

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**STUDIUM CHIRÁLNÍCH ASPEKTŮ
BIOTRANSFORMACE LÉČIV INSTRUMENTÁLNÍMI
ANALYTICKÝMI METODAMI**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.

Hradec Králové, 2011

Bc. Veronika Holmanová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Doc. PharmDr. Milanu Nobilisovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, konzultace a pomoc při vlastním měření i zpracování výsledků, neméně pak za jeho trpělivost, ochotu a veškerý mně věnovaný čas.

Dále děkuji Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za poskytnutý biologický materiál a seznámení s problematikou biotransformací *in vitro*.

Poděkování patří také Mgr. Elišce Matoušové za syntézu methylesteru naproxenu a Prof. RNDr. Milanu Pourovi, Ph.D. a Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření NMR spekter, jejich interpretaci a potvrzení struktury syntetizovaného vnitřního standardu.

Prof. Dr. rer. nat. Thomasovi Jirovi z Greifswaldu děkuji za naměření a interpretaci CD-spekter enantiomerů.

Prohlášení

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

Datum:

Veronika Holmanová

Abstrakt

Byla vyvinuta nová chirální chromatografická metoda pro zhodnocení stereospecifity lidských a potkaních cytosolických karbonylreduktas a mikrosomálních oxidas zapojených do biotransformace nabumetonu. Vzniklá LLE-HPLC-PDA metoda umožňovala extrakci, separaci a UV detekci prochirálního nabumetonu a jeho metabolitů I.fáze biotransformace, včetně enantiomerů dvou chirálních produktů karbonylové redukce. Jako vnitřní standard sloužil methylester naproxenu. Pro liquid-liquid extrakci byl použit diethylether. Dostatečnou separaci 9 analytů zajišťovala za isokratických podmínek mobilní fáze o složení MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (75:25, v/v) ve spojení s Chiralcel OD-R 250mm×4.6 mm kolonou. Při průtoku 0,5 ml/min trvala jedna analýza 60 min. Efluent z kolony byl monitorován photodiode-array detektorem (zaznamenávající celé spektrum nebo vybrané vlnové délky - 225 a 265 nm). Výsledky biotransformace nabumetonu in vitro s cytosolickými a mikrosomálními frakcemi hepatocytů byly porovnány u dvou živočišných druhů (potkan, člověk) a vypočten enantiomerní poměr chirálních nabumetonových metabolitů. U potkaních cytosolických karbonylreduktas byla pozorována stereospecifita k nabumetonu: enatiomerní poměr (+)-redukováného k (-)-redukovánému nabumetonu byl 10 : 90. Navržená chirální HPLC-PDA metoda doplňuje předchozí dvě studie věnované metabolitům I. a II. fáze biotransformace nabumetonu a byla úspěšně použita při drug-metabolism-trackingu.

Abstract

For the evaluation of stereospecificity of rat and human cytosolic carbonyl reductases and activity of microsomal oxidases involved in nabumetone biotransformation, a new chiral high-performance liquid chromatographic method was developed. The prepared LLE-HPLC-PDA method enabled extraction, separation and ultraviolet detection of prochiral nabumetone and its five phase I metabolites including enantiomers of two chiral biotransformation products of carbonyl reduction. Methyl ester of naproxen served as an internal standard. Diethyl ether was used for liquid-liquid extraction (LLE) of biomatrices. Chiralcel OD-R 250 mm×4.6 mm column with a mobile phase methanol–1M NaClO₄/HClO₄ aqueous solution pH=3 (75:25, v/v) were employed in isocratic sufficient separation of nine analytes. The whole analysis lasted 60 minutes at the flow rate of 0.5 ml/min. The column effluent was monitored using a photodiode-array detector (scan or single wavelength at $\lambda=265$ nm). The results of in vitro nabumetone biotransformation in cytosole and microsomal fraction of liver cells of two species (rat vs. human) were compared and enantiomeric excess of chiral nabumetone metabolites was evaluated. Stereospecificity in the rat cytosolic carbonyl reductases to nabumetone was observed: enantiomeric ratio of (+)-reduced nabumetone vs. (-)-reduced nabumetone was found to be 10 % vs. 90 %). The proposed chiral HPLC-PDA method complements previous chromatographic methods developed for the study of nabumetone phase I and phase II biotransformation and was successfully employed in drug-metabolism-tracking.

Obsah

1. ÚVOD	8
2. CÍL	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Historické konsekvence objevu chiralita	10
3.2 Příčiny chiralita	11
3.2.1 Centrální chiralita	12
3.2.2 Axiální chiralita	12
3.2.3 Planární chiralita	13
3.2.4 Helikální chiralita	13
3.3 Nomenklatura: Fischerova projekce, Cahn-Ingold-Prelogův nomenklaturní systém, a pojmy s ní související	14
3.4 Chiroptické metody (Polarimetrie, CD, ORD)	16
3.4.1 Polarimetrie	17
3.4.2 Spektropolarimetrie	17
3.4.3 Dichrografie	18
3.4.4 Využití chiroptických metod	20
3.5 Nabumeton	21
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1 Použité přístroje, chemikálie a biologický materiál	22
4.2 Optimalizace chromatografických podmínek	24
4.2.1 Volba mobilní fáze	25
4.2.2 Vnitřní standard	25
4.2.3 Příprava roztoků	26
4.3 Inkubace a příprava vzorků	28
4.4 Kalibrace a stabilita nabumetonových derivátů	30
4.5 Identifikace (+)- a (-)-enantiomerů	31
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	32
5.1 Výběr mobilní fáze a vnitřního standardu	32
5.2 Identifikace (+)- a (-)-enantiomerů	34
5.3 Kalibrace	36
5.4 Stabilita	38

5.4.1	Stock-solution stabilita	38
5.4.2	Post-preparative stabilita.....	38
5.5	Analýzy in vitro inkubovaných substrátů	39
5.5.1	Nabumeton.....	40
5.5.2	6-HO-nb-CO	44
5.5.3	6-MeO-nb-OH	45
5.5.4	6-HO-nb-OH.....	46
5.5.5	6-MNA.....	47
6.	ZÁVĚR	48
	SEZNAM ZKRATEK.....	49
	POUŽITÁ LITERATURA.....	50
	SEZNAM PŘÍLOH	53

1. ÚVOD

Chiralita je považována za jeden z nejzajímavějších a nejdůležitějších stereochemických fenoménů v oblasti léčiv. Zatímco po chemické stránce jsou enantiomery zpravidla stejně reaktivní, liší se směrem otáčení roviny polarizovaného světla a mohou se významně lišit svými farmakologickými a toxikologickými vlastnostmi. Důvodem je chirální charakter biologického prostředí zahrnující vazebná místa na plazmatických proteinech, enzymech, transportérech a receptorech. Vzhledem k tomu, že řada přirozených receptorových ligandů (neurotransmitery, endogenní opioidy) je homochirální, není ani rozdíl v účincích enantiomerů nebo konformačně fixovaných isomerů překvapující. Odlišné dispozice při stereospecifických reakcích s biomolekulami organismu vedou k odlišnostem jak farmakodynamickým, tak farmakokinetickým a mohou se projevovat také rozdíly v absorpci, distribuci, biotransformaci nebo eliminaci. Po Conterganové aféře se stala chiralita léčiv, hlavně porovnávání účinnosti enantiomerů a jejich racemických směsí, předmětem vážného zájmu pracovníků ve farmaceutickém výzkumu, který byl doprovázen i rozvojem instrumentálních analytických metod.

2. CÍL

Cílem této diplomové práce bylo osvojit si ovládání HPLC systému při hledání optimálních chromatografických podmínek pro chirální separaci nabumetonu a jeho metabolitů (včetně dvou párů enantiomerů), vyvinout a zvalidovat metodu využitelnou pro studium chirálních aspektů biotransformace nabumetonu v *in vitro* podmínkách a porovnat tak mezidruhovou enzymovou stereospecifitu. K řešení této problematiky jsme použili hepatocytární subcelulární frakce (mikrosomy a cytosol) lidského a potkaního původu.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Historické konsekvence objevu chiraloty

První zmínka o schopnosti látek stáčet rovinou procházejícího polarizovaného světla o určitý úhel se datujeme k roku 1811, kdy ji na vybraných krystalech křemene pozoroval Francois Arago.

Roku 1815 Jean-Baptiste Biot zjistil, že roztoky vybraných organických sloučenin, jako např. cukrů, kafru, kyseliny vinné, otáčí rovinu polarizovaného světla také. Některé ve směru hodinových ručiček, jiné zase naopak. Jako příčinu tohoto jevu předpokládal různou stavbu molekul. V roce 1835 ukázal, že právě pomocí změn v otáčení roviny polarizovaného světla je možno pozorovat hydrolyzu cukru. Položil tak základy polarimetrie.

Výzkum v tomto směru nijak nepokročil až do r.1849, kdy Louis Pasteur zkoumal krystalické soli kyseliny vinné získané z vína. Z roztoku původní soli krystalovaly současně dva rozdílné druhy krystalů v poměru 50:50. Tyto dva druhy krystalů byly zrcadlovými obrazy jeden druhého a nebylo možné je ztotožnit. Roztok každého z nich byl opticky aktivní; jejich specifické otáčivosti měly stejnou číselnou hodnotu a opačná znaménka. Roztok původní soli při tom rovinu polarizovaného světla nestáčet. Pasteur daleko předběhl svou dobu. Jestě nebyla navržena Kekulého strukturní teorie, ale on už při vysvětlování výsledků hovořil o molekulách jako takových: "Nelze pochybovat o tom, že v kyselině pravo-vinné existuje asymetrické uspořádání, které má neztotožnitelný obraz. Je neméně jisté, že atomy kyseliny levo-vinné mají asymetrické uspořádání přesně opačné." [1] Za objev v disymetrii molekul kyseliny hroznové získal profesorský titul. Vyslovil tak již na třírozměrné stavbě molekul založenou definici opticky aktivních sloučenin, pouze místo chiraloty použil výrazu disymetrie [2].

Vlastní pojem chiralita zavedl Lord Kelvin v roce 1873 slovy [3]: "*...I call any geometrical figure, or group of points, chiral, and say it has chirality, if its image in a plane mirror, ideally realized, cannot be brought to coincide by itself...*"

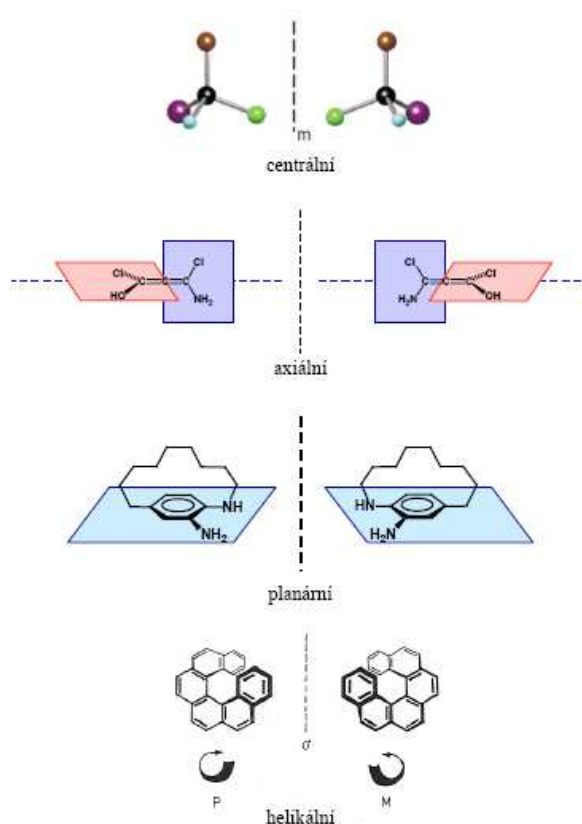
Roku 1858 publikoval Friedrich August Kekulé zásady čtyřmocnosti atomů uhlíku a jejich schopnost tvořit uhlíkaté řetězce. Stejně názory nezávisle na něm zastával i Archibald Scott Couper (1831–1892).

První teorii o asymetrickém uhlíku rozvíjeli van't Hoff a Le Bel v roce 1874. Podle jejich hypotézy jednoduché vazby vycházející z atomu uhlíku mají valenční úhel $109^{\circ}28'$ a směřují do vrcholů pravidelného čtyřstěnu (tetraedru) [4]. V roce 1884 publikoval van't Hoff své výzkumy z chemie pojmenované *Études de Dynamique chimique* [5].

3.2 Příčiny chirality

Objekty nebo molekuly, které nejsou ztotožnitelné se svými zrcadlovými obrazy prostou rotací, označujeme jako chirální. Jako chirální se dá klasifikovat jak mikroobjekt (jediná molekula), tak i makroobjekt (krystal). Definice chiralit přímo nesouvisí se strukturou objektu - např. chirální krystal může být vytvořen jak z achirálních částí – křemen, tak z částí chirálních – krystal (+)-vinné kyseliny. Chiralita je vlastností objektu jako celku [6].

Chirální látky nemají žádný z prvků symetrie druhého druhu, tj. rovinu zrcadlení, střed inverze ani rotačně reflexní osu. Mají však jeden z prvků chiralit, tj. chirální centrum, osu či rovinu, podle kterého rozeznáváme chiralitu centrální, axiální, planární a helikální [7]. Viz. Obr. 1.

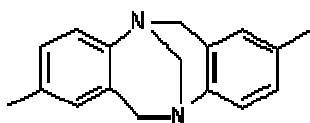


Obr. 1 Typy chiralit

Zdroj: [7]

3.2.1 Centrální chiralita

Je to nejběžněji se vyskytující typ chiralita. Nejčastější příčinou je přítomnost tetraedrického sp^3 -hybridizovaného atomu uhlíku se čtyřmi různými substituenty. Centrem chiralita však může být i trojvazný atom se třemi odlišnými substituenty, např. atom dusíku u aminů, atom fosforu a arsenu u fosfanů a arsanů nebo atom síry u sulfoxidů a sulfoniových solí (fiktivním čtvrtým substituentem je volný elektronový pár), případně kladně nabitý atom se čtyřmi různými substituenty u amoniových, fosfoniových a arsoniových solí [6]. Patří sem i Trögerovy báze (Obr. 2), které jsou chirální díky přemostění dvou stereogenních atomů dusíku ve struktuře.

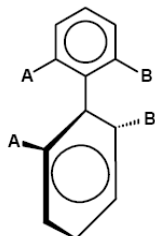


Obr. 2 Trögerova báze – centrální chiralita

3.2.2 Axiální chiralita

Axiální chiralita je vyvolána existencí čtyř substituentů neležících v jedné rovině; osa chiralita potom leží na spojnicích jejich dvojic [6]. Takovým systémem je například allen $abC=C=Ccd$, kde je chirální osa definována tak, že prochází $C=C=C$ vazbami.

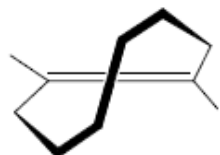
Tento jev je také pozorován u atropoisomerů (molekuly s bráněnou rotací kolem C-C vazby, např. *o,o'*-disubstituované bifenylly nebo binaftyly) nebo alkylicykloalkany s exocyklickou dvojnou vazbou [6].



