají z vialek umístěných v zásobníku. (4)



Obr.2 a) Smyčkový ventil, b) Šesticestný ventil(5)

Kolona je nejdůležitější součástí HPLC sestavy. Probíhá na ní vlastní separace jednotlivých složek směsi. V koloně dochází ke kontaktu mobilní fáze s fází stacionární, která má velký povrch a vyplňuje vnitřní prostor kolony. Je to zpravidla ocelová trubice s variabilní délkou (5 - 25 cm pro analytickou kolonu) a vnitřním průměrem (3-6 mm pro analytickou kolonu), která je vyplněna sorbentem s částicemi o různé velikosti (nejčastěji 3 - 10 μm) s velkým povrchem. Náplň kolony může být silikagel (u NP), chemicky modifikovaný silikagel s navázanými dlouhými hydrofobními alkylovými řetězci C8 a C18 (u RP) nebo s dvou až tříuhlíkatými řetězci s polárními funkčními skupinami (u NP),

iontoměniče (u IEX), chirální stacionární fáze pro chirální separace či modifikovaný ZrO_2 . (4)

Detektor zaznamenává změnu určité fyzikální veličiny po průchodu eluentu. Rozlišujeme několik typů detektorů, z nichž nejpoužívanější je UV detektor ze skupiny spektrofotometrických detektorů, který zachycuje změnu absorbance vybraných vlnových délek v průběhu analýzy způsobenou průchodem molekul studovaného analytu. Dále se využívají detektory elektrochemické (zachycují změnu elektrické veličiny, např. elektrodového potenciálu, proudu nebo kapacity), fluorimetrické (zachycují změnu fluorescence), refraktometrické (zachycují změnu lomu světla) nebo hmotnostní (zachycují m/z vybraných iontů). (4)

Zpracování naměřených dat a kontrolu HPLC soustavy zajišťuje počítačový systém, který kontroluje veškeré nastavené parametry HPLC sestavy (tlak, teplota, složení mobilní fáze apod.), shromažďuje naměřená data zachycená detektorem z každé analýzy a ukládá je do předem zvolené složky v počítači. (4)

2.3. Kvalitativní analýza s využitím HPLC

Kvalitativní analýza slouží k identifikaci analytů. Samotná kapalinová chromatografie není optimálním nástrojem kvalitativní analýzy, avšak dobře vybavená HPLC sestava ve spojení s vhodným detektorem může být při kvalitativní analýze velmi užitečná. Vždy je jednodušší dokázat odlišnost dvou podobných sloučenin, než dokázat, že dané dvě sloučeniny jsou totožné. (3)

Kvalitativní analýza využívá nejčastěji dvou parametrů: porovnání retenčních časů a porovnání UV spekter. Často jsou však strukturní rozdíly dvou podobných sloučenin natolik zanedbatelné, že je ani retenční časy a UV spektra neodhalí. V takových případech se přistupuje k identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie, NMR nebo jiných technik, které jsou pro identifikaci struktury vhodnější. (3)

Retenční čas je nejčastěji používaný parametr pro určení identity. Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku na kolonu do dosažení maxima eluční křivky. Za totožných podmínek analýzy by měl být retenční čas analytu neměnný. Pro důkaz totožnosti je nezbytné, aby retenční čas analytu byl v rozmezí retenčního času referenční látky. Ani v tomto případě ale není jisté, že se

referenční látka shoduje s analytem. Ačkoliv je retenční čas pro danou sloučeninu charakteristický, není jedinečný. (3)

Další možností, jak zjistit totožnost analytu, je porovnání UV spekter naměřených UV detektorem s UV spektrem referenční látky. (3)

2.4. Kvantitativní analýza s využitím HPLC

Kvantitativní analýza slouží ke stanovení obsahu analytů ve vzorcích. Existuje několik metod kvantitativní analýzy, z nichž nejvýznamnější je metoda vnějšího standardu, metoda vnitřního standardu a kalibrační metoda.(6)

2.4.1. Metoda vnějšího standardu

Vnější standard je zpravidla standard stanovované látky. Nejprve se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a poté se na kolonu nastříkne roztok vnějšího standardu. Koncentrace stanovovaného analytu se vypočítá jako poměr plochy (příp. výšek) píku analytu a plochy (příp. výšky) píku vnějšího standardu. Koncentraci analytu ve vzorku lze vypočítat podle následující rovnice:

$$c(vz) = \frac{c(st) \cdot A(vz)}{A(st)}, \text{ kde } c(vz) \text{ je koncentrace analytu ve vzorku, } c(st) \text{ je}$$

koncentrace analytu v roztoku standardu, $A(vz)$ je plocha píku analytu ve vzorku a $A(st)$ je plocha píku analytu v roztoku standardu.(6)

2.4.2. Metoda vnitřního standardu

Tato metoda se využívá k analýzám, kde se předpokládá určitá ztráta vzorku v průběhu jeho úpravy (např. při LLE, SPE). Jako vnitřní standard (IS) je vybrána látka, která je eluována v blízkosti píků stanovovaných analytů (má podobnou strukturu s analyty), musí mít podobnou koncentraci a musí být chemicky inertní. Ke známému objemu vzorku je přidáván definovaný objem IS a po promíchání a úpravě vzorku se nastříkne na kolonu. Stejný postup se zopakuje s roztoky standardů a připravený vzorek se taktéž nastříkne na kolonu. Tato metoda je přesnější než metoda vnějšího standardu. Koncentraci analytu lze vypočítat podle následující rovnice:

$$c(vz) = \frac{A(vz)/A(IS)vz}{A(st)/A(IS)st} \cdot c(st), \text{ kde } c(vz) \text{ je koncentrace analytu ve vzorku,}$$

$c(st)$ je koncentrace analytu v roztoku standardu, $A(vz)$ je plocha píku analytu ve vzorku, $A(IS)vz$ je plocha píku IS ve vzorku, $A(st)$ je plocha píku analytu v roztoku standardu a $A(IS)st$ je plocha píku IS v roztoku standardu. (6)

2.4.3. Kalibrační metoda

Kalibrační metoda se vyhodnocuje sestavením kalibrační křivky, která vyjadřuje závislost odezvy detektoru (plocha píku nebo poměr plochy píku analytu a IS) na koncentraci analytu. Tato kvantifikační metoda se často využívá v případě analýzy vzorků biologického materiálu. Připraví se série kalibračních vzorků obsahujících různou koncentraci vzorku (z konkrétního koncentračního rozmezí). Analýza těchto vzorků se graficky vyhodnotí. Na osu x je vynesena koncentrace analytu ve vzorku, na osu y je vynesena plocha píku analytu. Z grafu závislosti odezvy detektoru na koncentraci analytu vzejde rovnice křivky, podle níž je možné vypočítat koncentraci analytu v analyzovaném vzorku. Také se stanoví tzv. koeficient determinace r^2 , který číselně vystihuje těsnost závislosti a nabývá hodnot od 0 do 1. Čím blíže je r^2 hodnotě 1, tím menší jsou odchylky hodnot od dané závislosti. (7) Často se kalibrační metoda kombinuje s metodou vnitřního standardu. V takovém případě se na osu y vynáší poměr plochy píku analytu a IS. Následující rovnice vyjadřuje výpočet koncentrace analytu kalibrační metodou, je-li závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu lineární:

$$y = ax + b \rightarrow x = \frac{(y-b)}{a}, \text{ kde } y \text{ vyjadřuje plochu píku analytu, resp.}$$

poměr plochy píku analytu a IS; a je směrnice přímky, x vyjadřuje koncentraci analytu a b je intercept.

3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda využívající ionizaci molekul k jejich rozlišení podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Historie hmotnostní spektrometrie sahá až do počátku 20. století, většího rozkvětu se jí však dostalo až koncem 50. let 20. století, kdy byla poprvé spojena s plynovým chromatografem (GC-MS) a využita jako detektor. Až v 70. letech 20. století byl proveden první pokus o spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovým chromatografem (LC-MS). LC-MS se od té doby stalo nepostradatelným pomocníkem téměř ve všech přírodovědných odvětvích. (2)

3.1. Schéma a charakteristika jednotlivých součástí MS

Mezi základní části každého hmotnostního spektrometru patří iontový zdroj, hmotnostní analyzátor (nebo také hmotnostní filtr) a detektor, který detekuje ionty po jejich separaci a určuje intenzitu jednotlivých iontů (koncentraci).

3.1.1. Iontový zdroj

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul na nabitě ionty (k ionizaci), protože jen nabitě částice je možné analyzovat. Nejčastěji se setkáme s následujícími typy iontových zdrojů:

EI (Elektronová ionizace) je tzv. „tvrdá“ ionizační technika, při níž dochází ke kolizi molekul s proudem elektronů. Během kolize dojde k fragmentaci analyzovaných částic na menší nabitě i nenabitě částice. Ionizace probíhá v prostředí vakua. Tento typ se používá ve spojení s GC. (2)

ESI (Ionizace elektrosprejem) je nejšetrnější ionizační technika, která probíhá za atmosférického tlaku. Řadí se mezi tzv. „měkké“ ionizační techniky a využívá se nejčastěji pro spojení s HPLC. Do iontového zdroje je kapilárou přiváděn eluent z HPLC a pomocí zmlžovacího plynu z něj vznikají kapky aerosolu. Na přívodnou kapiláru je vloženo napětí, které nabíjí kapky aerosolu. Po odpaření rozpouštědla se kapky zmenšují a zvyšuje se hustota náboje na povrchu částic, až dojde k tzv. Coulombické explozi a uvolnění iontů, které jsou urychleny a usměrněny k analyzátoru. (2)

APCI (Chemická ionizace za atmosférického tlaku) je další z tzv. „měkkých“ ionizačních technik využívající se pro spojení s HPLC. Ionizace probíhá taktéž za atmosférického tlaku. Na elektrodu je přiváděno vysoké napětí. Vzniklý výboj ionizuje nejprve molekuly mobilní fáze, které jsou zde v nadbytku, a až následně se ionizují molekuly analytu. Ionty jsou poté urychleny k analyzátoru.(2)

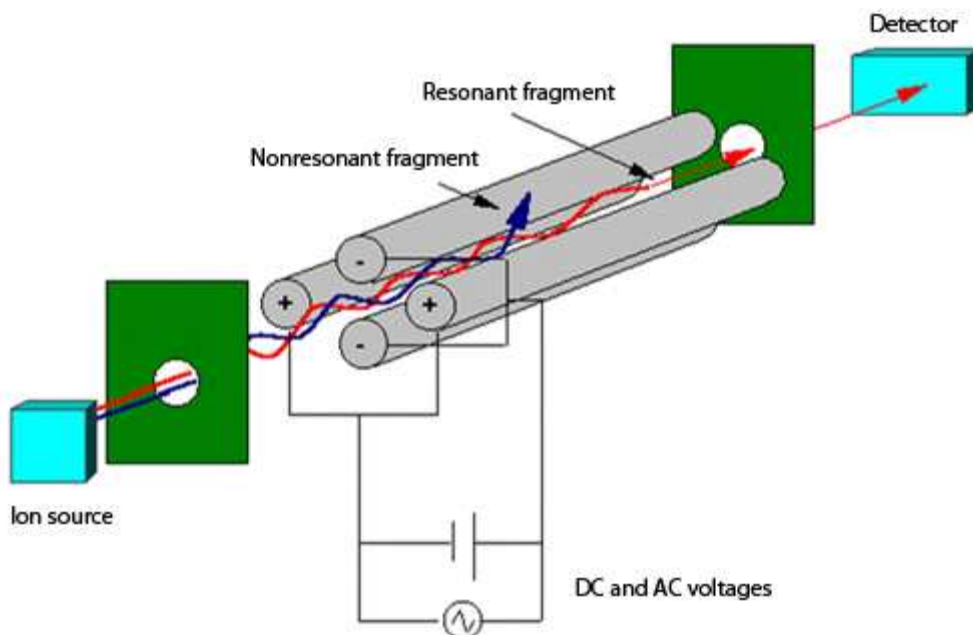
APPI (Fotoionizace za atmosférického tlaku) je analogická technika k APCI. Jediný rozdíl je v tom, že zde nevzniká výboj. Molekuly analytu jsou ionizovány pomocí UV záření, aniž by byly nejprve ionizovány molekuly mobilní fáze. Zdrojem UV záření je kryptonová výbojka. Tento typ iontového zdroje se využívá pouze minoritně.(2)

MALDI (Ionizace laserem za účasti matrice) je spojena výhradně s analyzátozem doby letu (TOF). Rozpuštěný vzorek se smísí s vhodnou matricí, která je schopna absorbovat UV nebo IR záření. Matrice absorbuje energii z krátkého laserového impulzu, která se dále přenáší ve formě fotonu na analyt. Po ionizaci dojde k desorpci iontů z matrice.(2)

3.1.2. Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor je zařízení, které slouží k separaci iontů na základě jejich m/z (poměru hmotnosti a náboje). Dominantní uplatnění v LC-MS mají ze všech následujících typů analyzátorů kvadrupól a iontová past.

Kvadrupól se skládá ze 4 stejných kovových tyčí s kruhovým průřezem o délce 20-30 cm. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbylé dvě tyče záporné stejnosměrné napětí. Na všechny čtyři kovové tyče je následně superponováno střídavé vysokofrekvenční napětí. Z iontového zdroje jsou přivedeny nabitě částice vzorku do středu osy kvadrupólu, kde začnou oscilovat. Pouze pro ionty o určitém poměru m/z jsou tyto oscilace v daný okamžik pro určitý poměr střídavého a stejnosměrného napětí stabilní. A pouze tyto ionty projdou skrz kvadrupól až na detektor. Ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou poměru střídavého a stejnosměrného napětí jsou všechny ionty postupně dopraveny na detektor(Obr. 3).(2)

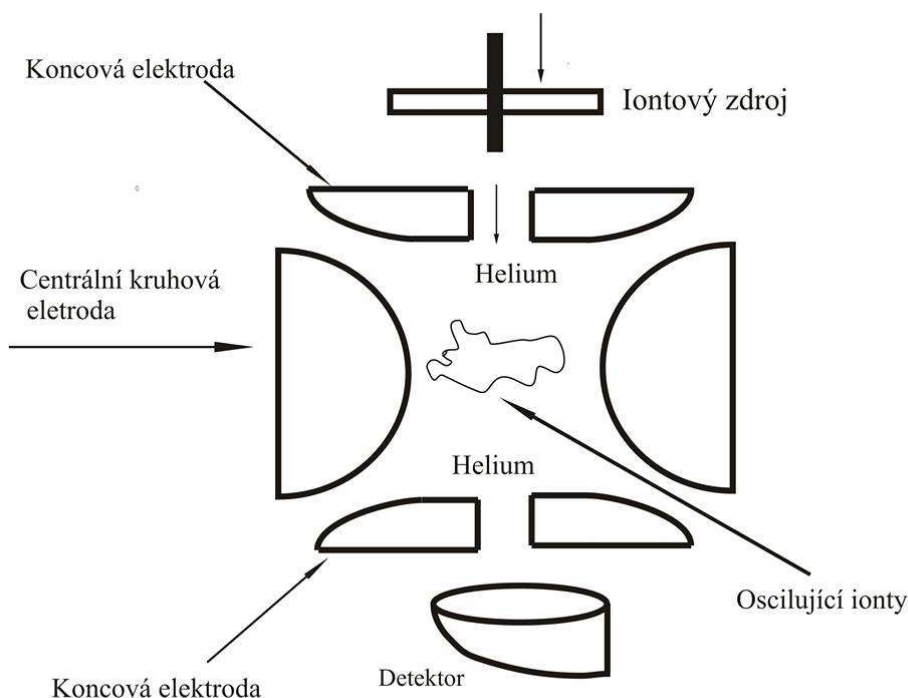


Obr.3 Schéma kvadrupólu(8)

Trojité kvadrupól vznikne sériovým zapojením tří klasických kvadrupólů. První z nich slouží jako analyzátor pro určitý poměr m/z , ve druhém, nazývaném „kolizní cela“, dochází k fragmentaci těchto vybraných iontů m/z na menší nabitě částice (tzv. MS^2), z nichž je ve třetím kvadrupólu oddělen jen fragment o konkrétním poměru m/z , který je následně přiveden na detektor. Jelikož může existovat více různých sloučenin se stejnou hodnotou poměru m/z , je použití tohoto analyzátoru jednou z možností, jak zvýšit selektivitu analytické metody, pokud víme, jak analyzovaná sloučenina fragmentuje. (2)

