

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

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE**  
**A KONTROLY LÉČIV**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Analytické hodnocení nových potenciálních léčiv ze skupiny  
chelátorů železa s využitím HPLC I.

Hradec Králové 2008

Michal Schöngut

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

.....

.....

Na tomto místě srdečně děkuji vedoucí mé diplomové práce, PharmDr. Petře Kovaříkové, PhD. za pomoc, obětavost, trpělivost a rady během vypracovávání diplomové práce.

Diplomová práce byla vypracována za podpory grantu GAUK 124307/2007/C/FaF a Výzkumného záměru MSM0021620822.

# OBSAH

1. ÚVOD.....	5
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	7
2.1. Definice a rozdělení chromatografických metod .....	8
2.2. Definice chromatografických charakteristik .....	10
2.2.1. Retenční údaje .....	10
2.2.2. Chromatografická data .....	11
2.2.3. Separační data.....	13
2.2.4. Přesnost kvantitativní analýzy .....	15
2.2.5. Způsobilost systému.....	16
2.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	17
2.3.1. Charakteristika HPLC, význam pro moderní analýzu léčiv .....	17
2.3.2. Historie .....	18
2.3.3. Základní schéma HPLC .....	18
2.3.4. Kvalitativní a kvantitativní analýza HPLC chromatogramu .....	26
2.4. Úprava vzorku před HPLC analýzou.....	28
2.4.1. Biologický vzorek.....	28
2.5. Chelátory železa .....	31
2.5.1. Železo v lidském těle .....	31
2.5.2. Terapie chelátory .....	31
2.5.3. Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon ze skupiny aroylhydrazonů .....	33
2.5.4. Analogy pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu .....	35
2.5.5. Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon .....	36
2.5.6. 2'-hydroxypropiofenon isonikotinoyl hydrazon (HPP-INH) .....	37
2.5.7. Analytické hodnocení aroylhydrazonů .....	38
2.5.8. Stabilita aroylhydrazonů .....	39
3. CÍL PRÁCE .....	42
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
4.1. Použité chromatografické chemikálie, materiály, přístroje a pomůcky.....	45
4.2. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty HPP-INH.....	46
4.3. Studium chování HPP-INH ve vodných roztocích – přechod izomerů, stabilita .....	49
4.3.1. Přechod izomerů .....	49

4.3.2. Stabilita ve vodných roztocích.....	49
4.4. Úprava chromatografických podmínek pro hodnocení HPP-INH v plazmě, vývoj metody extrakce pomocí precipitační deproteinace a její využití ve studii stability v plazmě.....	51
4.4.1. Úprava chromatografických podmínek pro analýzu HPP-INH v plazmě.....	51
4.4.2. Vývoj metody extrakce HPP-INH z plazmy .....	51
4.4.3. Linearita metody pro hodnocení stability HPP-INH v plazmě .....	52
4.4.4. Studie stability HPP-INH v plazmě .....	53
5. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	54
5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty HPP-INH.....	55
5.2. Analýza chování HPP-INH ve vodných roztocích – přechod izomerů, stabilita .....	58
5.2.1. Přechod izomerů HPP-INH .....	58
5.2.2. Stabilita ve vodných roztocích - PBS .....	60
5.3. Úprava chromatografických podmínek pro hodnocení HPP-INH v plazmě, vývoj metody extrakce pomocí precipitační deproteinace a její využití ve studii stability v plazmě.....	63
5.3.1. Úprava chromatografických podmínek pro analýzu HPP-INH v plazmě.....	63
5.3.2. Extrakce z plazmy .....	63
5.3.3. Linearita metody pro hodnocení stability HPP-INH v plazmě .....	64
5.3.4. Stabilita v plazmě.....	65
6. ZÁVĚR.....	68
7. ABSTRAKT.....	70
8. ABSTRACT.....	72
9. LITERATURA.....	74

# 1. ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří v současnosti mezi nejmodernější analytické separační metody. Mezi její největší výhody patří citlivost, selektivita, rychlost, malá spotřeba analyzovaného vzorku a možnost automatizace. Umožňuje zároveň analýzu kvalitativní a kvantitativní. Ve farmaceutické analýze je nejčastěji využívána ke stanovení obsahu účinných a pomocných látek v léčivých přípravcích, k hodnocení stability a čistoty léčiv a k analýze léčiv a metabolitů v biologickém materiálu.

Železo má v lidském organismu mnoho důležitých funkcí, ale ve větším množství může škodit. To se týká např. pacientů podstupujících opakované transfuze. Nadbytečné železo se též podílí na oxidačním stresu. Nejúčinnější způsob, jak tomu stavu zabránit, je použití selektivních chelátorů železa.

Chelátory železa, aroylhydrazony PIH a SIH jsou v poslední době jako potenciální léčiva předmětem intenzivního výzkumu. Bylo prokázáno, že vykazují zajímavé antioxidační a kardioprotektivní účinky. Nicméně, jejich zjevnou nevýhodou je omezená stabilita v plazmě, která se zdá být spoluzodpovědná za jejich krátký biologický poločas. Snahou je proto připravit nové účinné, ale stabilnější deriváty. Předmětem této studie je 2'-hydroxypropiofenon isonikotinoyl hydrazon (HPP-INH), který byl připraven cílenou obměnou struktury SIH.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## **2.1. Definice a rozdělení chromatografických metod**

Chromatografické metody jsou v analýze léčiv využívány velice široce. Jedná se o metody separační, které umožňují kvalitativní a často i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Chromatografie využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární (často se nazývá sorbent) a druhá mobilní. V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému a opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární fází, která je v koloně nebo plošné vrstvě, a mobilní fází, která unáší separované látky. Při styku fází s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro separaci. Ta je tedy důsledkem různé afinity dělených látek ke stacionární a mobilní fázi<sup>[1]</sup>.

V současné době se používá mnoho typů chromatografických metod, které se liší z hlediska povahy:

- 1) Mobilní fáze, resp. skupenství pohyblivé a nepohyblivé fáze (chromatografie kapalina – tuhá látka, kapalina – kapalina, plyn – kapalina, plyn – tuhá látka).
- 2) Separačního procesu (chromatografie adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná, gelová).
- 3) Způsobu vyvíjení (chromatografie eluční, vytěšňovací, frontální analýza).
- 4) Použité techniky (chromatografie sloupcová, papírová, na tenké vrstvě)<sup>[2]</sup>.

### **ad 1) Podle charakteru mobilní fáze:**

- a) Plynová chromatografie (GC).
- b) Kapalinová chromatografie (LC). Kapalinová chromatografie může být realizována:
  - i) V plošném uspořádání – především tenkovrstvá chromatografie (TLC).
  - ii) V kolonovém uspořádání – nejčastěji je využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

### **ad 2) Podle podstaty separačního procesu:**

- a) Adsorpční chromatografie. Dělení látek nastává důsledkem různé adsorpce z pohyblivé fáze na aktivní povrch adsorbentu. Adsorbentem bývá nejčastěji oxid hlinitý, oxid hořečnatý, silikagel, prášková celulóza nebo aktivní uhlí.



Pohyblivou fází tvoří buďto čistá rozpouštědla sestavená podle eluční schopnosti do tzv. eluotropické řady, nebo směsi rozpouštědel. Závislost mezi množstvím naadsorbované látky a její koncentrací v roztoku vyjadřuje adsorpční izoterma. V kapalinové chromatografii se jedná o separaci pevná fáze – kapalina (LSC), v plynové pevná fáze – plyn (GSC).

- b) Rozdělovací chromatografie. Podstatou separace je rozdílná rozpustnost dělených látek v mobilní a stacionární fázi. Po vnesení dělené směsi dochází při průchodu mobilní fáze k opakovanému rozdělování (extrakci) součástí směsi mezi obě fáze. V kapalinové chromatografii se jedná o rozpustnost ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách (LLC), kapalina použitá jako stacionární fáze je zakotvená na vhodném nosiči. V plynové rozdělovací chromatografii jde o rozdílnou rozpustnost dělených látek unášených nosným plynem v kapalně stacionární fázi (GLC).
- c) Iontově výměnná chromatografie (IEC). Lze ji realizovat pouze jako kapalinovou chromatografii. Stacionární fází jsou iontoměniče (katexy nebo anexy). Podstatou separace dělených látek, které jsou zpravidla v iontové formě, je rozdílná afinita k iontovýměnným skupinám iontoměniče. Ta je způsobena rozdílnými hodnotami disociačních konstant iontogenních skupin, různou velikostí a mocenstvím iontů.
- d) Gelová chromatografie. Mobilní fáze je kapalná, analyzované látky jsou separovány dle velikosti molekul. Molekuly jsou nesený protékající mobilní fází skrz kolonu naplněnou porézním materiálem (gelem), přičemž permeací pronikají do rozpouštědlem naplněných pórů gelu. Malé molekuly pronikají do pórů všech velikostí, větší do větších a molekuly přesahující průměr póru vycházejí z kolony bez zadržení. Separace tedy závisí na rozmezí velikostí pórů zvoleného gelu.
- e) Afinitní chromatografie. Je založena na vysoce specifických interakcích, užívá se k izolaci biologicky aktivních látek (enzymy, antigeny)<sup>[1, 2]</sup>.

## 2.2. Definice chromatografických charakteristik

### Chromatogram

Chromatogram představuje grafický nebo jiný záznam odezvy detektoru, koncentrace eluované látky nebo jiné veličiny použité jako měřítko této koncentrace v závislosti na čase, objemu nebo vzdálenosti. Idealizovaný chromatogram představuje řada gaussovských píků na základní linii<sup>[4]</sup>.

### 2.2.1. Retenční údaje

#### Retenční čas a retenční objem

Retence látky v eluční chromatografii může být vyjádřena retenčním časem ( $t_R$ ) přímo definovaným polohou vrcholu píku na chromatogramu. Z retenčního času může být vypočítán retenční objem ( $V_R$ ) podle vzorce:

$$V_R = t_R v,$$

v němž značí:

$t_R$  – retenční čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce;

$v$  – průtokovou rychlost mobilní fáze.

**Hmotnostní distribuční poměr** ( $D_m$ ) (známý též jako kapacitní faktor  $k'$  nebo retenční faktor  $k$ ) je definován jako poměr množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi a v mobilní fázi:

$$D_m = K_c \frac{V_S}{V_M}$$

v němž značí:

$K_C$  – rovnovážný distribuční koeficient (známý jako distribuční konstanta);

$V_S$  – objem stacionární fáze;

$V_M$  – objem mobilní fáze.

Hmotnostní distribuční poměr složky může být určen z chromatogramu s použitím vzorce:

$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M},$$

v němž značí:

$t_R$  – retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce;

$t_M$  – mrtvý čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce.

### **Distribuční koeficient**

Eluční charakteristika látky na určité koloně ve vylučovací chromatografii může být dána distribučním koeficientem ( $K_0$ ), který se vypočítá ze vzorce:

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0},$$

v němž značí:

$t_R$  – retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce;

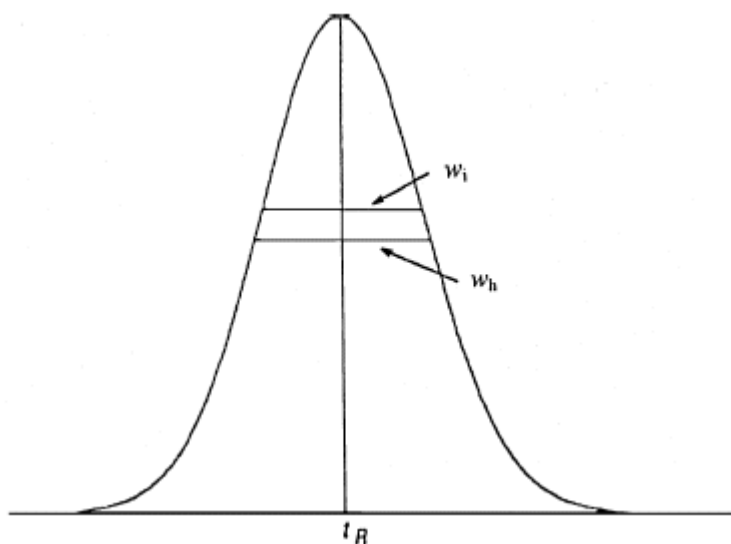
$t_0$  – mrtvý čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce;

$t_t$  – retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího složce, která může volně pronikat do všech pórů stacionární fáze<sup>[4]</sup>.

### **2.2.2. Chromatografická data**

Pík může být definován plochou píku ( $A$ ), nebo výškou píku ( $h$ ) a šířkou píku v poloviční výšce ( $w_h$ ), nebo výškou píku ( $h$ ) a šířkou píku mezi body inflexe ( $w_i$ ). Pro gaussovské píky platí vzorec:

$$w_h = 1,18 \cdot w_i$$



Obr. 1 – výška a šířka píku<sup>[4]</sup>

### Faktor symetrie

Faktor symetrie píku ( $A_s$ ) (nebo faktor chvostování píku) se vypočítá ze vzorce:

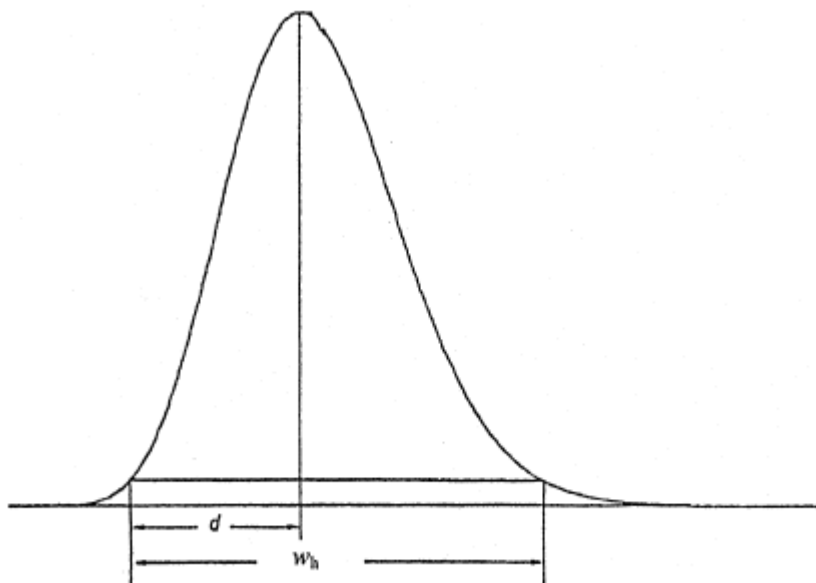
$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d},$$

v němž značí:

$w_{0,05}$  – šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky;

$d$  – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku.



Obr. 2 – faktor symetrie píku<sup>[4]</sup>

### Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater

Účinnost kolony (zdánlivá) může být vypočítána jako zdánlivý počet teoretických pater ( $N$ ) z dat získaných v závislosti na technice za podmínek izotermických, izokratických nebo izopyknických. Použije se následující vzorec, v němž hodnoty  $t_R$  a  $w_h$  musí být vyjádřeny ve stejných jednotkách (času, objemu nebo vzdálenosti):

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2,$$

v němž značí:

$t_R$  – retenční čas nebo vzdálenost (nebo objem) podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce;

$w_h$  – šířku píku v polovině jeho výšky.

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem<sup>[4]</sup>.

Pro porovnání účinnosti různých kolon se užívá parametr výškového ekvivalentu pater  $H$ , který je definován vzorcem  $H = L / N$ , kde  $L$  je délka kolony v metrech a  $N$  zdánlivý počet teoretických pater<sup>[15]</sup>.

### 2.2.3. Separační data

#### Rozlišení

Rozlišení ( $R_s$ ) mezi píky dvou složek, které mají podobnou výšku, může být vypočteno ze vzorce:

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}, \text{ kde } t_{R2} > t_{R1}$$

v němž značí:

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  – retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků;

$w_{h1}$  a  $w_{h2}$  – šířky píků v poloviční výšce.

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

Pro píky, které se vzájemně značně liší svými výškami, nemusí být výše uvedený vzorec vhodný.

### Poměr výšky píku k sedlu

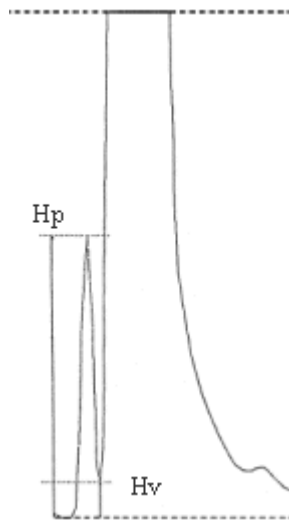
Jestliže není zcela oddělena nečistota od analyzované látky, lze použít jako kritérium způsobilosti systému ve zkouškách na příbuzné látky poměr výšky píku k sedlu ( $p/v$ ):

$$p/v = \frac{H_p}{H_v},$$

v němž značí:

$H_p$  – výšku píku nečistoty nad extrapolovanou základní linií;

$H_v$  – výšku nejnižšího bodu křivky oddělující píky nečistoty a analyzované látky (sedlo) nad extrapolovanou základní linií.



Obr. 3 – poměr výšky píku k sedlu<sup>[4]</sup>

### Relativní retence

Relativní retence ( $r$ ) se vypočítá ze vzorce:

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M},$$

v němž značí:

$t_{R2}$  – retenční čas sledovaného píku;

$t_{R1}$  – retenční čas referenčního píku (obvykle pík odpovídající zkoušené látce);

$t_M$  – mrtvý čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce<sup>[4]</sup>.

## 2.2.4. Přesnost kvantitativní analýzy

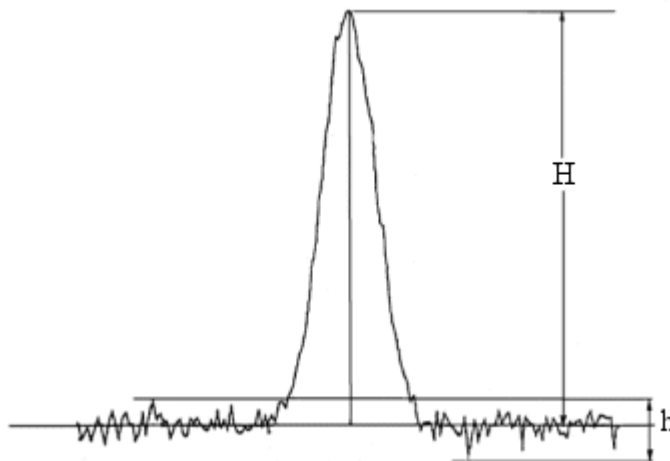
### Poměr signálu k šumu

Poměr signálu k šumu ( $S/N$ ), který ovlivňuje přesnost stanovení obsahu složek, se vypočítá ze vzorce:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}, \text{ v němž značí:}$$

$H$  – výšku píku odpovídající dané látce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřenou od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky;

$h$  – rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamenávaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku, a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík.