Obr. 3 Atropoisomer - axilární chiralita

3.2.3 Planární chiralita

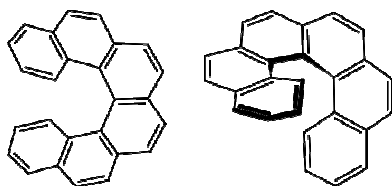
Za rovinu chirality se vybírá rovina, v níž leží největší počet atomů. Příkladem může být cyklookten (rovinou chirality je zde dvojná vazba a na ni vázané atomy), monosubstituované paracyklofany (rovinou chirality je substituovaný aromatický kruh) nebo chirální metaloceny [2].



Obr. 4 Cyklookten – planární chiralita

3.2.4 Helikální chiralita

Patří mezi tzv. inherentní chiralitu. Chiralita molekuly je zde vyvolaná chirální výstavbou z achirálních částí. Šroubovicově uspořádané objekty jsou obvyklé u přírodních makromolekul (bílkoviny, nukleové kyseliny). Každá šroubovice je charakterizována osou, směrem otáčení a stoupání závitů. Nejznámějšími představiteli jsou tzv. helicity [6] a sekundární struktury peptidických řetězců (pravotočivá α -helix složená z L- α -aminokyselin) [2].



Obr. 5 Helicen – helikální chiralita

3.3 Nomenklatura: Fischerova projekce, Cahn-Ingold-

Prelogův nomenklaturní systém, a pojmy s ní související

Skutečné uspořádání atomů nebo skupin atomů kolem chirálního centra se nazývá absolutní konfigurace. Popsat absolutní konfiguraci na chirálním centru můžeme dvěma způsoby, a to vzorcem nebo názvem.

Pro přepis absolutní konfigurace do roviny papíru slouží Fischerova projekce. Z té vychází i D/L systém, používaný u cukrů a aminokyselin, který vyjadřuje konfiguraci hydroxyskupiny. (podle D/L-glycealdehydu) na nejvzdálenějším chirálním uhlíku od karbonylové skupiny.

Aby bylo možné popsat chirální centrum i slovně názvem, byla definována tzv. Pravidla priority dle Cahna, Ingolda a Preloga (CIP) [8][9]. Pravidla určují dohodnuté pořadí („priority či důležitosti“) ligandů pro jednoznačné určení stereoisomerů a jsou následující:

- 1) Atomům připojeným přímo k stereogennímu centru se se přiřadí priorita v pořadí klesajících protonových čísel (největší protonové číslo =1, nejmenší=4).
- 2) Pokud nelze o prioritě rozhodnout dle pravidla 1, porovnají se protonová čísla druhých atomů v každém substituentu, a pokud je to nezbytné, pokračuje se stejně až do rozlišení.
- 3) Atomy vázané násobnými vazbami jsou ekvivalentní stejnému počtu atomů připojených jednoduchou vazbou.

Tato pravidla se používají pro označování:

- konfigurace R/S. Substituent nejmenší priority se natočí dozadu směrem od pozorovatele. umístí dolů pomocí dvou záměn (představuje hřídel volantu). Zbývající tři substituenty jsou na „volantu“, kterým otáčme ve směru 1-2-3 buď doprava (stereogenní centrum má konfiguraci R) nebo doleva (S).
- konfigurace E/Z na dvojně vazbě. Porovnává se skupina s nejvyšší prioritou dle CIP připojená k jednomu centru na dvojně vazbě (alkenu, oximu, apod.) se skupinou s nejvyšší prioritou na centru druhém. Pokud skupiny leží na téže straně referenční roviny procházející dvojnou vazbou, stereoisomer je označen Z (*zusammen* = dohromady).
- nomenklaturou M/P pro helicitu. Vpravo se stáčeující šroubovice či závit (helix) je označen jako P (nebo plus), a vlevo jako M (nebo minus). V úvahu se bere i torzní úhel mezi dvěma zvolenými (referenčními) skupinami připojenými k atomům spojeným touto

vazbou. Za referenční skupiny se vybírají ty s nejvyšší prioritou dle CIP pravidel. Znaménko menšího torzního úhlu pak určuje helicitu helixu.

Pro určení absolutní konfigurace je třeba určovat každé centrum chiralidy samostatně.

Nejdůležitější pojmy související s chiralitou:

enantiomorfy	jsou dva chirální objekty, které jsou neztotožnitelné se svým zrcadlovým obrazem, nebo dvě skupiny objektů či modelů, které jsou neztotožnitelné se zrcadlovým obrazem této skupiny.
enantiomery	optické isomery, rovněž nazývané antipody, vzájemně neztotožnitelné se svým zrcadlovým obrazem. Kromě chování v chirálním prostředí mají fyzikální a chemické vlastnosti stejné (teplotu tání, teplotu varu, dipólmoment, rozpustnost v nechirálních rozpouštědlech). U molekul s několika stereogenními centry mají opačnou konfiguraci na všech z nich.
diastereoisomery	isomery se stejnou konfigurací min. na jednom stereogenním centru a opačnou na zbývajících. Diastereoisomery jsou charakterizovány rozdílnými fyzikálními vlastnostmi i rozdílností v chemickém chování vůči achirálním i chirálním látkám.
epimery	dva diastereoisomery mající opačnou konfiguraci pouze na jednom chirálním centru
mesosloučeniny	sloučeniny mající několik chirálních center, ale jako celek jsou symetrické (mají např. rovinu symetrie)
racemát (racemická směs)	opticky neaktivní směs (+) a (-) enantiomerů (1:1)
eutomer	isomer s vyšší biologickou aktivitou
distomer	isomer s menší biologickou aktivitou nebo afinitou
epimerace	přeměna jednoho epimeru na druhý
isomerace	přeměna jednoho isomeru na druhý
racemizace	přeměna chirální sloučeniny na racemát
enantiomerizace	přeměna jednoho enantiomeru v druhý
enantiomerní excess, e.e.	enantiomerní přebytek (výtěžek). Pro směs (+)- a (-)-enantiomerů, jejíž složení je dáno molární frakcí $F(+)$ a $F(-)$ (kde $F(+)+F(-)=1$), je enantiomerní přebytek (excess)

definován jako $|F(+)-F(-)|$ (a procentuelní enantiomerní přebytek jako $100|F(+)-F(-)|$) [10]

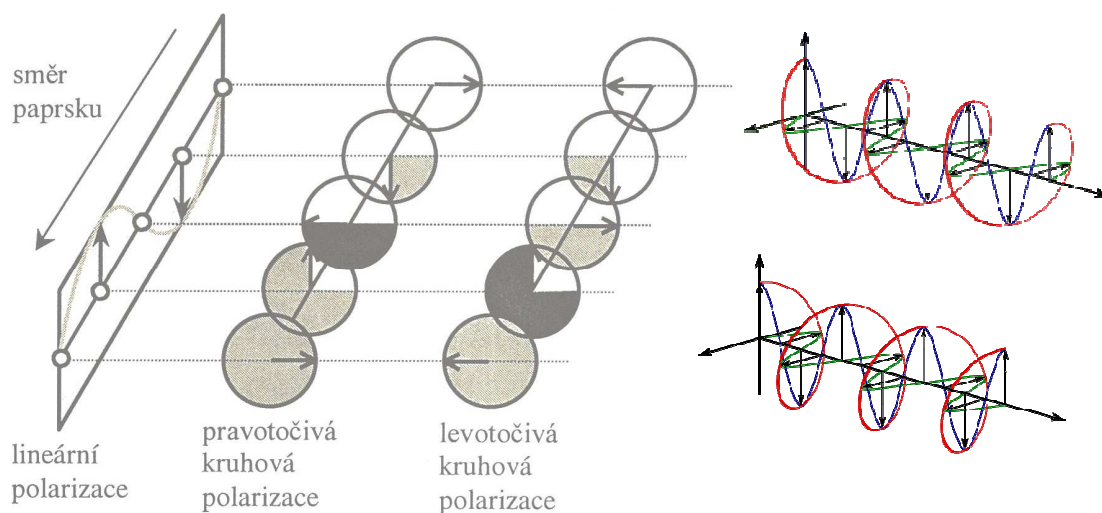
enantiomerní poměr vzájemné procentuální zastoupení obou enantiomerů ve směsi, např. 70(+):30(-) [10]

3.4 Chiroptické metody (Polarimetrie, CD, ORD)

Termín chiroptický označuje optické měřicí techniky pro výzkum chirálních látek, kterými je možno rozlišit enantiomery. Využívají závislost optické aktivity sloučeniny na vlnové délce použitého rovinně polarizovaného světla (metoda optické rotační disperze) nebo změny ve spektrech sloučenin za použití jedné a druhé zrcadlově souměrné formy kruhově polarizovaného světla (metoda cirkulárního dichroismu) [11].

Prochází-li lineárně polarizované světlo roztokem opticky aktivní látky (např. roztokem sacharózy), stáčí se jeho polarizační rovina v závislosti na koncentraci opticky aktivní látky c a na délce l optické dráhy o úhel $\alpha = [\alpha] \cdot l \cdot c$, kde $[\alpha]$ je tzv. specifická (měrná) otáčivost látky (udávaná v tabulkách). Opticky aktivní látky jsou pravo a levotočivé – $[\alpha]$ má buď znaménko plus nebo mínus. Nejčastějším případem optické aktivity je přítomnost asymetrického uhlíku v molekulách organických látek. U látek anorganických je příčinou optické aktivity centrální atom kovu (kobalt, platina apod.) [11].

Lineárně polarizované světlo se skládá ze dvou složek – doprava a doleva kruhově polarizovaného světla stejné amplitudy a frekvence (Obr. 6). Prostředí, ve kterém se vyskytuje opticky aktivní látka, má pro každou složku rozdílný index lomu. Složka, která se šíří rychleji má větší vlnovou délku, obě kruhově polarizované složky se postupně fázově rozcházejí, a výsledná rovina se tím otáčí. Čím více je molekul opticky aktivní látky v dráze paprsku, tím je úhel otočení roviny větší [12].



Obr. 6 Vznik lineárně polarizovaného světla jako vektorového součtu doprava a doleva kruhově polarizovaného světla – obrázek vlevo. Vpravo nahoře pravotočivě kruhově polarizované světlo, vpravo dole levotočivě polarizované (horizontální složka zeleně, vertikální modře)

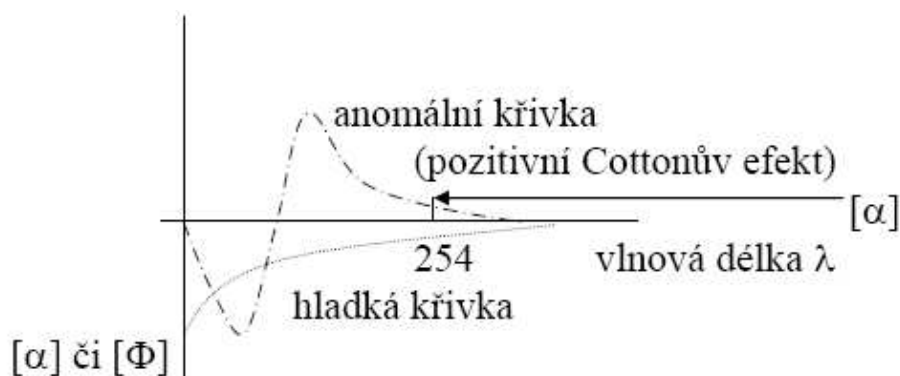
Zdroj: [12]

3.4.1 Polarimetrie

Polarimetrie je nejstarší chiroptickou metodou. Základními částmi polarimetru jsou polarizátor a analyzátor – nejčastěji tvořené různými hranoly – např. tzv. Nicolovým hranolem (nikol) z islandského vápence. Jinou možností jsou polarizační filtry – fólie s vrstvičkou jodchininsulfátu nebo turmalínu (herapatitu), ale ty jsou ve srovnání s hranoly drahé. Jako zdroj světla se používá záření sodíkové výbojky vlnové délky 589 nm pro D-čáru.

3.4.2 Spektropolarimetrie

Jak název napovídá, jde o polarimetrii se spojitě se měnící vlnovou délkou polarizovaného světla. – spektropolarimetrii. Závislost specifické otáčivosti opticky aktivní látky na vlnové délce světla [$\alpha = \alpha(\lambda)$] se nazývá OPTICKÁ ROTAČNÍ DISPERZE. V blízkosti vlnové délky, při níž je světlo opticky aktivní látkou absorbováno, se mění (skokem) znaménko optické aktivity – COTTONŮV JEV, viz. Obr. 7. Podle toho, zda směrem ke krátkovlnné oblasti křivka napřed stoupá anebo napřed klesá, rozeznáváme křivku (a Cottonův efekt) kladnou nebo zápornou [13].



Obr. 7 Monotónní a extrémní průběh závislosti $[\alpha]$ resp. $[\Phi]$ na λ

Zdroj: [14]

Zkušenosti ukázaly, že monotónní křivku závislosti optické otáčivosti na vlnové délce světla vykazují látky, které ve sledované oblasti neabsorbují světelnou energii, tj. nemají v molekule žádné chromofory s elektronovými přechody uskutečňujícími se při těchto vlnových délkách (např. u glukopyranózy). V opačném případě je průběh křivky narušen zpravidla strmou změnou měřených hodnot $[\alpha]$ nebo $[\Phi]$ k jednomu extrému, velmi strmým přechodem přes nulovou hodnotu k druhému extrému a následným pokračováním této, tzv. anomální křivky v poli opačných znamének rotace.

Křivky optické rotační disperse se měří na spektropolarimetrech. Jsou to v podstatě polarimetry se spojitou změnou vlnové délky v oblasti UV-VIS a grafickým nebo digitálním zápisem změřených hodnot. Látky se měří v roztocích a vedle ORD křivky lze zpravidla změřit i elektronové spektrum v dané vlnové oblasti. Většina přístrojů měří v rozmezí 250-750 nm. Dispersní křivku, která s klesající vlnovou délkou nabývá rostoucích kladných hodnot nazýváme pozitivní. Maximum křivky v pozitivní oblasti hodnot $[\varphi]$ se označuje jako vrch (peak), minimum v negativní oblasti je důl (trough). U pozitivní křivky hovoříme o pozitivním Cottonově efektu [14].

Základními aplikacemi ROA spektroskopie jsou: 1) určování absolutní konfigurace opticky aktivních molekul v roztoku, 2) měření enantiomerní čistoty a 3) studium struktury (bio)molekul v roztoku [15].

3.4.3 Dichrografie

Dichrografie využívá tzv. cirkulárního dichroismu. Ten má své místo i v Českém lékopise, protože se často využívá při analýze bílkovin a nukleových kyselin. Jako cirkulární dichroismus se označuje rozdíl absorbancí levotočivě a pravotočivě cirkulárně

polarizovaného světla u opticky aktivní látky v oblasti jejího absorpčního pásu. Přímé měření poskytuje střední algebraickou hodnotu podle vzorce: $\Delta A = A_L - A_R$, v němž značí ΔA diferenční cirkulárně dichroickou absorbanci, A_L absorbanci levotočivě a A_R pravotočivě cirkulárně polarizovaného světla [16].