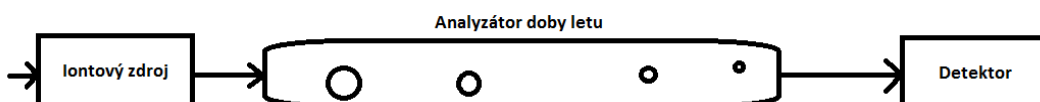
Iontová past je typ hmotnostního analyzátoru, který se skládá z centrální kruhové elektrody a dvou postranních koncových elektrod. Na elektrody je vkládán opět určitý poměr střídavého a stejnosměrného napětí. Do prostoru mezi elektrodami jsou přivedeny z iontového zdroje nabitě částice, které se tu kumulují a poté jsou postupně vypouštěny výstupním otvoremk detektoru podle jejich poměru m/z . Iontová past umožňuje mnohonásobnou fragmentaci (MS^n) a izolaci preferovaného fragmentu, avšak oba procesy probíhají narozdíl od trojitého kvadrupólu v jednom prostoru. Nejprve jsou izolované ionty v pasti fragmentovány a poté je požadovaný fragment izolován. Celý proces se takto může donekonečna opakovat, avšak s každou další fragmentací klesá citlivost detekce, neboť vznikají stále menší a méně specifické fragmenty a snižuje se

odezva detektoru, proto se v praxi využívá maximálně čtyřnásobná fragmentace (MS^5). Izolovaný fragment je poté vypuštěn na detektor (Obr. 4). (2)



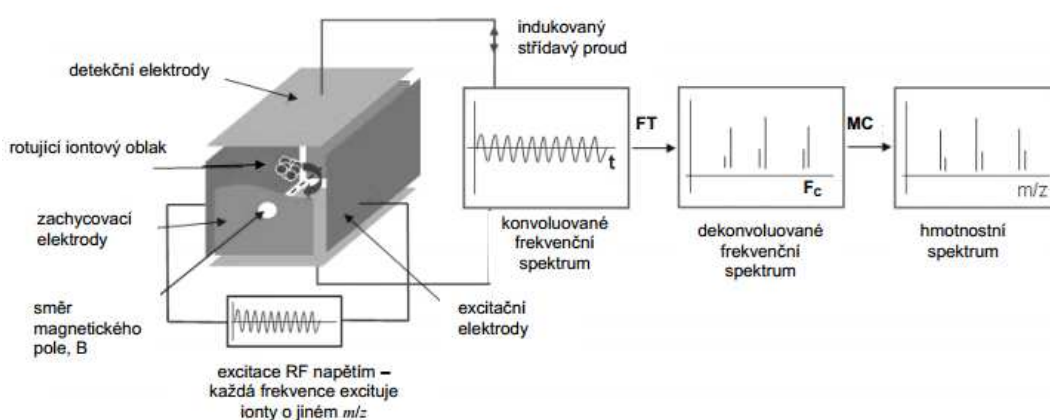
Obr.4 Schéma iontové pasti

Analyzátor doby letu (TOF analyzátor) pracuje na principu závislosti rychlosti pohybu částic na hodnotě m/z . Částicím, které jsou do analyzátoru přivedeny z iontového zdroje, je na počátku udělena stejná kinetická energie. Ionty s nižším poměrem m/z se pohybují rychleji než ionty s vyšším poměrem m/z a dostanou se díky tomu rychleji na detektor (Obr. 5). Čím delší vzdálenost ionty urazí, tím lépe se od sebe oddělí. Proto jsou kladeny relativně vysoké požadavky na velikost analyzátoru. Z tohoto důvodu se často využívá tzv. zrcadlového uspořádání, kdy je na konci dráhy umístěno tzv. iontové zrcadlo, od něhož se částice odrazí a pokračují opačným směrem k detektoru. Ionty tak mají k dispozici dvojnásobně dlouhou dráhu, která zajišťuje účinnější analýzu. (2)



Obr.5 Schéma TOF analyzátoru

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) se od ostatních typů hmotnostních analyzátorů jednoznačně liší svým principem. Skládá se z centrální cylindrické cely, která je umístěna uprostřed silného magnetického pole. Pokud se do tohoto pole dostanou ionty, začnou se pohybovat po uzavřených kruhových trajektoriích s určitou cyklotronovou frekvencí (Obr. 6). V tomto tzv. cyklotronu každá hodnota m/z odpovídá konkrétní cyklotronové frekvenci. Tato frekvence se poté přepočítá pomocí Fourierovy transformace na hodnotu m/z . Částice s nižším poměrem m/z mají vyšší cyklotronovou frekvenci a naopak. (2)



Obr.6 Schéma FT-ICR analyzátoru (9)

Orbitrap je typ analyzátoru, který se skládá z vnější a středové vřetenovité elektrody v symetrickém elektrostatickém poli. Okolo středové elektrody krouží částice přivedené z iontového zdroje a oscilují ve směru osy středové elektrody. Tyto oscilace jsou detekovány jako proud indukovaný částicemi na vnější elektrodě a opět pomocí Fourierovy transformace přepočítány na konkrétní hodnotu m/z . (2)

3.1.3. Detektor

Z hmotnostního analyzátoru jsou požadované ionty poslány na detektor, kde dojde k zesílení a detekci signálu, a to elektronásobičem, fotonásobičem nebo ve Faradayově kleci.

Elektronásobič je nejčastějším typem detektoru. Ionty z analyzátoru vyrazí po dopadu na elektrodu elektronásobiče z jejího povrchu vyšší počet elektronů, které postupně dopadají na povrch dalších dynod. Z jejich povrchu se vyráží stále vyšší

počet elektronů, až se signál zesílí na snadno měřitelnou hodnotu elektrického proudu.(2)

Fotonásobič pracuje na podobném principu s rozdílem, že ionty zde dopadají na fosforovou destičku. Z povrchu destičky se uvolní energie ve formě fotonů, která se opět přes systém dynod znásobí na měřitelnou hodnotu. (2)

Posledním typem detektoru je *Faradayova klec* tvořena kondenzátorem o určitém napětí. Po dopadu iontů na elektrodu dojde k vyražení elektronů. Tyto elektrony způsobí vybití kondenzátoru, které je přímo úměrné počtu dopadajících iontů.(2)

3.2. Využití MS v analýze léčiv

Hmotnostní spektrometrie se hojně využívá právě ve spojení s plynovou nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií vzhledem ke své vysoké citlivosti, specifitě a selektivitě detekce. Stala se proto nejpoužívanější technikou pro analýzu vzorků biologického materiálu. Své uplatnění najde také v oblasti strukturní analýzy a identifikace chemických sloučenin, proteinů, lipidů či metabolitů nebo ji lze využít ke stopové analýze nečistot, které jsou obsaženy ve vzorcích pouze ve velmi nízkých koncentracích. (2)

4. Metody úpravy vzorků biologického materiálu

Biologický materiál je až na výjimky (slzy, pot, sliny) složitá směs obsahující velké množství balastních látek (především proteinů). Tyto nežádoucí látky by mohly narušit správnou analýzu vzorku nebo poškodit některé citlivé součásti HPLC sestavy. Proto se před vlastní analýzou tyto složité vzorky upravují a stanovované látky se ze vzorku izolují. K úpravě biologických vzorků se nejčastěji využívá různých typů extrakce (LLE, SPE, ME, SFE) nebo deproteinace. (3)

4.1. Extrakce

Termín extrakce vyjadřuje proces vyluhování analytu nebo skupiny analytů ze vzorku. K extrakci se využívá kapalina, pevná fáze (sorbent) nebo superkritická fluidní tekutina. V dnešní době jsou stále populárnější i tzv. mikroextrakce, které využívají pouze minimální množství rozpouštědel i vzorků a jsou tak šetrnější a ekonomičtější variantou obyčejných extrakcí. (3)

4.1.1. Extrakce kapalina-kapalina

Extrakce kapalina-kapalina (LLE) je typ extrakce, kdy se extrahovaná látka rozděluje mezi dvě vzájemně nemísitelné kapalné fáze. Zpravidla je jedna fáze vodná a druhá organická. Hydrofilní sloučeniny se lépe extrahují do vodné fáze, hydrofobní sloučeniny preferují extrakci do organických rozpouštědel. (3)

LLE zahrnuje pět základních kroků, po nichž je vzorek připraven k nástřiku na kolonu:

- a) Míchání vzorku biologického materiálu s organickým rozpouštědlem
- b) Centrifugace
- c) Odebrání požadované vrstvy
- d) Odpaření rozpouštědla
- e) Rekonstituce odparku vhodným rozpouštědlem (např. mobilní fáze)

Rozdělení analytu mezi dvě kapalné fáze charakterizuje tzv. Nernstův rozdělovací

zákon $k = \frac{c(org)}{c(v)}$, kde k je tzv. rozdělovací koeficient, $c(v)$ je koncentrace

analytu ve vodné fázi a $c(org)$ koncentrace analytu v organické fázi. Rozdělovací

koeficient může být ovlivněn několika faktory: fyzikálně-chemickými vlastnostmi rozpouštědla, pH vodné fáze, poměrem vodné a organické fáze nebo dobou a způsobem provedení extrakce.(3)

4.1.2. Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (SPE) je typ extrakce, kde se extrahovaná látka adsorbuje na pevnou fázi (sorbet v separační kolonce z polypropylenu nebo skla, sorbet slisovaný v separační disk) a následně je eluována vhodným rozpouštědlem. Je nezbytné, aby extrahovaná látka měla určitou afinitu k sorbetu pevné fáze. Pokud by však afinita k sorbetu byla příliš vysoká, nebylo by možné extrahované látky ze sorbetu následně vyluhovat.(3)

Proces SPE se skládá z následujících 5 kroků:

1. Výběr vhodné separační kolonky nebo separačního disku

Výběr velikosti a typu a množství sorbetu v kolonce se odvíjí především od vlastností biologické matrice a extrahovaných analytů. Vyrábí se různé typy sorbetů: fáze normální, reverzní i iontovýměnné, jen mají větší zrnění než sorbenty chromatografických kolon. (3)

2. Aktivace sorbetu

Suchý sorbet musí být před nanesením vzorku aktivován zvlhčením rozpouštědlem vhodné polarit (pro reverzní fáze se používá nejčastěji methanol). Zvlhčení zároveň přispívá k lepší přilnavosti sorbetu k analyzovaným látkám, které se pak snáze oddělí od ostatních složek vzorku. Po aktivaci kolony je vhodné použít vhodný pufr, aby na sorbetu nedocházelo k precipitaci proteinů a k ucpání kolony. (3)

3. Nanesení vzorku

Vzorek je nanášen na sorbet rovnoměrně a vždy stejným způsobem pomocí volumetrických pipet nebo automatických mikropipet. Objem vzorku se pohybuje v rozmezí od několika mikrolitrů až po litry. (3)

4. Promytí balastů

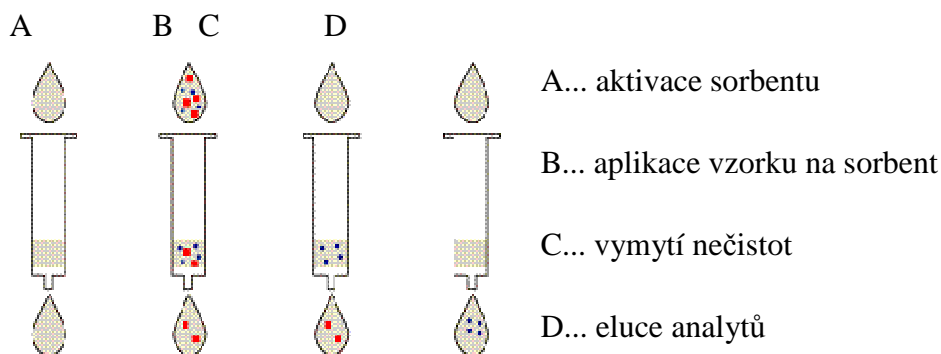
Po nanesení vzorku na sorbet a zadržení extrahovaných látek na sorbetu jsou vymyty slabě zadržené balastní látky takovým rozpouštědlem, kterým nejsou

sorbentu vyluhovány analyzované látky. Obvykle postačuje objem rozpouštědla, kterým se naplní separační kolonka, pro separační disky stačí 5 – 10 ml rozpouštědla. (3)

5. Eluce požadovaných látek

Po odstranění nežádoucích balastů z kolonky se vyluhují extrahované analyty ze sorbentu malým množstvím vhodného rozpouštědla (nejčastěji 200 μ l – 2 ml), které uvolní požadované analyty ze sorbentu. V ideálním případě by nemělo docházet k extrakci nečistot, které mohly ulpět na povrchu částic sorbentu a nebyly odstraněny promýváním v předchozím kroku. Takto izolované analyty jsou připraveny k další úpravě nebo k samotné analýze. (3)

SPE je velice oblíbená a hojně využívaná metoda úpravy biologického materiálu, která v mnoha aspektech předčí LLE a řeší její nejčastější problémy, jako je nedokonalé oddělení dvou kapalných fází, nízká výtěžnost, drahá a křehká aparatura, vysoká spotřeba kapalných rozpouštědel. SPE je vysoce účinná metoda separace. Jejími dalšími přednostmi je rychlost, jednoduchost provedení a možnost automatizace. Užívá se k izolaci, čištění a zakoncentrování analytu. Po extrakci se analyt nachází ve formě roztoku, je zakoncentrován a s minimálním obsahem balastních látek. (3)



Obr.7 Schéma procesu SPE(10)

4.1.3. Mikroextrakce

Současným trendem v oblasti analytických metod je miniaturizace, která se nevyhnula ani oblasti izolace látek z biologického materiálu. Proto byly vyvinuty metody mikroextrakce (ME), které umožňují provádět extrakce z minimálního objemu vzorku, s minimálním použitím organických rozpouštědel a bez

komplikovaných aparatur. Mikroextrakce lze provádět jak pevnou, tak kapalnou fází. (3)

Mikroextrakce pevnou fází (SPME) se využívá k izolaci léčiva pevnou fází bez použití rozpouštědel a komplikovaných aparatur. Pevná fáze, tvořená polymerem odvozeným od sorbentů využívaných v GC, je nanášena na flexibilní křemenné vlákno. Toto vlákno je spojeno s pístem a umístěno v duté ocelové jehle. Jehlou se propíchnou septum vialky, do vialky se vypustí vlákno z jehly a na vlákno se adsorbuje léčivo. (3)

Mikroextrakce kapalnou fází (LPME) je metoda, při které je do kapky organického rozpouštědla zavěšené na špičce jehly mikrostríkačky nebo do několika μl organického rozpouštědla uvnitř dutého vlákna extrahován analyt z kapalného vzorku. (3)

4.1.4. Superkritická fluidní extrakce (SFE)

SFE je metoda, která se velice často kombinuje se superkritickou fluidní chromatografií. Je to extrakce superkritickou tekutinou, což je tekutina s vlastnostmi plynu i kapaliny zároveň. Používá se výhradně CO_2 při superkritických podmínkách – při teplotě $31\text{ }^\circ\text{C}$ a tlaku $7,4\text{ MPa}$. Tato tekutina má oproti obyčejné kapalině nižší viskozitu, vyšší solvatační sílu a vyšší hustotu, která je pro extrakci nežádoucí. (3)

CO_2 je vhnán do čerpadla za nadkritického tlaku, potom přechází do extrakční kolony a je vypouštěn do sběrného rozpouštědla, kde vyubílá. Po celou dobu extrakce je nezbytné udržovat nadkritický tlak pomocí restriktoru (kapiláry dlouhé 30 cm o průměru $20\text{ }\mu\text{m}$) a nadkritickou teplotu umístěním do termostatu, aby si CO_2 ponechal vlastnosti superkritické tekutiny. (3)

4.2. Deproteinace

Deproteinace je typ úpravy biologického materiálu, kdy dochází k odstranění proteinů ze vzorku buď chemickými činidly, nebo ultrafiltrací. Volba deproteinační techniky závisí na chemické struktuře léčiva, na vazebnosti léčiva na bílkoviny a na množství léčiva obsaženého ve vzorku (vzorky se stopovým množstvím látky se neupravují deproteinací). (3)

4.2.1. Deproteinace chemickými činidly

Reakcí biologického materiálu (obsahujícího proteiny) s chemickými činidly dojde k precipitaci proteinů. Jako deproteinační činidlo lze použít:

- a) organická rozpouštědla, např. acetonitril, methanol, ethanol, aceton
- b) silné kyseliny, např. kyselina trifluoroctová, trichloroctová, fosforečná, chloristá, chlorovodíková (hodnota pH 1-3)
- c) soli těžkých kovů a hydroxidy, např. ZnSO_4 s NaOH, ZnSO_4 s Ba(OH)_2 , CuSO_4 , NaWO_4 s H_2SO_4
- d) kombinace bodů a) až c)

Ke vzorku ve zkumavce se přidá určené množství deproteinačního činidla, zkumavka se stočí na centrifuze a po stočení se odebere ze zkumavky supernatant, který se nechá analyzovat. (3)