Obr. 4 - poměr signálu k šumu<sup>[4]</sup>

### Opakovatelnost

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky ( $RSD\%$ ) v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku a vypočítá se ze vzorce:

$$RSD\% = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}},$$

v němž značí:

$y_i$  – jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu;

$\bar{y}$  – průměr jednotlivých hodnot;

$n$  – počet jednotlivých hodnot.

Maximální dovolená relativní standardní odchylka ( $RSD_{\max}$ ) se vypočítá pro řadu nástřiků porovnávacího roztoku pro definované limity podle následujícího vzorce:

$$RSD_{\max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%, n-1}}, \text{ v němž značí}$$

$K$  – konstantu (0,349) získanou ze vztahu:  $K = \frac{0,6}{\sqrt{2}} \cdot \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$ , v němž  $\frac{0,6}{\sqrt{2}}$  představuje

požadovanou  $RSD$  pro 6 nástřiků a pro  $B = 1,0$ ;

$B$  – horní limit obsahu uvedený v jednotlivých lékopisných člancích minus 100 %, za předpokladu, že tento horní limit je určen podle reprodukovatelnosti metody;

$n$  – počet opakovaných nástřiků porovnávacího roztoku ( $3 \leq n \leq 6$ );

$T_{90\%,n-1}$  – Studentův parametr  $t$  při 90% pravděpodobnosti (oboustranný) pro  $n - 1$  stupňů volnosti<sup>[4]</sup>.

### 2.2.5. Způsobilost systému

Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému. Pro hodnocení účinnosti kolony se používají následující parametry: zdánlivá účinnost, kapacitní faktor, rozlišení, relativní retence a faktor symetrie. Faktory, které mohou ovlivnit chromatografické chování, zahrnují složení mobilní fáze, její iontovou sílu, teplotu a zdánlivé pH, průtokovou rychlost, délku kolony, teplotu a tlak, charakteristiku stacionární fáze, včetně porozity, velikosti a typu částic, specifického povrchu a u nosičů používaných v chromatografii s obrácenými fázemi rozsah chemické modifikace (odstranění povrchových silanolových skupin, obsah vázaného uhlíku atd.).

Jednotlivé části použitého zařízení musí být kvalifikovány a musí být schopny dosáhnout přesnosti požadované pro provedení zkoušky nebo stanovení obsahu<sup>[4]</sup>.



## **2.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

### **2.3.1. Charakteristika HPLC, význam pro moderní analýzu léčiv**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) představuje separační metodu, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení složek směsi. Mezi její přednosti patří:

- rychlost a citlivost analýzy,
- postačuje minimální množství vzorku,
- možnost automatizace.

Předpokladem úspěšné HPLC analýzy je optimalizace chromatografických podmínek tak, aby jednotlivé separované složky směsi poskytovaly ostré a symetrické píky, rozdělené pokud možno až na základní linii.

Nejdůležitější oblasti využití HPLC v analýze léčiv:

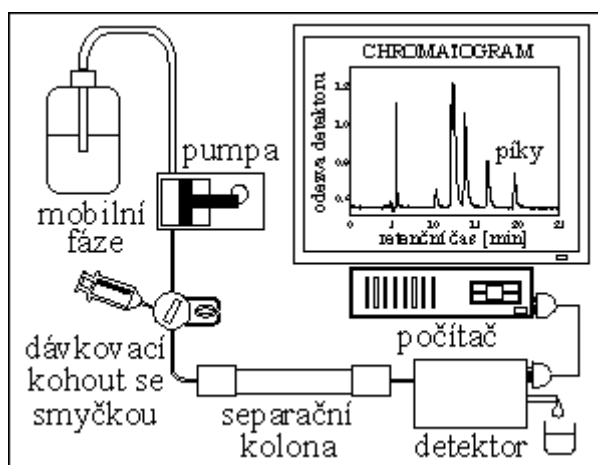
- 1) Kontrolně-analytická problematika směrem k identifikaci léčiv, stanovení obsahu a čistoty. HPLC se s výhodou používá především při analýze složených lékových přípravků. Hlavní píky na chromatogramu odpovídají účinným látkám, případné menší píky svědčí o přítomnosti nežádoucích nečistot (či reziduí pomocných látek).
- 2) Problematika stability léčiv. Na chromatogramu je zpravidla patrný hlavní pík analyzovaného léčiva a menší píky patřící rozkladným produktům. Metodika umožňuje kvantitativně hodnotit postupný úbytek sledovaného léčiva a současně kvalitativně i kvantitativně hodnotit vznikající rozkladné produkty.
- 3) Problematika monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách (nejčastěji v krevní plazmě, séru a moči). Před vlastní analýzou je zpravidla nutné izolovat léčivo a jeho metabolity z tělní tekutiny, a to nejčastěji extrakcí do vhodného organického rozpouštědla.
- 4) Analýza přírodních léčiv v rostlinném materiálu. Lze hodnotit obsah a zastoupení alkaloidů, glykosidů, vitamínů aj. v příslušných drogách<sup>[1]</sup>.

### 2.3.2. Historie

Před 70. lety 20. století bylo vědcům dostupných jen pár spolehlivých chromatografických metod. Většina chemických separací byla prováděna různými technikami, zahrnujícími chromatografii na otevřené koloně, papírovou chromatografii a chromatografii na tenké vrstvě. Tyto metody ovšem nebyly vhodné pro kvantifikaci a rozlišení podobných sloučenin. Když se v té době začala používat tlaková kapalinová chromatografie, znamenalo to snížení času průtoku, a tedy snížení času na purifikaci sloučenin izolovaných chromatografií na koloně. Ovšem, průtok nebyl stálý a debatovala se otázka, jestli je lepší mít stálý průtok nebo stálý tlak.

Vysokotlaká kapalinová chromatografie byla vyvinuta v polovině 70. let 20. století a rychle se zdokonalila s vývojem kolonových náplní a on-line detektory. Na konci 70. let nové metody, zahrnující reverzní fázi, umožnily zlepšit separaci mezi podobnými sloučeninami. V 80. letech se již HPLC běžně používala na separaci sloučenin. Nové techniky vylepšily separaci, identifikaci, purifikaci a kvantifikaci na úroveň přesahující techniky předešlé. Automatizace pomocí počítačů přidala na pohodlnosti ovládání. K vylepšení typů kolon a tím reprodukovatelnosti došlo, když se začaly používat mikro-kolony, afinitní kolony a rychlé HPLC. V současnosti je možno vybírat z mnoha typů kolon a řady detektorů, aby se dosáhlo optimální analýzy<sup>[9]</sup>.

### 2.3.3. Základní schéma HPLC



Obr. 5 – schéma HPLC soustavy<sup>[7]</sup>

Dělení látek nastává mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku. Protože k dělení látek lze přitom využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů, je možné nalézt selektivní a účinný chromatografický systém k dělení směsi prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech. Jelikož většina léčiv není těkavá, je v jejich analýze HPLC využívanější technikou než GC<sup>[1, 2]</sup>.

### **Mobilní fáze**

Mobilní fází v HPLC je rozpouštědlo, které je souvisle injikováno do kolony, tedy stacionární fáze. Roztok vzorku je nastříknut do mobilní fáze injekčním portem. Jak spolu s mobilní fází prochází kolonou, složky roztoku se pohybují podle nekovalentních interakcí s kolonou. Tyto interakce určují stupeň migrace a separace složek obsažených ve vzorku. Například, složky, které mají silnější interakce s mobilní než stacionární fází, se budou z kolony eluovat rychleji, mají kratší retenční čas<sup>[10]</sup>.

Základními požadavky na mobilní fáze jsou: čistota, kompatibilita s detektorem, rozpustnost vzorku, nízká viskozita, chemická inertnost, rozumná cena. Mobilní fáze musí být zbavené rozpuštěných plynů, dosahuje se toho probubláváním heliem nebo působením ultrazvuku za vakua. Zařízení na odplynění se nazývá degaser<sup>[2, 8]</sup>.

Existují dva základní typy použití mobilních fází, isokratická a gradientová eluce. Při dělení směsi látek, jejichž eluční parametry se příliš neliší, se používá izokratická eluce, při které se během analýzy nemění složení mobilní fáze. Její výhodou je jednoduchost a nenáročnost. U některých směsí látek však nelze tímto způsobem dosáhnout optimálního dělení, zejména jestliže se jednotlivé složky směsi svými elučními parametry významně liší. V tomto případě se využívá gradientová eluce, při které se k jedné složce mobilní fáze plynule přimíchává druhá složka s větším elučním účinkem. Obdobným způsobem lze pro eluci využít i gradient pH<sup>[2, 10]</sup>. Výhodou gradientové eluce je urychlení analýzy a ostřejší píky<sup>[11]</sup>.

### **Zásobník mobilní fáze**

Zásobník mobilní fáze by měl být o objemu nejméně 500 ml pro analytické účely; pro preparativní použití jsou nutné větší objemy. Nejčastěji je vyroben ze skla, nerezavějící oceli nebo plastu (PE, PP). Na propojení součástí chromatografického zařízení se používají kapiláry, obvykle z plastu (polytetrafluorethylen) nebo nerezavějící oceli<sup>[5, 6]</sup>.

## **Pumpy**

Při chromatografii je mobilní fáze čerpána vysokotlakým čerpadlem, které musí umožňovat konstantní bezpulzní tok mobilní fáze o malé rychlosti za vysokého tlaku<sup>[2]</sup>. Pumpa vytváří stálý průtok eluentu celým chromatografickým systémem. Současné pumpy by měly splňovat tyto parametry:

- Průtok: 0,01 – 10 ml/min
- Stabilita průtoku: pulzace tlaku pod 1 %, pro gelovou chromatografii pod 0,2 %
- Maximální tlak: do 5000 psi (344,74 bar, cca 34,5 MPa)

Základní rozdělení je na pumpy poskytující konstantní tlak a pumpy poskytující konstantní průtok. Tyto se používají častěji.

Výhodou pump s konstantním tlakem je jednoduchost a hladká základní linie, nenarušená pulzacemi. Jejich nevýhoda však spočívá v proměnlivém průtoku, který musí být stále monitorován. Nestálý průtok ovlivňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu změnou retenčního času a plochy píku.

Výhoda pump se stálým průtokem je, že dosahují opakovaně stejného elučního objemu a plochy píku, bez vlivu změny viskozity nebo ucpání kolony (až do tlakového maxima pumpy). Tyto pumpy se dále dělí na dvě skupiny – pumpy s recipročním pístem a syrinžové pumpy<sup>[8]</sup>.

Reciproční pumpy sestávají z malého pístu, který se rychle pohybuje tam a zpět, v hydraulické komoře o objemu 40 – 400  $\mu$ l. Využívají se pumpy se dvěma nebo třemi hlavami, které umožňují stálý průtok neomezeně dlouho<sup>[12]</sup>.

Syrinžové pumpy vydají jen omezený objem (250 – 500 ml) a poté musí být doplněny. Pumpa je poháněna vodícím šroubem, který pohání mobilní fázi stálou rychlostí. V porovnání s reciproční pumpou nevytváří žádné pulzace tlaku a průtoku<sup>[8, 12]</sup>.

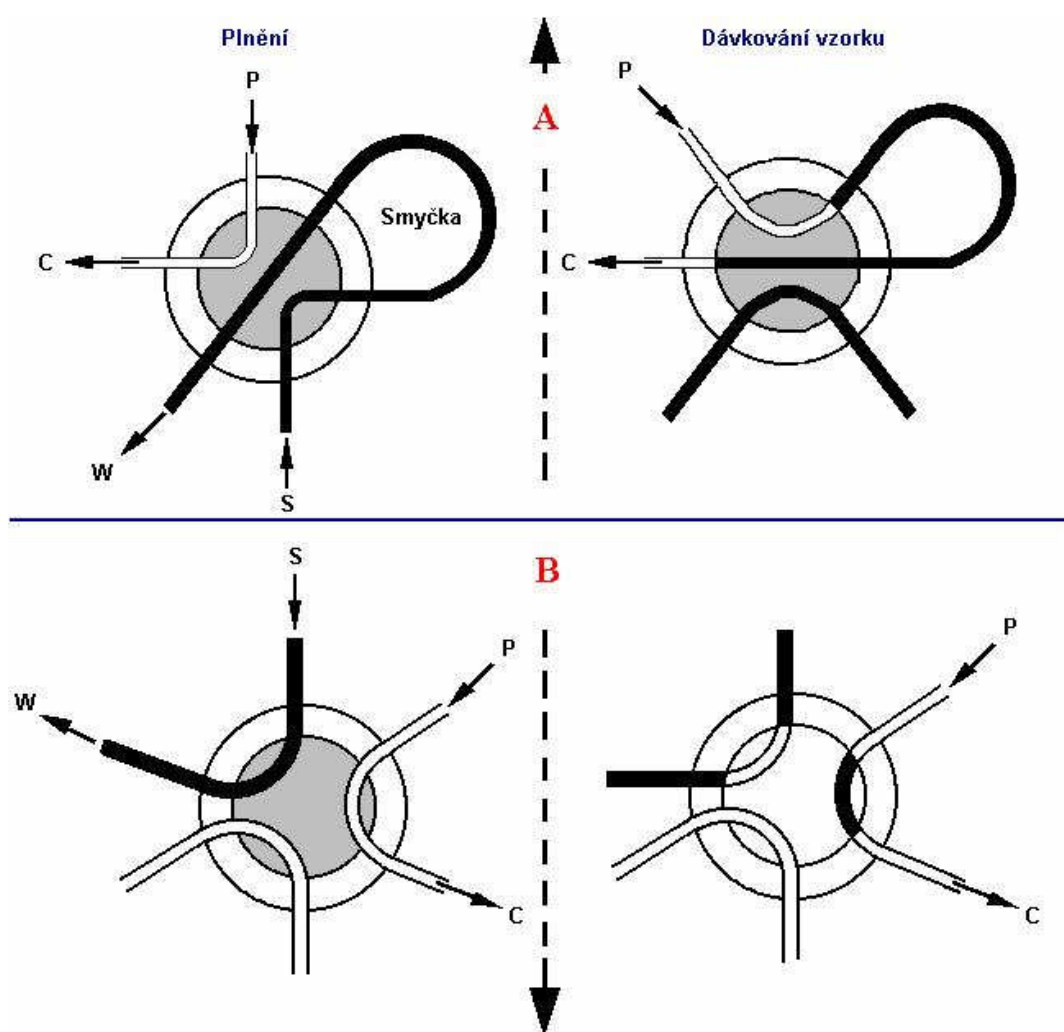
## **Injektory**

Injekce vzorku je možné dosáhnout více způsoby, nejjednodušší je použití injekčního ventilu. Nicméně v současnosti jsou již téměř výhradně používány automatické dávkovače (autosamplery). Dávkovač pro HPLC musí mít schopnost nastříknout vzorek v objemu 0,1  $\mu$ l až 100 ml (pro preparativní účely), s vysokou reprodukovatelností a pod vysokým tlakem (60 – 80 MPa). Též musí minimalizovat možné rušení průtoku<sup>[8]</sup>.

Dávkovací vysokotlaké ventily umožňují dávkovat jednak a) konstantní objem vnitřního prostoru ventilu, nebo b) při zařazení dávkovací smyčky objem smyčky. Princip dávkování šesticestného ventilu je schematicky znázorněn na obrázku 6 (P - čerpadlo, C - kolona, W - odpad, S - vzorek) <sup>[13]</sup>.

**A** - s využitím dávkovací smyčky: Otočným pohybem po směru hodinových ručiček umístí rotor ventilu smyčku se vzorkem do proudu mobilní fáze, s následným nastříknutím vzorku na kolonu.

**B** - s využitím vnitřního objemu ventilu: Ten se skládá z kruhové drážky na posuvné tyčce, která je vtlačena do tekoucího proudu <sup>[8]</sup>.



Obr. 6 – princip dávkovacího ventilu <sup>[13]</sup>

Nevýhoda dávkovacích ventilů spočívá v nutnosti změnit smyčku, pokud chceme analyzovat různé objemy vzorku.

Dávkování se dělí na manuální a automatické. Při manuálním je třeba ručně naplnit dávkovací smyčku stříkačkou a otočit ventil<sup>[8]</sup>.

### **HPLC kolony**

HPLC kolony pro analytické účely jsou nejčastěji 10 - 25 cm dlouhé, o vnitřním průměru 3 - 5 mm. Tento průměr je považován za nejvhodnější kompromis z hlediska objemu vzorku, spotřeby mobilní fáze, rychlosti a rozlišení. Zpravidla jsou kolony zhotoveny z nerezové oceli nebo skla, naplněny jsou vhodnými sorbenty. Náplň kolony musí být naprosto homogenní a rovnoměrná. Mechanicky zakotvená kapalná fáze není pro HPLC příliš vhodná, protože při vysokém tlaku dochází k jejímu narušení<sup>[1, 2, 8]</sup>. Jako HPLC polární sorbenty se používají silikagel a oxid hlinitý. Ovšem daleko častěji se používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze. Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrn jsou vhodnou chemickou reakcí navázány různé radikály:

- 1) Uhlovodíkové řetězce obsahující zpravidla 18 (nebo 8) uhlíkových atomů. Jde o nepolární fáze (tzv. reverzní).
- 2) Tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami  $-NH_2$ ,  $-CN$  aj. Jde o středně polární fáze.

Pro potřeby iontové výměnné chromatografie se jako sorbenty používají vhodné ionexy. V současné době jsou již běžně komerčně dostupné chirální stacionární fáze umožňující analýzu enantiomerů léčiv<sup>[1]</sup>.

Kromě kolon naplněných stacionární fází pro separaci existují i další typy:

- Předkolona se umísťuje před separační, aby prodloužila její životnost<sup>[14]</sup>.
- Monolitická kolona. Na rozdíl od konvenčních stacionárních fází, které se skládají z jednotlivých částic sorbentu o definované velikosti, monolitické HPLC kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Klasické 3 - 5  $\mu m$  částicové kolony vykazují výbornou separační účinnost, ale se snižující se velikostí sorbentu stoupá zpětný tlak, takže maximální rychlost průtoku je omezená. Největší výhodou monolitických kolon ve srovnání s klasickými částicemi plněnými kolonami jsou jejich hydrodynamické vlastnosti<sup>[19]</sup>.

## Detektory

Detektor vyšle paprsek světla skrz směs mobilní fáze a vzorku vycházející z kolony. Změna v intenzitě záření způsobená absorpcí, fluorescenční emisí nebo změnou refrakčního indexu (podle typu detektoru) vyvolá změnu výstupního napětí<sup>[8]</sup>.