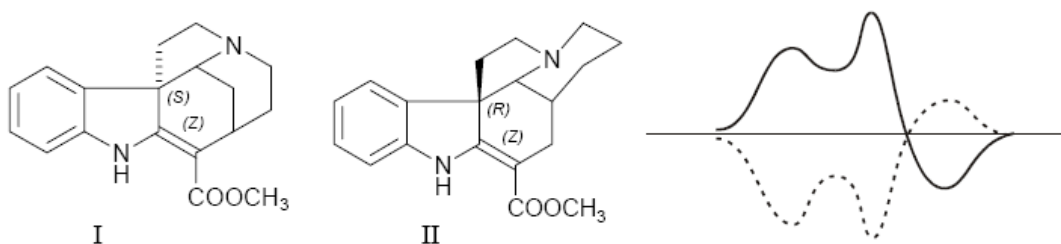
Je-li levotočivá složka kruhově polarizovaného světla jinak absorbována než pravotočivá složka kruhově polarizovaného světla, dojde ke změně rovinně polarizovaného světla na elipticky polarizované. Cirkulární dichroismus je pak definován jako rozdíl extinkčního koeficientu (konstanty úměrnosti) pro levo- a pravo-točivou složku kruhově polarizovaného světla, způsobený asymetrií molekulární struktury sledované látky.

$$CD = \Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_P = \Delta A / c \cdot l \quad \text{kde } \Delta \varepsilon \text{ je molární cirkulární dichroismus nebo molární dichroická absorptivita vyjádřená v } l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Úhel, který charakterizuje míru změny rovinně polarizovaného světla na elipticky polarizované nazýváme elipticitou θ . Jestliže je světlo rovinně polarizováno je $\theta = 0$, u kruhově polarizovaného světla je $\theta = 45^\circ$, viz. Obr. 9.

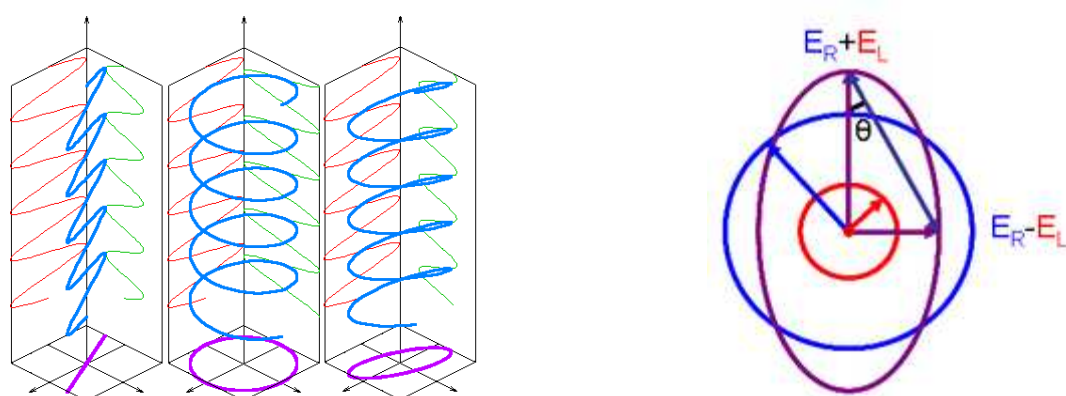
Křivky cirkulárního dichroismu (CD) se měří na přístrojích nazývaných dichrograf nebo dichrometr. Přístroj zaznamenává rozdíly v absorbancích cirkulárně polarizovaných paprsků, které jsou vzorkem střídavě propouštěny. Výsledné křivky zaznamenají pozitivní Cottonův efekt jako pás s pozitivním maximem, negativní CE jako pás s negativním maximem. Při překryvu více CD pásů už ovšem nemusí být obraz spektra takto jednoznačný [14].

Proti ORD dává tato metoda některé výhody: zpravidla poskytuje jednodušší křivky, takže analýza spekter je snadnější, dále je možné měřit ve zředěnějších roztocích (což plyne z větší hodnoty měřené veličiny). Tyto výhody podpořené výraznějším rozvojem instrumentální techniky vedly k tomu, že se v současné době dává přednost měření CD před ORD. Při určování absolutní konfigurace se podobně jako v ORD vychází z předpokladu, že enantiomerní látky poskytují zrcadlově symetrické křivky, což zůstává zachováno i při porovnávání struktur jen přibližně podobných. Jako příklad může posloužit určení absolutní konfigurace alkaloidu tubotaiwinu (Obr. 8.) srovnáním s alkaloidem známé absolutní konfigurace tabersoninem [14].



Obr. 8 Ukázka CD křivek: Ze srovnání křivek obou látek je zřejmá vzájemně opačná konfigurace na chirálním centru obou látek: CD-křivka tubotaiwinu (I), plná čára a tabersoninu (II), čárkovaná čára

Zdroj:[14]



Obr. 9 Vpravo: Lineárně, kruhově a elipticky polarizované světlo

Vlevo: Schéma elipticky polarizovaného světla, E_R – vektor intenzity pravotočivě polarizované složky, E_L – vektor intenzity levotočivě polarizované složky

3.4.4 Využití chiroptických metod

Tyto metody se využívají ke studiu teplotních konformačních závislostí peptidů (konformace peptidické vazby se mění); studiu konformací nukleových kyselin; studiu konformačních stavů polypeptidů, kdy jednotlivé konformace jako α -helix, skládaný list a podobně mají charakteristická CD spektra; studiu komplexací a vazeb (asociací) achirální molekuly s chromoforem s chirální molekulou založené na indukované chiralitě; studium vytváření nadmolekulárních chirálních struktur se vzrůstající molární chiroptickou vlastností (např. molární otáčivosti, ORD) [14].

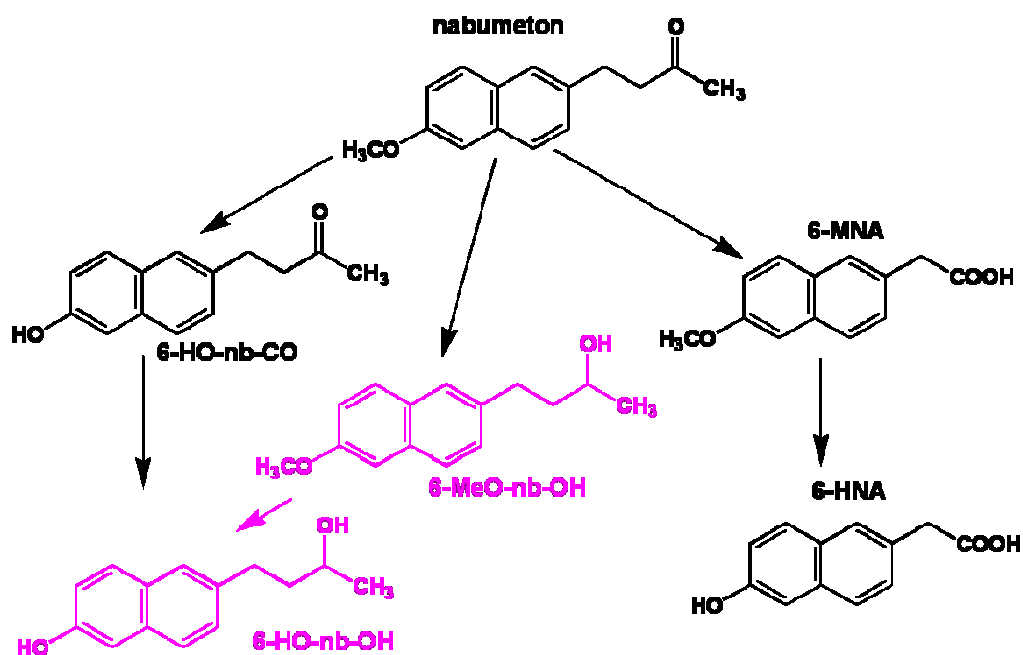
3.5 Nabumeton

Nabumeton je prodrug 6-methoxy-2-nyftyloctové kyseliny, která tlumí bolest a zánět u pacientů s osteoartrózou nebo revmatoidní artritidou [17,18,19]. Je řazen mezi přednostní inhibitory cyklooxygenasy-2 [20], ale míra inhibice COX-1 je stále významná[21,22].

Jedním z hlavních nežádoucích účinků nesteroidních antiflogistik (NSAIDs) je ulcerace mukosy gastrointestinálního traktu, všeobecně spojovaná s kyselou povahou těchto léčiv (přítomností karboxylové skupiny ve struktuře). Aby tomuto nežádoucímu účinku předešli, zaměřili výzkumníci ze SmithKline Beecham svou pozornost na vývoj „nekyselého“ NSAID. V roce 1973 tak Lake a Rose objevili nabumeton a nechali ho patentovat [23].

Protože se vstřebává jako „nekyselé“ neionizované proléčivo, nabízí výrazné výhody oproti ostatním NSAID, zejména s ohledem na lepší gastrointestinální snášenlivost, nižší incidenci mikrokrvácení a příznivé dávkovací schéma – pouze jednou denně [17,24,19].

V játrech prochází nabumeton rapidní biotransformací na hlavní účinnou molekulu 6-methoxy-2-naftyloctové kyseliny (6-MNA) a další biologicky neaktivní metabolity, jejichž struktury zobrazuje biotransformační schéma na Obr. 10. V praktické části nás budou zajímat především ty karbonyl-redukované, které jsou ve schématu barevně zvýrazněny. Redukcí karbonylu totiž na příslušném uhlíku vzniká nové stereogenní centrum, a tedy dva enantiomery daného metabolitu.



Obr. 10 Biotransformační schéma nabumetonu se zvýrazněnými chirálními metabolity

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tato část práce se zabývá stereospecifitou biotransformace nabumetonu a vývojem nové metody pro jeho chirální chromatografickou analýzu. Navazuje na již validované achirální metody pro stanovení nabumetonových biotransformačních metabolitů I. i II. fáze publikované Nobilise et al. (2003, 2004). Zároveň se snaží sledovat i mezidruhové rozdíly jeho metabolismu u dvou modelových organismů (potkan, člověk), k čemuž sloužily jejich subcelulární jaterní frakce.

4.1 Použité přístroje, chemikálie a biologický materiál

Přístroje použité pro přípravu roztoků a HPLC analýzy, chromatografický materiál

- analytické váhy Sartorius R160P, Sartorius AG, Göttingen, Německo
- předvážky Owlabor Rapido 3400B, Německo
- ultrazvuková lázeň K-10, Kraintek s.r.o., Slovensko
- pH-metr Cyber Scan pH/Ion 510, Eutech Instruments/Oakton Instruments, USA
- koncentrátor Thermovap TV10, ECOM s.r.o., Praha, ČR
- chromatografická sestava Thermo Electron (San Jose, Kalifornie, USA) sestávající z degaséru SCM1000, kvarterní gradientové pumpy P4000, autosampleru AS3000 se 100 μ l dávkovací smyčkou, PDA detektoru UV6000 LP, systémového kontroleru SN4000 a PC (Intel Pentium 4 CPU 1.6 GHz, RAM 256 MB, HDD 40 GB) s analytickým softwarem ChromQuest 4 (Thermo Electron, San José, USA) a operačním systémem Windows 2000 (Microsoft Corporation)
- chromatografická kolona Daicel 250mm \times 4,6mm plněná Chiralcel OD-R (Daicel, Japan)
- chromatografická předkolona Chromolith RP-18, 5-6 μ m, Merck, Darmstadt, Německo
- CD spektropolarimetr (cirkulárního dichroismu) Jasco J-710 s průtokovou celou LCCD-311 propojenou s Jasco HPLC sestavou s G-980-50 degasérem a PU-980 HPLC-pumpou a polarimeter (Chiralyzer, IBZ Messtechnik, Hannover, Německo) spojený s Shimadzu HPLC sestavou zahrnující CBM-10A systémový kontroler (Shimadzu), DGU-3A degasér, vysokotlakou pumpu LC-10AD, autoinjektor s chlazením vzorku SIL-10A

a kolonový termostat CTO-10A (*Ernst-Moritz-Arndtova Univezita v Greifswaldu, Ústav farmacie, F.-L.-Jahn-Str. 17, D-17489 Greifswald, Německo*)

Přístroje použité pro přípravu a inkubaci biologických vzorků

- analytické váhy Scaltec SBC 22, Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Německo
- ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex, Berlín, Německo
- laboratorní třepačka Multi-Vortex V-32, Biosan, Riga, Lotyšsko
- Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Německo
- centrifuga eppendorf 5415D, Eppendorf AG, Hamburg, Německo
- koncentrátor eppendorf 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Německo

Chemikálie

- nabumeton (4-(6-methoxy-2-naftyl)-butan-2-on, $C_{15}H_{16}O_2$, $M_r = 228,29$ g/mol), PRO.MED.CS Praha a.s., ČR
- naproxen ((+)-2-(6-methoxynaftalen-2-yl)propanová kyselina, $C_{14}H_{14}O_3$, 230,26 g/mol), Sigma-Aldrich, Praha, ČR
- methylester naproxenu (methylester 2-(6-methoxynaftalen-2-yl)propanové kyseliny, $C_{15}H_{16}O_3$, 244,29 g/mol), syntetizovaný na Katedře anorganické a organické chemie, FAF UK, HK, totožnost ověřena NMR
- standardy metabolitů nabumetonu (všechny syntetizované na Ústavu experimentální biofarmacie AVČR v HK, totožnost ověřena NMR a MS, podrobnosti lze nalézt v práci Nobilise et al. (2003)):
 - 6-methoxy-2-naftylactová kyselina (6-MNA, $C_{13}H_{12}O_3$, 216,24 g/mol)
 - 6-hydroxy-2-naftylactová kyselina (6-HNA, $C_{12}H_{10}O_3$, 202,21 g/mol)
 - 4-(6-methoxy-2-naftyl)-butan-2-ol (6-MeO-nb-OH, $C_{15}H_{18}O_2$, 230,31 g/mol)
 - 4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2-on (6-HO-nb-CO, $C_{14}H_{14}O_2$, 214,26 g/mol)
 - 4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2-ol (6-HO-nb-OH, $C_{14}H_{16}O_2$, 216,28 g/mol)
- chloristan sodný monohydrát p.a. ($NaClO_4 \cdot H_2O$, 140,46 g/mol), Sigma-Aldrich, Francie
- kyselina chloristá 70% p.a. ($HClO_4$), Sigma-Aldrich, Německo
- hydroxid sodný ($NaOH$, 40,00 g/mol) p.a., Lachema, Brno, ČR
- acetonitril (ACN) HPLC grade, Sigma-Aldrich, Israel

- methanol (MeOH) HPLC grade, Merck, Darmstadt, Německo
- diethylether p.a., Merck, Darmstadt, Německo
- kyselina chlorovodíková 35% p.a. (HCl), Lachema, Neratovice, ČR
- kyselina fosforečná 85% p.a., Lachema, Brno, ČR
- hexafluorofosfát draselný (KPF_6 , 184,06 g/mol), Sigma-Aldrich, USA
- β -nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaná tetrasodná sůl (NADPH; $C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$, 833,35g/mol), AppliChem, Darmstadt, Německo
- dimethylsulfoxid (DMSO, C_2H_6OS , 78,13 g/mol), Sigma–Aldrich, Praha, ČR
- UHQ voda (vyrobená přístrojem Elgastat UHQ PS apparatus, Elga, Bucks., UK)
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,4 - připravený z hydrogenfosforečnanu sodného, dihydrogenfosforečnanu sodného a 85% kyseliny fosforečné, vše p.a. čistota, Lachema, Brno, ČR

Biologický materiál

- zamražené potkaní hepatocytární subcelulární frakce (mikrosomy, cytosol), Katedra biochemických věd, FAF UK, HK
- zamražené lidské hepatocytární subcelulární frakce (mikrosomy, cytosol), Katedra biochemických věd, FAF UK, HK

4.2 Optimalizace chromatografických podmínek

Cílem této studie bylo najít vhodné chromatografické podmínky pro chirální separaci nabumetonu a jeho metabolitů, včetně dvou enantiomerů redukovaného nabumetonu a dvou enantiomerů O-desmethyl-redukovaného nabumetonu. K dispozici byla Chiralcel OD-R 250×4,6 mm chromatografická kolona plněná 10 μ m silikagelovými částicemi potaženými na povrchu chirálním selektorem – celulóza tris-3,5-dimethylfenylkarbamátem. Vlastnosti stacionární fáze byly tedy dány, musela být nalezena optimální mobilní fáze, která by umožnila separaci 9 analytů v co nejkratším čase. Její průtok byl předem limitován výrobcem. Vhodné komponenty mobilní fáze a maximální tlak ovlivňovaly životnost chirální kolony.