4.2.2. Deproteinace ultrafiltrací

Ultrafiltrace je metoda, která oddělí volné (nízkomolekulární) léčivo, které není navázané na proteiny, od léčiva navázaného na plazmatické bílkoviny přechodem přes semipermeabilní teflonovou nebo celulóзовou membránu. Ultrafiltrací se na membránu zachytí molekuly s molekulovou hmotností 50 000 - 1000 000 kDa, jako jsou peptidy, bílkoviny, pyrogeny nebo viry. Vzniká tak bezproteinový nenaředený ultrafiltrát, který neobsahuje žádná rezidua chemických činidel. (3)

Separaci přes membránu lze urychlit tlakem stlačeného plynu, tlakem pístu v injekční stříkačce nebo odstředivou silou v centrifuze. Po 20 – 30 minutách ultrafiltrace vzniká 1,5 – 2,0 ml ultrafiltrátu. Membrány lze regenerovat propláchnutím 3 % NaCl nebo 0,1 % NaOH. Pro ultrafiltraci menších objemů se využívá jiných zařízení s vyměnitelnou jednorázovou membránou a vzniká 0,25 ml ultrafiltrátu po 15 - 20 minutách ultrafiltrace.(3)

5. Železo v lidskémorganismu

Železo patří mezi esenciálníprvky pro většinu živých organismů včetně člověka. Lidskýorganismus obsahuje až5 gramů železa, přičemž u žen je jeho množství vzhledem k menstruaci nižší (cca 2 gramy) než u mužů. V lidském organismu se vyskytuje ve dvou formách: Fe^{2+} a Fe^{3+} , které mají díky svým redoxním vlastnostem schopnost navzájem v sebe přecházet a účastnit se tak řady oxidačně-redukčních dějů v organismu.(11)

5.1. Význam železa v lidském organismu

Železo se podílí na životně důležitých procesech, jako je buněčné dýchání, buněčné dělení, buněčný metabolismus. Je kofaktorem řady důležitých enzymů (jako např. enzymů citrátového cyklu a ribonukleotidreduktázy důležité pro syntézu DNA)a jeobsaženo ve struktuře důležitých makromolekul. Největší procento z celkového obsahu železa (přibližně 67 %) je zabudováno v hemoglobinu a dalších 3 – 4 % v myoglobinu jako tzv. hemové železo, menší podíl (cca 30 %) je uskladněn nejčastěji ve feritinu a jen 0,1 % je součástí enzymů. V krevní plazmě cirkuluje ve vazbě na transferin pouze 0,1 – 0,2 % železa. (11)

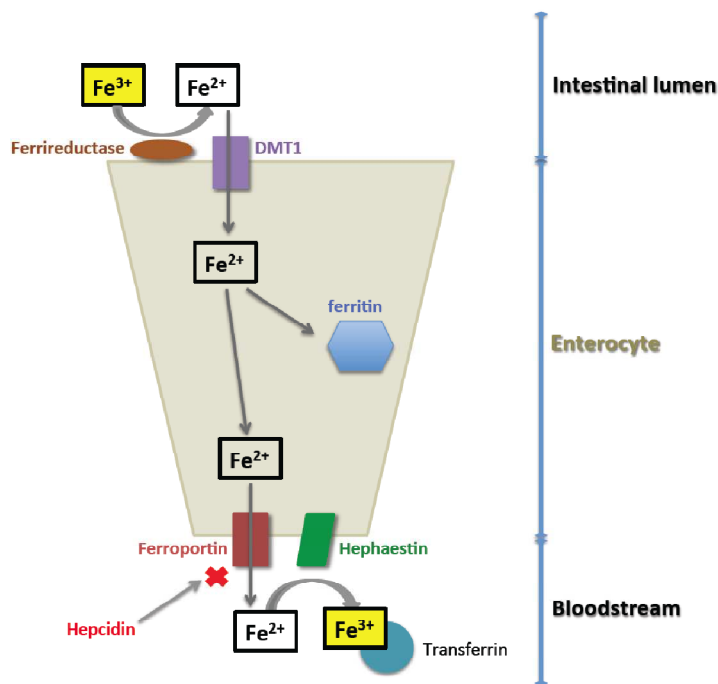
5.2. Homeostáza železa v normálních buňkách

Nadbytek železa je pro organismus toxický, naopak jeho nedostatek může vést ke vzniku závažných onemocnění, která mohou mít pro organismus fatální důsledky. Proto musí být zajištěna homeostáza železa v organismu a jeho množství musí být spolehlivě regulováno. Děje se takjen regulací absorpce železa z duodena. (12)

Absorpce hemového a nehemového železa se od sebe liší. Přesný mechanismus absorpce hemového železa prozatím nebyl detailně prozkoumán. Pravděpodobně je hem vychytáván endocytózou do enterocytů, kde je rozložen hemoxygenázou za uvolnění iontů železa.Tyto ionty mohou být buď uskladněny do feritinu, nebo přeneseny přes bazolaterální stranu enterocytů do krevního řečiště.(12)

Nehemové železo, které se v duodenu nachází převážně ve formě železitych iontů, je absorbováno přes intestinální epitel prostřednictvím svých transportérů DMT1 exprimovaných na apikální straně enterocytů. DMT1 transportéry jsou spojeny

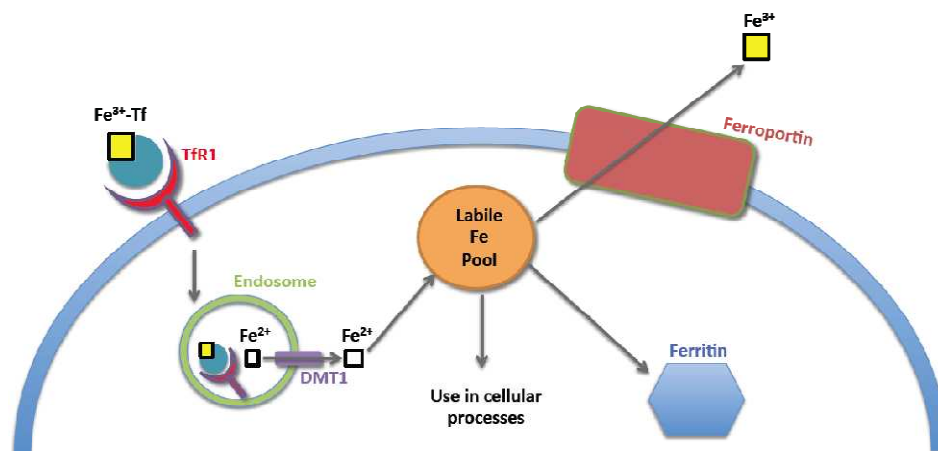
s ferireduktázou, která ionty Fe^{3+} redukuje na Fe^{2+} . Fe^{2+} ionty mohou být následně uskladněny ve feritinu nebo transportovány přes bazolaterální stranu enterocytuprostřednictvím transportéru ferroportinu do krevního řečiště. Na bazolaterální straně enterocytu je přítomna ferioxidáza (tzv. hefeestin), která oxiduje ionty Fe^{2+} zpět na Fe^{3+} . Fe^{3+} mohou být navázány namolekuly transferinu, který umožňuje jejich transport krevním řečištěm. Přechod železa přes ferroportin je regulován zejména tzv. hepcidinem, který je produkován hepatocyty při zvýšených hladinách železa v krvi. Přítomnost hepcidinu způsobuje degradaci ferroportinu. Tím je znemožněna absorpce železa z intestinálního lumen do krve. (Obr. 8). Veškeré železo, které není absorbováno do krevního řečiště, je vyloučeno z těla pravidelným obměňováním buněk intestinálního epitelu. (13)



Obr.8 Schéma absorpce nehemového železa z intestinálního lumen(12)

Komplex železa s transferinem putuje krevním řečištěm a může se vázat receptory TfR1 a TfR2, které se nachází na povrchu buněk. Po vazbě na jeden z těchto receptorů je komplex endocytózou dopraven do nitra buňky, konkrétně do endosomu, kde komplex na základě acidifikace prostředí disociuje. Volné ionty železa jsou přes DMT1 receptory uvolněny z endosomu do cytosolu buňky, kde mohou být ihned využity v buněčných procesech, případně jsou uskladněny do zásobního proteinu feritinu. Při vysokém obsahu volného železa v buňce jsou přebytečné ionty železa exportovány ven z buňky přes ferroportin. Proces

vychytávání železa do buněk musí být také spolehlivě regulován. Regulace se uskutečňuje na úrovni translace mRNA kódující TfR. (13)



Obr.9 Schéma vychytávání železa z krevního řečiště do buněk (12)

5.3. Homeostáza železa v nádorových buňkách

Pro neoplastické buňky je typický zrychlený metabolismus, intenzivnější růst a rychlejší proliferace. Ke všem těmto procesům potřebují buňky dostatečný přísun iontů železa, tudíž jsou také náchylnější na jeho případný nedostatek, jehož důsledkem je zpomalení až úplné zastavení procesů závislých na železe. (14)

V nádorových buňkách dochází ke zvýšené transkripci genů kódujících ribonukleotidreduktázu (RR) a ke zvýšené expresi TfR receptorů na buňkách, což následně vede ke zvýšenému vychytávání železa ze střevního lumen do buněk intestinálního epitelu a poté z krve do nádorových buněk. Zároveň se předpokládá, že existují i alternativní cesty umožňující vychytávání dalšího železa z krve v případě, že jsou již všechny TfR receptory saturovány. Tyto alternativní cesty jsou v současné době blíže prozkoumávány. (14)

U mnoha typů lidských nádorových buněk je také pozorována zvýšená transkripce tzv. c-Myc proteinů, které ovlivňují homeostázu železa a zapříčiňují zvýšení dostupnosti železa buňkám a nárůst obsahu železa uvnitř buňky prostřednictvím útlumu produkce feritinu. Tento nárůst nitrobuňčného obsahu železa pak vede k rychlejšímu růstu a proliferaci maligních buněk. (14)

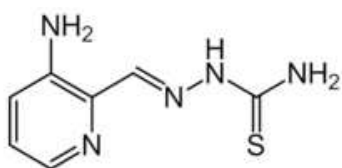
6. Chelátory železa

Již od 80. let 20. století jsou cíleně vyvíjeny a intenzivně studovány látky, které jsou díky své specifické struktuře schopny chelátovat ionty železa a tím je deaktivují. Existuje několik skupin chelátorů železa s odlišnou strukturou, funkcí a vykazující různou protinádorovou aktivitu. (14)

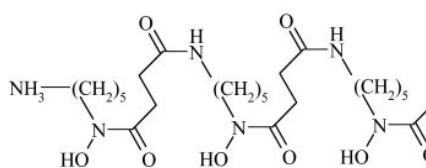
Prvním chelátorem železa s prokázanými antiproliferativními vlastnostmi *in vitro* byl desferrioxamin, jehož strukturní vzorec je znázorněn na Obr. 11. Desferrioxamin však kvůli své omezené permeabilitě přes buněčné membrány, způsobené pravděpodobně hydrofilní povahou, a velice krátkému biologickému poločas, díky kterému vyžaduje kontinuální subkutánní infúzi, nemůže být využit v protinádorové terapii. To podnítilo výzkum lipofilnějších chelátorů železa s vyšší selektivitou a silnějším protinádorovým účinkem. (14)

Vysoká protinádorová aktivita byla zaznamenána také u chelátorů železa ze skupiny thiosemikarbazonů, které mají ve srovnání s desferrioxaminem výrazně lipofilnější povahu. Nadějným pokrokem ve výzkumu chelátorů železa se stal objev 3-aminopyridin-2-karboxaldehyd-thiosemikarbazonu (označovaného jako Triapine®), který se nachází již ve 2. fázi klinických studií. (15) Jeho strukturní vzorec zachycuje Obr. 10. Mezi největší nedostatky Triapinu® patří krátký biologický poločas (cca 1 hodina po i.v. podání) a výskyt nežádoucích účinků. Proto se výzkum zaměřuje na léčiva s podobnou, ne-li vyšší účinností, nižším výskytem závažných nežádoucích účinků a několikanásobně delším biologickým poločasem. (16)

Dalším příkladem studovaných chelátorů železa jsou thiosemikarbazony DpT a BpT série, u kterých zatím nejsou dostupná žádná relevantní data o jejich farmakokinetickém profilu. (17) Společným znakem pro aroylhydrazony a thiosemikarbazony je jejich 2-pyridylketonová skupina, která je rovněž nositelem jejich antiproliferativního účinku. (15)



Obr.10 Strukturní vzorec Triapinu (16)



Obr.11 Strukturní vzorec desferrioxaminu (18)

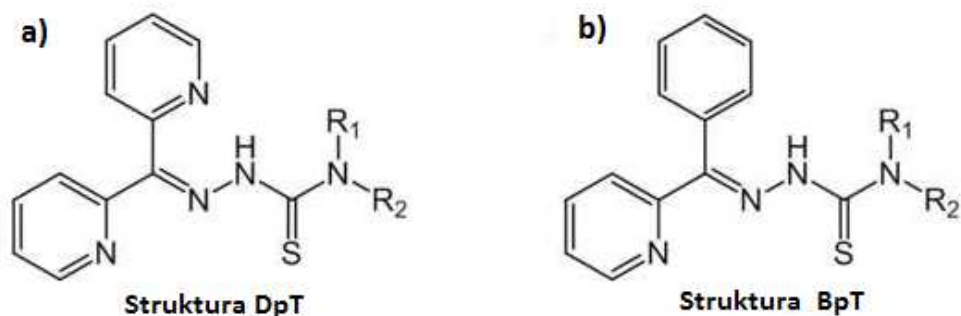
6.1. Chelátory železa odvozené odthiosemikarbazonu

Thiosemikarbazony, jejichž základní skelety jsou zachyceny na Obr. 12, jsou trojvaznéchelátoryschopné vyvazování kovů (železo, měď, zinek) z buněk za vzniku komplexů, a tak snižují jejich nitrobuněčný obsah i aktivitu. Atomy železa tvoří vazby s thiosemikarbazony přes atom síry v thiosemikarbazonové skupině, atom dusíku N¹ v iminu a atom dusíku v pyridylovém zbytku. (12)

Prozatím nebyl úplně objasněn jejich přesný mechanismus účinku. Předpokládá se však, že cílenou a relativně selektivní chelatací iontů železa v rychle se množících neoplastických buňkách dochází k deficitu železa, potřebného k rozmnožování buněk a k inhibici klíčového enzymu syntézy DNA (ribunukleotidreduktázy). Nádorové buňky mají několikanásobně vyšší spotřebu železa, a proto jsou výrazně citlivější na jeho nedostatek oproti normálním buňkám. Komplexy thiosemikarbazonů s železem mají navíc vysokou redoxní aktivitu a přispívají k destrukci nádorových buněk tvorbou volných radikálů s vysokou cytotoxickou aktivitou. (12) *In vitro* studiích byla prokázána významná účinnost thiosemikarbazonů při léčbě některých typů rakoviny prsu, prostaty, plic a pankreatu. (16; 19)

Rozlišujeme dvě hlavní skupiny thiosemikarbazonů, které se od sebe strukturálně odlišují typem ketonu na dusíku N¹: deriváty 2-benzoylpyridin-3-thiosemikarbazonu (BpT) zobrazené na Obr. 12a) a deriváty di-2-pyridylketon-3-thiosemikarbazonu (DpT) zobrazené na Obr. 12b).

Strukturální obměnou základního skeletu různými substituenty vznikla široká škála derivátů, které jsou v současné době intenzivně studovány.