Na detektory pro HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky:

- vysoká citlivost – detekce látek v koncentracích až ng/ml,
- reprodukovatelnost a linearita odezvy,
- umožnit gradientovou eluci,
- nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci,
- univerzálnost – detekce všech oddělených složek vzorku,
- nízká úroveň šumu,
- robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty,
- mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón co nejmenší<sup>[2, 11]</sup>.

V současné době jsou v podstatě všechny typy používaných detektorů koncentrační a lze je rozdělit do dvou skupin, a to na:

- 1) Selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci detekované komponenty v efluentu.
- 2) Univerzální, jejichž signál je úměrný celkové vlastnosti efluentu jako celku, tj. mobilní fáze a detekované komponenty<sup>[11]</sup>.

Detektory pro HPLC analýzu se dělí na:

- 1) **Spektrofotometrické detektory**, nejčastěji používané, proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektorem. Vyznačují se značnou citlivostí ( $10^{-9}$  až  $10^{-10}$  g/ml) a lze je použít ke gradientové eluci. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy ( $l$ ), koncentrací absorbující složky ( $c$ ) a vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance ( $A$ ):  $A = \varepsilon \cdot c \cdot l = \log(I_0/I)$ , kde  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient (l/mol/cm). K detekci se využívá především UV oblast spektra, mnohém méně oblast viditelná a minimálně infračervená oblast spektra. Uplatňují se především UV a UV-VIS detektory:

- a) UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm nebo 280 nm), má jednoduchou konstrukci a je cenově nejdostupnější. Pro vlnovou délku 254 nm se používá nízkotlaková rtuťová výbojka.
  - b) UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou, z rozmezí 190-700 nm. Jednodušší měří najednou jen při jedné vlnové délce, ale existují i detektory umožňující měření při dvou až čtyřech vlnových délkách současně. Zdrojem záření je deuteriová lampa, pro viditelnou oblast se často používá wolframová lampa. Vlnová délka se nastavuje monochromátorem.
  - c) Scanning UV detektor, během několika sekund snímá absorpční spektrum v maximu hodnoceného píku.
  - d) Detektor s diodovým polem (Diode array detector) je řízený počítačem. Snímá celé spektrum v reálném čase bez přerušování chromatografické separace. Záření se spektrálně rozkládá holografickou mřížkou, takže na každou z fotodiod dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v celé detektoru. Umožňuje trojrozměrnou projekci.
- 2) **Fluorimetrické detektory** jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního). Doba trvání fotoluminiscence bývá u fluorescence  $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  sekundy. Trasa paprsku začíná výbojkou (rtuťová, xenonová), přes monochromátor a štěrbinu do průtokové cely s analyzovanou látkou. Emitované záření jde přes další štěrbinu, cut-off filtr, monochromátor až do fotonásobiče. Fluorimetrické detektory jsou používány v případech, kdy analyzovaná látka (léčivo, rozkladný produkt, metabolit) vykazuje fluorescenci. Látky, které nefluoreskují, lze mnohdy reakcí s činidly převést na fluoreskující deriváty. Fluorimetrické detektory jsou tedy méně univerzální než UV-VIS, ale mnohem citlivější ( $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  g/ml) a selektivnější. Rovněž jsou použitelné při gradientové eluci. Většina současných detektorů umožňuje rychle přepínat mezi vlnovou délkou excitačního a emitovaného záření, což nabízí nejlepší možnost pro detekci všech látek směsi.
- 3) **Elektrochemické detektory** nacházejí uplatnění při hodnocení léčiv, u nichž lze využít dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí probíhající na rozhraní elektroda – eluent. Proměřují elektrochemickou veličinu (elektrodotový potenciál,



proud, kapacita), jejíž hodnota je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva. Schopnost redukovatelnosti a oxidovatelnosti látek využívá voltametrický, amperometrický a polarografický detektor. Mezi látky, které lze takto analyzovat, patří fenol, katecholaminy, nitrosaminy a organické kyseliny. Eluent musí být elektricky vodivý. Rovněž musí být dokonale odplyněn, aby v přítomnosti kyslíku nevznikal vedlejší proud a nezpůsobil šum na základní linii. Elektrochemické detektory jsou značně citlivé ( $10^{-9}$  až  $10^{-12}$  g/ml), ale nelze je použít při gradientové eluci.

- 4) **Vodivostní detektory** patří mezi univerzální detektory a měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci těchto elektrod. U vodivostního detektoru jsou kladené vysoké nároky na mobilní fázi, která by měla být pokud možno nevodivá, musí ovšem analyzované látky dostatečně rozpouštět a mít dostatečně velkou permitivitu. V případě použití pufrů se ale drasticky změní vodivost mobilní fáze a nepatrné zvýšení vodivosti v důsledku přítomnosti malého množství iontů vycházejícího z kolony detektor neumožňuje zaznamenat.
- 5) **Refraktometrické detektory** měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony, který obsahuje analyzovanou látku. Jsou prakticky univerzální, ale používají se minimálně. Jejich nevýhodou je výrazně menší citlivost ( $10^{-6}$  g/ml), nutnost termostatování a nemožnost gradientové eluce.
- 6) Pro detekci léčiv je v poslední době využíváno též spojení **HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS)**. Po výstupu z HPLC kolony dochází k ionizaci molekul léčiva, které jsou poté separovány v hmotnostním analyzátoru podle poměru hmotnosti a náboje. Nejčastěji je pro spojení HPLC-MS využívána ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku a fotoionizace za atmosférického tlaku. Spojení HPLC-MS je vysoce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci léčiv<sup>[1, 8, 11]</sup>.

## Zpracování dat

Jelikož signál z detektoru je elektrický, lze k vyhodnocení použít moderních zařízení, počítačů, což usnadňuje analýzu. Umožňuje zvýšit přesnost analýzy za snížení potřeby přítomnosti obsluhujícího pracovníka. Přispívá k automatizaci procesu a ulehčuje vyhodnocování složitých výsledků analýzy<sup>[8, 11]</sup>.

### 2.3.4. Kvalitativní a kvantitativní analýza HPLC chromatogramu

Na určení kvalitativních a kvantitativních hodnot HPLC analýzy slouží chromatografická křivka. Základní kvalitativní charakteristikou v HPLC analýze je retenční (eluční) čas  $t_R$ , což je čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Důkazem totožnosti tedy nejčastěji je shoda retenčních časů píků léčiva v analyzovaném vzorku a standardu. Dalšími identifikačními charakteristikami je shoda UV spekter, kterou některé UV detektory a především DAD umožňují v maximu píku sejmout, a analýza píku hmotnostní spektrometrií. Kvantitativní charakteristikou je plocha chromatografického píku. Použit k hodnocení výšky lze pouze u symetrických píků<sup>[1]</sup>.

Pro kvantitativní stanovení jednotlivých složek ve směsi se nejčastěji používají tyto metody:

- 1) **Metoda vnějšího standardu**, která spočívá ve dvou krocích (dvojm dávkování). V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci chromatografického záznamu se v druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se zaznamenává jeho chromatogram. Jako vnější standard se zpravidla používá u substancí standard stanovované látky, označovaný CRL (chemická referenční látka), nebo u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku vnějšího standardu.
- 2) **Metoda vnitřního standardu** – ke známému objemu roztoku vzorku se přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se opět vypočítá

z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Výběr vhodného vnitřního standardu však klade značné nároky na odbornou erudici operátora, obzvláště při stanovení vícesložkových směsí. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, musí mít podobnou koncentraci jako látky, jejichž obsah je zjišťován, musí být chemicky inertní a mít podobné fyzikálně chemické vlastnosti. Analýza léčiv a metabolitů z biologického materiálu se téměř výhradně provádí metodou vnitřního standardu<sup>[3]</sup>.

- 3) **Metoda normalizace.** Obsah jedné nebo více složek zkoušené látky v procentech se vypočítá z plochy nebo ploch jako procento celkové plochy všech píků, s výjimkou píků rozpouštědel nebo přidaných reakčních činidel a píků, které jsou v limitu zanedbatelnosti píků.
- 4) **Kalibrační postup.** Stanoví se vztah mezi měřeným nebo vyhodnocovaným signálem ( $y$ ) a množstvím (koncentrace, hmotnost, atd.) stanovované látky ( $x$ ) a vypočítá se kalibrační funkce. Výsledky analýzy se vypočítají ze změřeného nebo vyhodnoceného signálu stanovované látky pomocí inverzní funkce<sup>[4]</sup>.

## 2.4. Úprava vzorku před HPLC analýzou

Úprava vzorku je nezbytná součást HPLC analýzy. Poskytuje reprodukovatelný a homogenní roztok, který je vhodný k nastříknutí na kolonu. Cílem úpravy je vzorek, který:

- je relativně zbaven interferencí,
- nepoškodí kolonu,
- je kompatibilní se zamýšlenou HPLC metodou, tedy že se roztok vzorku rozpustí v mobilní fázi bez ovlivnění retence nebo rozlišení.

Též je žádoucí analyt zakoncentrovat, případně derivovat pro lepší detekci či separaci<sup>[15]</sup>.

### 2.4.1. Biologický vzorek

Mezi biologické materiály, které se nejčastěji analyzují, patří krev, plazma, moč a sliny. Není ovšem proveditelné aplikovat plazmu přímo do HPLC kolony nebo izolovat jednotlivé metabolity rovnou z velkého množství moči. Nejprve je třeba odstranit co nejvíce nežádoucího endogenního materiálu, beze ztráty sledované látky. K nejčastěji používaným metodám úpravy vzorku patří extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), extrakce na pevné fázi (SPE) a deproteinace<sup>[16]</sup>.

#### **Extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-Liquid Extraction)**

Metoda spočívá v rozdělení látky mezi dvě nemísitelná rozpouštědla. Biologické vzorky pro analýzu mají většinou charakter vodných roztoků, proto je jedním z požadavků na druhé rozpouštědlo nemísitelnost s vodou. Rovněž by mělo být inertní, netoxické a nemělo by tvořit emulze. Stechiometrický poměr analytu v organické a ve vodné fázi se označuje distribuční poměr  $D$ ; ideálně by se měl blížit 100 %. Rozdělovací koeficient  $P$  je dán jako podíl koncentrace látky v organické fázi ku koncentraci ve vodné fázi. Protože se tento poměr může lišit v mnoha řádech, používá se  $\log P$ .

K problémům spojeným s LLE patří:

- tvoření emulze,
- rozpustnost látky mezi obě fáze,

- analyt může být sorbován na malé částice nebo navázán na vysokomolekulární látky (bílkoviny) <sup>[15, 16]</sup>.

### **Extrakce na pevné fázi (Solid-Phase Extraction)**

SPE využívá pevného sorbentu naplněného nejčastěji v kolonce. Způsoby sorpce zahrnují reverzní fázi, normální fázi a iontovou výměnu.

SPE proces se skládá ze čtyř kroků. V prvním je pevná fáze upravena – nechá se rozpouštědlo protékat sorbentem, aby solvatovalo jeho funkční skupiny. Dalším účelem je odstranit přítomný vzduch, zaplnit prázdná místa rozpouštědlem, popřípadě odstranit drobné nečistoty z výroby. Nejčastěji se pro tento účel používá methanol. Následně je aplikováno slabé rozpouštědlo, voda nebo pufr, které je biologické matrici podobnější než methanol. Tím se zabrání vysrážení biologického materiálu.

Potom je vzorek nanesen na SPE kolonku. Jako mechanismy retence se uplatňují van der Waalsovy interakce, vodíkové můstky a dipólové síly. Během této retenční fáze se analyt koncentruje na sorbentu.

V dalším kroku jsou z kolonky vypláchnuty endogenní látky (balasty z plasmy). Analyt ovšem na kolonce musí zůstat. Platí pravidlo, že podobné se vymývá podobným.

Nakonec je ze sorbentu vhodným rozpouštědlem selektivně eluován analyt. Rozpouštědlo je zvoleno tak, aby narušilo interakce analyt-sorbent. Zároveň by mělo eluovat co nejméně ostatních látek.

Výhody SPE oproti LLE jsou:

- kompletnější extrakce analytu,
- efektivnější separace interferencí z analytu,
- nižší spotřeba organického rozpouštědla,
- pohodlnější manuální provedení.

K nevýhodám SPE patří:

- velká různorodost SPE náplní,
- nevratná adsorpce některých analytů na náplň <sup>[15, 17]</sup>.

### **Deproteinace**

Deproteinace zahrnuje metody odstranění bílkovin z analytu. Je však nutné přihlídnout k tomu, že některé látky mohou být na bílkoviny navázány. Deproteinace biologického materiálu musí splňovat tyto podmínky:

- kompletní odstranění proteinů i o malé molekulové hmotnosti,
- samotný precipitát nesmí na svůj povrch adsorbovat sledované léčivo,
- deproteinační činidlo nesmí působit na sledované léčivo a ovlivňovat pracovní postupy.

Precipitační deproteinace. Zahřívání na 90 °C po dobu 5 – 15 minut není příliš účinné, navíc může negativně ovlivnit stabilitu léčiva. Nejčastěji se k precipitaci užívají organická rozpouštědla – methanol, ethanol a acetonitril. Velmi účinná je precipitace kyselinami, například trichloroctovou a chlorovodíkovou. Méně často se využívá anorganických sloučenin a solí těžkých kovů – síran amonný, síran zinečnatý a chlorid rtuťnatý.

Výhodou je rychlost a jednoduchost úpravy. Nevýhodou je, že deproteinace není dokonalá a čistota vzorku je horší. Navíc vzorek není zakoncentrován.

Enzymová deproteinace. Deproteinace může také probíhat působením proteolytických enzymů. Byly použity subtilisin, trypsin, papain a ketodáza.

Ultrafiltrace. Narozdíl od předešlých způsobů deproteinace, kdy se po precipitaci uvolňuje do supernatantu složka vázaná na bílkoviny, zůstává při ultrafiltraci vázaná složka společně s proteiny na stejné straně membrány a membránou prošlý ultrafiltrát obsahuje jen volnou složku. Jak velké molekuly budou zadržovány semipermeabilní membránou, závisí na velikosti pórů. V principu lze zachytit sloučeniny o velikosti 1 až 10 nm, tj. o molekulové hmotnosti 500 až 1000000<sup>[18]</sup>.

## **2.5. Chelátory železa**

### **2.5.1. Železo v lidském těle**

Železo je pro organismus důležitým kovem, jeho užití jako biologického katalyzátoru je mnohostranné. Je zahrnuto v širokém spektru esenciálních biologických pochodů, např. transport kyslíku (hemoglobin), přenos elektronů (mitochondriální proteiny) a syntéza DNA (ribonukleotid reduktáza). V organismu se železo vyskytuje ve dvou formách,  $\text{Fe}^{2+}$  jako součást hemoglobinu a  $\text{Fe}^{3+}$  navázaný na transportní a zásobní proteiny (transferin a feritin). Ionty železa mohou katalyzovat Haber-Weissovou reakci vedoucí ke vzniku škodlivých hydroxylových radikálů, které poškozují buňky. Z tohoto důvodu je volné železo za fyziologických podmínek přítomné v tělesných tekutinách jen ve velmi nízkých koncentracích. Ovšem schopnosti těla vyloučit nadbytečné železo jsou omezené a může dojít k přesycení transportních a zásobních ligandů. Přetížení železem se může vyvinout jako důsledek nadměrné absorpce železa potravou, parenterálně (krevní transfuze) nebo oběma způsoby<sup>[20, 21, 22, 23, 24, 27]</sup>.

### **2.5.2. Terapie chelátory**

Termín chelátor patrně pochází z řeckého slova „chele“, což v překladu znamená krabí klepeta. Z dnešního pohledu chápeme chelátory jako látky, které díky své chemické struktuře mají afinitu k vícemocným kovům a vytvářejí s nimi pomocí kovalentních vazeb komplexní sloučeniny. Prvotní zájem o vývoj biokompatibilních chelátorů železa byl iniciován nutností pomoci pacientům s přetížením organismu železem (iron-overload). Tento stav se rozvíjí u pacientů s hereditárními onemocněními krevetvorby (např.  $\beta$ -thalasemie), které vyžadují opakovanou transfuzní léčbu<sup>[24]</sup>.

S rozvíjejícími se znalostmi o významu iontů Fe v patofyziologii řady onemocnění se však spektrum potenciálních indikací pro chelátory Fe značně rozšířilo. Bylo zjištěno, že díky selektivnímu vyvazování železa mohou být chelátory účinné u řady onemocnění,

v nichž hraje etiopatogenetickou úlohu oxidační stres<sup>[24]</sup>. Dosud bylo doloženo pozitivní působení chelátorů železa u:

- ischemicko-reperfúzního poškození<sup>[28, 29]</sup>,
- neurodegenerativních onemocnění<sup>[30, 31]</sup>,
- působení proti patogenním organismům, které jsou citlivé ke krátkodobému vyvázání železa (např. HIV virus, Plasmodium falciparum)<sup>[32, 34]</sup>,
- působení proti nádorovým buňkám, které jsou též citlivé ke krátkodobému vyvázání železa<sup>[33, 35, 36]</sup>.

Pro léčbu přetížení železem se klinicky užívá dexrazoxan, deferoxamin a deferipron L1, případně deferasirox ICL 670.

**Dexrazoxan** je ve vodě rozpustný S (+) enantiomer razoxanu, jenž patří do skupiny bisdioxopiperazinových derivátů, strukturně příbuzných EDTA. Razoxan byl původně vyvíjen jako protinádorové léčivo, což souvisí s jeho schopností inhibovat katalytickou aktivitu topoisomérázy II a následně indukovat apoptickou smrt proliferujících buněk. Během vývoje byl zjištěn jeho kardioprotektivní účinek vůči srdečnímu poškození vyvolanému antracykliny. Mechanismus působení tkví v železo-chelatujících vlastnostech. Dexrazoxan je poměrně lipofilní, a proto může snadno procházet biologickými membránami. Uvnitř kardiomyocytu pak dochází k enzymatické hydrolyze obou heterocyklů, která končí u plně hydrolyzované struktury ADR-925, což je velmi silný chelátor železa. Významným omezením užití dexrazoxanu v profylaxi antracyklinové kardiomyopatie mohou být jeho toxické účinky. Inhibice topoisomérázy a/nebo ribonukleotidreduktázy může způsobit myelosupresi<sup>[24, 25, 26]</sup>.

**Deferoxamin** (DFO) patří do skupiny tzv. sideroforů, což jsou nízkomolekulární sloučeniny produkované aerobními a fakultativně anaerobními mikroorganismy. Jelikož ve své struktuře obsahuje řadu hydrofilních skupin, má velmi omezenou biologickou dostupnost. Navíc má krátký poločas eliminace (5 – 10 min).