V souladu s prací Nobilise et al.(2003) byla použita PDA detekce (195-380 nm), kvantifikace byla prováděna při vlnových délkách 225 a 265 nm.

4.2.1 Volba mobilní fáze

Separací enantiomerů na Chiralcel OD-R 250×4,6mm koloně, kterou jsme měli k dispozici, se zabýval již Kučera et al.(2005) u metabolitů benfluronu a dimefluronu a Nobilis et al.(2007, 2008) u metabolitů flubendazolu. Použité mobilní fáze byly o složení ACN–1M NaClO₄ (40:60, v/v) a MeOH–1M NaClO₄ (75:25, v/v).

Na vzorcích ze standardních roztoků nabumetonu a jeho metabolitů (viz. 4.2.3) jsme tedy otestovali mobilní fáze s rozpouštědly v těchto poměrech:

- ACN-1M NaClO₄ pH 3 (40:60, v/v)
 - ACN-1M NaClO₄ pH 6,74 (40:60, v/v)
 - MeOH-1M NaClO₄ pH 6,74 (75:25, v/v)
 - MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (75:25, v/v)
 - MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (65:35, v/v)
 - gradientovou kombinaci dvou předchozích: 0.-35.min. MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (65:35, v/v), do 40.min. přechod na MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (75:25, v/v)
 - MeOH-0,1M KPF₆ pH 3 (75:25, v/v)
- a
- ACN-UHQ voda-kys. octová (45:55:0,1, v/v/v) – pro hmotnostní spektrometrii.

4.2.2 Vnitřní standard

Jako vnitřní standard jsme po vzoru publikace Nobilise et al. (2003) vybrali naproxen. V průběhu hledání vhodné mobilní fáze se ovšem ukázal jako nevhodný a byli jsme tak nuceni zvolit jiný.

4.2.3 Příprava roztoků

Všechny roztoky vč. navážek byly připravovány při laboratorní teplotě 27°C. Podmínky následného uchovávání těchto roztoků se sice lišily (viz. dále), avšak před dalším ředěním či analýzami byly zpět vytemperovány na laboratorní teplotu.

Zásobní roztoky nabumetonu a jeho metabolitů

Celkem bylo připraveno 8 zásobních roztoků, každý o koncentraci 10^{-3} M, které jsme uchovávali ve tmě v lednici při teplotě 4-6°C. Z nich se následně (po vytemperování) ředěním příslušnou mobilní fází získávaly vzorky o koncentraci 10^{-5} M používané při hledání optimálního složení mobilní fáze.

Je dobré si uvědomit, že u 4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2-olu a 4-(6-methoxy-2-naftyl)-butan-2-olu se jednalo o syntetickou racemickou směs dvou enantiomerů (poměr 1:1), které na chromatogramu tvořily dva samostatné píky každý o poloviční koncentraci, než měl připravený standární roztok těchto analytů.

10^{-3} M zásobní roztok nabumetonu [4-(6-methoxy-2-naftyl)-butan-2-on]

22,83 mg nabumetonu bylo v 100 ml odměrné baňce rozpuštěno a po rysku doplněno acetonitrilem, sonifikováno.

10^{-3} M zásobní roztok 6-HO-nb-OH [4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2-ol]

5,41 mg 6-HO-nb-OH bylo rozpuštěno a po rysku doplněno v 25 ml odměrné baňce methanolem, sonifikováno.

10^{-3} M zásobní roztok 6-MeO-nb-OH [4-(6-methoxy-2-naftyl)-butan-2-ol]

23,03 mg 6-MeO-nb-OH bylo v 100 ml odměrné baňce rozpuštěno a po rysku doplněno acetonitrilem, sonifikováno.

10^{-3} M zásobní roztok 6-HO-nb-CO [4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2-on]

21,43 mg 6-HO-nb-CO bylo ve 100 ml odměrné baňce rozpuštěno a po rysku doplněno acetonitrilem, sonifikováno.

10⁻³ M zásobní roztok 6-HNA [6-hydroxy-2-naftyloctová kyselina]

20,21 mg 6-HNA bylo ve 100 ml odměrné baňce rozpuštěno v 10 ml (4 mg) NaOH, 40 ml UHQ vody a 50 ml methanolu, sonifikováno.

10⁻³ M zásobní roztok 6-MNA [6-methoxy-2-naftyloctová kyselina]

21,62 mg 6-MNA bylo ve 100 ml odměrné baňce rozpuštěno v 10 ml (4 mg) NaOH, 40 ml UHQ vody a 50 ml methanolu, sonifikováno.

10⁻³ M zásobní roztok naproxenu [2-(6-methoxynaftalen-2-yl)propanová kyselina]

23,03 mg naproxenu bylo ve 100 ml odměrné baňce rozpuštěno v 10 ml (4 mg) NaOH, 70 ml UHQ vody a 20 ml methanolu, sonifikováno.

10⁻³ M zásobní roztok methylester naproxenu

[methylester 2-(6-methoxynaftalen-2-yl) propanové kyseliny]

6,11 mg methylesteru naproxenu bylo rozpuštěno a po rysku doplněno v 25 ml odměrné baňce acetonitrem, sonifikováno.

Roztoky pro mobilní fáze

Připravili jsme tyto 3 základní roztoky, které byly následně míseny s acetonitrem nebo methanolem ve výše uvedených poměrech (viz 4.2.1) a odzdušněny v ultrazvukové lázni. Tyto roztoky i vlastní mobilní fáze byly ponechávány při laboratorní teplotě (kolem 27°C).

1M NaClO₄ pH 6,74

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 140,46 g NaClO₄ UHQ vodou v 1000 ml odměrné baňce a ultrazvukován.

1M NaClO₄ pH 3

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 140,46 g NaClO₄ UHQ vodou v 1000 ml odměrné baňce, upraven 70% HClO₄ na pH 3 a ultrazvukován.

0,1 M KPF₆ pH 3

Roztok byl připraven rozpuštěním navážky 9,20 g KPF₆ UHQ vodou v 500 ml odměrné baňce a upraven 2 M kyselinou fosforečnou na pH 3, ultrazvukován.

4.3 Inkubace a příprava vzorků

Jaterní mikrosomální a cytosolické frakce lidského či potkaního původu jsme *in vitro* inkubovali s nabumetonem a jeho vybranými metabolity (6-MeO-nb-OH, 6-HO-nb-CO, 6-HO-nb-OH a 6-MNA) – s každým substrátem zvlášť. Poté jsme analyty liquid-liquid extrakcí převedli do organického rozpouštědla, to odpařili a odpary uchovávali při -20°C v mrazicím boxu. Před analýzou byly rekonstituovány v mobilní fázi.

Celý proces probíhal v 1,5 ml polypropylenových mikrozkuvkách s víčkem typu Eppendorf.

Jako extrakční činidlo jsme použili diethylether, s kterým byly dle validačních parametrů dosaženy nejlepší výsledky – dichlormethan a ethylacetát byly o něco horší. Recovery analytů se pohybovalo v rozmezí 78-85 % (Nobilis et al., 2003).

Pro inkubace jsme přichystali čerstvý roztok koenzymu NADPH a roztoky nabumetonu i jeho metabolitů, tentokrát v dimethylsulfoxidu (DMSO). Při přípravě inkubačních směsí jsme tedy použili tyto roztoky:

- 10 mM nabumeton v DMSO
- 10 mM 6-MeO-nb-OH v DMSO
- 10 mM 6-HO-nb-CO v DMSO
- 10 mM 6-HO-nb-OH v DMSO
- 10 mM 6-MNA v DMSO
- 3 mM NADPH v redestilované vodě
- 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4
- DMSO

Pro každý z 5 substrátů byla zhotovena následující série vzorků:

- vzorek s potkaními mikrosomy (ve 3 paralelách, označení 1A-C)
Do označené Eppendorfký jsme napipetovali 3 μ l 10 mM roztoku substrátu a 97 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4, přemístili ji na led a přidali 100 μ l 3 mM roztoku NADPH a 100 μ l potkaních mikrosomů.
- vzorek s lidskými mikrosomy (ve 3 paralelách, označení 1A-C-h)
Do označené Eppendorfký jsme napipetovali 3 μ l 10 mM roztoku substrátu a 97 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4, přemístili ji na led a přidali 100 μ l 3 mM roztoku NADPH a 100 μ l lidských mikrosomů.
- vzorek s potkaním cytosolem (ve 3 paralelách, označení 2A-C)
Do označené Eppendorfký jsme napipetovali 3 μ l 10 mM roztoku substrátu a 97 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4, přemístili ji na led a přidali 100 μ l 3 mM roztoku NADPH a 100 μ l potkaního cytosolu.
- vzorek s lidským cytosolem (ve 3 paralelách, označení 2A-C-h)
Do označené Eppendorfký jsme napipetovali 3 μ l 10 mM roztoku substrátu a 97 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4, přemístili ji na led a přidali 100 μ l 3 mM roztoku NADPH a 100 μ l lidského cytosolu.
- slepý vzorek chemický (ve 2 paralelách, označení 3A-B)
Do označené Eppendorfký jsme napipetovali 3 μ l 10 mM roztoku substrátu a 197 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4, přemístili ji na led a přidali 100 μ l 3 mM roztoku NADPH.

Tyto inkubační směsi o celkovém objemu 0,3 ml tedy obsahovaly substrát o koncentraci 10^{-4} mol/l (tj. 30 nmol) a NADPH o koncentraci 10^{-3} mol/l.

Dále byly připraveny slepé vzorky biologické, které byly pro všechny substráty společné, neboť žádný z nich neobsahovaly.

- slepý vzorek biologický – s potkaními mikrosomy (ve 3 paralelách, označení 4A-C)
Inkubační směs sestávala z 3 μ l DMSO, 197 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4 a 100 μ l potkaních mikrosomů.

- slepý vzorek biologický – s lidskými mikrosomy (ve 3 paralelách, označení 4A-C-h)
Inkubační směs obsahovala 3 μl DMSO, 197 μl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4 a 100 μl lidských mikrosomů.
- slepý vzorek biologický – s potkaním cytoelem (ve 3 paralelách 5A-C)
Inkubační směs tvořilo 3 μl DMSO, 197 μl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4 a 100 μl potkaního cytosolu.
- slepý vzorek biologický – s lidským cytoelem (ve 3 paralelách 5A-C-h)
Inkubační směs byla složena z 3 μl DMSO, 197 μl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,4 a 100 μl lidského cytosolu.

Takto připravené vzorky jsme promíchali na třepačce a dali do termostatu inkubovat – na 60 minut, při 37°C, třepání 700 rpm. Inkubaci jsme ukončili ochlazením inkubační směsi na 0°C v ledové lázni a přidáním 15 μl 35% HCl. Ke každému vzorku jsme přidali 6 μl 10⁻³M roztoku I.S., 900 μl diethyletheru a dali na třepačku 12 min. intenzivně třepat. Eppendorfký jsme umístili do centrifugy, vzorky se stočily (5 min. při 5200 rcf) a poté byly uloženy do hlubokomrazicího boxu. Po zamrznutí vodné fáze jsme horní organickou vrstvu dekantovali do připravených popsaných čistých Eppendorfků. Extrakty jsme dali odpařit do koncentrátoru (30°C, asi 15 min.) a suché vzorečky uschovali v mrazicím boxu při -20°C.

Před chromatografickou analýzou jsme je na ultrazvukové lázni rekonstituovali v 600 μl mobilní fáze.

4.4 Kalibrace a stabilita nabumetonových derivátů

Ze zásobních roztoků analytů a I.S. byla připravena kalibrační řada o 8 koncentračních úrovních. Jelikož maximální očekávaná koncentrace (dle množství substrátu daného do inkubační směsi a předpokládané 100% recovery při extrakci) kteréhokoli analytu ve vzorku byla 5·10⁻⁵ mol/l, přizpůsobili jsme tomu i rozsah kalibračních koncentrací. Ty se pohybovaly v rozmezí 0,01-5 10⁻⁵ mol/l, přičemž vnitřní standard měl na všech úrovních koncentraci 10⁻⁵ M. Vyhodnocení jsme provedli při 225 a 265 nm.

Z kalibračních křivek naměřených v různých časových intervalech jsme usuzovali i na stock-solution a post-prepartive stabilitu standardních roztoků analytů. Long-term a freeze-

and-thaw stabilitu jsme nesledovali, protože jsme vzorky zpravidla ihned druhý den po přípravě měřili.