Obr.12 Obecné strukturální vzorce derivátů thiosemikarbazonů(16)

6.1.1. Thiosemikarbazony odvozené od DpT

První skupina thiosemikarbazonů obsahuje deriváty odvozené od di-2-pyridylketon-3-thiosemikarbazonu (DpT), které mají keton v poloze N¹ sedvěma pyridinovýmicykly. Na rozdíl od svých předchůdců (aroylhydrazonů) se vyznačují vyšší stabilitou v plazmě, která by mohla být výhodná pro jejich farmakokinetický profil. (15) Vznikly kondenzací di-2-pyridylketonu s celou škálou thiosemikarbazidů. (14)

K nejúčinnějším thiosemikarbazonům vůbec patří di-2-pyridylketon-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon (Dp44mT), který byl vybrán a studován jako tzv. „leadcompound“ této DpT skupiny thiosemikarbazonů. Bylo prokázáno, že protinádorová aktivita Dp44mT je výrazně vyšší ve srovnání s Triapinem® a že je účinný proti širokému spektru rakovinových buněk *in vitro*. Ze všech DpT derivátů má Dp44mT největší redoxní aktivitu. (14)

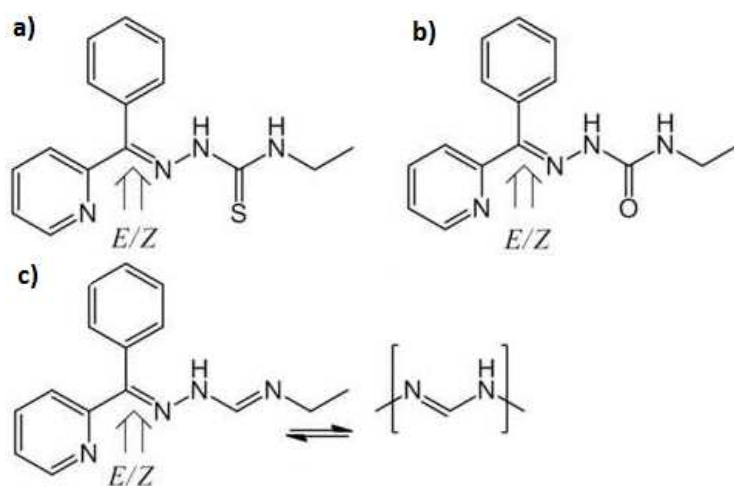
Ačkoliv se při preklinických studiích ukázalo, že Dp44mT je srovnatelně účinný, ba dokonce účinnější než klinicky nejpoužívanější cytostatikum doxorubicin, byl rovněž pozorován vznik nežádoucí srdeční fibrózy po podávání vyšších dávek, proto se od dalšího výzkumu upustilo. (19)

Chemickou modifikací struktury Dp44mT na dusíku N⁴ se podařilo nasynthetizovat nového zástupce DpT skupiny thiosemikarbazonů, di-2-pyridylketon-4-cyklohexyl-4-methyl-3-thiosemikarbazon (DpC), který je na rozdíl od Dp44mT méně toxický a v současné době je předmětem rozsáhlých studií. (19)

6.1.2. Thiosemikarbazony odvozené od BpT

Druhou skupinou thiosemikarbazonů jsou látky odvozené od 2-benzoylpyridin-3-thiosemikarbazonu. Tyto látky vznikly substitucí jedné 2-pyridyl skupiny v ketonu na dusíku N¹ skupinou fenylovou. Tím došlo k výraznému nárůstu lipofility, redoxní aktivity komplexů se železem a k účinnější inhibici vychytávání železa z transferinu. Na základě prostudování účinnosti a toxicity nasynthetizovaných zástupců BpT skupiny thiosemikarbazonů byl vybrán 2-benzoylpyridin-3-thiosemikarbazon (Bp4eT) jako tzv. „leadcompound“ BpT skupiny pro další preklinickou studii (Obr. 13a). (19)

Bp4eT je lipofilní sloučenina, která velmi dobře proniká přes buněčné membrány do nitrobuněčných prostor, kde účinně chelatuje nitrobuněčné zásoby železa v neoplastických buňkách. Na základě jeho dobré permeace *in vitro* se předpokládá i dobrá absorpce z gastrointestinálního traktu. Vyskytuje se ve dvou izomerních formách (*E/Z*). V pevném stavu převládá izomer *Z*, ve vodných roztocích však dochází ke konverzi *E/Z* izomerů, která vysoce závisí na zvoleném rozpouštědle. V předchozích studiích se podařilo identifikovat a izolovat jeho hlavní metabolity 1. fáze metabolismu. Hlavní metabolickou cestou Bp4eT je oxidace síry thiosemikarbazonu, díky čemuž vznikají deriváty semikarbazonu (Obr. 13b) amidrazonu (Obr. 13c). V předchozích studiích byl nalezen ještě třetí metabolit, hydroxylovaný derivát amidrazonu, avšak kvůli problematické identifikaci jeho přesné struktury a předpokládané zanedbatelné koncentraci v plazmě nebyl blíže studován. (19)



Obr.13 Strukturní vzorce Bp4eT (a), derivátu semikarbazonu (b) a derivátu amidrazonu (c)(19)

Cíl práce

Cílem této práce bylo vyvinout HPLC-MS/MS metodu pro stanovení nového potenciálního protinádorového léčiva Bp4eT a jeho hlavních metabolitů (M1-E, M1-Z, M2) v plazmě potkana a ověřit její základní validační parametry. Tato metoda byla následně využita pro analýzu vzorků z pilotní farmakokinetické studie na potkanech.

Experimentální část

7. Použitá chemikálie, přístroje, chromatografický materiál, další pomůcky

V experimentální části práce byly použity níže vyjmenované chemikálie, přístroje, chromatografický materiál a další uvedené pomůcky.

7.1. Chemikálie

2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazon (Bp4eT) syntetizovaný na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Česká republika; totožnost ověřena NMR

(*E/Z*)-2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-semikarbazon (*E/Z* izomer metabolitu M1) syntetizovaný na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Česká republika; totožnost ověřena NMR

*N*³-ethyl-*N*¹-[fenyl-(pyridin-2-yl)metylen]formamidrazon (metabolit M2) syntetizovaný na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Česká republika; totožnost ověřena NMR

Di-2-pyridylketon-4-fenyl-3-thiosemikarbazon (Dp4pT), syntetizovaný na University of Sydney; totožnost ověřena NMR

Methanol (MeOH), Merck, Darmstadt, Německo

Acetonitril (ACN), Merck, Darmstadt, Německo

Mravenčan amonný, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo

Disodná sůl ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA, Na₂), Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo

Ultračistá voda (Millipore purification system, Schwalbach, Německo)

Prázdňá potkaní plazma, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Česká republika

7.2. Přístroje a chromatografický materiál

Semimikrováhy Sartorius AG CPA225D-0CE, Německo

Vakuový manifold a SPE plato v 96 jamkovém formátu se sorbentem Discovery DSC-Ph (100 mg/ml), Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo

SPE kolonky Discovery C18, 100 mg/ml, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo

SPE kolonky Discovery Ph, 100 mg/ml, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo

Generátor vakua Mevacs, Medist s.r.o., Slovensko

Vortex Mixer, Velt Scientifica, Itálie

HPLC sestava Schimadzu Prominence skládající se z degaséru DGU-20A3, dvou čerpadel LC-20 AD, autosampleru SIL-20 AC, kolonového termostatu CTO-20 AC a komunikačního modulu CBM 20A, Duisburg, Německo

Hmotnostní spektrometr ThermoFinnigan LCQ Advantage Max s iontovým zdrojem ESI a APCI a analyzátozem typu iontové pasti, San Jose, CA, USA

Analytická kolona Discovery HS C18; 75x4,6mm; 3 μ m, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo

Analytická kolona Ascentis Express C18; 150 x 3,0 mm; 2,7 μ m, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo

Předkolona Discovery HS C18; 20x4,0 mm; 3 μ m, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo

Předkolona Ascentis Express C18; 5 x 3,0 mm; 2,7 μ m, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Německo

7.3. Další pomůcky

Laboratorní sklo

Automatické mikropipety

Skleněné vialky a inzerty pro HPLC

Mikrozkumavky s uzávěrem typu Eppendorf

Software ThermoFinnigan Xcalibur, verze 2.0

8. Příprava roztoků a úprava vzorků

8.1. Příprava zásobních a pracovních roztoků

Všechny zásobní roztoky (Bp4eT, M1-E, M1-Z, M2, Dp4pT) byly připraveny rozpuštěním přesného množství každé substance v čistém acetonitrilu (ACN) tak, aby výsledná koncentrace každého zásobního roztoku byla 320 µg/ml.

Pracovní roztoky byly připraveny prostým zředěním zásobních roztoků 50 % vodným roztokem ACN tak, aby po přidání 1 µl pracovního roztoku analytu do 99 µl plazmy byla dosažena požadovaná koncentrace látky v plazmě (50 ng/ml; 100 ng/ml; 200 ng/ml, 400 ng/ml, 600 ng/ml, 800 ng/ml).

8.2. Příprava vzorků s biologickým materiálem

Vzorky pro ověření linearity v plazmě byly připraveny přidáním 1 µl pracovního roztoku každého analytu (Bp4eT, M1-E, M1-Z, M2) do 96 µl prázdné potkaní plazmy. Nakonec byl do vzorku před jeho úpravou přidán 1 µl pracovního roztoku Dp4pT (IS) a vzorek byl krátce promíchán na Vortexu.

8.3. Úprava vzorků před HPLC analýzou

Pro úpravu vzorků plazmy byla zvolena metoda SPE. Byly použity SPE kolony Discovery C18 (100 mg/ml), SPE kolony Discovery Ph (100 mg/ml) a extrakční plato v 96 jamkovém formátu se sorbentem Discovery DSC-PH (100 mg/ml).

SPE byla provedena pomocí následujícího postupu. Sorbent byl nejprve aktivován 1 ml methanolu, zbytky rozpouštědla byly následně vymyty 1 ml 2 mM vodného roztoku edetanu disodného. Poté byl na sorbent přenesen mikropipetou vzorek plazmy a balastní látky z plazmy byly vymyty 1 ml 2 mM vodného roztoku edetanu disodného. Analyty zachycené na sorbentu byly nakonec eluovány 0,5 ml methanolu. Eluát byl odpařen proudem dusíku dosucha. Odparek byl rekonstituován ve 100 µl 50 % vodného roztoku ACN.

9. Vývoj HPLC-MS/MS metody

Při vývoji HPLC-MS/MS metody bylo hlavním cílem optimalizovat chromatografické podmínky a získat ostré, symetrické a oddělené píky jednotlivých analytů a zároveň dostatečné citlivosti. Cílem bylo najít vhodnou stacionární fázi, zvolit optimální složení mobilní fáze a optimální rychlost průtoku mobilní fáze. Zároveň bylo žádoucí nastavit všechny tyto parametry tak, aby byla doba analýzy co nejkratší. Ke kvantifikaci byla zvolena metoda vnitřního standardu a za vnitřní standard byl vybrán Dp4pT.

Chromatografické podmínky

Nejprve byla zkoušena kolona Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μ m). Byly vyzkoušeny tři různé poměry obou složek za izokratických podmínek, kde anorganickou složku tvořil 2 mM vodný roztok mravenčanu amonného (AmF) a organickou složku představoval acetonitril (ACN), konkrétně 50:50 (v/v) AmF:ACN, 60:40 (v/v) AmF:ACN a 55:45 (v/v) AmF:ACN při nastaveném průtoku mobilní fáze 0,3 ml/min. Objem vzorku, nastříkovaného na kolonu, byl vždy 10 μ l a před každou analýzou bylo na kolonu nastříknuto 20 μ l 20 mM vodného roztoku edetanudisodného, která byla eluována do odpadu. Byla testována i gradientová metoda s následujícím profilem: 0. – 15. minuta 40 % \rightarrow 60 % organické složky, 15. – 27. minuta 60 % organické složky, 27. - 40. minuta 40 % organické složky. (16)

Stejná gradientová metoda byla vyzkoušena s kolonou Discovery HS C18 (75 x 4,6 mm; 3,0 μ m). Na této koloně byla testována izokratická metoda s konstantním složením mobilní fáze. Byly vyzkoušeny dva poměry složek mobilní fáze: 50:50 (v/v) AmF:ACN a 40:60 (v/v) AmF:ACN a v rámci snahy o zkrácení doby analýzy byl testován průtok mobilní fáze 0,3 ml/min, 0,4 ml/min a 0,5 ml/min.

Parametry detekce

U hmotnostního detektoru byly testovány obě dostupné ionizační techniky APCI a ESI v pozitivním módu. Vzhledem k výsledkům předchozí studie byla jako první využita APCI. (15) Základní nastavení APCI zahrnovalo napětí 3 kV na spreji a teploty 300 °C na kapiláře. Nastavení MS pro detekci jednotlivých analytů bylo dále optimalizováno automaticky během přímé infuze jejich standardů

v acetonitrilu ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) do proudu mobilní fáze. Zároveň byla sledována fragmentace analytů za účelem optimalizace SRM přechodů. Nastavení detektoru pro jednotlivé analyty bylo srovnatelné, proto bylo využito jedno nastavení pro detekci všech analytů. Kvantifikace probíhala v kladném SRM módu, kdy byly sledovány následující reakce, při kterých docházelo k fragmentaci vybraných iontů na sledované fragmenty: pro Bp4eT m/z 285 $\rightarrow m/z$ 240; pro M1 m/z 269 $\rightarrow m/z$ 224; pro M2 m/z 253 $\rightarrow m/z$ 174; a pro Dp4pT m/z 334 $\rightarrow m/z$ 241.

Vzhledem k nízké citlivosti odezvy pro metabolit M1 byla pozornost zaměřena na možnost využití iontového zdroje ESI. V první řadě bylo nutné zajistit srovnatelnou odezvu *E/Z* isomerů Bp4eT. Ze začátku byla během přímé infuze standardu Bp4eT v acetonitrilu ($c = 500 \text{ ng/ml}$) ze stříkačky do zdroje sledována odezva pro různé pozice a napětí na ESI (1 – 5 kV) a teploty na kapiláře (100 – 300 °C). Následně bylo nastavení MS a SRM přechodů optimalizováno pro všechny analyty infuzí do mobilní fáze podobně jako v případě APCI. Taktéž bylo vybráno jedno nastavení pro všechny analyty. Za účelem zvýšení reprodukovatelnosti byly SRM přechody monitorovány v definovaných časových intervalech odpovídajících retenčním časům analytů.

Úprava vzorků

K úpravě vzorků plazmy byly nejprve použity extrakční kolonky naplněné sorbentem tvořeným reverzní fází s navázanými fenylowymi zbytky (Discovery Ph, 100 mg/ml). Následně byly zkoušeny kolonky naplněné sorbentem s reverzní fází s navázanými zbytky C18 (Discovery C18, 100 mg/ml). Pro hodnocení extrakční výtěžnosti byly připraveny dva vzorky od každého analytu (Bp4eT, M1-*E*, M1-*Z*, M2, Dp4pT) tak, že do 96 μl prázdné plazmy potkana byl přidán 1 μl pracovního roztoku každého analytu tak, aby výsledná koncentrace byla 800 ng/ml. Vzorky byly promíchány na Vortexu a upraveny pomocí SPE dle postupu uvedeného v kapitole 8.3. Lepších výsledků bylo dosaženo na kolonkách DiscoveryPh, 100 mg/ml, proto byl stejný typ sorbentu testován na extrakčním platu v 96 jamkovém formátu (Discovery DSC-Ph, SPE-96-well).

10. Prevalidace HPLC-MS/MS metody

Novou HPLC-MS/MS metodu bylo nutné zvalidovat před tím, než byla použita k analýze vzorků z farmakokinetické studie. Samotné validaci předcházela tzv. prevalidace, v rámci které byla ověřena linearita v plazmě, efekt matrice a tzv. *E/Z* přechody Bp4eT.

10.1. Linearita v plazmě

Nejprve byla testována linearita v plazmě na koloně Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm, 2,7 μm). Bylo připraveno šest vzorků v koncentračním rozmezí 50 ng/ml - 800 ng/ml od každého analytu (Bp4eT, M1-*E*, M1-*Z*, M2) dle postupu uvedeného v kapitole 8.2. Vzorky byly upraveny s využitím SPE a třikrát za sebou nastříknuty na kolonu. Poté byl stejný postup zopakován na koloně Discovery HS C18 (75 x 4,6 mm; 3,0 μm). K hodnocení linearity byly využity průměry hodnot ze tří měření.

10.2. Efekt matrice

Efekt matrice byl zjišťován metodou podle EMA: porovnáním plochy pod píkem dvou následujících vzorků: první vzorek byl tvořen 96 μl vyextrahované prázdné plazmy, do které byl po extrakci přidán 1 μl pracovního roztoku každého analytu (Bp4eT, M1-*E*, M1-*Z*, M2) tak, aby vznikl vzorek s koncentrací analytů 800 ng/ml a 1 μl pracovního roztoku IS o výsledné koncentraci IS ve vzorku 400 ng/ml; druhý vzorek byl tvořen 1 μl pracovního roztoku všech analytů (Bp4eT, M1-*E*, M1-*Z*, M2) o výsledné koncentraci 800 ng/ml a 1 μl pracovního roztoku IS o výsledné koncentraci 400 ng/ml rozpuštěnými v 96 μl mobilní fáze. Stejný postup byl využit pro přípravu vzorků s výslednou koncentrací analytů 200 ng/ml a 50 ng/ml. Porovnáním ploch pík jednotlivých analytů odpovídající koncentrace na obou chromatogramech byl hodnocen vliv matrice na ionizaci.