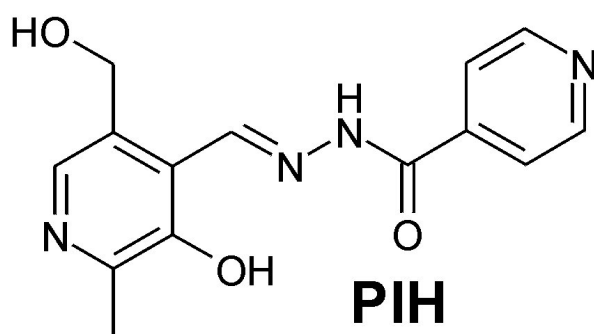
**Deferipron L1** je dosud jediný perorálně účinný chelátor železa. Díky relativně nízké molekulové hmotnosti a dostatečné lipofilitě proniká intracelulárně a může tedy uplatňovat své chelatační vlastnosti.

**Deferasirox ICL670** je zástupcem nové skupiny chelátorů železa – derivátů bishydroxyfenyl triazolu. Vyznačuje se silnou afinitou k  $Fe^{3+}$  a značnou lipofilitou<sup>[24]</sup>.



Při vývoji efektivního p.o. dostupného chelátoru Fe musí být brána v potaz řada vlastností najednou. Musí být dobře vstřebatelný z trávicího systému, mít velkou biologickou dostupnost, být rychle transportován na místo účinku. Musí být selektivní, tedy vázat železo bez ovlivnění metabolismu jiných kovů. Komplex se železem musí být rychle vyloučen, aby se nehromadil v tkáni a nedocházelo k reabsorpci. Chelátor musí umožnit příjem železa požadovaného pro esenciální buněčné procesy, např. pro syntézu hemu a buněčnou proliferaci<sup>[27]</sup>.

### 2.5.3. Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon ze skupiny aroylhydrazonů



Obr. 7 – strukturní vzorec pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu

Molární hmotnost  $M_r = 287$  g/mol

Vlastnosti: krystalická látka nažloutlé až intenzivně žluté barvy, soli se mohou barvou lišit<sup>[24]</sup>.

Chelatační účinek pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu (PIH) byl objeven Ponkou et al. na konci 70. let. V experimentu, kde byly retikulocyty inkubovány s trasferinem (s navázaným <sup>59</sup>Fe) a isoniazidem (INH, inhibitor hemové syntézy), bylo zjištěno, že se Fe hromadí v různých non-hemových kompartmentech. Autoři zaznamenali, že po přidání pyridoxalu do inkubačního média se z buněk mobilizuje značné množství Fe. Bylo prokázáno, že tento jev byl způsoben přítomností PIH jako produktu spontánní chemické reakce mezi pyridoxalem a INH v daném prostředí<sup>[24, 37]</sup>.

PIH lze nasyntetizovat poměrně rychlým, jednoduchým a efektivním způsobem. Výchozími látkami jsou pyridoxal (vitamin B6) a isoniazid, tedy látky jasně definované, levné a komerčně dostupné. PIH je molekula o relativně vysoké lipofilitě. PIH jako volná base je poměrně obtížně rozpustný ve vodném prostředí. Tento fakt vedl experimentátory k aplikaci suspenze PIH base, nebo alespoň k částečnému rozpuštění s užitím různých kosolventů (např. 10% Cremophor EL). Nejnovější přínos v optimalizaci rozpustnosti PIH je patent USA, který popisuje přípravu diprotonizovaných solí (PIH·2HCl apod.)<sup>[24]</sup>. Další chemickou vlastností společnou pro všechny hydrazonové analogy je schopnost podstupovat hydrolytickou degradaci v kyselém či zásaditém prostředí, jejímž produktem jsou výchozí reaktanty syntézy hydrazonu<sup>[38]</sup>.

### Farmakokinetika a farmakodynamika

Předpokládá se, že PIH vstupuje do buněk pasivní difuzí. Nepředpokládá se však, že by difuze PIH byla limitním faktorem rychlosti mobilizace nitrobuněčného železa. Kinetika mobilizace Fe z retikulocytů byla shodná s kinetikou efluxu FePIH<sub>2</sub>, což je nejpomalejší krok procesu<sup>[39, 40]</sup>.

Mobilizace <sup>59</sup>Fe je nejúčinnější u analogů, jejichž log P předpovídá rozpustnost ve vodě i prostupnost membránou. Nejúčinnější mobilizace <sup>59</sup>Fe dosáhly analogy syntetizované z pyridoxalu a nejméně účinné byly analogy odvozené 2-hydroxy-1-naftaldehydu<sup>[41, 42, 43, 44]</sup>.

Na rozdíl od jiných chelátorů lze PIH pokládat za značně selektivní ligand. Za fyziologických podmínek má relativně nízkou afinitu k Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup>, má však určitou afinitu k Zn<sup>2+</sup><sup>[24]</sup>.

PIH působil signifikantně antioxidačně v různých biochemických in vitro modelech:

- železem indukované tvorbě hydroxylových radikálů<sup>[45]</sup>,
- oxidaci 2-deoxyribózy<sup>[46]</sup>,
- tvorbě askorbového radikálu<sup>[47]</sup>,
- peroxidaci lipidů,
- indukci zlomů plazmidové DNA<sup>[48]</sup>.

V řadě experimentů měl PIH ekvivalentní či vyšší antioxidační účinek než DFO. Rovněž byl studován protektivní vliv analogu SIH před oxidačním stresem<sup>[49]</sup>.

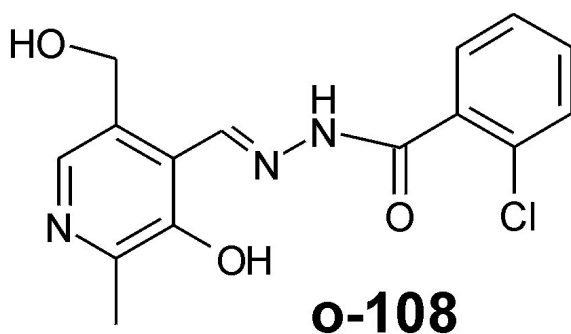
## Toxicita

Heshko et al. po p.o. podávání PIH v dávce 125-500 mg/kg/den po dobu 10 dní nezjistili u potkanů žádné abnormální změny svědčící pro renální, hepatální nebo hematopoetickou toxicitu. Sookvanischsilp měřil LD<sub>50</sub> PIH po jednorázovém p.o. podání: u myši je 5,0 g/kg (samci) a 4,5 g/kg (samice), u potkanů pak 5,3 resp. 5,0 g/kg. LD<sub>50</sub> po i.p. podání byla stanovena na 1,1 a 1,0 g/kg u myši a 1,2 a 1,1 g/kg u potkanů. Mikroskopické vyšetření tkání odhalilo tukovou degeneraci jater a městnání v ledvinách<sup>[24]</sup>.

### 2.5.4. Analogy pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu

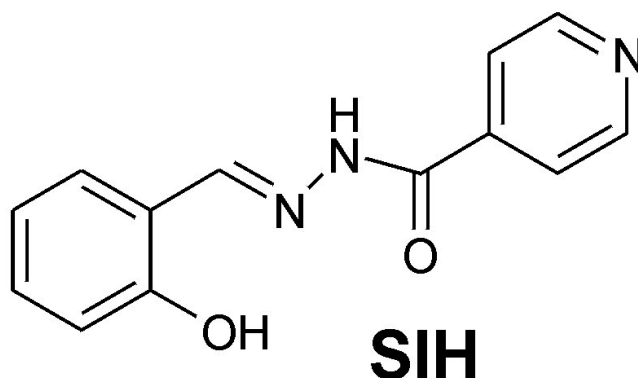
V dnešní době představuje PIH mateřskou látku skupiny aroylhydrazonových analogů, které se od sebe liší svými fyzikálně-chemickými i biologickými vlastnostmi. Odvozené látky byly připraveny Schiffovou kondenzací aromatických aldehydů s aromatickými hydrazidy. Od pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu byla odvozena série 300, PIH; od salicylaldehyd isoniazid hydrazonu série 200, SIH; od naftalaldehyd isonikotinoyl hydrazonu série 100, NIH; od 2-pyridylkarbaldehyd isonikotinoyl hydrazonu série PCIH; od di-2-pyridylketon isonikotinoyl hydrazonu série PKIH.

Mezi nejzajímavější analogy vzešlé z in vitro screeningu patří SIH, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazon (o-108), pyridoxal 2-fluorbenzoyl hydrazon (o-109) a 2-hydroxynaftaldehyd isonikotinoyl hydrazon (NIH 311)<sup>[24]</sup>.



Obr. 8 – strukturní vzorec pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazonu (o-108)

### 2.5.5. Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon



Obr. 9 – strukturní vzorec salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu

Sumární vzorec:  $C_{13}H_{11}N_3O_2$

Molární hmotnost  $M_r$ : 241,24

Syntéza: SIH je syntetizován kondenzací jako Schiffova base z dostupných prekurzorů salicylaldehydu a isoniazidu<sup>[50]</sup>.

#### Vlastnosti

SIH je žlutá krystalická látka. Jelikož je slabě rozpustný ve vodě, byla připravena rozpustná sůl  $SIH \cdot HCl$ . SIH tvoří se železem komplexy o stechiometrii 2:1, tedy  $FeSIH_2$ . Potenciometrickou titrací byly určeny  $pK_a$  hodnoty chelátoru: 3,34, 8,29 a 9,8<sup>[15, 50]</sup>.

#### Afinita k železu

Protože chelátory železa mívají různou stechiometrii, pro jejich srovnání může být použit parametr  $pFe^{3+}$ , který představuje záporný logaritmus  $[Fe^{3+}]$  v přítomnosti definovaného množství  $Fe^{3+}$  a chelátoru. Při 1  $\mu M$   $Fe^{3+}$  a 1 mM chelátoru,  $pFe^{3+}$  pro EDTA a DFO je 25,3 a 28,6, respektive. Pro PIH analogy je tato hodnota rovna jejich  $K_{7,4}$ . Jelikož bylo dokázáno, že analogy PIH účinně inhibují endozomální uptake železa z transferinu, afinita chelátoru k  $Fe^{3+}$  v kyselém prostředí je též předmětem zájmu. Při pH 5 žádný chelátor nepřejmul  $Fe^{3+}$  od EDTA, pro porovnání kompetice byl použit slabší chelátor – nitrilotrioctová kyselina, NTA.

Chelátor	Log $K_{7,4}$	Kompetice s NTA (pH 5,0)*
PIH	27,4±0,1	0,90±0,02
SIH	27,3±0,04	0,77±0,02

Tab. 1 – afinita chelátorů k  $Fe^{3+}$

\* Část z 25  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  vázaného k PIH, resp. SIH, koncentrace PIH, resp. SIH, a NTA byla 50  $\mu\text{M}$ <sup>[51]</sup>.

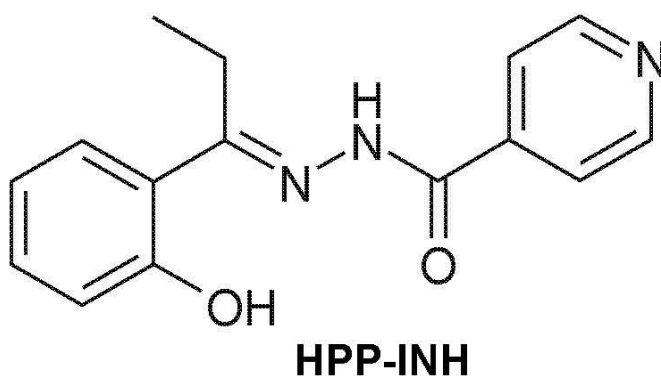
### Toxicita

SIH, jako i jiné analogy PIH, se ve vodném prostředí rozkládá, vznikají produkty hydrolýzy. Jejich antiproliferativní efekt na K562 buňky byl zkoumán, aby se zjistilo, jestli přispívají k antiproliferativním účinkům chelátoru. Hydrazidy nejsou toxické v koncentraci nižší než 1 mM.  $\text{IC}_{50}$  salicylaldehydu a pyridoxalu je 110 a 500  $\mu\text{M}$ , respektive. PIH a SIH jsou toxické při mnohem nižší koncentraci, takže se dá předpokládat, že jejich toxicita je způsobena samotnými chelátory a produkty hydrolýzy ji příliš neovlivní.

Chelátor	aldehyd a hydrazid [ $\mu\text{M}$ ]	čerstvě připravený chelátor [ $\mu\text{M}$ ]	chelátor při hydrolytické rovnováze [ $\mu\text{M}$ ]
PIH	110±16	89±5	87±5
SIH	36±2	14±3	28±6

Tab. 2 - hodnoty  $\text{IC}_{50}$  pro K562 buňky (inkubace 72 hodin)

### 2.5.6. 2'-hydroxypropiofenon isonikotinoyl hydrazon (HPP-INH)



Obr. 10 – struktura 2'-hydroxypropiofenon isonikotinoyl hydrazonu

Molární hmotnost Mr: 269 g/mol

Vlastnosti: HPP-INH je žlutá krystalická látka s bodem tání 244 – 246 °C.

Chelátor železa SIH má slibné farmakologické vlastnosti, ovšem trpí relativně krátkým poločasem rozkladu. Aby se tomu předešlo, byl nasyntetizován nový derivát. 2'-hydroxypropiofenon isonikotinoyl hydrazon (HPP-INH) byl připraven z ekvimolárních množství 2'-hydroxypropiofenonu a isonikotinoyl hydrazonu, pod mikrovlnnou radiací (400W) <sup>[52]</sup>.

## 2.5.7. Analytické hodnocení aroylhydrazonů

### UV/VIS spektroskopie

Při analýze stability PIH v roztoku o neutrálním pH 7,5 byla naměřena 4 absorpční maxima – 210, 295, 308 a 384 nm. V alkalickém roztoku (pH 12) byla pozorována 3 maxima – 210, 304 a 387 nm. V kyselém roztoku (pH 1) byla zjištěna 3 absorpční maxima – 233, 307 a 343 nm <sup>[53]</sup>.

### TLC

Metoda pro rychlou a jednoduchou analýzu stability tří aroylhydrazonů (PIH, SIH a pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon - o-108), jejich syntetických prekurzorů a komplexů se železem. Byla zvolena reverzní stacionární fáze, RP-TLC, protože umožňuje lepší separaci chelátorů, prekurzorů a chelátů. Jako mobilní fáze byly zkoušeny kombinace různých rozpouštědel – voda, methanol, acetonitril, 0,01 M fosfátový pufr při různém pH. Jako nejvhodnější pro separaci byla zvolena směs 0,01 M fosfátový pufr o pH 7 a acetonitril v poměru 70:30 <sup>[54]</sup>.

### HPLC

Pro zvýšení rozpustnosti ve vodě byly PIH a SIH převedeny na soli PIH · 2HCl a SIH · HCl. Byly vyzkoušeny různé chromatografické podmínky, aby se dosáhlo optimální separace chelátorů z jejich syntetických prekurzorů. Jako nejvhodnější kolona byla vybrána Waltrex C<sub>18</sub> o délce 25 cm, naplněná stacionární fází Nucleosilem. Acetonitril a nižší pH způsobovaly nižší retenci, methanol vedl k silnější retenci všech látek. Pro lepší separaci pyridoxalu, isoniazidu a PIH byla přidána 1-heptansulfonová kyselina. Aby na sebe chelátor nenavazoval volné železo z HPLC zařízení, byl do mobilní fáze přidán v nadbytku jiný chelátor – EDTA v koncentraci 2 mM. Navíc přidání EDTA vylepšilo tvar píků všech chelátorů. Pro PIH byla jako nejvhodnější mobilní fáze určena směs

0,01 M fosfátový pufr o pH 7 : methanol : acetonitril (60:20:20), průtok 0,8 ml/min. Analyt byl detekován při 297 nm. Pro SIH byla zvolena směs 0,01 M fosfátový pufr o pH 7 : methanol : acetonitril (55:25:15), průtok 0,8 ml/min. Detekce probíhala při 288 nm<sup>[54]</sup>.

### **HPLC analýza SIH v plazmě**

(stanovení základních farmakokinetických parametrů)

Požadovaná chromatografická separace byla dosažena na koloně (250 x 4,6 mm) se stacionární fází LiChrospher® RP-18, 5µm. Mobilní fází byla směs fosfátového pufru (0,01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O s 2 mM EDTA, pH 6) a methanolu (53:47, v/v), průtok byl 0,9 ml/min. Na úpravu vzorku byly vyzkoušeny různé metody (SPE, LLE, proteinová precipitace). Precipitace s použitím 0,1 M HClO<sub>4</sub> a acetonitrilu dosáhla největšího reprodukovatelného výtěžku. Koncentrace 0,26 µg/ml byla určena jako LLOQ (nejnižší kvantifikovatelné množství)<sup>[50]</sup>.

### **HPLC analýza o-108 v plazmě**

(stanovení základních farmakokinetických parametrů)

Separace byla prováděna na koloně 250x4,6 mm s náplní LiChrospher®100, RP-18 (5 µm) chráněné předkolonou Purospher RP-18 (5 µm). Mobilní fáze byla směs roztoku fosfátového pufru (0,01 M) s 2mM EDTA, methanolu a acetonitrilu (42:24:14; v/v/v), průtok 1,0 ml/min. Detekce probíhala při 288 nm, nástřik byl 100 µl. Tato metoda byla validována na selektivitu, linearitu (0,8 – 150 µg/ml) a stabilitu. Tato metoda byla úspěšně použita k analýze vzorků obdržných z pilotní farmakokinetické studie, ve které byl chelátor intravenózně podán králíkům<sup>[56]</sup>.

## **2.5.8. Stabilita aroylhydrazonů**

Stabilita PIH byla zjištěna měřením UV absorpce. Při fyziologickém pH byl hydrazon stabilní, resp. se rozkládal mnohem pomaleji než při extrémním pH. Jsou naměřena 4 absorpční maxima – 210, 295, 308 a 384 nm. Hydrolyza je charakterizována úbytkem hydrazonového píku na 384 nm. Průběh absorbance byl měřen poblíž tohoto píku, při vlnové délce 380 nm, a je popsán rovnicí exponenciálního rozkladu:

$$A_t = A_0 e^{-kt} + C,$$

kde A je absorbance v čase t, C je absorbance v nekonečnu a k je konstanta rozkladu pseudo prvního řádu. Poločas rozkladu ve fosfátovém pufru (phosphate buffered saline-PBS) při teplotě 37 °C je přibližně 24 hodin. V RPMI buněčném médiu se PIH rozkládá rychleji, s poločasem cca 80 minut. Způsobeno to nejspíš je tím, že RPMI obsahuje přibližně 6,5 mM aminokyselin. Amino skupina aminokyseliny snižuje elektronovou hustotu uhlíku imino skupiny a tím se zvýší náchylnost hydrazonové vazby k nukleofilním útokům vody. V obou případech, v roztoku PBS a RPMI je hydrolyza nekompletní, dochází k rovnováze mezi hydrolyzou a následnou kondenzací.