4.5 Identifikace (+)- a (-)-enantiomerů

Určení absolutní konfigurace separovaných enantiometů dle Cahn-Ingold-Prelogova systému nebylo z důvodu komerční nedostupnosti samostatných standardů (S)- a (R)-enantiomerů karbonyl-redukovaných nabumetonových metabolitů možné. Zároveň jsme ani nebyli schopni identifikovat, které z enantiomerů jsou (+) a které (-), neboť naše laboratoř nedisponovala příslušným, k tomu nezbytným, přístrojovým vybavením. Vzorky proto byly odeslány na Univerzitu v Greifswaldu, kde pro nás Prof. Dr. Thomas Jira a jeho spolupracovníci provedli potřebné analýzy a tyto údaje za použití polarimetrického a CD detektoru zjistili.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výběr mobilní fáze a vnitřního standardu

Při testování různých mobilních fází jsme postupovali tak, že jsme na koloně analyzovali nejdříve čisté 10^{-5} M roztoky jednotlivých analytů pro identifikaci retenčních časů a následně jejich směs o stejné koncentraci. Současně jsme ověřovali možnost použití naproxenu jako vnitřního standardu. Aby bylo splněno doporučení výrobce nepřekračovat hodnotu tlaku na koloně 5MPa, byl průtok mobilní fáze nastaven na 0,5 ml/min.

První vyzkoušená mobilní fáze, ACN-1M NaClO₄ pH 3 (4:6, v/v), byla zcela nevhodná. Píky 6-MNA a 6-HO-nb-CO se úplně překrývaly s píky obou enantiomerů 6-HO-nb-OH a analýza trvala bezmála 80 min.

Pík O-desmetylovaného nabumetonu kolidoval s enantiomerem 6-HO-nb-OH (v pořadí druhým eluovaným) i v další mobilní fázi - o složení ACN-1M NaClO₄ pH 6,74 (4:6, v/v).

Při použití mobilní fáze MeOH-1M NaClO₄ pH 6,74 (75:25, v/v) se nám sice podařilo O-desmetylovaný nabumeton separovat a oproti předchozím MF se zkrátila doba analýzy přibližně o 25 min. na výsledných 55 min., ale všechny kyseliny se eluovaly společně kolem 7.minuty a 6-MNA s naproxenem tvořili téměř jediný pík. K jeho rozdělení nám nepomohlo ani snížení pH mobilní fáze na hodnotu 3.

Téměř optimální separaci poskytla fáze o složení MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (65:35, v/v), avšak doba analýzy 140 min. pro nás byla nepřijatelně dlouhá. Proto jsme se ji pokusili zkrátit gradientovou elucí, kde by se v 35.-40. minutě přešlo na fázi MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (75:25, v/v). Ani to se však neukázalo jako vhodná volba, docházelo k nestabilitám baseliny (drift).

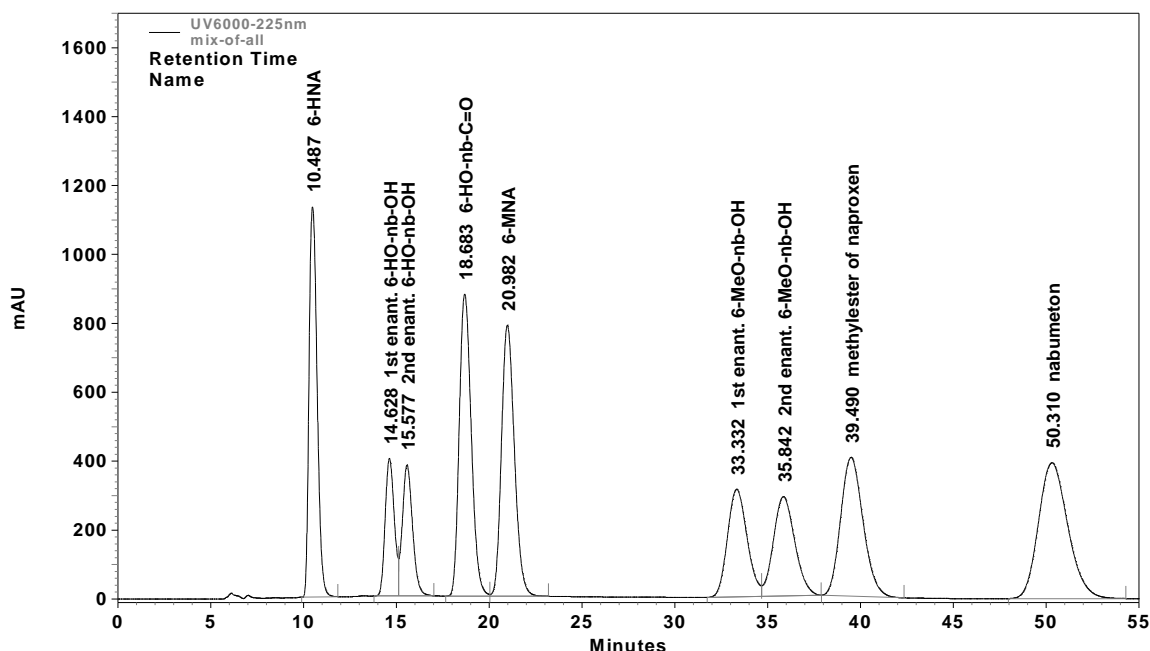
Retenční časy analytů v jednotlivých mobilních fázích porovnává Tab. 1 a přehled chromatogramů nabízí Příloha 1.

Tab. 1 Srovnání retenčních časů analytů v různých mobilních fázích

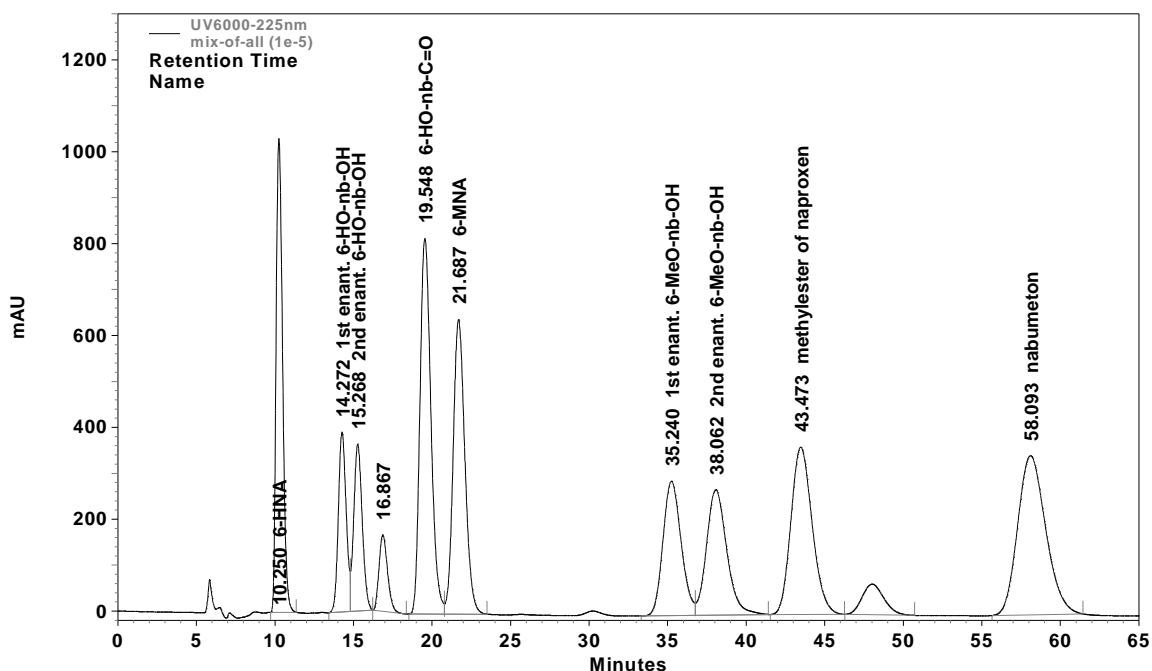
	R _t (min.)				
	ACN-1M NaClO ₄ pH 3 (4:6, v/v)	ACN-1M NaClO ₄ pH 6,74 (4:6, v/v)	MeOH-1M NaClO ₄ pH 6,74 (75:25, v/v)	MeOH-1M NaClO ₄ pH 3 (75:25, v/v)	MeOH-1M NaClO ₄ pH 3 (65:35, v/v)
6-HNA	12,367	6,150	6,347	10,803	15,770
6-HO-nb-OH (1st)	26,767	24,890	14,448	15,587	30,253
6-HO-nb-OH (2nd)	28,708	26,598	15,493	16,853	33,622
6-MNA	27,272	6,820	7,000	22,812	42,787
6-HO-nb-CO	29,058	27,202	18,712	20,133	38,570
naproxen	36,995	7,777	7,322	23,600	48,690
6-MeO-nb-OH (1st)	63,460	58,748	34,383	38,393	93,830
6-MeO-nb-OH (2nd)	66,533	61,507	37,098	41,605	103,070
nabumeton	80,748	76,377	52,388	58,088	135,237

V dalším kroku jsme se rozhodli pro zkoušku jiného vnitřního standardu místo naproxenu.. Pro koeluci původně používaného naproxenu s 6-MNA se logicky hledal lipofilnější derivát naproxenu. První volba padla na jeho methylester, který se ve spojení s mobilní fází MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (75:25, v/v) osvědčil, viz. Obr. 11.

Obdobně uspokojivé výsledky separace přineslo i použití MeOH-0,1M KPF₆ pH 3 (75:25, v/v) jako mobilní fáze a opět methylester naproxenu jako I.S..



Obr. 11 Chromatografický záznam separace nabumetonu, jeho potenciálních metabolitů a I.S. (methylester naproxenu) v MF o složení MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (75:25, v/v).



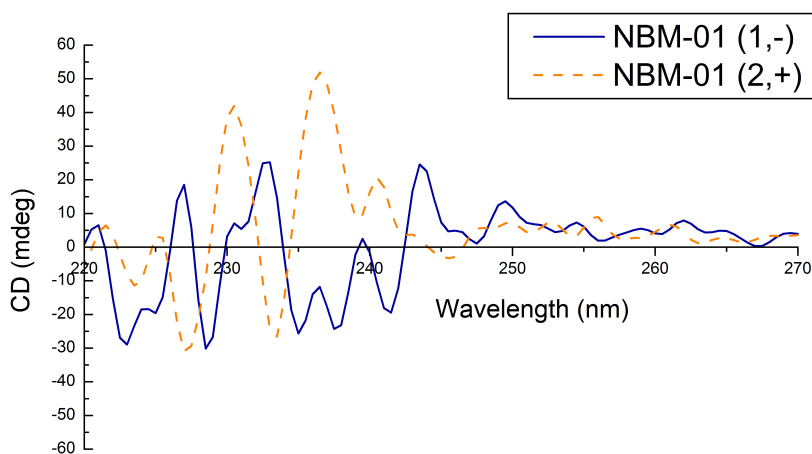
Obr. 12 Chromatografický záznam separace nabumetonu, jeho potenciálních metabolitů a I.S. (methylester naproxenu) v MF o složení MeOH-0,1M KPF₆ pH 3 (75:25, v/v).

Z těchto dvou vhodných mobilních fází jsme pro analýzy nakonec používali tu o složení MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (75:25, v/v) s methylesterem naproxenu jako vnitřním standardem. Důvodem bylo pouze to, že než nám byla dodána chemikálie (KPF₆) na přípravu druhé vhodné MF a mohli jsme ji tedy vyzkoušet, osvědčila se nám už tato a měli jsme s ní část pokusů již naměřenou. V budoucnu by mohlo být použití KPF₆ perspektivní, protože k dosažení srovnatelných chromatografických výsledků bylo zapotřebí 10x nižší koncentrace KPF₆ v porovnání s fází využívající NaClO₄.

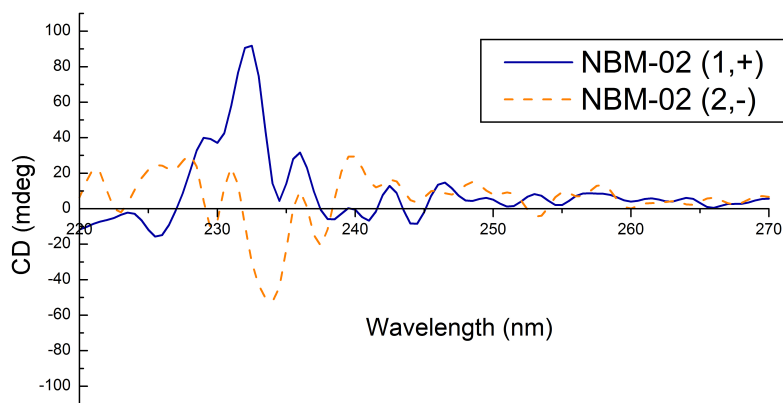
5.2 Identifikace (+)- a (-)-enantiomerů

Pro interpretaci CD-spekter byla vybrána oblast mezi 240-225 nm, jelikož to byla nejmenší vlnová délka vykazující pouze nepatrné interference s NaClO₄ a roztoky používanými ve studii (UV cut-off pro vodu: 190 nm, pro methanol: 220 nm). Snaha byla udržet vlnovou délku co nejmenší, protože karbonyl-redukované nabumetonové metabolity mají λ_{\max} kolem 229 nm.

Na Obr. 13 a 14 jsou CD-spektra jednotlivých enantiomerů 6-HO-nb-OH (NBM-01) a 6-MeO-nb-OH (NBM-02). Tato spektra naznačují, že eluční pořadí enantiomerů je pro 6-HO-nb-OH (-,+)¹ a pro 6-MeO-nb-OH (+,-)². Navíc i chirální HPLC analýza racemické směsi těchto látek s polarimetrickou detekcí (Chiralyser) prokázala stejné výsledky.



Obr. 13 CD-spektrum (-)- a (+)-enantiomeru 6-HO-nb-OH



Obr. 14 CD-spektrum (+)- a (-)- enantiomeru MeO-nb-OH

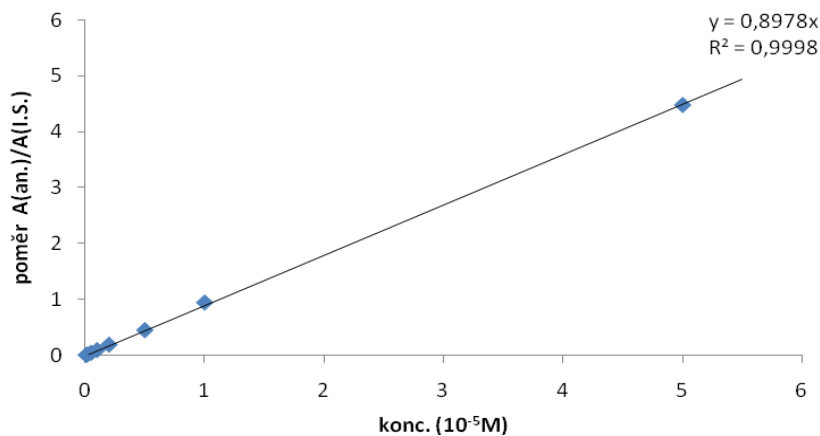
5.3 Kalibrace

Pro každý analyt byla sestrojena osmibodová kalibrační křivka, vypočtena regresní rovnice a koeficient determinace při vlnové délce 225 i 265 nm. Rovnice kalibračních křivek byla získána proložením závislosti poměru ploch píků (plocha píku jednotlivého analytu/plocha píku vnitřního standardu) na koncentraci metodou nejmenších čtverců. Srovnání parametrů regresních rovnic pro jednotlivé analyty při obou vlnových délkách uvádí Tab. 2.