10.3. *E/Z* přechody Bp4eT

Přechod *E/Z* izomerů Bp4eT byl nejprve testován ve 20 % a 50 % roztoku ACN ve vodě, a to v koncentraci 800 ng/ml, kdy byl vzorek pětkrát za sebou nastříknut na kolonu. Dále byl přechod *E/Z* izomerů Bp4eT, rovněž v koncentraci 800 ng/ml, testován v 35 % vodném roztoku ACN. Nakonec byl přechod *E/Z* izomerů

otestován ve 35 % vodném roztoku ACN pro dané rozmezí koncentrací Bp4eT. Bylo připraveno 6 roztoků Bp4eT v 35 % vodném roztoku ACN o následujících koncentracích: 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 600 ng/ml a 800 ng/ml. Tyto roztoky byly analyzovány šestkrát v řadě a vyhodnoceny. Byly sledovány a porovnány změny plochy píků obou izomerů. Pokud je poměr úbytku množství *Z*-izomeru a nárůstu množství *E*-izomeru roven jedné, *Z*-izomer přechází v *E*-izomer kvantitativně (snížení odezvy pro *Z*-izomer odpovídá zvýšení odezvy pro *E*-izomer).

11. Farmakokinetická studie

Čtyřem samcům potkana (Konárovice, Česká republika) byl intravenózně aplikován Bp4eT (3 mg/kg) rozpuštěný v médiu PEG 300 / fyziologický roztok / ethanol v poměru 50:40:10 (v/v/v). V časech 0 minut; 30 minut; 60 minut; 120 minut; 180 minut; 240 minut; 300 minut a 360 minut po aplikaci byly potkanům odebírány vzorky krve, která byla ihned po odběru stočena centrifugou. Odebraná plazma byla zamrazena a až do doby analýzy uchovávána při -80 °C. Vzorky byly upraveny a analyzovány dle výše popsaných postupů. Základní farmakokinetické parametry Bp4eT byly vypočítány pomocí softwaru Kinetica 5.0.

Výsledky a diskuze

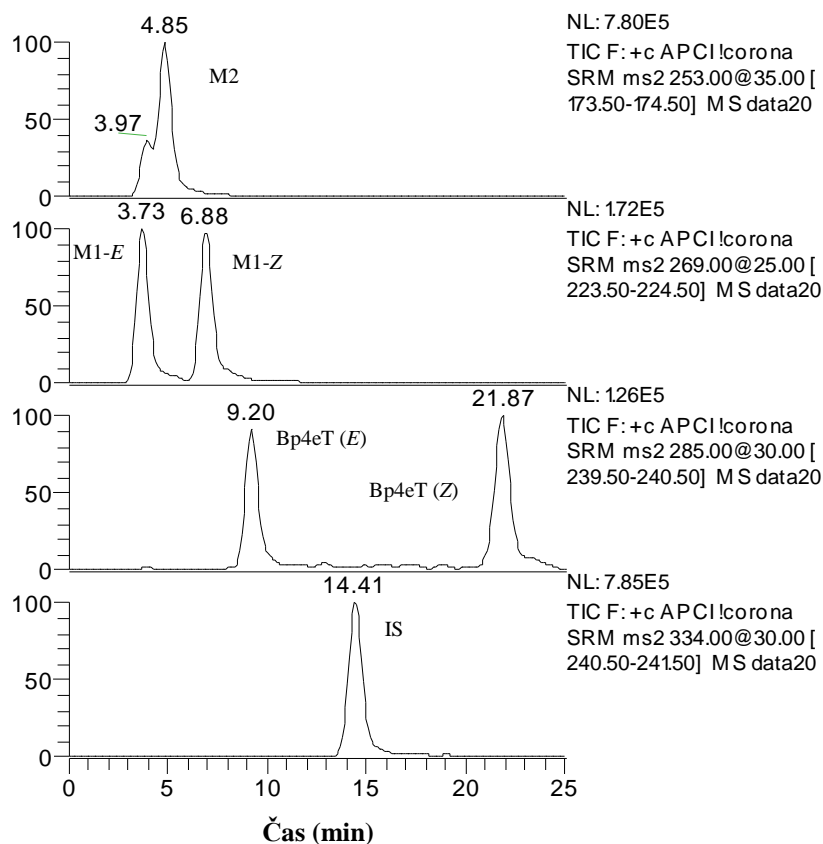
Mým úkolem bylo vyvinout HPLC-MS/MS metodu pro stanovení Bp4eT a jeho hlavních metabolitů (M1-E, M1-Z, M2) v plazmě, ověřit základní parametry, které předcházely vlastní validaci metody (linearita v plazmě, efekt matrice, přechod E/Z izomerů). Kromě toho jsem se také podílela na validaci finální metody (kalibrační křivka, efekt matrice) a analyzovala jsem vzorky plazmy dvou potkanů z farmakokinetické studie.

Na počátku vývoje chromatografické metody se vycházelo z chromatografických podmínek použitých dříve pro analýzu Bp4eT. (15; 16) K detekci byl zvolen hmotnostní detektor s iontovým zdrojem APCI, který byl testován jako první. Důraz byl kladen zejména na dostatečnou citlivost a reprodukovatelnost měření pro všechny obsažené analyty ve vzorku. Bylo provedeno ladění parametrů pro každý konkrétní analyt zvlášť (Bp4eT, M1-E, M1-Z, M2, Dp4pT), ale bylo zjištěno, že je ve všech případech odezva velice podobná. Proto bylo pro analýzu všech látek vybráno jedno univerzální ladění, při kterém měl nejvyšší odezvu Bp4eT.

Kolona Ascentis Express

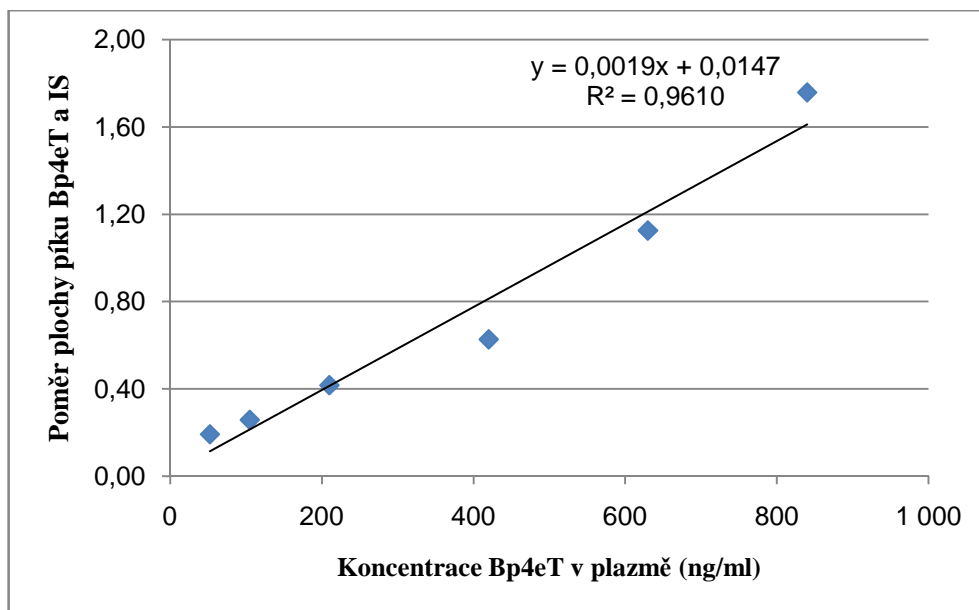
Nejprve byla testována kolona Ascentis Express C18 (150 x 3,0 mm; 2,7 μm) a předkolona se stejným typem sorbentu (Ascentis Express C18; 5 x 3,0 mm; 2,7 μm). Kolona je naplněna částicemi s pevným jádrem, proto bylo očekáváno zrychlení analýzy a vysoká účinnost. Při optimalizaci složení mobilní fáze se začínalo poměrem anorganické a organické složky 50:50 (v/v) AmF:ACN. Všechny analyty byly eluovány příliš rychle, že zde bylo riziko koeluce analytů s balasty z plazmy. Následně byl testován poměr anorganické a organické fáze 60:40 (v/v) AmF:ACN. Při tomto složení nebyl poslední analyt (Z-izomer Bp4eT) eluován ani za 30 minut a celkově se všechny retenční časy prodloužily na dvojnásobek. Proto byl poměr nastaven na 55:45 (v/v) AmF:ACN, kdy byly všechny sledované analyty úplně odděleny až na základní linii a analýza trvala 25 minut. Pro zlepšení tvaru píků se osvědčil přednástřík 20 μl 20 mM vodného roztoku edetanu disodného, který byl eluován do odpadu. Nástřík roztoku edetanu disodného zajistil, že byly z kolony odstraněny případně nežádoucí ionty,

které by mohly reagovat s analyty a ovlivnit výsledky analýzy. Chromatogram separace všech analytů je znázorněn na Obr. 14.

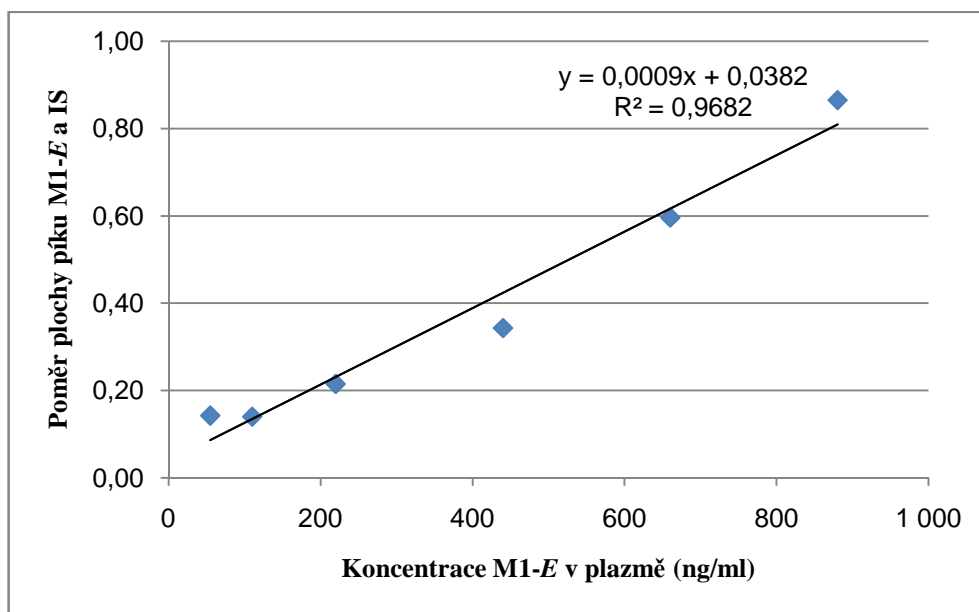


Obr. 14 Chromatografický záznam znázorňující separaci Bp4eT-E/Z, M1-E, M1-Z, M2 a IS (kolona Ascentis Express, izokratická metoda, 55:45(v/v)AmF:ACN, APCI)

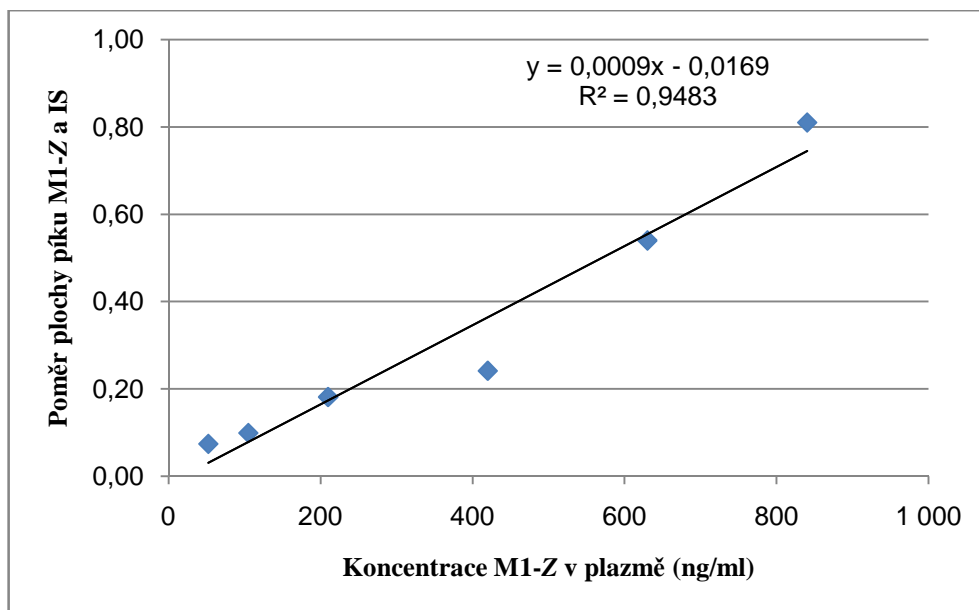
Tato metoda byla využita pro testování linearitu v plazmě a efektu matrice. Výsledky hodnocení linearitu pro všechny analyty včetně rovnic lineární regrese a koeficientů determinace jsou graficky znázorněny na Obr. 15 – 18. Koeficienty determinace pro všechny analyty nabývají hodnot 0,9482 – 0,9682.



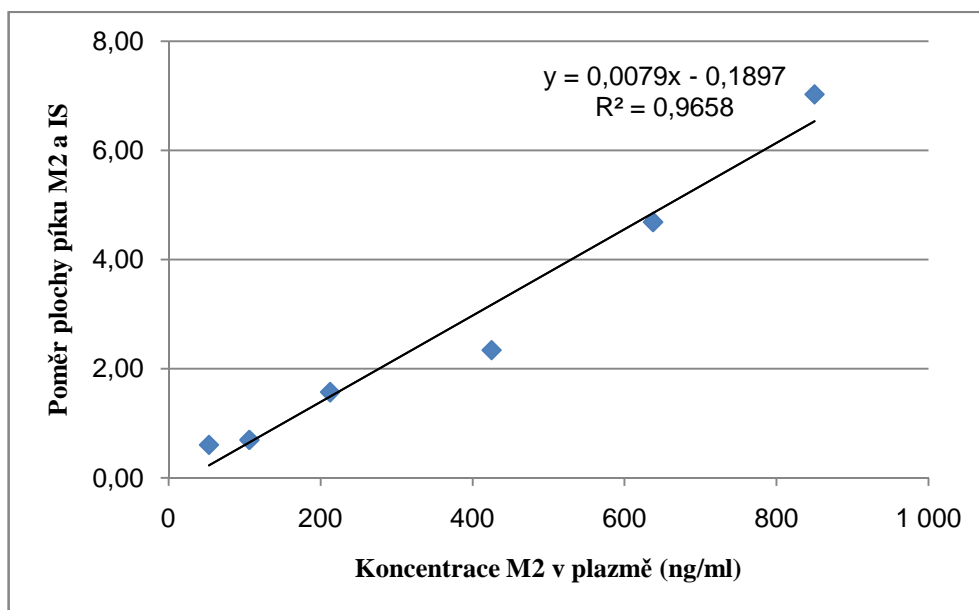
Obr. 15 Graf závislosti poměru plochy píku Bp4eT a IS na koncentraci Bp4eT v plazmě (kolona Ascentis Express, izokratická metoda, 55:45 (v/v)AmF:ACN, APCI)



Obr. 16 Graf závislosti poměru plochy píku M1-E a IS na koncentraci M1-E v plazmě (kolona Ascentis Express, izokratická metoda, 55:45 (v/v)AmF:ACN, APCI)



Obr. 17 Graf závislosti poměru plochy píku M1-Z a IS na koncentraci M1-Z v plazmě (kolona Ascentis Express, izokratická metoda, 55:45 (v/v)AmF:ACN, APCI)



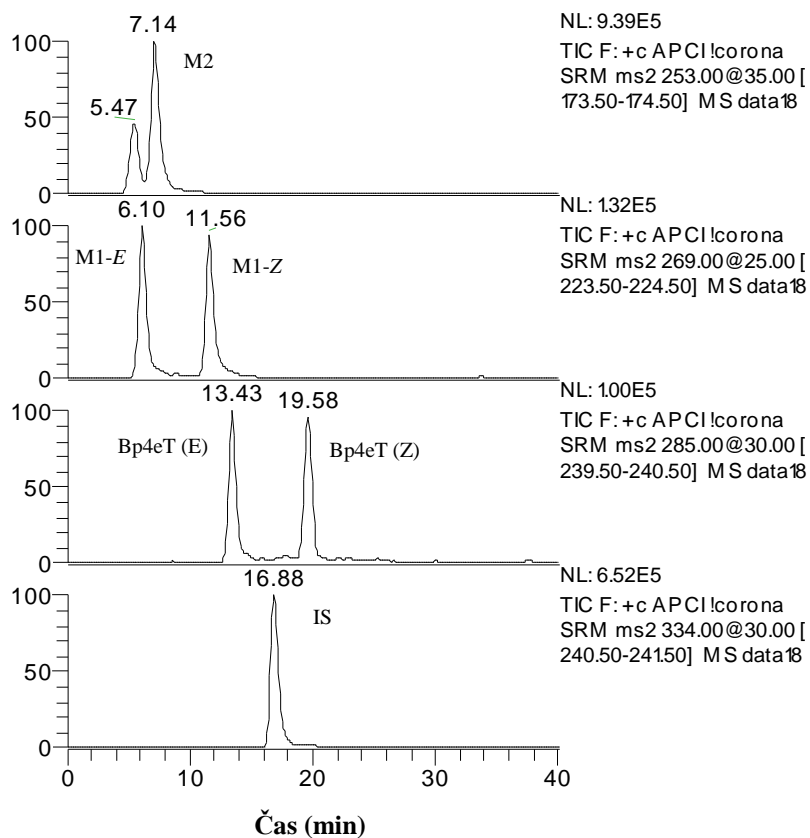
Obr. 18 Graf závislosti poměru plochy píku M2 a IS na koncentraci M2 v plazmě (kolona Ascentis Express, izokratická metoda, 55:45 (v/v)AmF:ACN, APCI)

Efekt matrice byl testován metodou podle EMA se dvěma druhy potkaní plazmy. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 1. Rozdíly mezi dvěma plazmami byly poměrně vysoké, a tak lze předpokládat, že byly přítomny maticové efekty, které ovlivňují průběh analýzy.