PIH se rozkládá rychleji než jeho analog SIH, způsobuje to pyridinový dusík, který snižuje elektronovou hustotu na iminovém uhlíku. Obdobně, rychlost kondenzace analogů z prekurzorů rostla u látek se skupinami vyvolávajícími záporný indukční efekt. Údaje jsou uvedeny v tabulce 3. Rovnováha hydrolyzy je závislá na koncentracích pyridoxalu, resp. salicylaldehydu a isoniazidu. Konstanta rovnováhy je pro jednotlivé chelátory určena vzorcem:

$$K_{eq} = \frac{[PIH]}{[pyridoxal][INH]} \quad K_{eq} = \frac{[SIH]}{[salicyl aldehyd][INH]}$$

Chelátor	Hydrolyza		Kondenzace		Rovnováha
	k [10 <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> ]	t <sub>1/2</sub> [h]	k <sub>k</sub> [10 <sup>3</sup> min <sup>-1</sup> ]	t <sub>1/2</sub> [h]	
SIH	4,3±0,2	2,7	5,0±0,02	2,3	2000±100
PIH	8,8±0,2	1,3	17,5	0,7	6650±800

Tab. 3 – stabilita aroylhydrazonů

Zatímco hydrolyza samotného chelátoru je extenzivní, komplex s Fe<sup>3+</sup> je poměrně stabilní ve fosfátovém pufru i RPMI.

V silně kyselém prostředí se PIH rozložil na pyridoxal a isoniazid. Poklesla intenzita absorpce při vlnové délce 225 nm a nad 300 nm. Výrazná absorpční maxima byla při vlnových délkách 233, 307 a 343 nm. Pokud kyselé hydrolyzovaný PIH nebo kyselý roztok ekvimolárního množství pyridoxalu a isoniazidu upravíme na pH 12, mají shodné spektrum jako čerstvě připravený PIH při pH 12. Při vysokém pH tedy spolu pyridoxal a isoniazid kondenzují a vytváří PIH. Projeví se to zvýšením absorbance při vlnové délce 387 nm. Při pH 1,3 byly pro PIH naměřeny rychlostní konstanta k = 4,14±0,08 s<sup>-1</sup> a



poločas  $t_{1/2} = 16,7 \pm 0,3$  ks. Pravděpodobný mechanismus hydrolyzy hydrazonové vazby začíná protonací iminového dusíku. Krokem určujícím rychlost v kyselém prostředí je útok aminu na karbonylovou skupinu. V neutrálním prostředí je určujícím krokem adice vody, čímž se tvoří karbinolaminový intermediát.

I při vysokém pH došlo k hydrolyze, snížila se absorpce při vlnové délce 387 nm. Absorpční maxima byla pozorována při 210, 304 a 387 nm. Při pH 10,7 byly pro PIH naměřeny rychlostní konstanta  $k = 6,99 \pm 0,34 \text{ s}^{-1}$  a poločas  $t_{1/2} = 9,9 \pm 4,6 \text{ ks}^{[51,53]}$ .

K objasnění krátkého poločasu rozkladu aroylhydrazonových chelátorů byla důkladně analyzována jejich stabilita v plazmě a dalších relevantních biologických materiálech. Poločasy rozkladu SIH a PIH jsou uvedeny v tabulce 4:

<b>Chelátor</b>	<b>králíčí plazma</b>	<b>ultrafiltrát králíčí plazmy</b>	<b>BSA</b>	<b>RMPI</b>	<b>PBS</b>
SIH	0,52±0,10	1,21±0,24	3,59±0,23	7,24±0,45	52,73±9,04
PIH	0,66±0,13	1,11±0,17	2,54±0,18	4,00±0,47	28,35±0,25

Tab. 4 – poločasy rozkladu v biologických materiálech [h]

koncentrace látek  $c$  byla 100  $\mu\text{M}$

U SIH byla stabilita měřena i v jiných druzích zvířecí plazmy: V prasečí dosáhl poločasu rozkladu  $1,47 \pm 0,07$  h a v hovězí plazmě  $1,30 \pm 0,09$  h. Ačkoliv zde byla degradace výrazně nižší než v králíčí plazmě, stále byla významná. Zajímavostí je, že když se měřila stabilita v králíčí plazmě při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , měl SIH delší poločas rozkladu (1 h), kdežto PIH se rozkládal rychleji (0,46 h)<sup>[55]</sup>.

### **3. CÍL PRÁCE**

Cílem práce bylo:

- 1) Vyvinout optimální chromatografické podmínky pro HPLC analýzu čistoty HPP-INH.
- 2) Studovat chování HPP-INH ve vodných roztocích a to zejména s ohledem na přechod izomerů a základní hodnocení jejich stability.
- 3) Vyvinout metodu extrakce HPP-INH z plazmy a využít ji v hodnocení stability HPP-INH v plazmě.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## **4.1. Použité chromatografické chemikálie, materiály, přístroje a pomůcky**

### **Chemikálie**

Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) a 2'-hydroxypropiofenon isonikotinoyl hydrazon (HPP-INH) byly syntetizovány výše popsánymi způsoby na katedře anorganické a organické chemie FaF, UK. Totožnost byla ověřena NMR.

Isoniazid (INH) a 2'-hydroxypropiofenon (HPP) byly koupeny od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo).

Methanol, acetonitril a DMSO byly koupeny od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

EDTA,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  a NaOH byly koupeny od firmy Lachema (Brno, ČR).

Králičí plazma byla koupena ze ZOO Servisu (Dvůr Králové, Česká republika).

Voda byla purifikována reverzní osmózou.

### **Chromatografický materiál**

Chromatografická kolona 250×4 mm I. D. s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 μm), Merck (Darmstadt, Německo).

Předkolona Purospher® 100, RP-18e (5 μm), Merck (Darmstadt, Německo).

### **Přístroje**

Analytické váhy, Helago (Česká republika, Slovenská republika, Maďarsko).

Acidimetr 333, Drupta, Praha (Česká republika).

Ultrazvuková lázeň K10, Kraittek (Slovenská republika).

Chromatografický systém LC20A Shimadzu (Duisburg, Německo) sestávající z DGU-20A3 degasseru, dvou LC-20 AD pump, SIL-20 AC autosampleru, CTO-20AC udržovače teploty, UV detektoru a CBM-20AC komunikačního modulu. Chromatografická data byla zpracována programem LC solution software, verze 1.21 SP1.

### **Pomůcky**

Laboratorní sklo

Mikrostríkačka – 25 μL, Hamilton (Švýcarsko).

Mikropipeta

## **4.2. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty HPP-INH**

Ideální chromatografické podmínky zahrnují vhodnou stacionární fázi, mobilní fázi, průtok a vlnovou délku UV detekce. Cílem bylo najít takové nastavení, aby spolu na chromatogramu neinterferovaly píky HPP-INH, rozkladných produktů a čela. Nastříkováno bylo 20 µl vzorku tvořeného 0,5 ml vody, 0,5 ml methanolu a 5 µl zásobních roztoků zkoumaných látek - (HPP-INH, INH a HPP) o přibližné koncentraci 1 mg/ml.

### **Výběr stacionární a mobilní fáze a vlnové délky detekce**

Používána byla chromatografická kolona 250 x 4 mm s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm). Chráněna byla předkolonou s náplní Purospher® 100, RP-18e (5 µm).

Na koloně byly vyzkoušeny tyto isokratické chromatografické podmínky:

- 1) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol, 40:60 (v/v). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 254 a 288 nm.
- 2) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol, 35:65 (v/v). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 254 a 288 nm.
- 3) vodný roztok EDTA (2 mmol/l) : methanol, 40:60 (v/v). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 254 a 288 nm.
- 4) vodný roztok EDTA (2 mmol/l) : methanol, 35:65 (v/v). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 254 a 288 nm.
- 5) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : acetonitril, 50:50 (v/v). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 254 a 288 nm.
- 6) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : acetonitril, 55:45 (v/v). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 254 a 288 nm.
- 7) vodný roztok EDTA (2 mmol/l) : acetonitril, 50:50 (v/v). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 254 a 288 nm.

- 8) vodný roztok EDTA (2 mmol/l) : acetonitril, 55:45 (v/v). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 254 a 288 nm.
- 9) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol, 33:67 (v/v). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 254 a 288 nm.
- 10) fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol, 33:67 (v/v). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 252 a 288 nm.

Poté byly vyzkoušeny tyto chromatografické podmínky gradientové eluce:

fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol (A:B). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 252 a 288 nm.

- 11) 0:00 - 3:00 min B 50 %, 3:00 - 5:30 min B 50 – 65 % (v/v).
- 12) 0:00 - 3:00 min B 45 %, 3:00 - 5:30 min B 45 – 70 % (v/v).
- 13) 0:00 - 3:00 min B 35 %, 3:00 - 5:30 min B 35 – 65 % (v/v).
- 14) 0:00 - 3:00 min B 35 %, 3:00 - 5:30 min B 35 – 50 % (v/v).
- 15) 0:00 – 10:00 min B 30 – 65 % (v/v).
- 16) 0:00 – 10:00 min B 35 – 70 % (v/v).

Pro analýzu samotného HPP-INH byla nejvhodnější mobilní fáze: fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 : methanol, 33:67 (v/v), průtok 1,0 ml/min. Pro detekci byly zvoleny vlnové délky UV lampy 252 a 288 nm, 252 nm odpovídá absorpčnímu maximu rozkladného produktu HPP, 288 nm je vhodné pro detekci HPP-INH.

Dále bylo nutné optimalizovat podmínky, aby se bez vzájemné koeluce separovaly HPP-INH, INH, HPP a aby INH neinterferoval s DMSO, které se eluovalo v čele chromatogramu. Jednalo se o úsek do 3. minuty, kde bylo potřeba snížit podíl organické fáze a tím od sebe separovat píky DMSO a INH. Byla vyzkoušena různé objemová a časová nastavení gradientové eluce. Při rychlém nástupu většího rozdílu gradientu (3:00 – 5:30 min, 35 → 65 % methanolu) docházelo k porušení základní linie, při malém rozdílu (35 → 50 % methanolu) se prodloužily retenční časy.

Po každé gradientové eluci bylo třeba ekvilibrovat kolonu na počáteční podmínky, a proto se 20 minut promývala mobilní fází, jejíž složení odpovídalo nastavení v počátku příští analýzy.

Z těchto hledisek byla nejvhodnější gradientová eluce:

fosfátový pufr s EDTA, pH 6 : methanol (A:B), 0:00 – 10:00 min B 35 – 70 % (v/v).

### **Příprava mobilní fáze**

Pro analýzu byl připravován fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, upravený 0,1 mol/l roztokem NaOH na pH 6. Před použitím byl roztok přefiltrován. Smísení obou složek mobilní fáze řídil automaticky operátor.

### **Příprava roztoků**

Při vývoji chromatografických podmínek byly připravovány zásobní roztoky jednotlivých analytů, o koncentraci 1 mg/ml. HPP-INH a SIH byly rozpuštěny v DMSO, isoniazid (INH) a 2'-hydroxypropiofenon (HPP) byly rozpuštěny v methanolu. Pro lepší rozpuštění byly roztoky umístěny na 5 minut do ultrazvukové lázně.



### **4.3. Studium chování HPP-INH ve vodných roztocích – přechod izomerů, stabilita**

#### **4.3.1. Přechod izomerů**

Během analýzy HPP-INH se zjistilo, že se na chromatogramu rozdílně eluují jeho dva izomery, (Z) a (E). Poté bylo zkoumáno, za jakých podmínek přechází jeden izomer v druhý a jak jsou stabilní.

Pro analýzu přechodu (Z) a (E) izomerů HPP-INH byly použity chromatografické podmínky vyvinuté dříve pro hodnocení čistoty HPP-INH (gradientová metoda):

Stacionární fáze: chromatografická kolona 250x4 mm s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm). Předkolona Purospher® 100, RP-18e (5 µm).

Mobilní fáze: směs fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol (A:B), 0:00 – 10:00 min B 35 – 70 % (v/v). Průtok 1,0 ml/min. UV detekce 252 a 288 nm.

Přechod izomerů byl sledován v roztocích, které se běžně při HPLC analýze HPP-INH používaly:

- 1) methanol : voda (50:50, v/v),
- 2) methanol,
- 3) acetonitril – voda (50:50, v/v),
- 4) acetonitril.

5 µl zásobního roztoku HPP-INH o koncentraci přibližně 1 mg/ml bylo přidáno do 1 ml výše uvedených roztoků. V určených časech bylo poté 20 µl vzorku nastříknuto na HPLC kolonu a zanalyzováno.

#### **4.3.2. Stabilita ve vodných roztocích**

Analýza stability HPP-INH ve vodných roztocích byla zkoumána s těmito chromatografickými podmínkami:

Stacionární fáze: chromatografická kolona 250x4 mm s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm). Předkolona Purospher® 100, RP-18e (5 µm).

Mobilní fáze: směs fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol, poměr 33:67 (v/v). Průtok 1,0 ml/min.

UV detekce 252 a 288 nm.

Stabilita HPP-INH byla hodnocena při vystavení těmto podmínkám:

- stabilita ve fosfátovém pufru (PBS) v lázni o teplotě 37 °C,
- stabilita v kyselém roztoku (0,1M HCl : PBS 50:50, v/v),
- stabilita v zásaditém roztoku (0,1M NaOH : PBS 50:50, v/v),
- stabilita při vystavení UV záření.

Pro analýzu byl připraven 50 µmol/l roztok HPP-INH, obsahoval 1,345 mg v 100 ml PBS. Ten byl dále 10x zředěn přidanými 450 ml methanolu a 450 ml PBS.

1 ml byl odebrán do zkumavky a umístěn do vodní lázně s udržovanou teplotou 37 °C. V časech 0, 4, 24 a 48 bylo odebráno 0,1 ml, doplněno 0,45 ml vody a 0,45 ml methanolu. Nastříkováno bylo 60 µl.

2x 1 ml byl odebrán do zkumavek. Jedna zkumavka byla vystavena UV záření (254 nm), druhá byla ponechána ve tmě. V časech 0, 1, 4 a 24 hodin bylo z každé zkumavky odebráno 0,1 ml, přidáno 0,45 ml vody a 0,45 ml methanolu. Nastříkováno bylo 60 µl.

K 0,5 ml roztoku PBS s HPP-INH bylo přidáno 0,5 ml 0,1 mol/l roztoku HCl. V časech 0 a 1 hodin bylo odebráno 0,1 ml, přidáno 0,45 ml vody a 0,45 ml methanolu. Nastříkováno bylo 60 µl.

K 0,5 ml roztoku PBS s HPP-INH bylo přidáno 0,5 ml 0,1 mol/l roztoku NaOH. V časech 0 a 1 hodin bylo odebráno 0,1 ml, přidáno 0,45 ml vody a 0,45 ml methanolu. Nastříkováno bylo 60 µl.

#### **4.4. Úprava chromatografických podmínek pro hodnocení HPP-INH v plazmě, vývoj metody extrakce pomocí precipitační deproteinace a její využití ve studii stability v plazmě**

##### **4.4.1. Úprava chromatografických podmínek pro analýzu HPP-INH v plazmě**

Při vývoji chromatografických podmínek pro analýzu HPP-INH v plazmě byla optimalizována isokratická metoda vyvinutá pro hodnocení čistoty. Byl upraven především poměr organické a vodné složky mobilní fáze a průtok. Cílem bylo dosáhnout dostatečné separace HPP-INH, SIH (vnitřní standard) a HPP (rozkladný produkt).

Stacionární fáze: Chromatografická kolona 250x4 mm s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm). Předkolona Purospher® 100, RP-18e (5 µm).

Mobilní fáze: směs fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : acetonitril:

- 1) 60:40 (v/v), průtok 1 ml/min,
- 2) 55:45 (v/v), průtok 1 ml/min,
- 3) 60:40 (v/v), průtok 1,1 ml/min,
- 4) 59:41 (v/v), průtok 1,1 ml/min.

Detekce probíhala při vlnových délkách 252 a 288 nm.

Optimální separace a rychlosti analýzy bylo dosaženo při použití mobilní fáze fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 : acetonitril, 59:41 (v/v), průtok 1,1 ml/min.

##### **4.4.2. Vývoj metody extrakce HPP-INH z plazmy**

Jako metoda úpravy vzorku byla vybrána precipitační deproteinace. Jako precipitační činidlo byl zvolen acetonitril, protože v něm je HPP-INH stabilnější než v methanolu (viz 5.2.1.).

Do 0,2 ml králičí plazmy byla přidána zkoumaná látka:

- 5  $\mu$ l zásobního roztoku HPP-INH o přibližné koncentraci 1 mg/ml,
- 5  $\mu$ l zásobního roztoku SIH o přibližné koncentraci 1 mg/ml,
- 2,5  $\mu$ l zásobního roztoku HPP o přibližné koncentraci 1 mg/ml.

Pro všechny analyzované látky byly připraveny tři vzorky. Následovalo promíchání a přidání 0,4 ml acetonitrilu. 2 minuty byl vzorek třepán na třepačce, pak byl odstředován po dobu 4 minut na centrifuze při rychlosti 3000 otáček za minutu. Precipitát byl odsán mikropipetou a pipetován do vialky. Porovnávací vzorky obsahovaly 0,1 ml vody, 0,4 ml acetonitrilu a příslušnou zkoumanou látku.

#### **4.4.3. Linearita metody pro hodnocení stability HPP-INH v plazmě**

Při měření linearity metody byly použity chromatografické podmínky pro analýzu HPP-INH v plazmě:

Stacionární fáze: chromatografická kolona 250x4 mm s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5  $\mu$ m). Předkolona Purospher® 100, RP-18e (5  $\mu$ m).

Mobilní fáze: směs fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : acetonitril, 59:41 (v/v), průtok 1,1 ml/min.

UV detekce 252 a 288 nm.

Pro analýzu byla zvolena koncentrační řada 10 – 20 – 35 – 70 – 100. HPP-INH má molární hmotnost 269 g/mol, to znamená, že v 1 ml roztoku koncentrace 100  $\mu$ mol/l je obsaženo 26,9  $\mu$ g HPP-INH. Pro objem 0,2 ml to odpovídá 5,38  $\mu$ g. Připravená koncentrační řada byla tvořena 5 vzorky, kde k 0,2 ml plazmy byly přidány tyto objemy roztoku HPP-INH koncentrace 1mg/ml:

0,5  $\mu$ l - 1,0  $\mu$ l – 1,9  $\mu$ l – 3,8  $\mu$ l – 5,4  $\mu$ l.