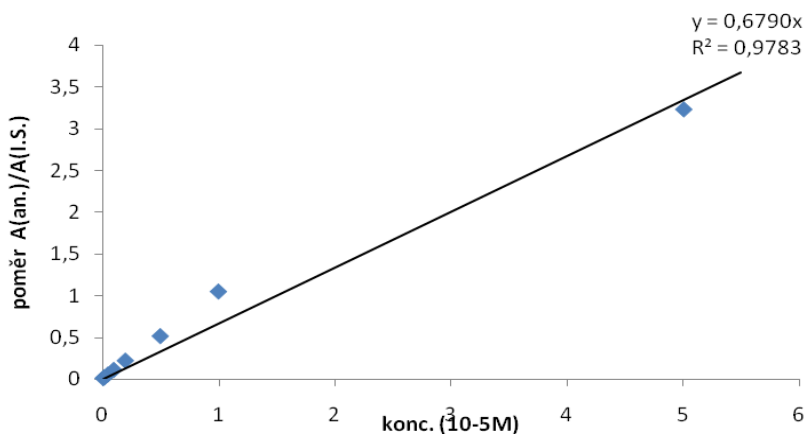
Pro konečné vyhodnocování dat byla upřednostněna vlnová délka 265 nm, neboť při 225 nm měla většina kalibračních křivek při lineárním proložení nízký koeficient determinace a bylo by pro ně vhodnější proložení polynomem 2. stupně. Na Obr. 15-17 jsou pro příklad znázorněny kalibrační křivky 6-methoxy-2-naftyloctové kyseliny zhotovené při 265 nm s lineárním a při 225 nm i s kvadratickým proložením hodnot. Poměry ploch píků analytu k I.S. naměřené na jednotlivých koncentračních hladinách dokumentuje Příloha 2.

Tab. 2 Parametry kalibračních křivek jednotlivých analytů - při 225 a 265 nm

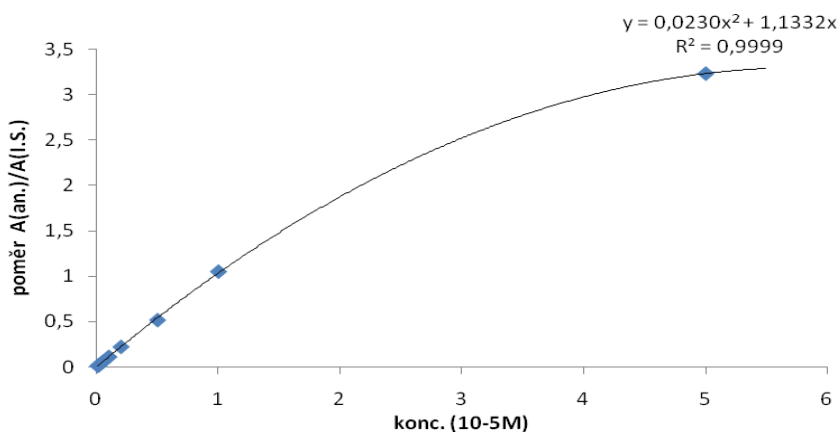
	265 nm		225 nm	
	parametry regresní rovnice $y = k \cdot x$		parametry regresní rovnice $y = k \cdot x$	
	směrnice	koef.determinace	směrnice	koef.determinace
	k	R^2	k	R^2
6-HNA	0,808695	0,999780	0,534525	0,949429
(-)-6-HO-nb-OH	0,563669	0,997924	0,652333	0,991733
(+)-6-HO-nb-OH	0,637426	0,999933	0,767978	0,996275
6-HO-nb-CO	0,827185	0,999333	0,650271	0,952600
6-MNA	0,897827	0,999825	0,678979	0,978271
(+)-6-MeO-nb-OH	0,89308	0,999666	1,088969	0,997459
(-)-6-MeO-nb-OH	0,931021	0,999298	1,155725	0,997555
nabumeton	0,926381	0,999396	0,990609	0,994458



Obr. 15 Kalibrační křivka 6-MNA vyhodnocovaná při 265 nm – lineární proložení



Obr. 16 Kalibrační křivka 6-MNA vyhodnocovaná při 225 nm – lineární proložení



Obr. 17 Kalibrační křivka 6-MNA vyhodnocovaná při 225 nm – kvadratické proložení

5.4 Stabilita

Z kalibrací naměřených v různých časových obdobích jsme sledovali stock-solution a post-preparative stabilitu zásobních roztoků analytů na koncentrační hladině 10^{-5} mol/l.

5.4.1 Stock-solution stabilita

Stabilitu základních roztoků analytů skladovaných při teplotě 4-6°C jsme ověřili porovnáním naměřených koncentrací u vzorků z nich čerstvě připravených a po 30 dnech skladování v lednici.

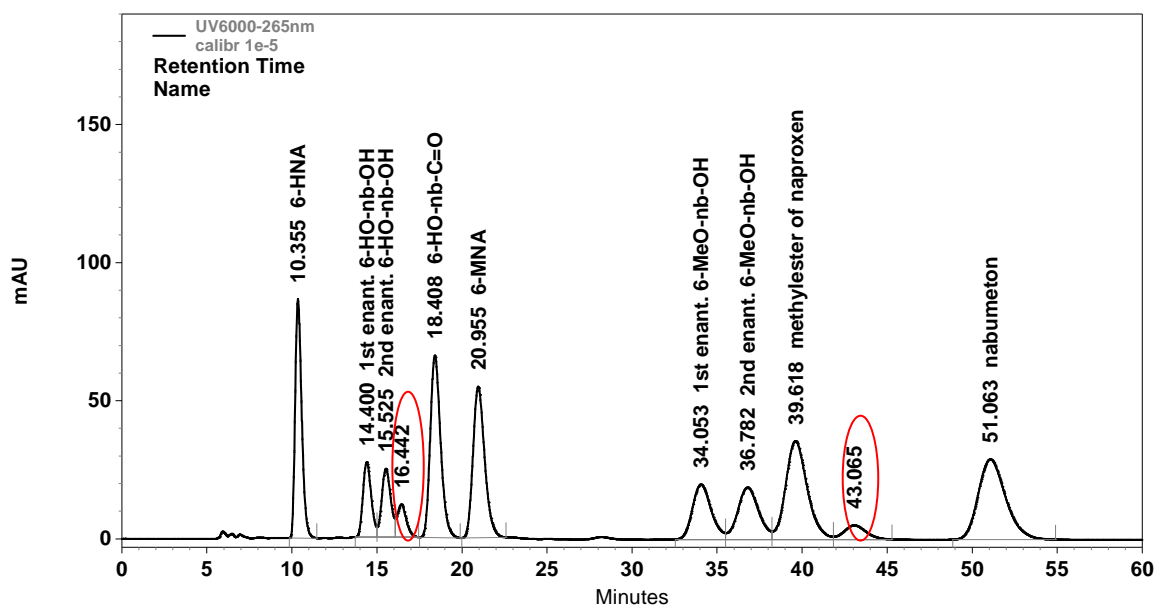
Rozdíly v koncentracích se u všech analytů pohybovaly do 4,5 %. V nich je navíc zahrnuta i nepřesnost pipetování, neboť zásobní roztoky (10^{-3} M) jsme před každou analýzou zvlášť na požadovanou 10^{-5} M koncentraci ředili. Lze tedy říci, že roztoky jsou při uchovávání v lednici po dobu jednoho měsíce stabilní. Naměřené výsledky dokládá Příloha 3.

5.4.2 Post-preparative stabilita

U kalibračních vzorků o koncentraci 10^{-5} mol/l jsme sledovali i stabilitu analytů od uložení v autosampleru až do analýzy.

Z téže vialky byla provedena analýza vzorku ihned/po 17.hod./po 34. hod. po jeho přípravě, resp. umístění do autosampleru. V chromatogramech z druhého a třetího nástřiku téhož vzorku se objevily dva nové neznámé píky – cca v 16. a 43 .min (viz. Obr. 18), které v prvním chromatogramu přítomny vůbec nebyly. Plocha jejich píku rostla s dobou od uložení vzorku v autosampleru. Tyto píky jsme registrovali i u analýz s hexafluorofosfátem v mobilní fázi. Dále jsme zaznamenali, že s tím, jak narůstá plocha těchto píků, ubývá srovnatelně s nimi i plocha jiných dvou. Konkrétně plocha u 6-HNA se vůči I.S. po 34 hodinách vzorku v autosamperu zmenšila o 16 %, u 6-MNA o 13 %. Naopak pík eluovaný v 16.minutě měl po stejné době 14 % - ten kolem 42. min. dokonce 15 % - plochy píku vnitřního standardu. Podrobnější čísla viz Příloha 3.

Tuto korelaci podpořili i výsledky získané během drug-metabolism tracingu, kde byla jako substrát použita 6-MNA. I zde bylo možné u vzorků měřených ihned/po sedmi/po patnácti hodinovém stání v autosampleru registrovat pík eluovaný kolem 43.min. a jeho s časem rostoucí plochu při současném úbytku 6-MNA. Pík kolem 16.minuty zde nalezen nebyl.



Obr. 18 Chromatografický záznam analýzy 10^{-5} M směsi standardů - po 34 hod. stání vzorku v autosampleru s dvěma novými píky

5.5 Analýzy in vitro inkubovaných substrátů

Původně jsme chtěli inkubovat nabumeton pouze se subcelulárními frakcemi z potkaních hepatocytů. Po vyhodnocení prvotních výsledků jsme se ale rozhodli pokusy rozšířit o inkubace s jaterními frakcemi lidského původu a jako substrát jsme enzymům nabídli i vybrané nabumetonové metabolity - 6-MeO-nb-OH, 6-HO-nb-CO, 6-HO-nb-OH a 6-MNA. Tedy kromě 6-HNA všechny metabolity, které jsme měli k dispozici.

Následující část vzájemně porovnává od každého substrátu vždy 4 reprezentativní vzorky – a to po inkubaci s lidskými mikrosomy, potkaními mikrosomy, s lidským cytosolem a potkaním cytosolem. Při vyhodnocování jsme se zaměřili především na enantiomerní poměr redukováných nabumetonových metabolitů, který jsme počítali ze stanovených koncentrací.

5.5.1 Nabumeton

Cytosol

Ve vzorcích inkubovaných s cytosolem, ať už potkaního či lidského původu, byl nalezen pouze jediný metabolit, resp. jeho dva enantiomery, a to 6-MeO-nb-OH (viz. Obr. 23 a Obr. 24).

U potkana na něj bylo přeměněno celých 94 % aplikovaného nabumetonu. Výsledný enantiomerním excess činil 82 % s preferenční tvorbou (-)-enantiomeru. Enantiomerní poměr (+):(-) 6-MeO-nb-OH byl 9:91.

Při inkubaci s cytosolem lidského původu bylo spotřebováno substrátu o něco méně – cca 82 %. Rovněž enantiomerní excess byl ve srovnání s potkanem menší – 26%. Co je ale zajímavé, tentokrát s nadbytkem (+)-enantiomeru. Enantiomerní poměr (+):(-) redukováného nabumetonu u lidského cytosolu tedy byl 63:37.

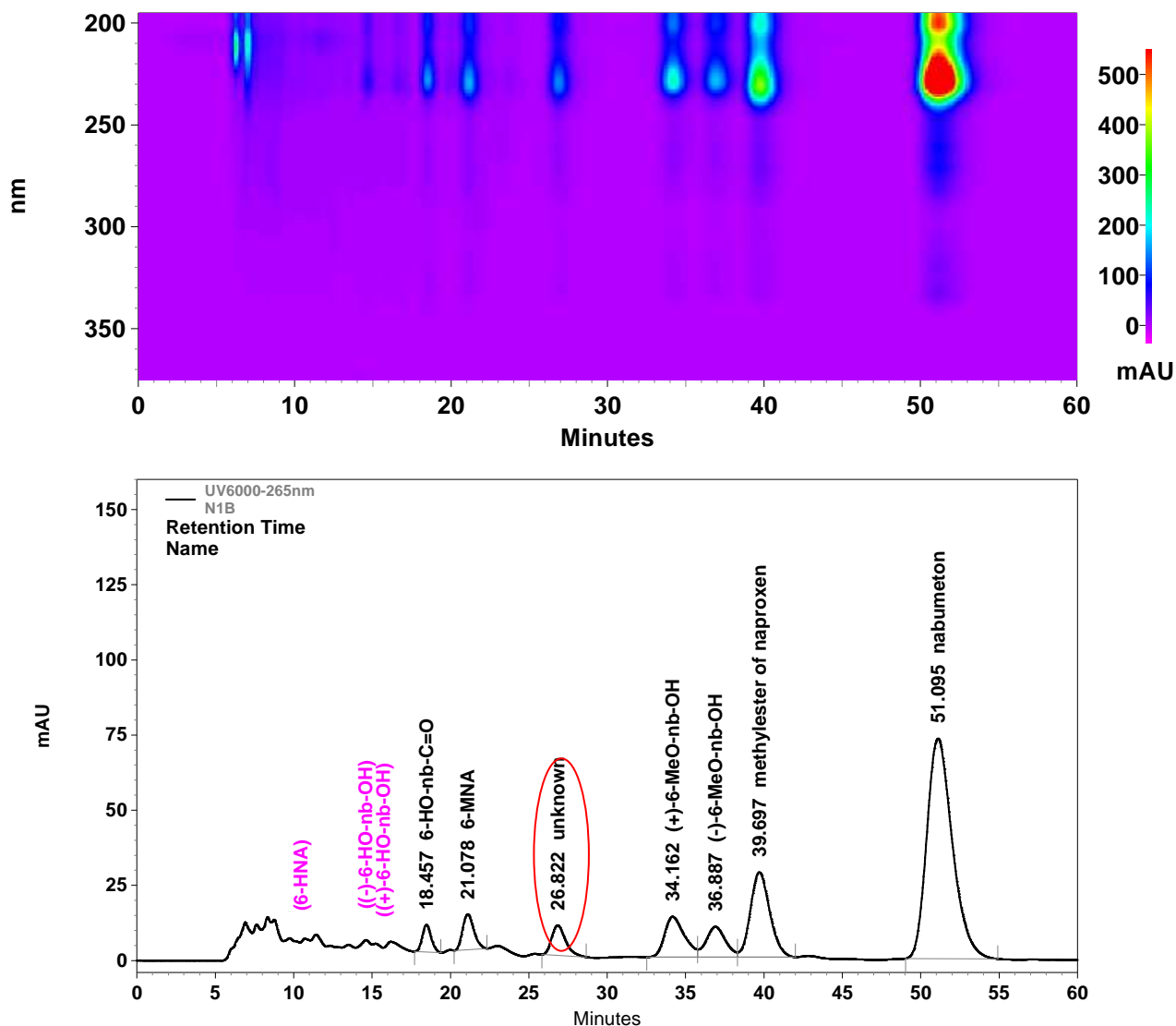
Mikrosomy

Spektrum metabolitů bylo u inkubací nabumetonu s mikrosomálními frakcemi bohatší než u cytosolu, jak lze vidět na Obr. 19 a Obr. 22. Na druhou stranu mikrosomální enzymy u obou druhů utilizovali přibližně pouze třetinu dodaného substrátu (oproti 80-90 % využitého u cytosolu).