Analyt	c (ng/ml)	1. plazma Efekt matrice (%)	2. plazma Efekt matrice (%)
Bp4eT	50	82,57	110,67
	200	91,95	79,39
	800	87,81	91,54
M1-E	50	77,18	79,48
	200	79,57	89,63
	800	72,75	73,94
M1-Z	50	76,36	86,65
	200	103,12	99,90
	800	74,70	79,89
M2	50	61,13	70,56
	200	74,65	79,57
	800	73,44	71,67
IS	50	116,23	121,48
	200	144,12	141,26
	800	128,26	134,14

Tab. 1 Efekt matrice pro Bp4eT, M1-E/Z, M2 a IS (izokratická metoda, 55:45 (v/v) AmF/ACN, kolona Ascentis Express, APCI)

Protobyla následně testována gradientová metoda, u které bylo dosaženo separace všech analytů. Profil gradientu byl následovný: 0. – 15. minuta 40 % → 60 % organické složky, 15. – 27. minuta 60 % organické složky, 27. - 40. minuta 40 % organické složky. Ve srovnání s izokratickou metodou došlo k výraznému prodloužení doby analýzy. Chromatogram znázorňující separaci všech analytů s využitím gradientové metody je zobrazen na Obr. 19. Na chromatogramu je patrný náznak dvou píků na záznamu metabolitu M2. Jelikož se metabolit M2 vyskytuje ve formě dvou izomerů (*E/Z*) a dvou tautomerů, došlo pravděpodobně při těchto chromatografických podmínkách k jejich částečné separaci.



Obr. 19 Chromatografický záznam znázorňující separaci analytů Bp4eT-E/Z, M1-E, M1-Z, M2 a IS (kolona Ascentis Express, gradientová metoda, APCI)

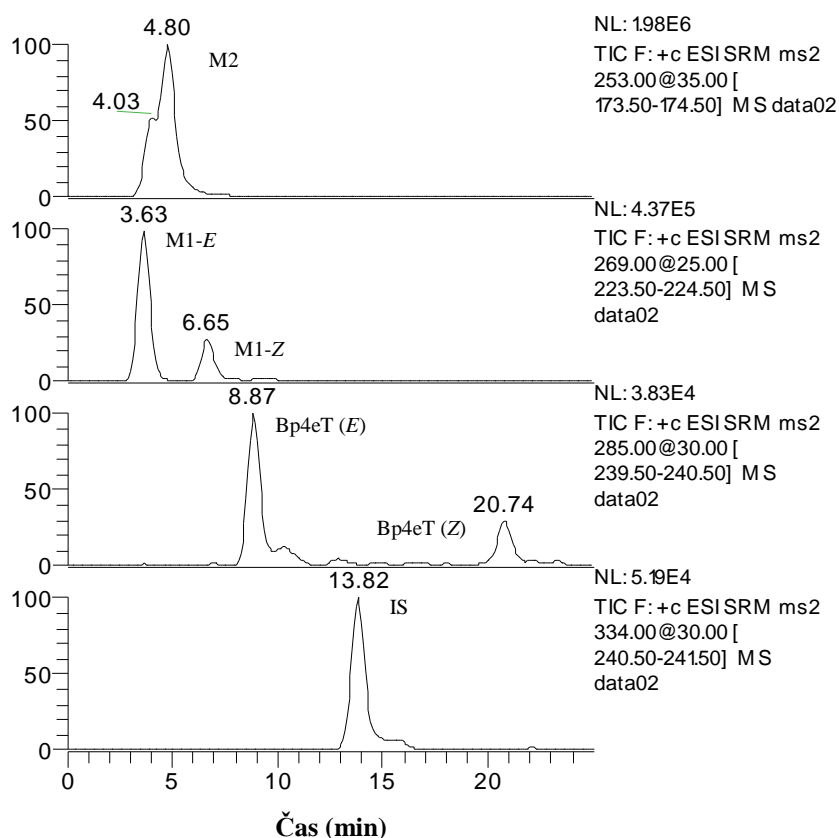
Touto metodou byl testován kvůli rychlému ověření metody pouze efekt matrice, a to stejným způsobem jako v předchozím případě. Z výsledků, které jsou uvedeny v Tab. 2, jsou znovu patrné větší odchylky, které poukazují na možnost přítomnosti efektu matrice.

Analyt	c (ng/ml)	1. plazma (%)	2. plazma (%)
Bp4eT	200	91,95	79,39
	800	87,81	91,54
M1-E	200	102,99	89,63
	800	72,75	73,94
M1-Z	200	103,12	99,90
	800	74,70	79,89
M2	200	74,65	79,57
	800	73,44	71,67

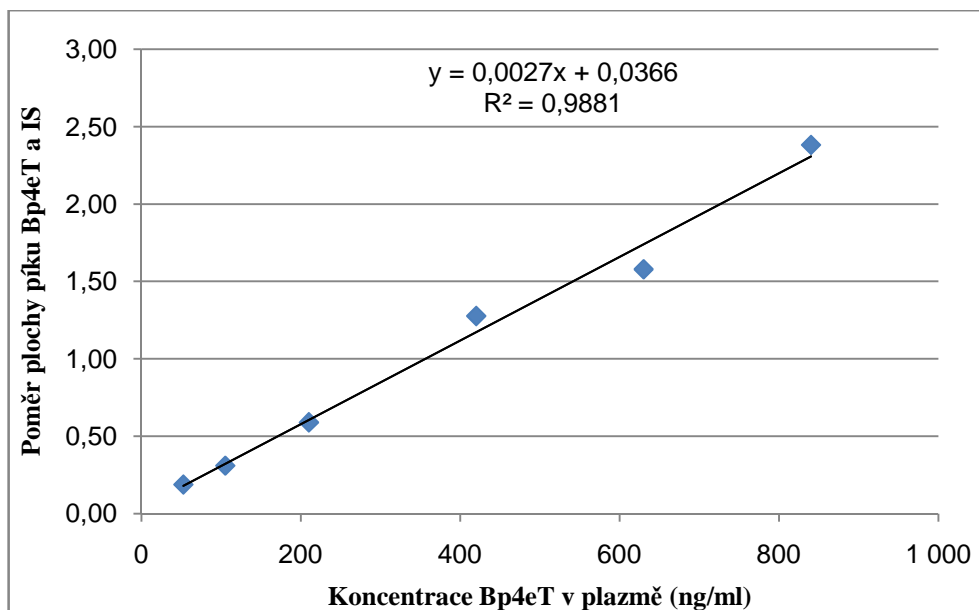
Tab. 2 Efekt matrice Bp4eT, M1-E, M1-Z, M2 (kolona Ascentis Express, gradientová metoda, APCI)

Kvůli nižší odezvě metabolitu M1 při analýze vzorků plazmy byl vyzkoušen druhý zdroj ionizace ESI, při jehož použití vykazoval M1 dostatečnou citlivost. Ačkoliv byl iontový zdroj ESI původně zavrhnut pro vysokou tvorbu aduktů Bp4eT se sodíkem, které by vedly k nesprávné kvantifikaci Bp4eT, vhodným nastavením MS (především snížením teploty na kapiláře) došlo k částečnému potlačení jejich tvorby. Při změně teploty kapiláry z 300 °C na 150 °C byla tvorba aduktů snížena z 20 % na 3-4 %. S dalším snižováním teploty kapiláry se již snižovala odezva i pro molekulární ion Bp4eT, proto byla ponechána teplota 150°C. S využitím ESI byla dosažena dostatečně citlivá odezva pro všechny analyty. Chromatogram zachycující separaci všech analytů izokratickou metodou na koloně Ascentis Express tentokrát s využitím ESI je na Obr. 20.

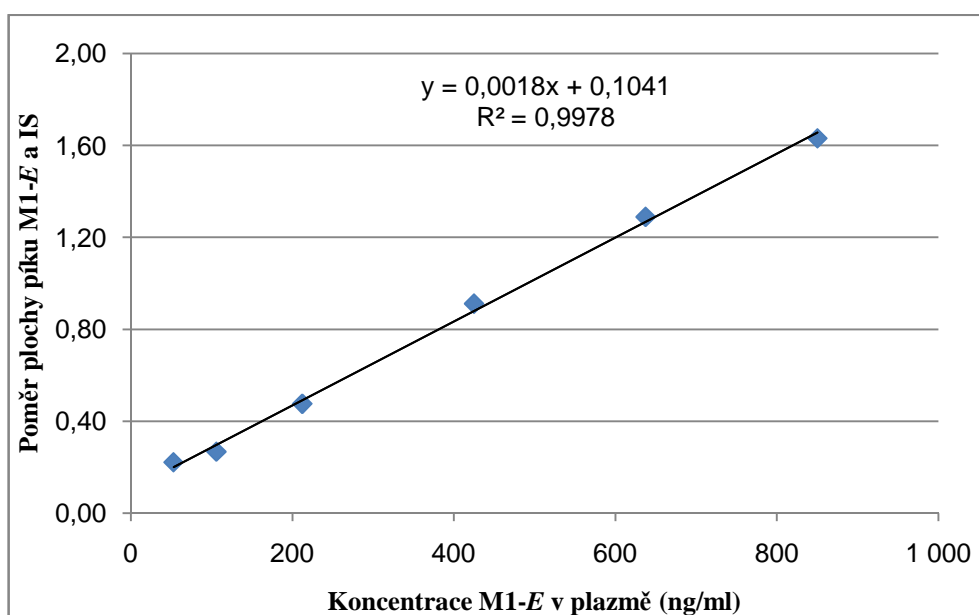
Touto metodou byla znovu testována linearita stanovení analytů v plazmě. Výsledky jsou graficky znázorněny na Obr. 21 – 24. Uvedené koeficienty determinace nabývají hodnot od 0,9791-0,9986.



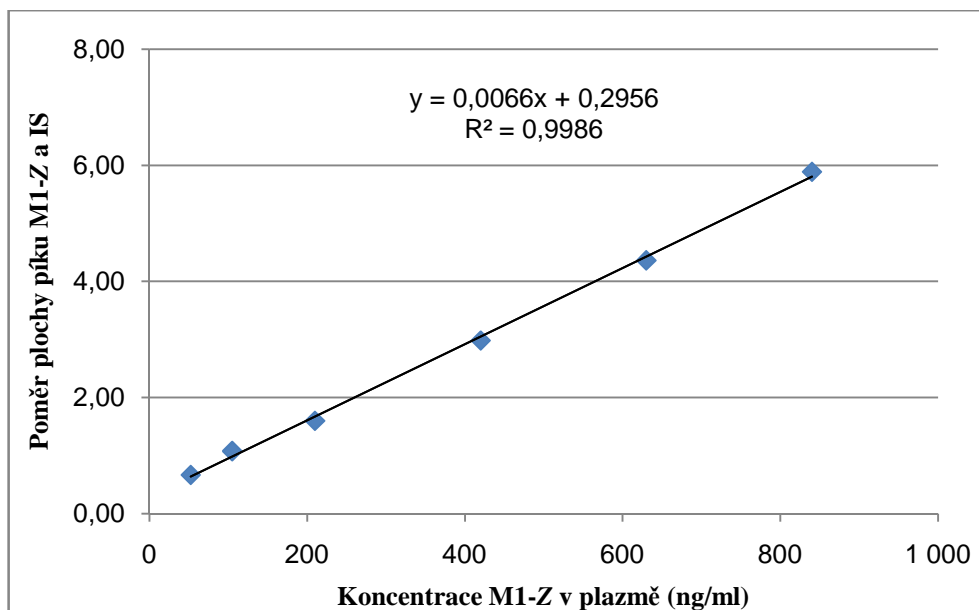
Obr. 20 Chromatografický záznam zachycující separaci Bp4eT-E/Z, M1-E, M1-Z, M2 a IS v plazmě (kolona Ascentis Express, izokratická metoda, 55:45 (v/v) AmF:ACN, ESI)



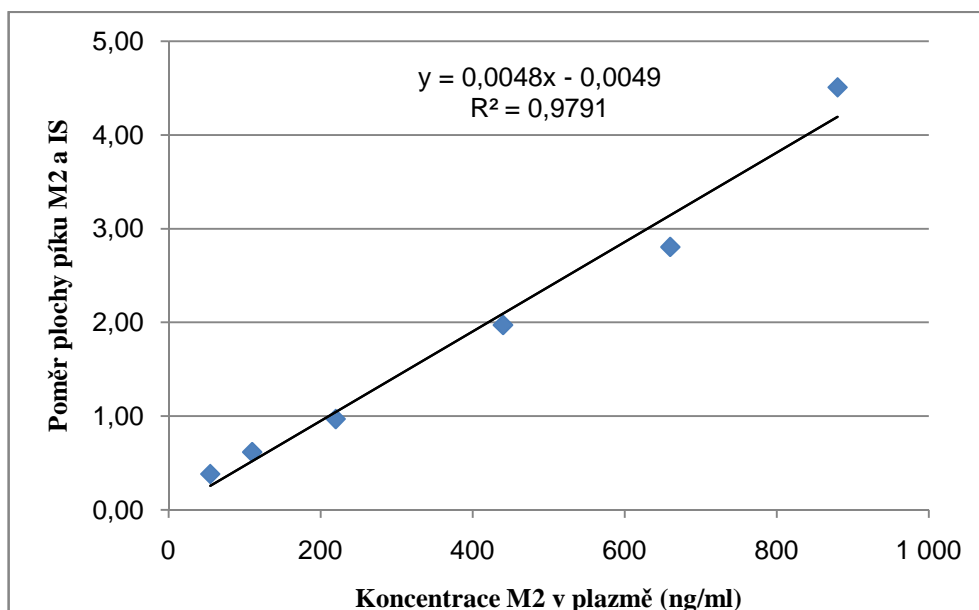
Obr. 21 Závislost poměru plochy píku Bp4eT a IS na koncentraci Bp4eT v plazmě (kolona Ascentis Express, izokratická metoda, 55:45 (v/v) AmF:ACN, ESI)



Obr. 22 Závislost poměru plochy píku M1-E a IS na koncentraci M1-E v plazmě (kolona Ascentis Express, izokratická metoda, 55:45 (v/v) AmF:ACN, ESI)



Obr. 23 Závislost poměru plochy píku M1-Z a IS na koncentraci M1-Z v plazmě (kolona Ascentis Express, izokratická metoda, 55:45 (v/v) AmF:ACN, ESI)



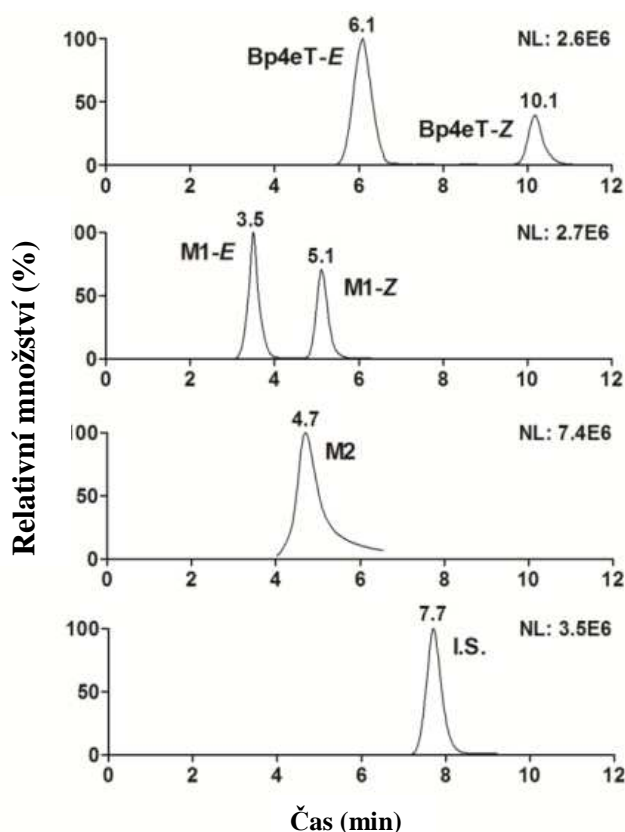
Obr. 24 Závislost poměru plochy píku M2 a IS na koncentraci M2 v plazmě (kolona Ascentis Express, izokratická metoda, 55:45 (v/v) AmF:ACN, ESI)