Jako vnitřní standard bylo přidáno 5  $\mu$ l roztoku SIH o koncentraci 0,5 mg/ml.

Vzorek byl upraven dle metody extrakce HPP-INH z plazmy. Nastříknuto bylo 20  $\mu$ l precipitátu, každý vzorek se analyzoval dvakrát.

Křivka linearity byla sestrojena jako závislost poměru píků HPP-INH (součet píků obou izomerů)/ SIH (vnitřní standard) na koncentraci HPP-INH.

#### **4.4.4. Studie stability HPP-INH v plazmě**

Při studii stability byly použity chromatografické podmínky pro analýzu HPP-INH v plazmě:

Stacionární fáze: chromatografická kolona 250x4 mm s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm). Předkolona Purospher® 100, RP-18e (5 µm).

Mobilní fáze: směs fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : acetonitril, 59:41 (v/v), průtok 1,1 ml/min.

UV detekce 252 a 288 nm.

Vzorek byl upraven dle metody extrakce HPP-INH z plazmy.

Na dvě řady 14 vzorků bylo použito 2x 3 ml plazmy a 2x 80 µl roztoku HPP-INH o koncentraci 1 mg/ml. Do zkumavek bylo přidáno míchadélko, aby udržovalo homogenitu. V určených časových intervalech bylo odebráno 0,2 ml plazmy s HPP-INH a bylo přidáno 5 µl roztoku SIH o koncentraci 0,5 mg/ml jako vnitřní standard. Potom bylo precipitováno pomocí 0,4 ml acetonitrilu. Vzorek byl 2 minuty třepán na třepačce a 4 minuty centrifugován při rychlosti 3000 otáček za minutu. Precipitát byl odsán mikropipetou a pipetován do vialky. Nastříknuto bylo 20 µl, každý vzorek se analyzoval dvakrát. Stabilita byla vyjádřena jako úbytek plochy HPP-INH v čase.

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

## **5.1. Vývoj chromatografických podmínek pro hodnocení čistoty HPP-INH**

### **Stacionární fáze**

Při vývoji chromatografických podmínek analýzy HPP-INH a jeho rozkladných produktů/potenciálních metabolitů bylo možné vycházet z metody použité pro analýzu plazmatických koncentrací SIH. Testovanou byla kolona 250x4 mm s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm). Separace jednotlivých látek i rychlost analýzy byly v pořádku, proto jiné kolony nebyly testovány. Jako ochranná předkolona byla použita Purospher® 100, RP-18e (5 µm).

### **Mobilní fáze**

Ve vzorku byly přítomny čtyři analyty ((Z) a (E) izomer HPP-INH, HPP, INH). Cílem metody bylo najít optimální složení mobilní fáze, která umožní separaci všech těchto složek. Nejprve bylo snahou nalézt vhodné podmínky pro separaci za isokratických podmínek.

Vyzkoušeny byly isokratické eluce směsí vodný roztok EDTA – methanol, vodný roztok EDTA – acetonitril, fosfátový pufr s EDTA – methanol, fosfátový pufr s EDTA – acetonitril; podíly methanolu byly v rozmezí 60 – 67 %, podíly acetonitrilu 45 - 50 %. Nejlepší separace za isokratických podmínek bylo dosaženo s použitím mobilní fáze o složení : fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol, 33:67 (v/v), průtok 1,0 ml/min.

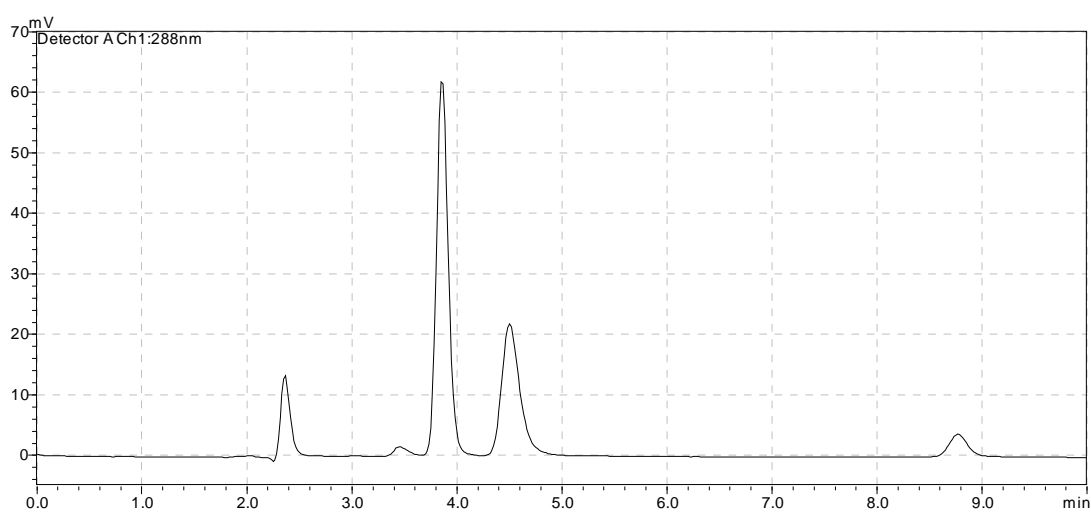
Při isokratických podmínkách a větším podílu organické fáze nedocházelo k dostatečné separaci isoniazidu od DMSO v čele chromatogramu. Při nižším podílu organické fáze se HPP dlouho zdržoval na koloně a analýza byla zdlouhavá. Proto byla vyzkoušena různá nastavení gradientové eluce.

Jako nejvhodnější mobilní fáze byla vybrána směs: fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol (A:B). Vhodný gradient byl 0:00 – 10:00 min B 35 – 70 % (v/v). Průtok 1,0 ml/min. Nicméně, ani za podmínek gradientové eluce se nepodařilo významně zvýšit retenci isoniazidu. V porovnání s isokratickými podmínkami došlo ke zvýšení retenčního času isoniazidu o cca 0,3 min.

EDTA byla přidávána, protože zabraňuje HPP-INH v tvorbě chelátů s volnými ionty železa v HPLC soustavě. Proto bylo možné předpokládat, že bude mít pozitivní vliv na tvar píků.

### Detekce

Zpočátku vývoje metody byla detekce prováděna při vlnových délkách 254 a 288 nm. Jelikož rozkladný produkt HPP má absorpční maximum při 252 nm, bylo pro analýzu čistoty výhodné provádět detekci při 252 a 288 nm (při 288 nm absorbuje HPP-INH).



Obr. 11 - Chromatogram, isokratická eluce  
fosfátový pufr s EDTA : methanol, 33:67.

Retenční časy: INH: 2,35 min

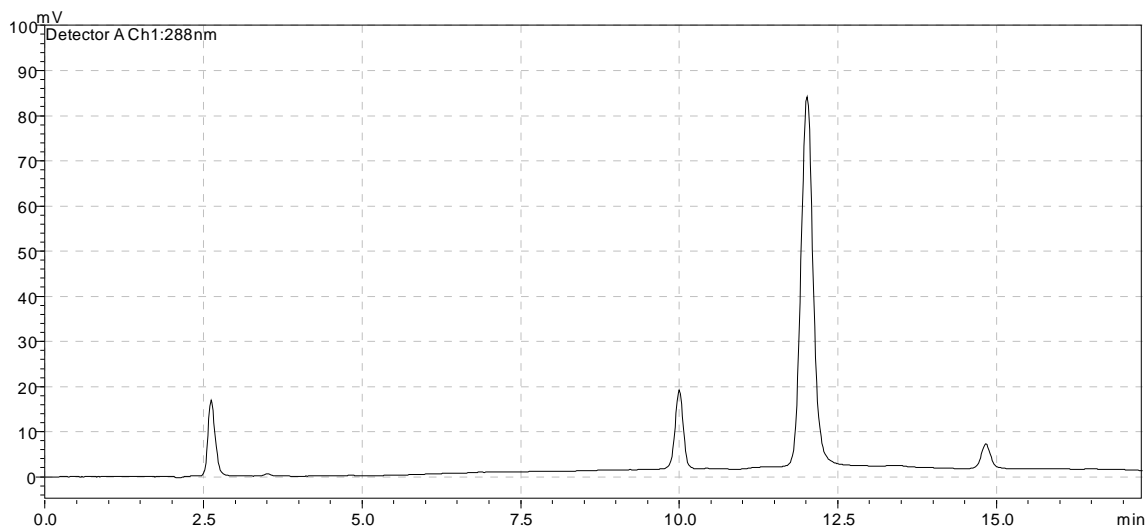
(Z)-HPP-INH: 3,44 min

SIH: 3,85 min

(E)-HPP-INH: 4,49 min

HPP 8,76 min





Obr. 12 - Chromatogram, gradientová eluce

fosfátový pufr s EDTA : methanol, 0:00 – 10:00 min B 35 – 70 %

Retenční časy: INH: 2,61 min

(Z)-HPP-INH: 9,99 min

(E)-HPP-INH: 12,00 min

HPP 14,82 min

## 5.2. Analýza chování HPP-INH ve vodných roztocích – přechod izomerů, stabilita

### 5.2.1. Přechod izomerů HPP-INH

Během analýzy HPP-INH se zjistilo, že se na chromatogramu objevil další pík. Jeho plocha ve vodném roztoku rostla, zatímco pík hlavní sloučeniny se zmenšoval. Retenční čas nečistoty neodpovídal syntetickým prekurzorům a předpokládaným rozkladným produktům. Pokusy izolovat nečistotu dopadly neúspěšně. Hmotnostní spektrometrie ukázala stejně protonované molekulové ionty  $[M+H]^+$ . Tím se přišlo na to, že by se mohlo jednat o dva izomery HPP-INH. (Z)-izomer, který se eluuje dříve, byl považován za nečistotu a (E)-izomer za hlavní látku.

Poté bylo zkoumáno, za jakých podmínek přechází jeden izomer v druhý a jak jsou stabilní. Cílem bylo zvolit medium, ve kterém bude přechod izomerů co nejmenší. Přechod izomerů byl testován v roztocích methanol : voda (50:50, v/v), methanol, acetonitril : voda (50:50, v/v), acetonitril.

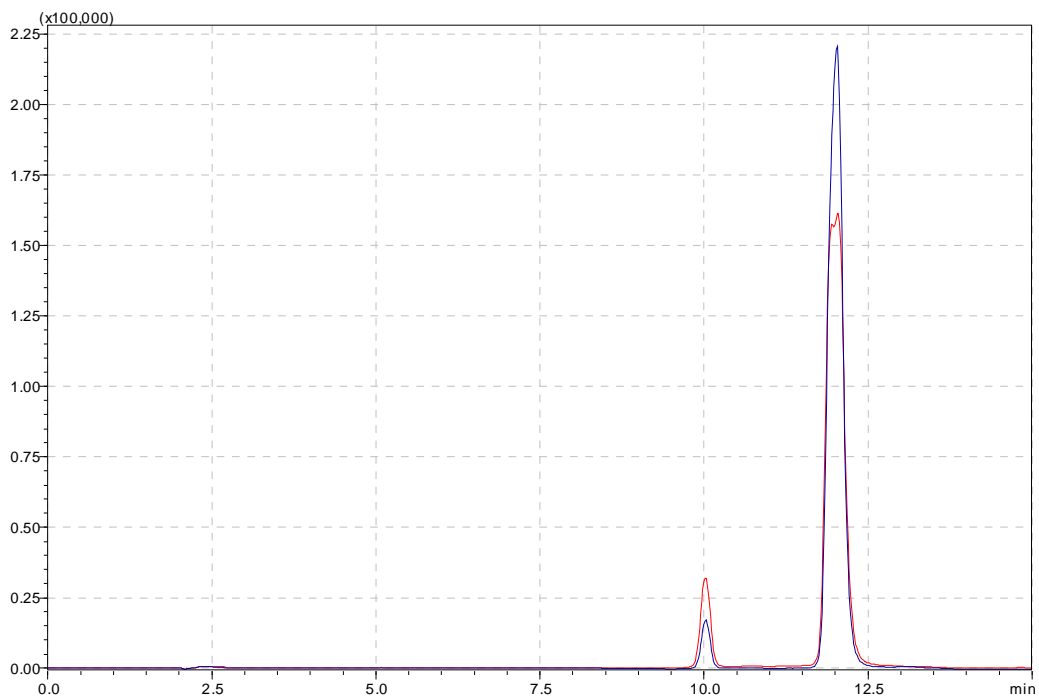
Naměřené hodnoty a výsledky:

Čas [hod]	0		2		4		18	
Roztok (plocha)	Z izomer	E izomer	Z izomer	E izomer	Z izomer	E izomer	Z izomer	E izomer
MeOH-voda	108998	3594532	167531	3472496	212722	3394353	337935	3138126
MeOH	79540	3753210	106680	3699271	129244	3681229	189312	3566080
ACN-voda	40105	3650611	53523	3627216	65182	3600855	113833	3499326
ACN	31391	3510466	30835	3509312	30168	3495288	28916	3492451

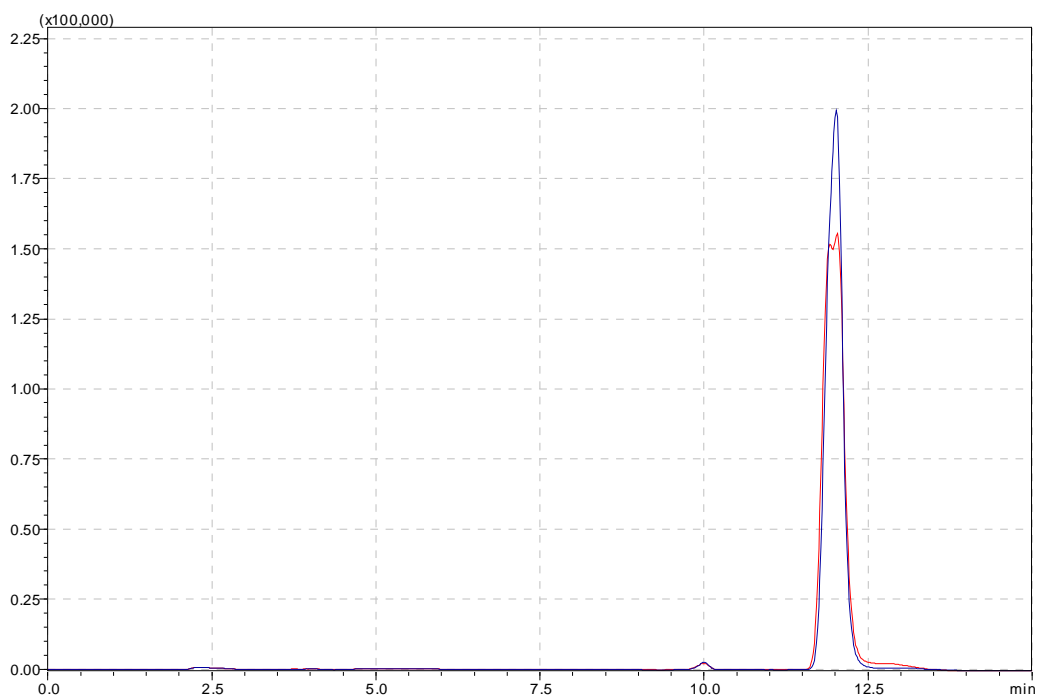
Tab. 5 - plochy izomerů rozpuštěných v příslušném roztoku

Čas [hod]	0		2		4		18	
Roztok/ $t_0$ [%]	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E
MeOH-voda	100	100	153,70	96,60	195,16	94,43	310,038	87,30
MeOH	100	100	134,12	98,56	162,49	98,08	238,01	95,01
ACN-voda	100	100	133,46	99,36	162,53	98,64	283,84	95,86
ACN	100	100	98,23	99,97	96,11	99,57	92,16	99,49

Tab. 6 - poměr ploch analytu k plochám v čase 0 hodin [%]



Obr. 13 – přechod (E)-HPP-INH v (Z)-izomer v roztoku methanol : voda



Obr. 14 – přechod (E)-HPP-INH v (Z)-izomer v acetonitrilu

Nejméně přechází (E)-izomer HPP-INH v (Z)-izomer v acetonitrilu, nejvíce přechází ve směsi methanol : voda (50:50). To je dobré vzít v úvahu pro další analýzy.

### 5.2.2. Stabilita ve vodných roztocích - PBS

Stabilita byla vyjádřena jako úbytek plochy (koncentrace) HPP-INH v čase.