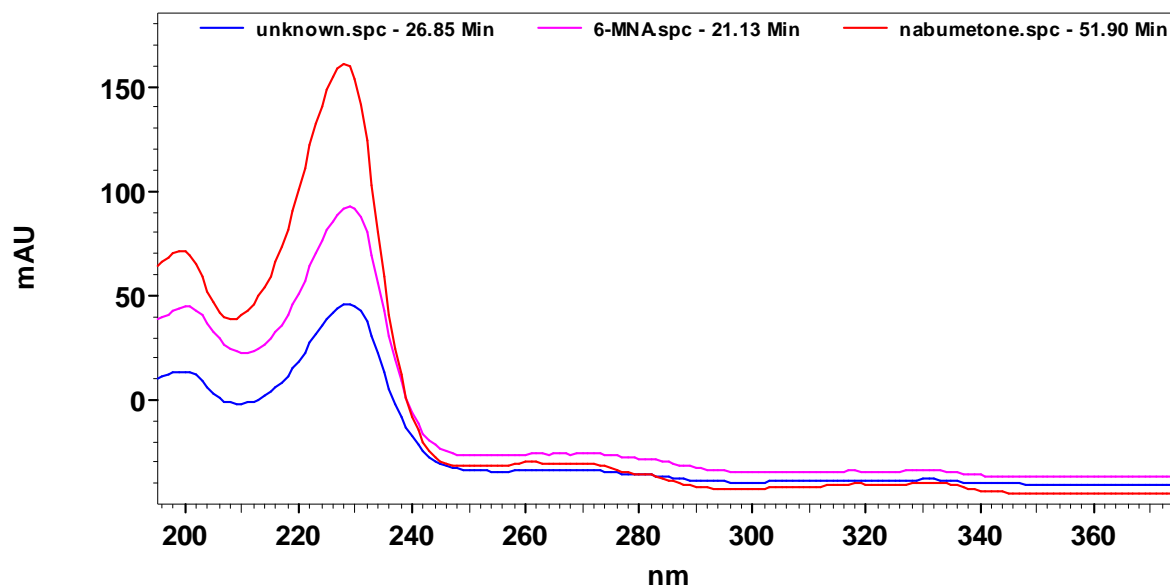
U lidských mikrosomů byl nabumeton z přibližně 6 % metabolizován na 6-MNA, z 10 % desmethylován na 6-HO-nb-CO a z 6 % redukován na (-)- a z 13 % na (+)-enantiomer 6-MeO-nb-OH. Nejvíce nás opět zajímal enantiomerní poměr (+):(-) 4-(6-methoxy-2-naftyl)-butan-2-olu, který činil 69:31.

U inkubací s potkaními mikrosomy bylo dodané množství substrátu z 5 % přeměněno na 6-MNA, ze 3 % na 6-HO-nb-CO, ze 7 % na (-)- a z 10 % na (+)-enantiomer 6-MeO-nb-OH. Poměr (+):(-) enantiomerů redukováného nabumetonu byl 59:41. Kromě toho se v 26.minutě (viz. Obr. 19) eluoval nový neznámý pík, odpovídající cca 5% původního substrátu, s UV spektrem korespondujícím s nabumetonovými metabolity (Obr. 20 a Obr. 21). Tento pík se nevyskytoval v žádném jiném vzorku inkubovaném s nabumetonem. Přistoupili jsme proto k drug-metabolism-tracingu a dále ověřili vhodnost jiné metody (Nobilis et al., 2003) pro jeho identifikaci hmotnostní spektrometrií. Při tom jsme zjistili, že neznámý metabolit má za daných podmínek stejný retenční čas s naproxenem, používaným v předchozích studiích jako I.S. [30],[31]. Na jednu stranu to mohl být důvod, proč v těchto

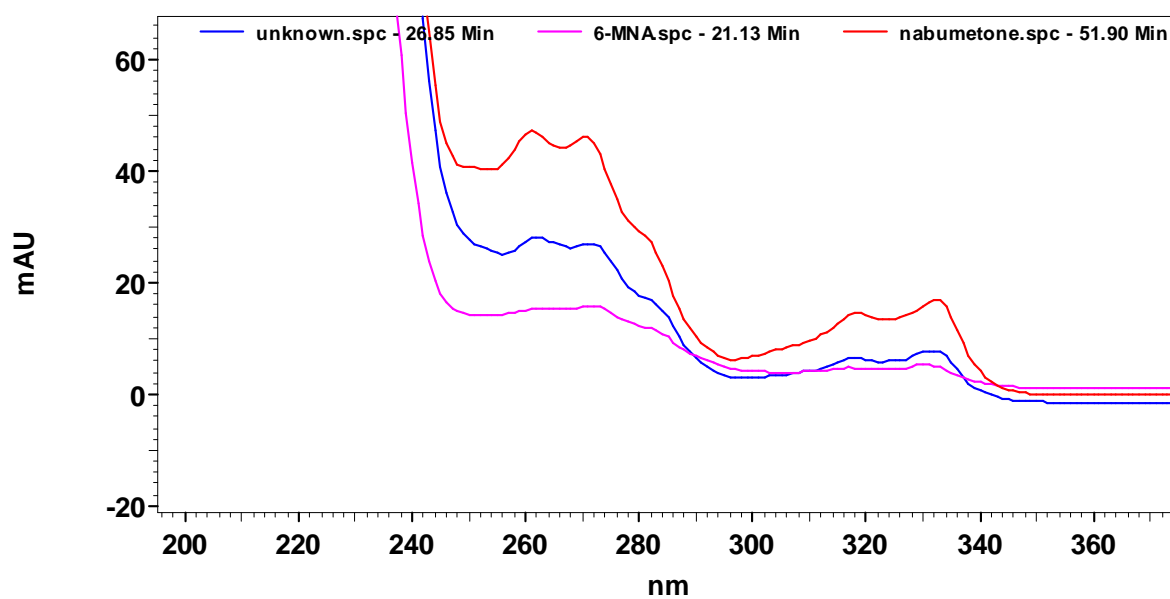
studíích nebyl nalezen, na druhou jako modelové organismy v těchto studíích figurovali prase a člověk, a my, jak víme, jsme ho také u lidských vzorků nenašli.



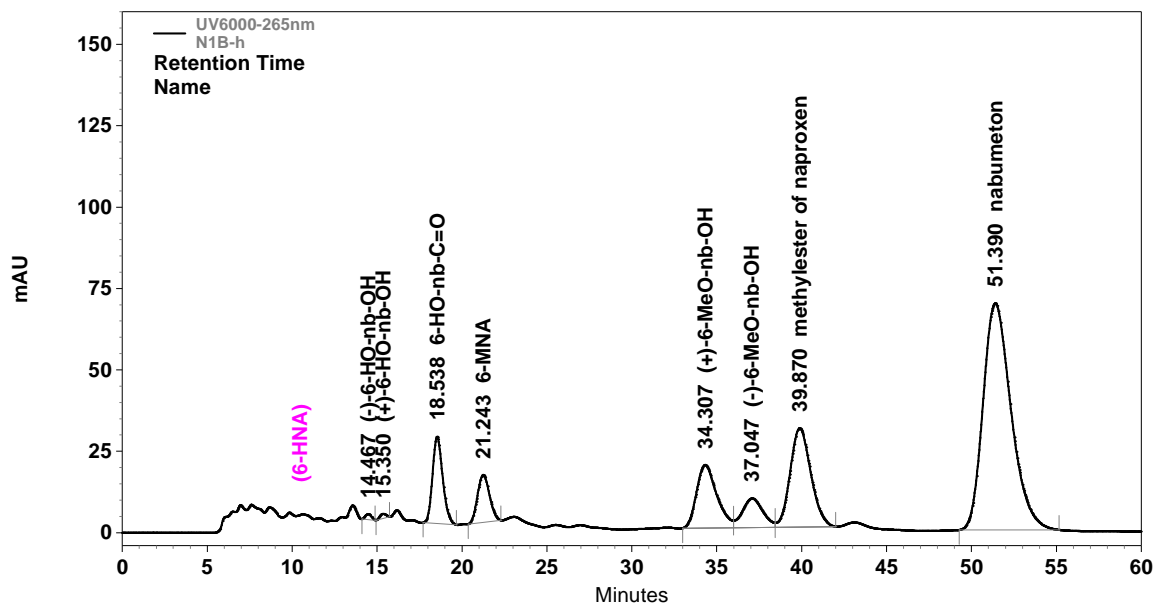
Obr. 19 Spektrochromatogram s chromatogramem vzorku nabumetonu inkubovaného s potkaní mikrosomální jaterní frakcí. Enantiomerní poměr (+):(-) 6-MeO-nb-OH je 59:41. V 26.min. objeven neznámý pík s UV spektrem odpovídajícím nabumetonovým metabolitům.



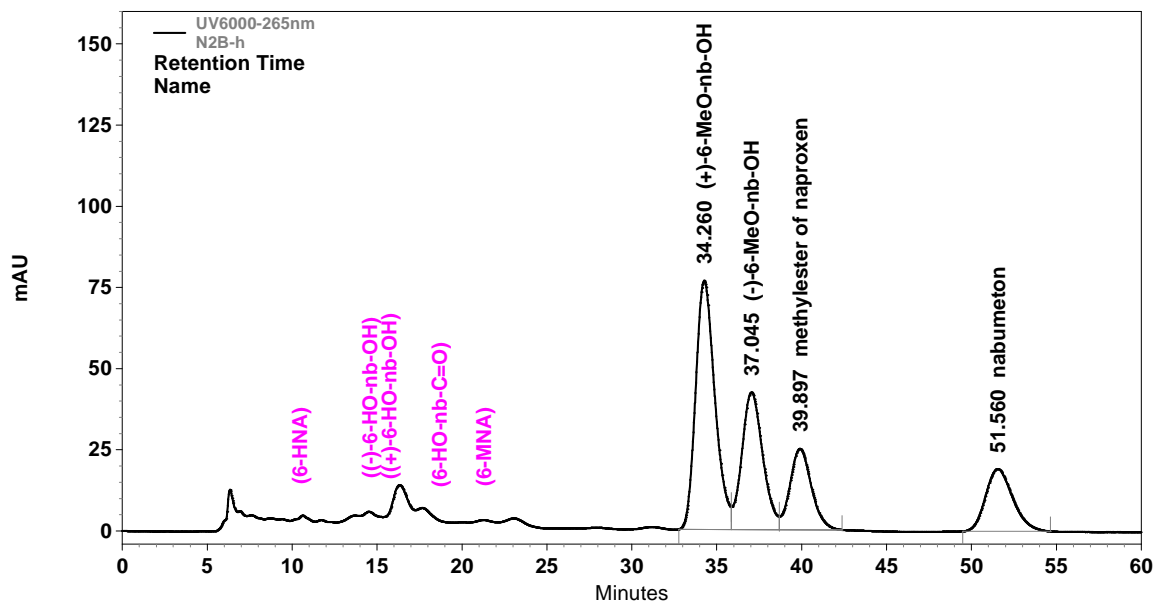
Obr. 20 UV-spektra nabumetonu, 6-MNA a neznámého píku z 26.min.



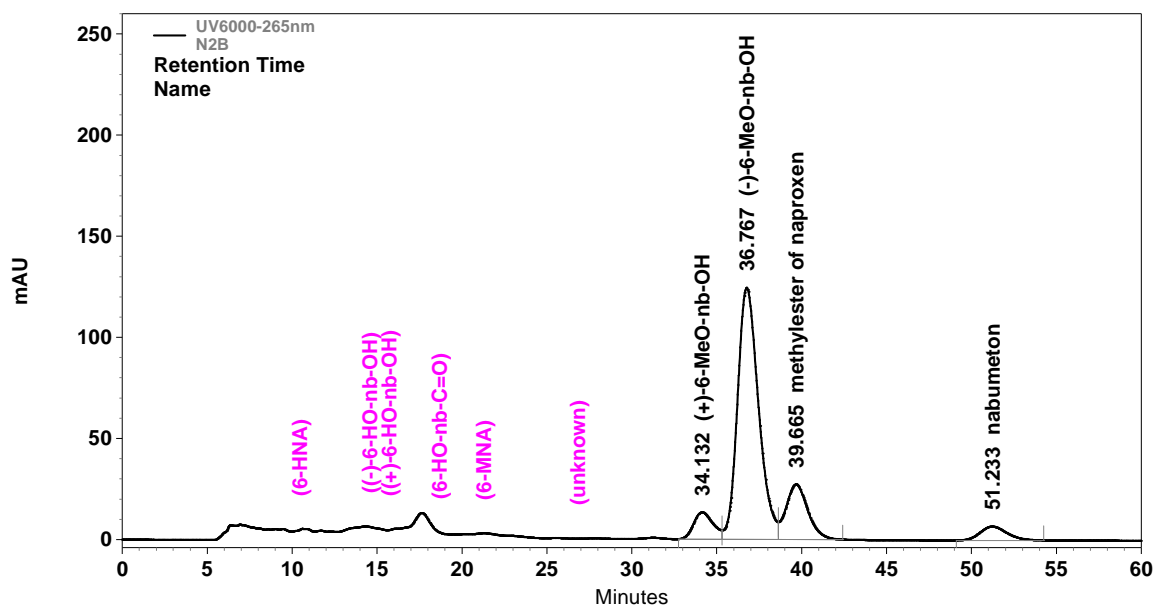
Obr. 21 Detail UV-spekter nabumetonu, 6-MNA a neznámého píku při 240-260 nm



Obr. 22 Chromatogram vzorku nabumetonu inkubovaného s lidskou mikrosomální jaterní frakcí. Enantiomerní poměr (+):(-) 6-MeO-nb-OH je 69:31.



Obr. 23 Chromatogram vzorku nabumetonu inkubovaného s lidským cytoelem. Enantiomerní poměr (+):(-) 6-MeO-nb-OH je 63:37.



Obr. 24 Chromatogram vzorku nabumetonu inkubovaného s potkaním cytoelem. Enantiomerní poměr (+):(-) 6-MeO-nb-OH je 9:91.

5.5.2 6-HO-nb-CO

Cytosol

Ve vzorcích O-desmetylovaného nabumetonu inkubovaných s lidským či potkaním cytoelem byly detekovány metabolity dva, a to karbonyl-redukovaný metabolit podaného substrátu a v menší míře 6-MNA.

Lidským cytoelem bylo zmetabolizováno přibližně 84 % substrátu, z 6 % vznikla 6-MNA, z 47 % (-)-a z 33 % (+)-enantiomer 6-HO-nb-OH. Enantiomerní poměr (+):(-) u tohoto analytu byl 41:59.