Kolona Discovery

I přes relativně dobré výsledky analýzy byla metoda stále příliš dlouhá (25 minut). Během vývoje se navíc vyskytly problémy s poměrně rychlým ucpáváním předkolony. Snahou proto bylo otestovat i jiné typy stacionární fáze a vyvinout pokud možno kratší metodu. Byla vyzkoušena kolona Discovery HS C18 (75 x 4,6 mm; 3,0 μ m) a stejný typ předkolony (Discovery HS C18; 20 x 4,0 mm,

3 μm). Při izokratické eluci se složením mobilní fáze 50:50 (v/v) AmF:ACN trvala analýza téměř 30 minut (pík *Z*-izomeru Bp4eT měl retenční čas 27minut). Při složení mobilní fáze 40:60 (v/v) AmF:ACN byla doba jedné analýzy 15 minut. Zvýšením průtoku mobilní fáze z původních 0,3 ml/min na 0,4 ml/min se metoda zkrátila na 12 minut. Dalším zvyšováním průtoku mobilní fáze docházelo již pouze ke snižování odezvy detektoru. Před každou analýzou byl ponechán nástřik 20 μl 20 mM vodného roztoku edetanu disodného. Kvantifikace probíhala opět v kladném SRM módu a byly sledovány následující reakce, při kterých docházelo k fragmentaci vybraných iontů na sledované fragmenty v daných časových intervalech: pro Bp4eT m/z 285 \rightarrow m/z 240 (5,2 - 12,5 min), pro M1 m/z 269 \rightarrow m/z 224 (2,0 - 6,6 min), pro M2 m/z 253 \rightarrow m/z 174 (4,0 - 6,6 min), pro Dp4pT m/z 334 \rightarrow m/z 241 (6,6 - 9,2 min)

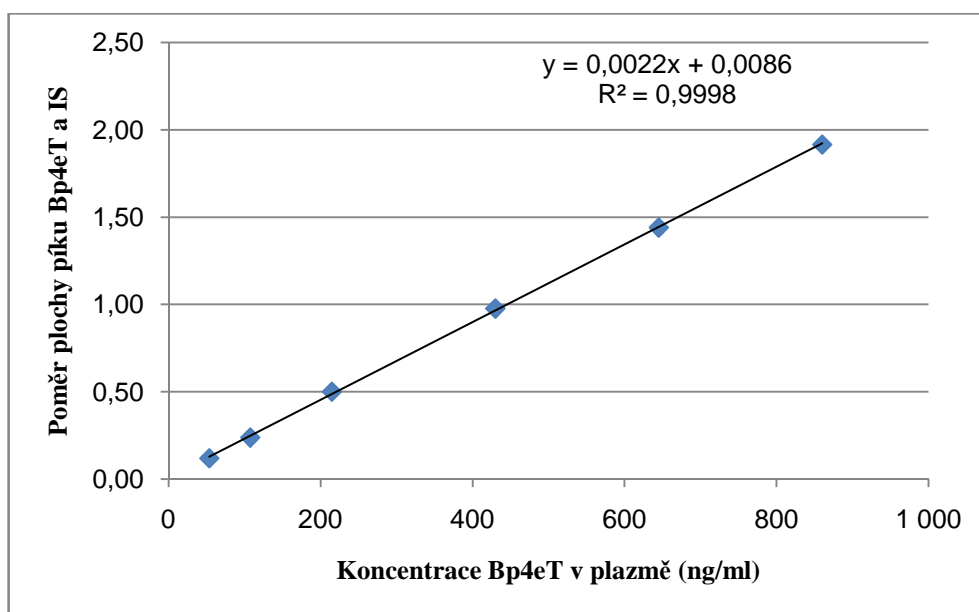
Chromatogram, který zachycuje separaci všech analytů, je znázorněn na Obr. 25.



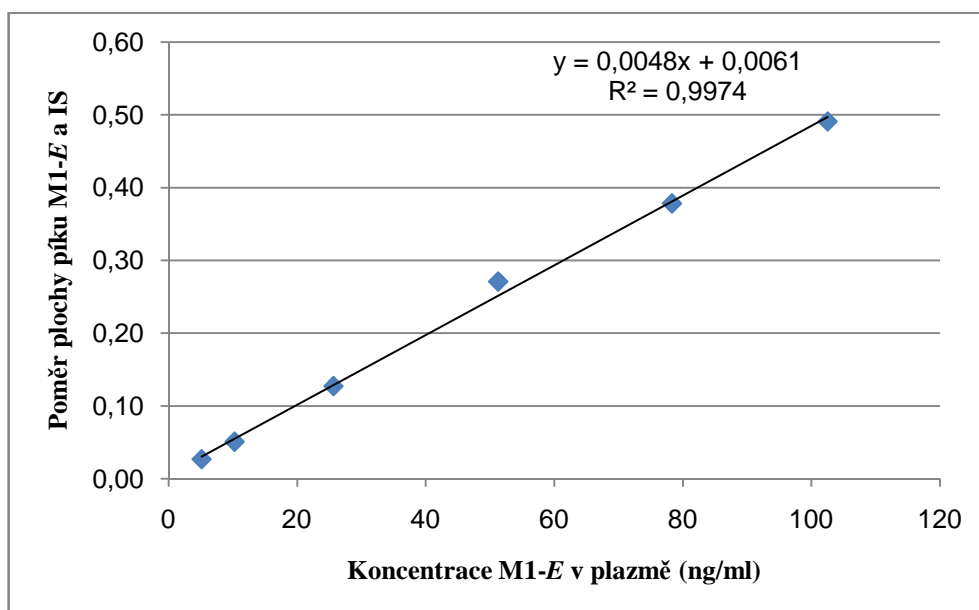
Obr. 25 Chromatografický záznam zachycující analýzu Bp4eT-E/Z, M1-E/Z, M2, IS (kolona Discovery, izokratická metoda, 40:60 (v/v) AmF:ACN, ESI)

Metoda byla dále optimalizována ostatními členy týmu a finální metodou byla znovu změřena linearita v plazmě a efekt matrice podle EMA (s pěti různými

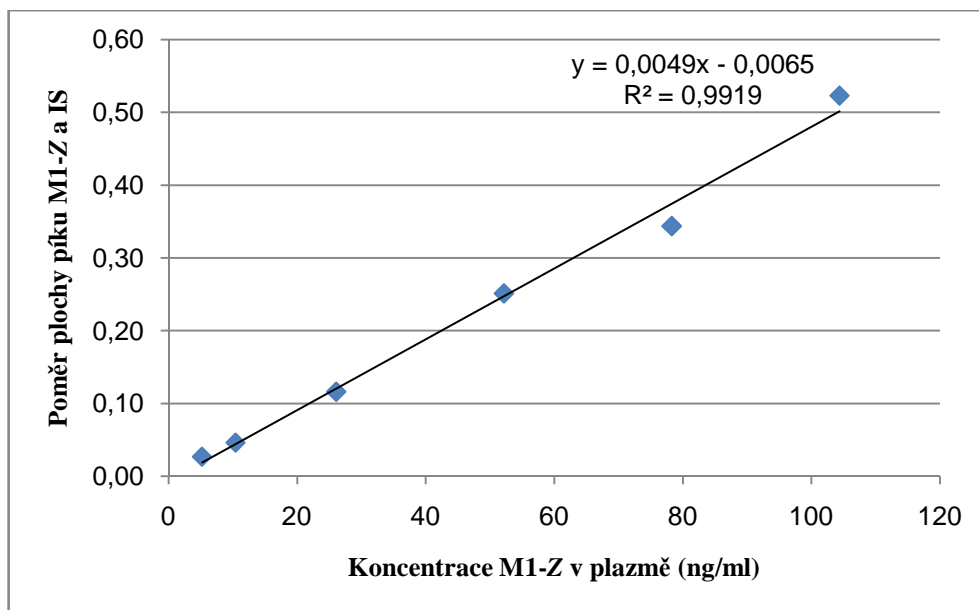
vzorky potkaní plazmy). Kalibrační přímky jsou včetně rovnic lineární regrese a koeficientů determinace zachyceny na Obr. 26 – 29. Koeficient determinace pro všechny analyty nabývá hodnot 0,9974 – 0,9998. Linearita tedy byla prokázána pro Bp4eT v rozmezí 50 ng/ml – 800 ng/ml, pro M1-E v rozmezí 5 ng/ml – 100 ng/ml, pro M1-Z v rozmezí 5 ng/ml – 100 ng/ml a pro M2 v rozmezí 25 ng/ml – 400 ng/ml.



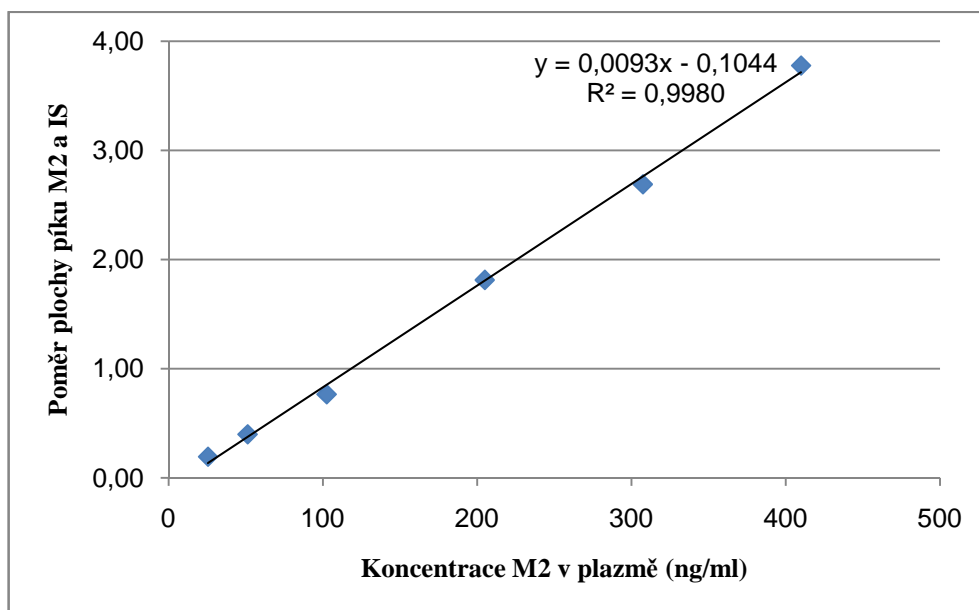
Obr. 26 Graf závislosti poměru plochy píku Bp4eT a IS na koncentraci Bp4eT v plazmě (kolona Discovery, izokratická metoda, 40:60 (v/v) AmF:ACN, ESI)



Obr. 27 Graf závislosti poměru plochy píku M1-E a IS na koncentraci M1-E v plazmě (kolona Discovery, izokratická metoda, 40:60 (v/v) AmF:ACN, ESI)



Obr. 28 Graf závislosti poměru plochy píku M1-Z a IS na koncentraci M1-Z v plazmě(kolona Discovery, izokratická metoda, 40:60 (v/v) AmF:ACN, ESI)



Obr. 29 Graf závislosti poměru plochy píku M2 a IS na koncentraci M2 v plazmě(kolona Discovery, izokratická metoda, 40:60 (v/v) AmF:ACN, ESI)

Výsledky hodnocení efektu matrice jsou opět shrnuty v Tab. 3. Efekt matrice se pohyboval v rozmezí 93,59 - 114,73 %. Z toho lze usuzovat, že v průběhu analýzy nedochází k žádným významným efektům matrice, které by negativně ovlivňovaly výsledky analýzy.

Analyt	c (ng/ml)	Průměr (%)	RSD (%)
Bp4eT	50	114,73	10,25
	200	109,98	3,32
	800	112,26	9,90
M1-E	50	111,04	4,77
	200	103,03	3,07
	800	114,06	8,09
M1-Z	50	106,74	1,94
	200	103,04	10,11
	800	103,61	10,59
M2	50	110,24	8,86
	200	108,20	4,52
	800	114,35	9,72
IS	400	93,59	7,55

Tab. 3 Efekt matrice pro Bp4eT, M1-E,Z, M2 a IS v plazmě potkana(kolona Discovery, izokratická metoda, 40:60 (v/v) AmF:ACN, ESI)

S takto vyvinutou metodou byl hodnocen přechod *E/Z* izomerů Bp4eT. Bp4eT se v roztoku vyskytuje ve formě dvou izomerů (*E/Z*), přičemž izomer *Z* ve vodných rozpouštědlech přechází v izomer *E*. Na chromatogramu se tyto izomery jeví jako dva oddělené píky. Proto bylo nejprve nutné zjistit, zda tyto přechody probíhají kvantitativně a zda je možné při kvantifikaci Bp4eT sčítat plochy píkúobou izomerů. Přechod *E/Z* izomerů Bp4eT rozpuštěného ve 20 % vodném roztoku ACN probíhal pomalu (Tab. 4), v 50 % vodném roztoku ACN probíhal naopak velmi rychle (Tab. 5). Pro tento experiment se proto jeví jako nejlepší připravit roztoky Bp4eT v 35 % vodném roztoku ACN, kde probíhal přechod optimální rychlostí. Přechod izomerů byl v tomto rozpouštědle testován v šesti různých koncentracích Bp4eT. Výsledky jsou zachyceny v Tab. 6.

nástřiky	<i>E</i> -izomer	<i>Z</i> -izomer	<i>E+Z</i>
1.	73 552 187	79 621 668	153 173 855
2.	99 723 763	57 629 945	157 353 708
3.	115 001 093	43 711 761	158 712 854
4.	112 764 854	43 501 218	156 266 072
5.	124 196 640	37 537 554	161 734 194

Tab. 4 *E/Z* přechody Bp4eT (800 ng/ml) ve 20 % vodném roztoku ACN(kolona Discovery, izokratická metoda, 40:60 (v/v) AmF:ACN, ESI)

nástřiky	<i>E</i> -izomer	<i>Z</i> -izomer	<i>E</i> + <i>Z</i>
1.	35 346 978	93 146 454	128 493 432
2.	35 716 916	90 124 962	125 841 878
3.	40 702 846	90 447 162	131 150 008
4.	40 228 259	80 077 304	120 305 563
5.	42 645 779	81 632 418	124 278 197

Tab. 5*E/Z* přechody Bp4eT (800 ng/ml) v 50 % vodném roztoku ACN(kolona Discovery, izokratická metoda, 40:60 (v/v) AmF:ACN, ESI)

<i>c</i> (ng/ml)	<i>E</i> ₁	<i>E</i> ₆	<i>Z</i> ₁	<i>Z</i> ₆	<i>E</i> ₆ - <i>E</i> ₁	<i>Z</i> ₁ - <i>Z</i> ₆	$\frac{E_6-E_1}{Z_1-Z_6}$	RSD (%)
50	13309604	23640348	16576630	6753049	10330744	9823581	1,052	2,16
100	17192221	25586647	19170365	10851075	8394426	8319290	1,009	1,75
200	20600708	40310697	38173934	22205843	19709989	15968091	1,234	2,32
400	62818422	97617907	85092005	53148185	34799485	31943820	1,089	0,80
600	58717015	126340575	142007906	79106077	67623560	62901829	1,075	1,17
800	209065897	266317323	130953402	68388007	57251426	62565395	0,915	1,42
Průměr							1,062	

Tab. 6*E/Z* přechody Bp4eT ve 35 % vodném roztoku ACN(kolona Discovery, izokratická metoda, 40:60 (v/v) AmF:ACN, ESI)

Z výsledků(Tab. 6) vyplývá, že poměry rozdílů úbytku ploch *Z*-izomerů a nárůstu ploch *E*-izomerů jsou blízké jedné a přechody probíhají kvantitativně. Plochy *E*-izomerů a *Z*-izomerů Bp4eT je tedy možné při kvantifikaci Bp4eT sčítat.

Pro úpravu všech vzorků plazmy byla zvolena metoda s využitím SPE kolonek DiscoveryPh, která byla převzata z předchozí studie. (20)Otestovány byly také kolony naplněné sorbentem s reverzní fází s navázanými zbytky C18. Vyšší výtěžnost extrakce a dostatečnou reprodukovatelnost vykazoval sorbent s fenylovými zbytky. Proto byla zvolena metoda SPE s využitím extrakčního plata v 96 jamkovém formátu naplněné sorbentem tvořeným reverzní fází s navázanými fenylovými zbytky, který vzhledem k možnosti úpravy většího množství vzorků najednou dosahoval vyšší reprodukovatelnosti a zrychlení úpravy vzorků.