Naměřené hodnoty a výsledky:

<b>Lázeň 37 °C, 1 ml PBS</b>					
<b>Analyt</b>	<b>Čas [hod]</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>24</b>	<b>48</b>
(Z)-HPP-INH (plocha)		28116	34858	21786	11755
(E)-HPP-INH (plocha)		144820	119687	56155	32247
HPP (plocha)		1375	16919	59663	80719
(E) poměr k t <sub>0</sub> [%]		100	82,65	38,78	22,27
HPP-INH poměr k t <sub>0</sub> [%]		<b>100</b>	<b>89,37</b>	<b>45,09</b>	<b>25,44</b>

Tab. 7 – stabilita HPP-INH v PBS při 37 °C

<b>0,5ml PBS + 0,5 ml 0,1 M HCl</b>			
<b>Analyt</b>	<b>Čas [hod]</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
(Z)-HPP-INH (plocha)		12424	0
(E)-HPP-INH (plocha)		135901	0
HPP (plocha)		58389	157302
(E) poměr k t <sub>0</sub> [%]		100	0
HPP-INH poměr k t <sub>0</sub> [%]		100	0

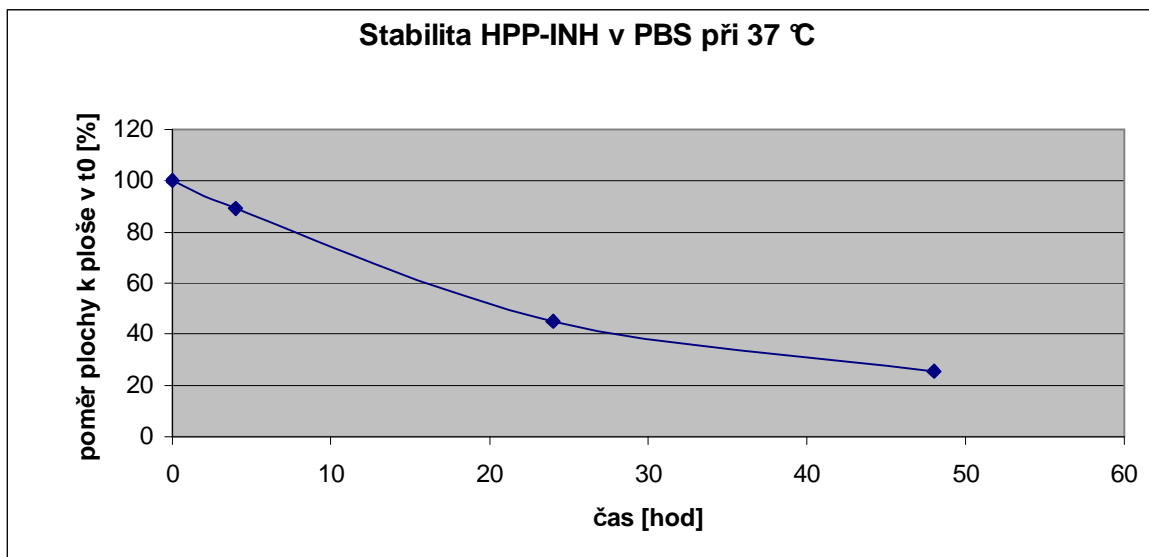
Tab. 8 – stabilita HPP-INH v roztoku HCl

<b>0,5 ml PBS + 0,5 ml 0,1M NaOH</b>			
<b>Analyt</b>	<b>Čas [hod]</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
(Z)-HPP-INH (plocha)		4926	6046
(E)-HPP-INH (plocha)		175213	152205
HPP (plocha)		0	12885
(E) poměr k t <sub>0</sub> [%]		100	86,87
HPP-INH poměr k t <sub>0</sub> [%]		100	87,85

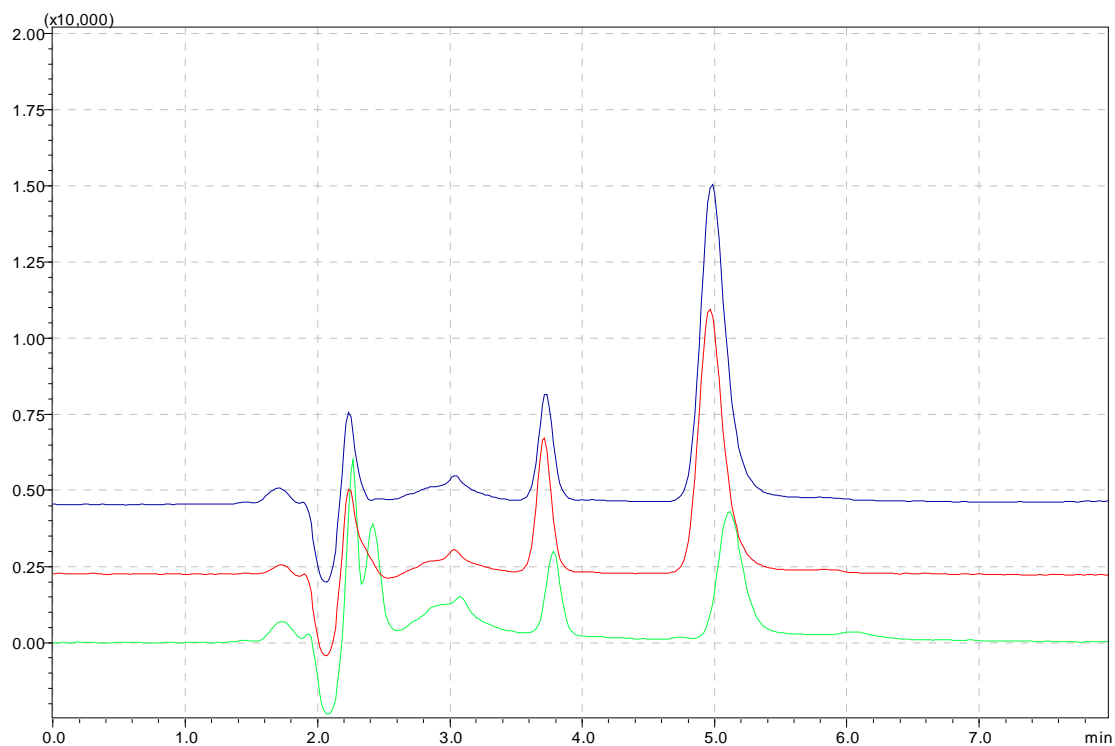
Tab. 9 – stabilita HPP-INH v roztoku NaOH

Analyt Čas [hod]	UV				porovnávací			
	0	1	4	24	0	1	4	24
(Z)-HPP-INH (plocha)	26193	33607	31526	20083	30395	21057	37596	31309
(E)-HPP-INH (plocha)	122082	108255	96812	55153	142317	155393	129710	88066
HPP (plocha)	1056	2669	6575	29823	1014	2239	5047	33116
(E) poměr k t <sub>0</sub> [%]	100	88,67	79,30	45,18	100	109,19	91,14	61,88
HPP-INH poměr k t <sub>0</sub> [%]	100	95,67	86,56	50,74	100	102,16	96,87	69,12
UV / porovnávací [%]	<b>85,85</b>	<b>80,40</b>	<b>76,71</b>	<b>63,02</b>				

Tab. 10 – stabilita HPP-INH při působení UV záření



Graf 1 – stabilita HPP-INH v PBS při 37 °C



Obr. 15 – chromatogram, stabilita v PBS při 37 °C, časy 0, 4, 24 hodin

V PBS o teplotě 37 °C zůstalo po 24 hodinách expozice 45 % nerozložené látky. Ve zkumavce vystavené UV záření se po 24 hodinách, vztaženo k porovnávacímu vzorku, nerozložilo 63 %. HPP-INH je labilnější v kyselém prostředí (během jedné hodiny se kompletně rozložil) než v zásaditém roztoku, kde po 1 hodině zbylo 88 % látky.

Z výsledků vyplývá, že HPP-INH je velmi citlivý k rozkladu v kyselém prostředí. V alkalickém prostředí dochází k pomalejšímu rozkladu látky. V prostředí PBS je látka nejstabilnější.

### **5.3. Úprava chromatografických podmínek pro hodnocení HPP-INH v plazmě, vývoj metody extrakce pomocí precipitační deproteinace a její využití ve studii stability v plazmě**

#### **5.3.1. Úprava chromatografických podmínek pro analýzu HPP-INH v plazmě**

Jako optimální mobilní fáze pro analýzu HPP-INH z plazmy byla vyhodnocena tato: fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : acetonitril, 59:41 (v/v), průtok 1,1 ml/min. Tato metoda poskytla rychlou analýzu a separované analyty.

#### **5.3.2. Extrakce z plazmy**

Pro úpravu vzorku byla vybrána precipitační deproteinace. Vhodným činidlem je acetonitril (0,4 ml acetonitrilu k 0,2 ml plazmy), protože je v něm HPP-INH nejstabilnější.

Za použití precipitační deproteinace acetonitrem bylo dosaženo následujících výtěžností:

Naměřené hodnoty a výsledky:

<b>Analyt</b>	<b>Plocha (Z) HPP-INH</b>	<b>Plocha (E) HPP-INH</b>	<b>Plocha celkem</b>	<b>Výtěžnost</b>	<b>Průměr</b>
HPP-INH vz1	26092	381272	407364	72,43 %	<b>67,36 %</b>
HPP-INH vz2	23786	347532	371318	66,02 %	
HPP-INH vz3	23441	334446	357887	63,63 %	
HPP-INH std	12847	549566	562413	100 %	-----

Tab. 11 – výtěžnost extrakce HPP-INH z plazmy

Analyt	Plocha	Výtěžnost [%]	Průměr
SIH vz1	381775	59,41	<b>66,18 %</b>
SIH vz2	400470	62,32	
SIH vz3	493625	76,81	
SIH std	642631	100	-----

Tab.12 – výtěžnost extrakce SIH z plazmy

Analyt	Plocha	Výtěžnost [%]	Průměr
HPP 1	28369	89,12	<b>79,79 %</b>
HPP 2	26749	84,03	
HPP 3	21082	66,22	
HPP std	31832	100	-----

Tab. 13 – výtěžnost extrakce HPP z plazmy

Výtěžnost HPP-INH extrahovaného z plazmy byla 67,36 %. SIH dosáhl výtěžnosti 66,18 % a HPP měl výtěžnost 79,79 %.

### 5.3.3. Linearita metody pro hodnocení stability HPP-INH v plazmě

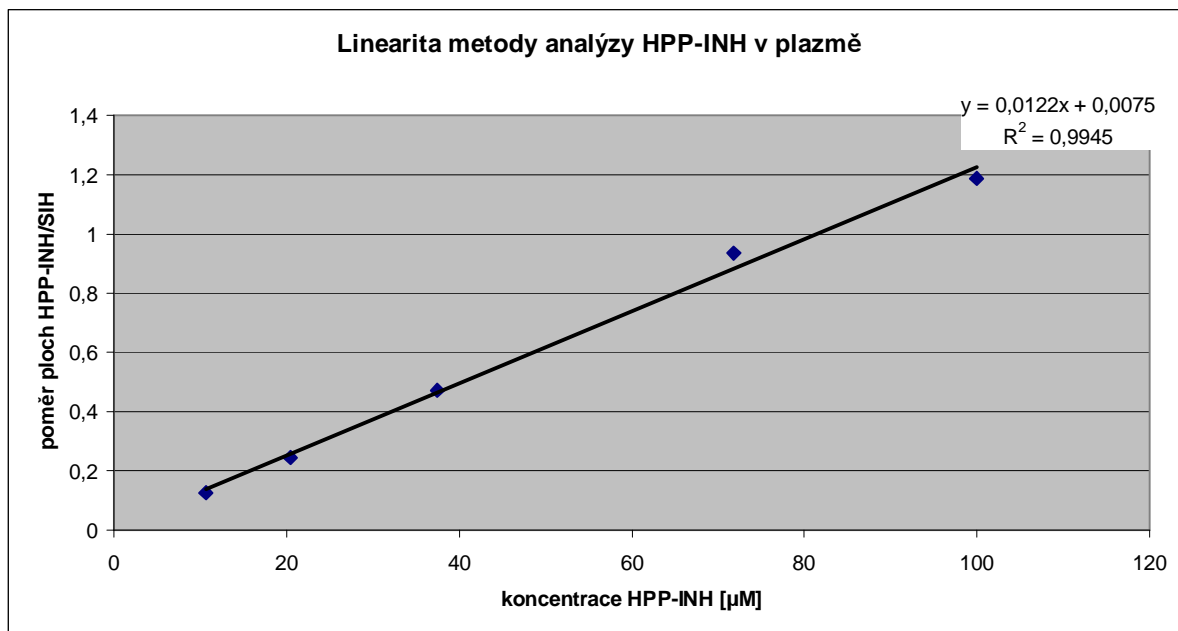
Linearita metody byla prokázána v rozmezí 10-100  $\mu\text{M}$ . Protože se látka vyskytuje ve formě dvou izomerů, byly plochy jejich píků sečteny.

Naměřené hodnoty a výsledky:

Analyt konc.	10 $\mu\text{M}$	20 $\mu\text{M}$	35 $\mu\text{M}$	70 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
HPP-INH (plocha)	54450	104056	190388	365537	508591
SIH i.s. (plocha)	433715	423490	404364	390726	428193
HPP-INH/SIH (poměr ploch)	0,1256	0,2458	0,4710	0,9356	1,1880
HPP-INH/SIH (poměr ploch, [%])	<b>10,57</b>	<b>20,69</b>	<b>39,65</b>	<b>78,75</b>	<b>100</b>
HPP-INH/ 100 $\mu\text{M}$ (poměr ploch, [%])	<b>10,71</b>	<b>20,46</b>	<b>37,43</b>	<b>71,87</b>	<b>100</b>

Tab.14 – linearita metody analýzy HPP-INH v plazmě





Graf 2 - linearita metody analýzy HPP-INH v plazmě

Závislost poměru ploch HPP-INH/SIH na koncentraci HPP-INH.

Linearita metody pro hodnocení stability HPP-INH v plazmě je dána rovnicí:

$y = 0,0122x + 0,0075$ . Koeficient linearity  $R^2 = 0,9945$ .

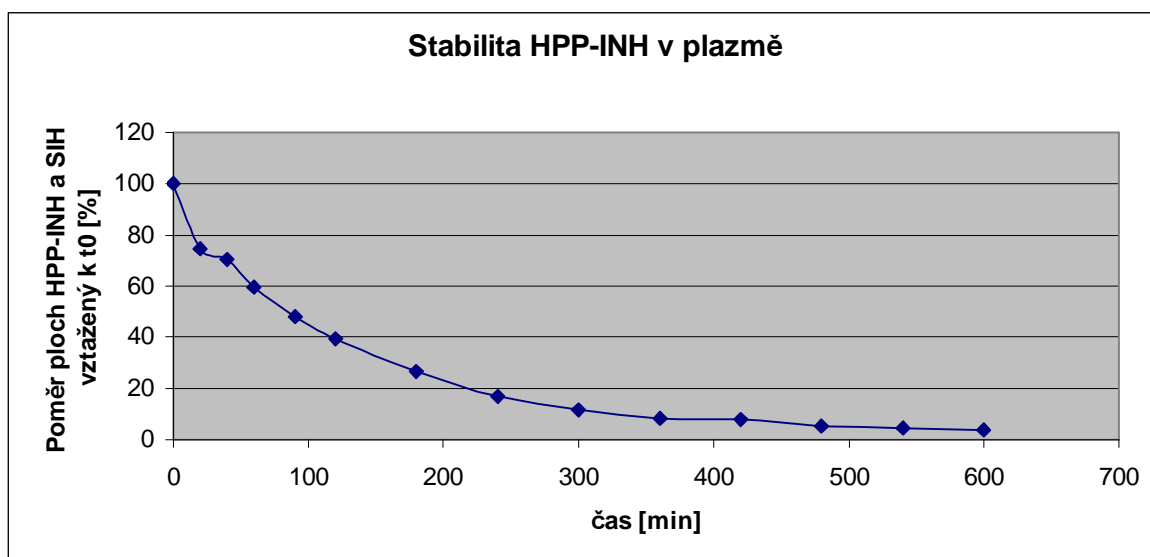
#### 5.3.4. Stabilita v plazmě

Hodnocení stability HPP-INH v plazmě probíhalo za fyziologicky relevantních podmínek. Naměřené hodnoty ploch HPP-INH (Z + E izomer) byly vyděleny plochou vnitřního standardu SIH. Dále byly vyděleny hodnotou podílu v čase 0 hodin a převedeny na procenta.

Naměřené výsledky:

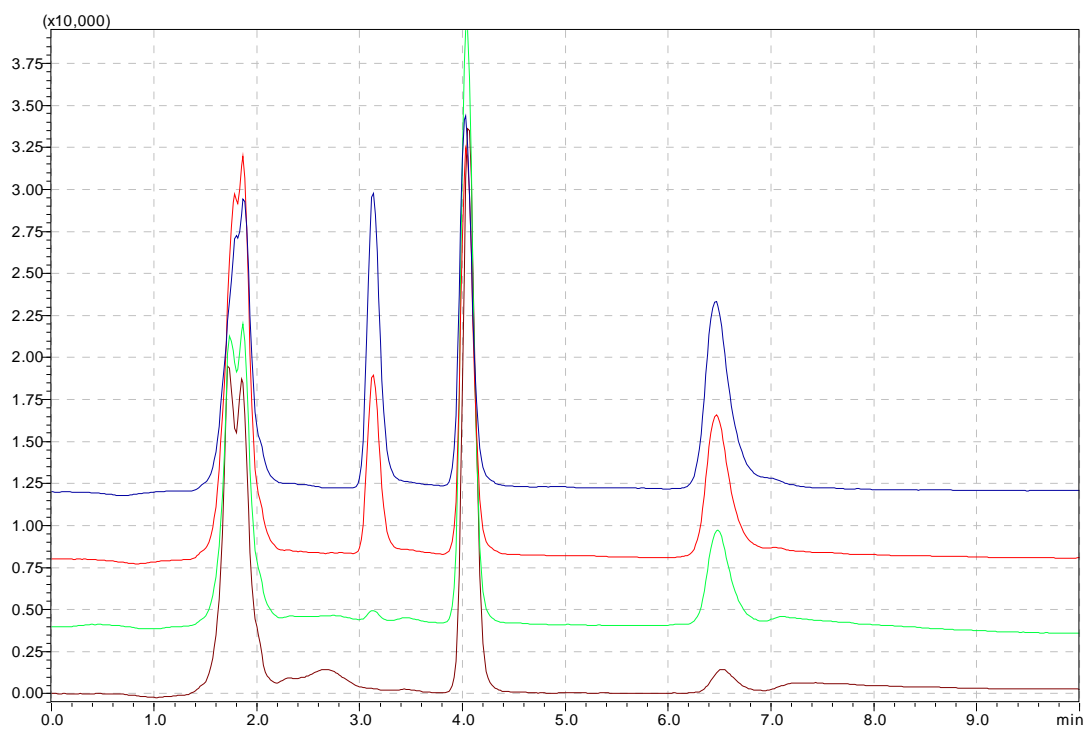
Analyt	čas	0 min	20 min	60 min	120 min	240 min	420 min	600 min
HPP-INH/SIH 1		100	70,28	60,90	36,12	15,31	6,92	3,52
HPP-INH/SIH 2		100	72,76	59,57	37,68	16,85	6,87	4,18
HPP-INH/SIH 3		100	82,01	55,43	41,97	17,97	6,49	3,62
HPP-INH/SIH 4		100	73,90	62,86	41,55	17,59	11,17	3,57
Průměr		<b>100</b>	<b>74,74</b>	<b>59,69</b>	<b>39,33</b>	<b>16,93</b>	<b>7,86</b>	<b>3,73</b>

Tab. 15 – poměr ploch HPP-INH a standardu SIH vztažený k času 0 hodin [%]



Graf 3 – stabilita HPP-INH v plazmě

Po 1 hodině v plazmě zbylo 59,69 % HPP-INH, po 4 hodinách zůstalo nerozložených 16,93 %. HPP-INH tedy projevila vyšší stabilitu v plazmě než SIH, který má poločas rozkladu přibližně půl hodiny.

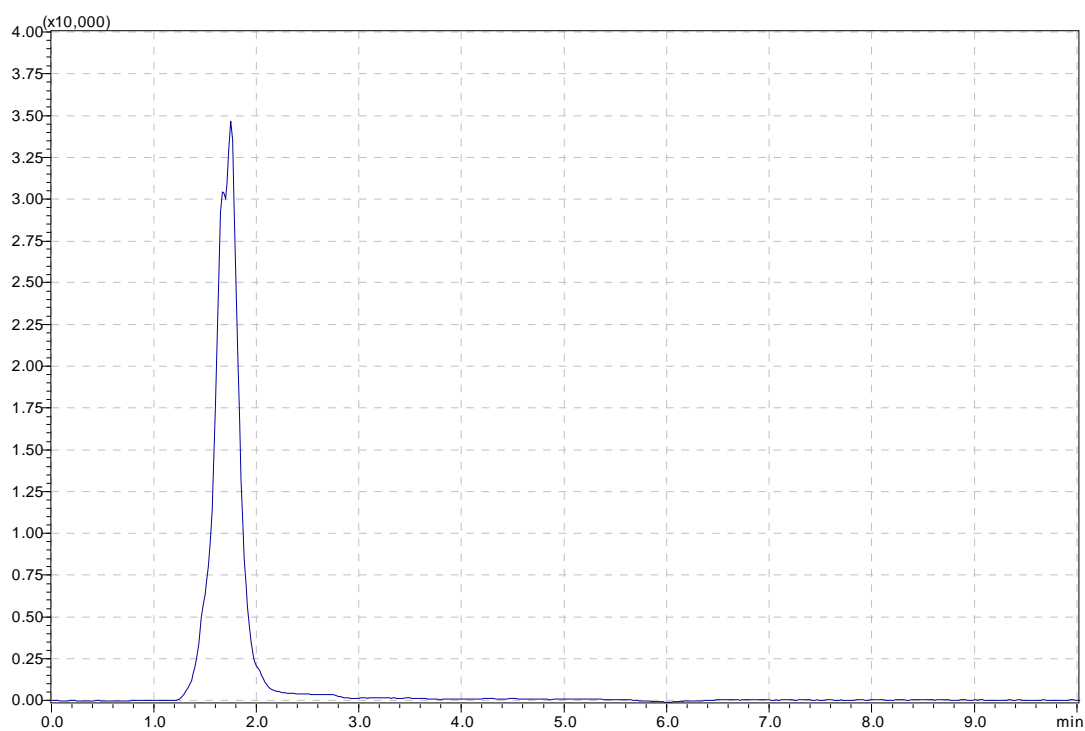


Obr. 16 - chromatogram, stabilita v plazmě, časy 0, 60, 240 a 600 minut

Retenční časy: (Z)-HPP-INH: 3,13 min

SIH 4,03 min

(E)-HPP-INH: 6,46 min



Obr. 17 - chromatogram, čelo plazmy

## 6. ZÁVĚR

V diplomové práci byly vyvíjeny chromatografické podmínky pro HPLC analýzu HPP-INH. Analýza byla prováděna na koloně Merck 250x4 mm I. D. s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm) s předkolonou Purospher® 100, RP-18e (5 µm).

Pro hodnocení čistoty byly vyvinuty isokratická a gradientová metoda. Mobilní fáze isokratické metody: fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol, 33:67 (v/v), průtok 1,0 ml/min.

Mobilní fáze gradientové metody: fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol (A:B), 0:00 – 10:00 min B 35 – 70 % (v/v), průtok 1,0 ml/min.

UV detekce byla nastavena na 252 a 288 nm.

Dále bylo studováno chování ve vodných roztocích. (E) a (Z) izomery byly nejméně stabilní ve směsi methanol : voda a nejvíce stabilní v acetonitrilu. Ve fosfátovém pufru o teplotě 37 °C zbylo po 24 hodinách 45 % HPP-INH. V kyselém prostředí je látka mnohem labilnější než v zásaditém. UV záření též přispívá k rozkladu HPP-INH, oproti referenčnímu vzorku se po 24 hodinách nerozložilo 63 %.

Pro analýzu HPP-INH v plazmě byla vyvinuta mobilní fáze: fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : acetonitril, 59:41 (v/v), průtok 1,1 ml/min. Jako metoda úpravy vzorku před HPLC analýzou byl vyvinut postup precipitační deproteinace. K 0,2 ml plazmy bylo přidáno 0,4 ml acetonitrilu. Po protřepání a odstředění byl precipitát připraven k analýze. Při extrakci z plazmy byla dosažena výtěžnost 67 % pro HPP-INH, 66 % pro SIH a HPP měl výtěžnost 80 %. Metoda extrakce z plazmy byla použita při hodnocení stability v plazmě. HPP-INH je stabilnější než mateřská látka - SIH, po 1 hodině zbylo v plazmě 60 %, po 4 hodinách 17 %.

## 7. ABSTRAKT

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří v současnosti mezi nejmodernější a nejpoužívanější analytické separační metody.

Biokompatibilní chelátory železa jsou v terapii používány především pro léčbu přetížení organismu železem. Nicméně, ve světle nových informací o fyziologické a patofyziologické roli železa v organismu došlo k výraznému rozšíření jejich potenciálu i do oblastí dalších chorob. Bylo prokázáno, že vykazují např. antioxidační, kardioprotektivní a cytostatické účinky.

Tyto účinky prokazuje i biokompatibilní chelátor železa salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon. Jeho využití však ztěžuje krátký poločas rozkladu v plazmě. V dnešní době se od jeho struktury odvozuji deriváty, u kterých se předpokládá větší stabilita. Jedním z nich je 2'-hydroxypropiofenon isonikotinoyl hydrazon (HPP-INH).

Cílem této práce bylo vyvinutí optimálních chromatografických podmínek HPLC analýzy HPP-INH a metody úpravy vzorku precipitací pro stanovení analytu v plazmě.

Analýza byla prováděna na koloně Merck 250x4 mm I. D. s náplní LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm) s předkolonou Purospher® 100, RP-18e (5 µm).

Pro hodnocení čistoty byla použita mobilní fáze: směs fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : methanol (A:B), 0:00 – 10:00 min B 35 – 70 % (v/v), průtok 1,0 ml/min. UV detekce byla nastavena na 252 a 288 nm.

Pro analýzu HPP-INH v plazmě byla používána mobilní fáze: fosfátový pufr (0,01 mol/l vodný roztok  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) s 2 mmol/l EDTA, pH 6 bylo upraveno 0,1 mol/l roztokem NaOH : acetonitril, 59:41 (v/v), průtok 1,1 ml/min. Jako metoda úpravy vzorku byla použita precipitační deproteinace acetonitrilem. Byly dosaženy tyto výtěžnosti: HPP-INH 67 %, SIH 66 %, HPP 80 %. Při studii stability bylo zjištěno, že HPP-INH je stabilnější než SIH, po 1 hodině ho zbylo v plazmě 60 %. V současnosti probíhá testování antioxidačních a kardioprotektivních účinků HPP-INH na zavedených *in vitro* modelech.

## **8. ABSTRACT**



Nowadays, high performance liquid chromatography (HPLC) belongs among the most modern and most frequently used analytical separation techniques.

Biocompatible iron chelators are mainly used for the treatment of iron overload. Nevertheless, in the light of new information about physiological and pathophysiological role of iron in organism, their potential use was widened into other diseases. Iron chelators were proved to have antioxidative, cardioprotective and cytostatic effects.

Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone is a biocompatible iron chelator, which also shows these activities. However, its short half life in plasma makes its use difficult. Nowadays, novel derivatives of SIH were prepared to improve its stability in plasma. 2'-hydroxypropiophenone isonicotinoyl hydrazone (HPP-INH) is one of newly prepared SIH derivatives.

The aim of this study was to develop optimal chromatographic conditions for HPLC analysis of HPP-INH and to develop sample pretreatment method using precipitation for its analysis in plasma.

The analysis was carried out on a Merck 250x4 mm column I.D. LiChrospher® 100, RP-18e (5 µm) protected with Purospher® 100, RP-18e (5 µm) guard column.

The following mobile phase gradient condition was developed for HPP-INH purity evaluation: phosphate buffer (0,01 mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  water solution) with 2 mmol/l EDTA, pH 6 was adjusted by 0,1 mol/l NaOH water solution : methanol (A:B), 0:00 – 10:00 min B 35 – 70 % (v/v), flow 1,0 ml/min. UV detection was set to 252 a 288 nm.

Following mobile phase isocratic condition was used for the analysis of HPP-INH in plasma: phosphate buffer (0,01 mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  water solution) with 2 mmol/l EDTA, pH 6 was adjusted by 0,1 mol/l NaOH water solution : acetonitrile, 59:41 (v/v), flow 1,1 ml/min. Precipitation using acetonitrile was developed as the sample pretreatment method. These extraction recoveries were achieved: HPP-INH 67 %, SIH 66 %, HPP 80 %. The stability experiment revealed that HPP-INH is much more stable in plasma than SIH, since 60 % of the initial amount stayed undegradated after 1 hour of exposition. Nowadays, antioxidative and cardioprotective effects of HPP-INH are tested at standardized *in vitro* models.

## 9. LITERATURA

- [1] Klimeš, J. a kol.; *Kontrola léčiv I.*; Karolinum, Praha 2002
- [2] Karlíček, R. a kol.; *Analytická chemie pro farmaceuty*; Karolinum, Praha 2001
- [3] Klimeš, J. a kol.; *Kontrola léčiv II.*; Karolinum, Praha 2004
- [4] *Český lékopis (ČL 2005)*; Grada, Praha 2005
- [5] Snyder L.R., Kirkland J.J.; *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Second Edition*; John Wiley & sons, Inc., 1979
- [6] Stariat, J.; *Diplomová práce HPLC analýza potenciálních léčiv odvozených od arolyhydrazonu II*; Hradec králové 2007
- [7] Coufal, P.; <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [8] <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/>
- [9] Brown, P.R.; *Anal. Chem.* 1990; 62:995-1008;  
<http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/history.html>
- [10] Synder, L.R., Stadalius, M.A., Quarry, M.A.; *Analytical Chemistry*, 1983; Vol. 55, 1412-30; [http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/mobile\\_phase.html](http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/mobile_phase.html)
- [11] <http://sweb.cz/HPLC/>
- [12] <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/>
- [13] <http://www.hplc.cz>
- [14] Brown, P.R.; *Analytical Chemistry*, 1990; Vol. 62, 995;  
<http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/columns.html>
- [15] Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L.; *Practical HPLC Method Development*; John Wiley & sons, Inc.
- [16] Venn, R.F.; *Principles and Practice of Bioanalysis*; Taylor & Francis, 2000
- [17] Thurman, E.M., Mills, M.S.; *Solid-Phase Extraction*; John Wiley & sons, Inc., 1998
- [18] Babjuk, J., Perlík, F., Šídlo, Z.; *Bioanalytika léků*; Avicenum, Praha 1990
- [19] Peters, E.C., Petro, M., Švec, F., Fréchet, J.M.J.; *Anal.Chem.* 69, 1997
- [20] Rouault, T., Klausner, R.; *Regulation of Iron Metabolism in Eukaryotes*; *Curr. Top. Cell. Regul.* 1997; 35: 1-19
- [21] Richardson, D.R., Ponka, P.; *The Molecular Mechanisms of the Metabolism and Transport of Iron in Normal and Neoplastic Cells*; *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1331: 1-40
- [22] Aisen, P., Enns, C., Wessling-Roesnick, M.; *Chemistry and Biology of Eukaryotic Iron Metabolism*; *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2001; 33: 940-959

- [23] Hershko, C., Link, G., Cabantchik, I.; Pathophysiology of Iron Overload; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998; 850: 191-201
- [24] Štěrbá, M.; Disertační práce, Antracyklinová kardiotoxicita a potenciálně kardioprotektivní účinky látek chelatujících železo; Lékařská fakulta UK v Hradci Králové, 2007
- [25] Creighton, A.M., Hellmann, K., Whitecross, S.; Antitumour Activity in a Series of Bisdiketopiperazines; *Nature (Lond)* 1969; 22: 384-385
- [26] Schroeder, P.E., Davidson, J.N., Hasinoff, B.B.; Dihydroorotase catalyzes the ring opening of the hydrolysis intermediates of the cardioprotective drug dexrazoxane (ICRF-187); *Drug. Metab. Dispos.* 2002; 30: 1431-1435
- [27] Buss, J.L., Hermes-Lima, M., Ponka, P.; Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogues; *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002; 509: 205-229 PMID: 12572996
- [28] Dobsak, P., Siegelova, J., Wolf, J.E., Rochette, L., Eicher, J.C., Vasku, J., Kuchtickova, S., Horky, M.; Prevention of apoptosis by deferoxamine during 4 hours of cold cardioplegie and reperfusion: in vitro study of isolated working rat heart model; *Patophysiology* 2002; 9: 27
- [29] Horwitz, L.D., Sherman, N.A., Kong, Y., Pike, A.W., Gobin, J., Fennessey, P.V., Horwitz, M.A.; Lipophilic siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* prevent cardiac reperfusion injury; *Prot. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95: 5263-5268
- [30] Richardson, D. R.; Novel chelators for central nervous system disorders that involve alterations in the metabolism of iron and other metal ions; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1012: 326-341
- [31] Youdim, M.B., Stephenson, G., Ben Sachar, D.; Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1012: 306-325
- [32] van Asbeck, B.S., Georgiou, N.A., van der Bruggen, T., Oudshoorn, M., Nottet, H.S., Marx, J.J.; Anti-HIV effect of iron chelators: Different mechanism involved; *J. Clin. Virol.* 2001; 20: 141-147
- [33] Murren, J., Modiano, M., Clairmont, C., Lambert, P., Savaraj, N., Doyle, T., Sznol, M.; Phase I and pharmacokinetic study of triapine, a potent ribonucleotide reductase inhibitor, administered daily for five days in patients with solid tumors; *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 4092-4100

- [34] Tsafack, A., Loyevsky, M., Ponka, P., Cabantchik, Z.I.; Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials. IV. Potentiation of desferal action by benzoyl and isonicotinoyl hydrazone derivatives; *J. Lab. Clin. Med.* 1996; 127: 574-582
- [35] Donfrancesco, A., Deb, G., De Sio, L., Cozza, R., Castellano, A.; Role of deferoxamine in tumor therapy; *Acta Haematol.* 1996; 95: 66-69
- [36] Lin, Z.P., Belcourt, M.F., Cory, J.G., Sartorelli, A.C.; Stable Suppression of the R2 subunit of ribonucleotide reductase R2-targeted siRNA sensitizes p53(-/-) HCT-116 colon cancer cells to DNA-damaging agents and ribonucleotide reductase inhibitors; *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 27030-27038
- [37] Ponka, P., Borova, J., Neuwirt, J., Fuchs, O.; Mobilization of iron from reticulocytes. Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent; *FEBS Lett.* 1979; 97: 317-321
- [38] Richardson, D.R., Vitolo, L.W., Baker, E., Webb, J.; Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and analogues. Study of their stability in acidic, neutral and basic aqueous solutions by ultraviolet-visible spectrophotometry; *Biol. Met.* 1989; 2: 69-76
- [39] Huang, A.R., Ponka, P.; A study of the mechanism of action of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone at the cellular level using reticulocytes load with non-heme <sup>59</sup>Fe; *Biochim. Biophys. Acta* 1983; 757: 306-315
- [40] Ponka, P., Grady, R.W., Wilczynska, A., Schulman, H.M.; The effect of various chelating agents on the mobilization of iron from reticulocytes in the presence and absence of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone; *Biochim. Biophys. Acta* 1984; 802: 477-489
- [41] Richardson, D.R., Tran, E.H., Ponka, P.; The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents; *Blood* 1995; 86: 4295-4306
- [42] Edward, J.T., Ponka, P., Richardson, D.R.; Partition coefficients of the iron (III) complexes of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogues and the correlation to iron chelation efficacy; *Biometals* 1995; 8: 209-217
- [43] Edward, J.T., Chubb, F.L., Sangster, J.; Iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class. Relationship of the lipophilicity of the apochelator to its ability to mobilize iron from reticulocytes in vitro: reappraisal of reported partition coefficients; *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1997; 75: 1362-1368

- [44] Ponka, P., Richardson, D.R., Edward, J.T., Chubb, F.L.; Iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class. Relation of the lipophilicity of the apochelator to its ability to mobilize iron from reticulocytes *in vitro*; *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1994; 72: 659-666
- [45] Hermes-Lima, M., Santos, N.C., Yan, J., Andrews, M., Schulman, H.M., Ponka, P.; EPR spin trapping and 2-deoxyribose degradation studies of the effect of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) on  $^*OH$  formation by the Fenton reaction; *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1426: 475-482
- [46] Hermes-Lima, M., Ponka, P., Schulman, H.M.; The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate; *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1523: 154-160
- [47] Mauricio, A.Q., Lopes, G.K., Gomes, C.S., Oliveira, R.G., Alonso, A., Hermes-Lima, M.; Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits iron-induced ascorbate oxidation and ascorbyl radical formation; *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1626: 15-24
- [48] Hermes-Lima, M., Nagy, E., Ponka, P., Schulman, H.M.; The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against  $^*OH$  mediated strand breaks; *Free Radic. Biol. Med.* 1998; 25: 875-880
- [49] Horackova, M., Ponka, P., Byczko, Z.; The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of  $H_2O_2$  injury in adult cardiomyocytes; *Cardiovasc. Res.* 2000; 47: 529-536
- [50] Kovarikova, P., Klimes, J., Sterba, M., Popelova, O., Mokry, M., Gersl, V., Ponka, P.; Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an *in vivo* study; *J. Sep. Sci.* 2005; 28: 1300-1306
- [51] Buss, J.L., Ponka, P.; Hydrolysis of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs; *Biochim. Biophys. Acta* 2003; 1619: 177-186
- [52] Kovarikova, P., Vavrova, K., Tomalova, K., Schongut, M., Hruskova, K., Haskova, P., Klimes, J.; HPLC-DAD and MS/MS analysis of novel drug candidates from the group of aromatic hydrazones revealing the presence of geometric isomers; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, doi:10.1016/j.jpba.2007.12.017

- [53] Richardson, D., Vitolo, L.W., Baker, E., Webb, J.; Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and analogues. Study of their stability in acidic, neutral and basic aqueous solutions by ultraviolet-visible spectrophotometry; *Bio. Metals* 1989; 2: 69-76
- [54] Kovarikova, P., Mokry, M., Klimes, J., Vavrova, K.; Chromatographic methods for the separation of biocompatible iron chelators from their synthetic precursors and iron chelates; *J. Sep. Sci.* 2004; 27: 1503-1510
- [55] Kovarikova, P., Mrkvickova, Z., Klimes, J.; Investigation of the stability of aromatic hydrazones in plasma and related biological material; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, doi:10.1016/j.jpba.2008.01.011
- [56] Kovarikova, P., Klimes, J., Sterba, M., Popelova, O., Gersl, V., Ponka, P.; HPLC determination of a novel aroylhydrazone iron chelator (*o*-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study; *J. Chromatogr.* 2006; 838: 107–112, doi:10.1016/j.jchromb.2006.04.020