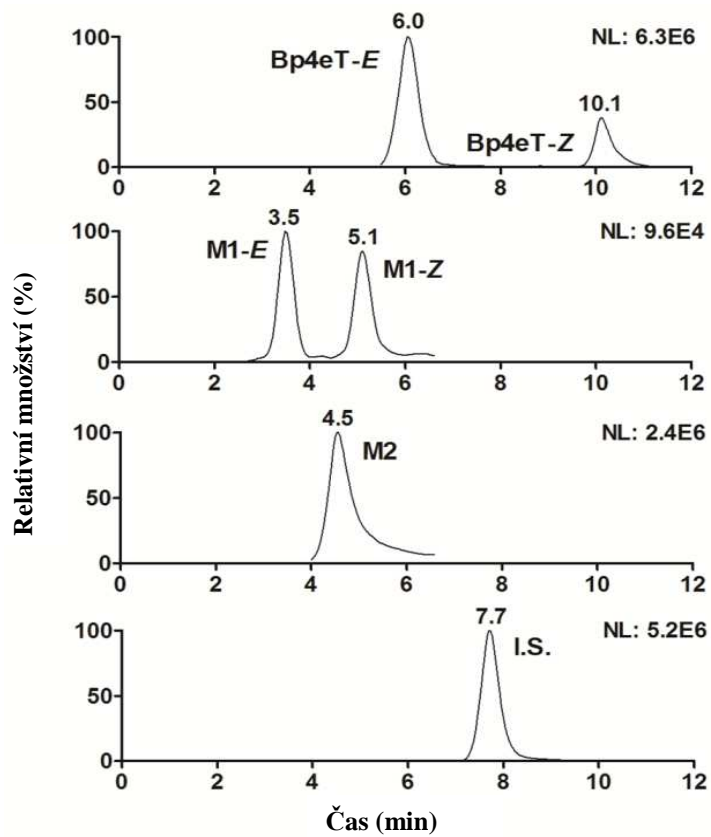
Tato nová HPLC-MS/MS metoda byla úspěšně zvalidována spolupracovníky, kteří se na projektu podíleli, a byla použita k analýze vzorků z pilotní farmakokinetické studie. Ve vzorcích z farmakokinetické studie byly identifikovány všechny

analyty: parentní látka Bp4eT, metabolit M1 (*E* a *Z* izomer) a metabolit M2. Pouze Bp4eT a M2 byly přítomny v takových koncentracích, aby mohly být kvantifikovány. M1-*E* a M1-*Z* se ve vzorcích vyskytovaly v koncentracích nižších než LLOQ. Chromatografický záznam analýzy plazmy je znázorněn na Obr. 30. Profil koncentrací Bp4eT a M2 v plazmě zachycuje Obr. 31. Z výsledků analýzy byly pomocí softwaru Kinetica 5.0 vypočítány základní farmakokinetické parametry (biologický poločas, clearance, distribuční objem, maximální plazmatická koncentrace apod.). Tato data jsou shrnuta v Tab. 7.

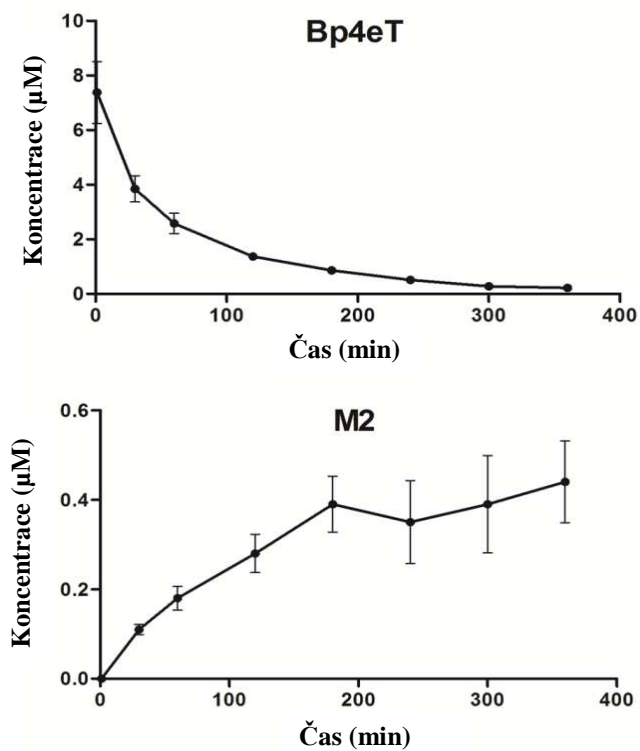
Základní farmakokinetické parametry získané po jednorázovém i.v. podání Bp4eT potkanům (n=4)	
c_{\max}	7,38 ± 2,27 (μmol/l)
t_{\max}	1,0 (min)
AUC (0-t)	529,9 ± 136,3 (μmol.min/l)
AUC (0-∞)	557,4 ± 142,4 (μmol.min/l)
$t_{1/2}$	84,9 ± 15,2 (min)
Clearance	0,0198 ± 0,0043 (l/h/kg)
Distribuční objem	2,41 ± 0,62 (l/kg)

Tab. 7 Základní farmakokinetické parametry Bp4eT

Povzbudivým výsledkem je výrazně delší biologický poločas Bp4eT (84,9 min). Ve srovnání s aroylhydrazony, studovaných v předchozích experimentech ($T_{1/2}$ aroylhydrazonu byl 27,7 min), je nárůst biologického poločasu trojnásobný. (21)



Obr. 30 Chromatografický záznam analýzy plazmy z 60. min po *i.v.* aplikaci Bp4eT potkanovi



Obr. 31 Závislost koncentrace Bp4eT a M2 v plazmě na čase

Závěr

V této práci se podařilo vyvinout HPLC/MS-MSmetodu pro stanovení nového potenciálního léčiva Bp4eT a jeho hlavních metabolitů v plazmě potkana. Během vývoje byly testovány a porovnávány dvě chromatografické kolony (Ascentis Express C18 a Discovery HS C18). Nakonec byla k separaci vybrána analytická kolona Discovery HS C18 (75 x 4,6 mm, 3 μm). Jako mobilní fáze byla zvolena směs 2 mM mravenčanu amonného a acetonitrilu v poměru 40:60 (v/v) a průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,4 ml/min. Před každou analýzou bylo nastříknuto 20 μl 20 mM vodného roztoku edetanudisodného. Pro detekci byl použit hmotnostní spektrometr s iontovým zdrojem ESI a analyzátozem iontovou pastí. Detekce probíhala v SRM módu, kde byly sledovány konkrétní fragmentační reakce všech analytů (Bp4eT, M1-E, M1-Z, M2, Dp4pT).

Pro úpravu vzorků byla využita metoda SPE s využitím extrakčního plata v 96 jamkovém formátu naplněné sorbentem tvořeným reverzní fází s navázanými fenylovými zbytky.

Byly provedeny prevalidační zkoušky a byla úspěšně ověřena linearita v plazmě. Při testování *E/Z* přechodů Bp4eT bylo dokázáno, že tyto izomery přechází kvantitativně a je možné plochy jejich píků na chromatogramu pro kvantifikaci počítat. Bylo také úspěšně prokázáno, že analýzu nenarušují žádné efekty matrice biologického materiálu.

Tato metoda byla úspěšně zvalidována a poté využita k analýze vzorků z pilotní farmakokinetické studie na potkanech, kterým bylo potenciální léčivo Bp4eT intravenózně aplikováno. Díky této studii byla vůbec poprvé shromážděna data o farmakokinetice Bp4eT a jeho hlavního metabolitu M2. Zásadním výsledkem analýzy této studie je výrazně delší biologický poločas Bp4eT, ve srovnání s jeho předchůdci z řady aroylhydrazonů.

I přes tento objev se další studie derivátů thiosemikarbazonů nebudou již zabývat studiem Bp4eT. Následující výzkum se bude týkat především derivátů odvozených od di-2-pyridylketon-3-thiosemikarbazonů (DpT), a to konkrétně zástupcům DpC a Dp44mT. U těchto derivátů je očekáván prodloužený biologický poločas a především výrazně nižší toxicita ve srovnání s Bp4eT.

Abstrakt

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se vzhledem k vysoké citlivosti a selektivitě v současnosti řadí mezi nejpoužívanější analytické metody stanovování obsahu léčiv v biologickém materiálu. Je vhodná jak pro kvantitativní, tak pro kvalitativní analýzu.

2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazon (Bp4eT) je potenciálním léčivem ze skupiny thiosemikarbazonů, které jsou v dnešní době intenzivně studována a vyvíjena jako protinádorová léčiva. Jejich specifický mechanismus účinku, který je založen na chelataci železa, může výrazně přispět k léčbě nádorů rezistentních vůči standardní chemoterapii.

Cílem této práce bylo vyvinout a ověřit základní validační parametry HPLC-MS/MS metody pro stanovení Bp4eT včetně jeho hlavních metabolitů v potkaní plazmě a využít ji pro analýzu vzorků z pilotní farmakokinetické studie na potkanech.

Separace Bp4eT a jeho metabolitů bylo dosaženo na chromatografické koloně Discovery HSC18 (75 x 4,6 mm, 3 μm) chráněné stejným typem předkolony použitím mobilní fáze skládající se z 2mM mravenčanu amonného a acetonitrilu v poměru 40:60 (v/v). Byla využita izokratická eluce při průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min. Jako detektor byl využit hmotnostní spektrometr, přičemž kvantifikace probíhala v SRM módu. Vzorky plazmy byly upraveny pomocí SPE. Metoda byla úspěšně zvalidována a využita pro analýzu vzorků *in vivo* studie na potkanech, v rámci které byl Bp4eT intravenózně aplikován čtyřem potkanům a v pravidelných časových intervalech jim byly odebrány vzorky krve.

Z výsledků pilotní studie na potkanech byly vypočítány základní farmakokinetické parametry pro Bp4eT a byl zjištěn farmakokinetický profil Bp4eT a metabolitu M2 v potkaní plazmě.

Další snaha bude zaměřena na analytické hodnocení thiosemikarbazonů ze skupiny derivátů di-2-pyridylketon-3-thiosemikarbazonu, které vykazují vyšší účinnost, mají lepší farmakokinetické vlastnosti a nižší výskyt závažných nežádoucích účinků.

Abstract

Nowadays, high-performance liquid chromatography is widely used analytical method for separation and quantification of drugs in biological material due to its high sensitivity and selectivity. HPLC is suitable for quantitative as well as qualitative analysis.

2-benzoylpyridine-4-ethyl-3-thiosemicarbazone (Bp4eT) is a potential drug from the group of thiosemicarbazones, which are currently intensively studied and developed as anticancer agents. Their specific mechanism of action, based on chelation of iron, might overcome resistance to standard chemotherapy.

The aim of this study was to develop and assess essential validation parameters of an HPLC-MS/MS method for determination of Bp4eT and its main phase I metabolites in rat plasma and to utilise the method for the analysis of samples from a pilot pharmacokinetic study in rats.

The separation of Bp4eT and its metabolites was achieved on chromatographic column Discovery HSC18 (75 x 4.6 mm, 3 μ m) protected by the same type of guard column using the mobile phase consisting of ammonium formate and acetonitrile in ratio 40:60 (v/v). The isocratic elution and the flow rate of 0.4 ml/min were utilised. Mass spectrometer was chosen as a detector and the quantification was performed in selected reaction monitoring mode. Plasma samples were treated using the solid phase extraction. The method was successfully validated and utilised for the analysis of samples from *in vivo* study in rats, where Bp4eT was intravenously administered to four male rats and blood was collected in predefined time intervals.

The main pharmacokinetics parameters for Bp4eT were calculated and basic pharmacokinetic profiles of Bp4eT and M2 metabolite in rat plasma were determined.

Further effort will be focused on analytical evaluation of thiosemicarbazones from the group of di-2-pyridylketone-3-thiosemicarbazone which express higher efficacy, more appropriate pharmacokinetic properties and lower rate of side effects.

Seznam citací

1. **Poole, C. F.** *The Essence of Chromatography*. Amsterdam : Elsevier, 2003. ISBN 978-0-44450198-1.
2. **Kazakevich, Yuri a Lobrutto, Rosario.** *HPLC for pharmaceutical Scientists*. New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2007. ISBN 978-0-47008794-7.
3. **Snyder, L. R., Kirkland, J. J. a Dolan, J. W.** *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd edition. New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2010. ISBN 978-1-11821039-0.
4. **Meyer, Veronika R.** *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. New Jersey : John Wiley & Sons, 2013. ISBN 978-1-11868134-3.
5. **Douša, Michal.** Dávkovací ventily. [Online] 11. 15., 2007. [Cited: 12. 27., 2013.] http://www.hplc.cz/Teorie/valve_injection.html.
6. **Klimesš, Jiří a kolektiv.** *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové : Nucleus HK, 2012.
7. **Snyder, L. R., Kirkland, J. J. a Glajch, J. L.** *Practical HPLC Method Development*. Hoboken : John Wiley & Sons, 1997. ISBN 9781118591512.
8. Popis GC/MS-TOF. *Chromservis*. [Online] [Cited: 4. 6., 2014.] <http://chromservis.cz/item/gc-ms-tof-description?lang=CZ>.
9. **Boháč, M., a další.** Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR MS) a její využití jako nejflexibilnější hmotnostně spektrometrické metody v proteomice. *Chemické listy*. 2005, Sv. 99, stránky 943-951.
10. SPE kolonky. *Labicom s.r.o.* [Online] [Cited: 12 27, 2013.] <http://www.labicom.cz/spe-kolonky-81/>.
11. **Sedláčková, T. a Racek, J.** Metabolismus železa a jeho regulace. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2009, Sv. 17, 1., stránky 17-23.

12. **Health, Jessica L., a další.** Iron Deprivation in Cancer- Potential Therapeutic Implications. *Nutrients*. 2013, Sv. 5, stránky 2836-2859. DOI: 10.3390/nu5082836.
13. **Ganz, Tomas.** Heparin and iron regulation, 10 years later. *Blood*. 2011, Sv. 117, stránky 4425-4433.
14. **Richardson, D. R., a další.** Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, Sv. 1790, stránky 702-717. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.04.003.
15. **Stariat, Ján, a další.** Development of an LC-MS/MS method for analysis of interconvertible Z/E isomers of the novel anticancer agent, Bp4eT. *Anal Bioanal Chem*. 2010, Sv. 397, stránky 161-171. DOI: 10.1007/s00216-009-3448-7.
16. **Stariat, Ján, a další.** LC-MS/MS identification of the principal in vitro and in vivo phase I metabolites of the novel thiosemicarbazone anti-cancer drug, Bp4eT. *Anal Bioanal Chem*. 2012, stránky 309-321. DOI: 10.1007/s00216-012-5766-4.
17. **Mrkvičková, Zlata, a další.** Development and validation of HPLC-DAD methods for the analysis of two novel iron chelators with potent anti-cancer activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, Sv. 43, stránky 1343-1351. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.11.011.
18. **Kalinowski, Danuta S. a Richardson, Des R.** The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer. *Pharmacological Reviews*. 2005, Sv. 57, 4., stránky 547-583.
19. **Stariat, Ján, a další.** Simultaneous determination of the novel thiosemicarbazone anti-cancer agent, Bp4eT, and its main phase I metabolites in plasma: Application to a pilot pharmacokinetic study in rats. *Biomedical Chromatography*. 2013. DOI: 10.1002/bmc.3080.
20. **Stariat, J., a další.** HPLC methods for determination of two novel thiosemicarbazone anti-cancer drugs (N4mT and Dp44mT) in plasma and their application to in vitro plasma stability of these agents. *Journal of Chromatography B*. 2009, Sv. 877, stránky 316-322.

21. **Kovaříková, P., a další.** HPLC determination of a novel aroylhydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. 2006, Sv. 838, stránky 107-112.

Seznam příloh

Příloha č. 1: Abstrakt ze Studentské vědecké konference (konané dne 16.4.2013 na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové)

Příloha č. 2: Abstrakt z konference HPLC 2013 (konané ve dnech 18. – 21. 11. 2013 v Hobartu, Tasmánie, Austrálie)

Příloha č.3: Plakát z konference HPLC 2013 (konané ve dnech 18. – 21. 11. 2013 v Hobartu, Tasmánie, Austrálie)

Příloha č. 4: Publikovaná práce: Stariat, Ján, et al. Simultaneous determination of the novel thiosemicarbazone anti-cancer agent, Bp4eT, and its main phase I metabolites in plasma: Application to a pilot pharmacokinetic study in rats. *Biomedical Chromatography*. 2013. DOI: 10.1002/bmc.3080.