Potkaní cytosol zužitkoval 95 % dodaného substrátu, z toho 3 % na 6-MNA, 10 % na (-) a 82 % na (+)-enantiomer 6-HO-nb-OH. Jeho enantiomerní poměr (+):(-) činil 89:11.

Ze srovnání vyplývá, že je-li jako substrát nabídnuta cytosolickým lidským či potkaním karbonylreduktasám ketoskupina nabumetonu, vznikají (+) a (-) enantiomery s přesně opačným % zastoupením, než je-li jim jako substrát dána ketoskupina O-desmetylovaného nabumetonu. Srovnání enantiomerních efluxů u těchto dvou substrátů nabízí Tab. 3.

Mikrosomy

V těchto vzorcích byla přeměněna pouze malá část substrátu, celých 83 % u potkaních a 93 % u lidských zůstalo nevyužito.

U lidských mikrosomálních enzymů jsme zaznamenali pouze vznik 6-HO-nb-OH - s poměrem enantiomerů (+):(-) 60:40.

Potkaními mikrosomy byly 2 % podaného substrátu biotransformovány na 6-HNA, dalších 15 % tvořil jeho karbonyl-redukovaný metabolit, s poměrem enantiomerů (+):(-) 41:59.

Tab. 3 Enantiomerní poměry redukováných nabumetonových metabolitů

substrát	poměr (+) : (-) - 6-MeO-nb-OH				poměr (+) : (-) - 6-HO-nb-OH			
	mikrosomy		cytosol		mikrosomy		cytosol	
	lidské	potkaní	lidský	potkaní	lidské	potkaní	lidský	potkaní
nabumeton	69:31	59:41	63:37	9:91				
6-HO-nb-CO					60:40	41:59	41:59	89:11

5.5.3 6-MeO-nb-OH

U těchto pokusů byla pro inkubace použita syntetická racemická směs enantiomerů substrátu v poměru 1:1.

Cytosol

U cytosolických vzorků byla pozorována pouze zpětná oxidace substrátu na nabumeton.

Lidským cytosolem bylo zpětně na nabumeton transformováno 9 % substrátu. Preferenčně byl využit jeho (+)-enantiomeru, neboť v analyzovaných extraktech byl poměr 6-MeO-nb-OH (+):(-) 40:60.

U potkaního cytosolu, kde zpětně na nabumeton bylo oxidováno 6 % substrátu, byl tento poměr dokoce 28:72.

Pro srovnání v lidském cytosolu z nabumetonu preferenčně vznikal (+)-enantiomer 6-MeO-nb-OH. Byla-li jako substrát enzymům podána jeho chirální směs, zpětně na nabumeton byla preferenčně oxidována rovněž jeho (+)-forma. U potkaního cytosolu bylo

upřednostnění (+)-enantiomeru pro zpětnou oxidaci ještě výraznější. Z nabumetonu u něj přitom s 90% preferencí vznikál (-)-enantiomer 6-MeO-nb-OH.

Mikrosomy

Mikrosomy obou druhů výrazně neupřednostňovaly žádný z enantiomerů jako substrát, vždy bylo využito přibližně jejich ekvimolární množství.

U lidských mikrosomů byl převážná část 6-MeO-nb-OH (33 %) přeměněna zpět na nabumeton, 1 % na 6-HNA, 2 % na 6-MNA, 3 % na 6-HO-nb-CO a po 3 % desmethylována na enantiomery 6-HO-nb-OH.

Potkaní mikrosomy byly aktivní o něco méně než ty lidské, na nabumeton oxidovaly 29 % substrátu a přibližně po 1 %, až na 6-HNA, vznikaly ostatní metabolity.

5.5.4 6-HO-nb-OH

U těchto pokusů byla pro inkubace použita syntetická racemická směs enantiomerů substrátu v poměru 1:1. Vyhodnocení chromatogramů jsme provedli při 225 nm, protože při 265 nm v hojné míře interferovaly balasty s analyty. Pro 6-MNA a O-desmethylovaný nabumeton jsme k výpočtu koncentrace použili regresní rovnice z jejich sedmibodových kalibračních křivek (pro zvýšení přesnosti byla hladina $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l vynechána). Pro 6-MNA měla rovnice tvar $y=1,05018 \cdot x$ s koeficientem determinace 0,999726, pro 6-HO-nb-CO se $y=1,162189 \cdot x$, koeficient determinace byl 0,999581.

Cytosol

U obou živočišných druhů byl na 6-HO-nb-CO preferenčně oxidován (-)-enantiomer substrátu. Zrovna tak u obou zůstalo cca 80 % substrátu nevyužito.

Ve vzorcích inkubovaných s lidskou jaterní frakcí byl substrát z 14 % oxidován na keton a z 5 % vznikala 6-MNA. Enantiomerní poměr zbytkového substrátu (+):(-) byl 61:39.

U potkaní frakce byl substrát zpětně oxidován na keton z 11 % a z 7 % vznikala 6-MNA. Enantiomerní poměr zbytkového substrátu (+):(-) byl 66:44.

Mikrosomy

Mikrosomy obou druhů výrazně neupřednostňovaly žádný z enantiomerů jako substrát, vždy bylo využito přibližně jejich ekvimolární množství. Zároveň měly o trochu větší

enzymatickou aktivitu než cytosol, lidské nevyužily 62 % a potkaní 74 % podaného substrátu.

U lidských mikrosomů byl nalezen pouze jediný metabolit, a to 6-HO-nb-CO. Ten z 23 % vznikal i u potkaní frakce, kde navíc z 2 % byla zastoupena i 6-MNA.

Enantiomerní poměry ve zbytkovém substrátu rekapituluje Tab. 4.

Tab. 4 Enantiomerní poměr zbytkového substrátu po podání racemátu

zbytkový substrát	mikrosomy		cytosol	
	lidské	potkaní	lidský	potkaní
poměr (+):(-) - 6-MeO-nb-OH	50:50	52:48	39:61	28:72
poměr (+):(-) - 6-HO-nb-OH	50:50	46:54	61:39	66:34

5.5.5 6-MNA

Ve vzorcích inkubovaných s touto kyselinou nebyl kromě očekávané, O-desmethylací vzniklé, 6-HNA nalezen jiný metabolit. Ta byla navíc detekována pouze v mikrosomálních vzorcích a tvořila jen 3-5 % původního množství substrátu.

Výsledky analýz těchto vzorků jsme využili i k posouzení post-preparative stability, neboť u nich šlo pozorovat nárůst neznámého píku eluovaného v 43.min. s délkou doby umístění vialky v autosampleru.

Tab. 5 Množství přeměněného substrátu v jednotlivých jaterních frakcích

	množství utilizovaného substrátu v %			
	nabumeton	6-HO-nb-CO	6-MeO-nb-OH	6-HO-nb-OH
lidský cytosol	82	74	9	12
potkaní cytosol	94	95	6	11
lidské mikrosomy	36	6	46	25
potkaní mikrosomy	30	17	33	16

6. ZÁVĚR

Vyvinuli jsme novou chirální HPLC metodu pro separaci a stanovení nabumetonu a jeho 5 metabolitů, včetně dvou enantiomerů redukovaného nabumetonu a dvou enantiomerů O-desmethyl-redukovaného nabumetonu.

Měření jsme prováděli na chirální chromatografické koloně od firmy Daicel o rozměrech 250 mm × 4,6 mm plněné 10 μm silikagelovými částicemi na povrchu potaženými celulóza tris-3,5-dimethylfenylkarbamátem. Dostatečnou separaci 9 analytů zajišťovala při isokratických podmínkách mobilní fáze o složení MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (75:25, v/v) s methylesterem naproxenu jako vnitřním standardem. Při použitím průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min. trvala jedna analýza 60 min. Efluent z kolony byl monitorován PDA detektorem zaznamenávajícím UV spektrum, přičemž vyhodnocení jsme prováděli při vlnové délce 265 nm nebo 225 nm.

Tuto metodu jsme využili ke studiu aktivity a stereospecifity enzymů účastnících se biotransformace nabumetonu, během kterého jsme se snažili sledovat i rozdíly jeho metabolismu u dvou modelových organismů (potkan, člověk). K tomu nám sloužily jejich subcelulární jaterní frakce. Zaměřili jsme hlavně na zhodnocení enantiomerního poměru chirálních nabumetonových metabolitů.

Naměřené výsledky lze shrnout následovně:

V cytosolu byla daleko větší aktivita karbonylreduktas než u mikrosomů. K redukci karbonylu významněji docházelo v cytosolických vzorcích, kdežto zpětná oxidace již karbonyl-redukovaných metabolitů byla dominantou mikrosomů. Ty navíc poskytovaly i O-desmethylované metabolity, které v cytosolu nevznikaly.

Potkaní cytosolické karbonylreduktasy byly o poznání více stereospecifické než ty mikrosomální. Navíc ve srovnání s lidskými byly nejenže stereospecifičtější, ale i aktivnější. Příkladem lze uvést inkubaci nabumetonu s cytosolární frakcí potkanů vedoucí k vysoce stereospecifické redukci karbonylu za preferenční tvorby (-)-enantiomeru 6-MeO-nb-OH (90 %), kdežto u jaterní frakce člověka preferenčně vznikal (+)-enantiomer (63 %). Potkaní cytosol zmetabolizoval 94 % podaného nabumetonu, lidský pouze 82 %.

Inkubace nabumetonu s mikrosomální frakcí potkanů a koenzymem NADPH poskytla nový dosud nepopsaný intermediát mezi nabumetonem a 6-MNA.

S využitím drug-metabolism tracingu byla sledována posloupnost biotransformačních cest nabumetonu.

SEZNAM ZKRATEK

MeOH	methanol
ACN	acetonitril
6-MNA	6-methoxy-2-naftyloctová kyselina
6-HNA	6-hydroxy-2-naftyloctová kyselina
6-MeO-nb-OH	4-(6-methoxy-2-naftyl)-butan-2-ol
6-HO-nb-CO	4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2-on
6-HO-nb-OH	4-(6-hydroxy-2-naftyl)-butan-2-ol
DMSO	dimethylsulfoxid
I.S.	vnitřní standard (internal standard)
MF	mobilní fáze
NMR	nukleární magnetická rezonance
UHQ	ultra high quality

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MC MURRY J. *Organická chemie*. Překlad z originálu 6. vydání, 2004, vydáno VUT Brno-nakladatelství VUTIUM a VŠCHT Praha, 2007. Stereochemie, s. 275-306. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [2] ČERVINKA O. Chiralita a pojmy s ní související. *Chemické listy*. 1999; 93:294-305.
- [3] CINTAS P. Tracing the Origins and Evolution of Chirality and Handedness in Chemical Language. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007; 46: 4016–4024. [cit. 2011 05-05]. Převzato z <[http://en.wikipedia.org/wiki/Chirality_\(chemistry\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Chirality_(chemistry))>.
- [4] KLÁSEK A. *Organická chemie*. Zlín, 2006. ISBN 80-7318-483-4.
- [5] Jacobus Henricus van 't Hoff. *Wikipedia the free encyclopedia* [online]. [cit. 2011 05-05]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Jacobus_Henricus_van_%27t_Hoff>.
- [6] KROUTIL J. *Problémy ve stereochemii uhlíkatých sloučenin*. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze.]. [cit. 2011 05-05] Dostupné z: <<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/27kroutil.pdf>>.
- [7] HODAČOVÁ J. *Supramolekulární stereochemie*. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR.]. [cit. 2011 05-05] Dostupné z: <http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/9_Hodacova.pdf>.
- [8] CAHN RS, INGOLD CK, PRELOG V. Specification of Molecular Chirality. *Angewandte Chemie International Edition*. 1966; 5 : 385-415.
- [9] PRELOG V; GÜNTHER HELMCHEN G. Basic Principles of the CIP-System and Proposals for a Revision. *Angewandte Chemie International Edition*. 1982; 21: 567-583.
- [10] IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology, (the "Gold Book")*. 2nd ed. Compiled by A. D. McNaught a A. Wilkinson. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. ISBN 0-9678550-9-8.]. [cit. 2011-12-05] Dostupné z: <<http://goldbook.iupac.org>>. Verze 2.2., Poslední revize 22.12.2010.
- [11] SKLENÁK L. *Preparativní a separační metody*. Ostrava. 2005.
- [12] KLOUDA P. *Fyzikální chemie*. 2.vyd.Ostrava: nakl. Klouda, 2002. s. 125-126. ISBN 80-86369-06-4.

- [13] KOPECKÝ V, BAUMRUK V. Kam kráčí Ramanova optická aktivita aneb ohlédnutí za uplynulými 40 lety. *Chemické listy*. 2011; 105, 162-169.
- [14] Strukturní analýza přírodních látek. Ústav chemických technologií. Praha, 2009.
- [15] BAUMRUK V. Ramanova optická aktivita – proč a nač, MFF UK, Praha. [cit. 2011 03-05] Dostupné z: <<http://biomolecules.mff.cuni.cz/media/img/problems/roa.pdf>>.
- [16] Ministerstvo zdravotnictví ČR. *Český lékopis 2009*. Praha: Grada, 2009. 1.díl s.126-7, 3.díl s.2673-2674. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [17] DAHL SL. Nabumetone: a “nonacidic” nonsteroidal antiinflammatory drug. *The Annals of pharmacotherapy*. 1993; 27: 456–463.
- [18] HEDNER T, SAMULESSON O, WÄHRBORG P et al. Nabumetone: therapeutic use and safety profile in the management of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Drugs*. 2004, s. 2315–2343.
- [19] FRIEDEL HA, LANGTRY HD, BUCKLEY MM. Nabumetone. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic use in rheumatic diseases. *Drugs*. 1993; 45: 131–136.
- [20] DAVIES NM. Clinical pharmacokinetics of nabumetone. The dawn of selective cyclooxygenase-2 inhibition? *Clinical pharmacokinetics*. 1997; 33:404-16.
- [21] CIPPOLONE F, GANCI A, PANARA MR, et al. Effects of nabumetone on prostanoid biosynthesis in humans. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1995; 58: 335-41.
- [22] HALLYAR J, BJARNASON I. NSAIDs, COX-2 inhibitors, and the gut. *Lancet*. 1995; 346:521-22.
- [23] GOUDIE AC, GASTER LM, LAKE AW et al. 4-(6-Methoxy-2-naphthyl)butan-2-one and related analogues, a novel structural class of antiinflammatory compounds. *Journal of medicinal chemistry*. 1978; 21:1260-4.
- [24] ROTHSTEIN R. Safety profiles of leading nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American journal of medicine*. 1998; 105: 39S–43S.
- [25] TURPEINEN M., HOFMANN U., KLEIN K. et al. A predominate role of CYP1A2 for the metabolism of nabumetone to the active metabolite, 6-methoxy-2-naphthylacetic acid, in human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2009; 37: 1017-24.

- [26] SWEETMAN S. C. *Martindale: The Complete Drug Reference*. 36th ed., London: Pharmaceutical Press, 2009, p.91. ISBN 978-0-85369-840-1.
- [27] NEGWER M. *Organic-chemical drugs and their synonyms*. 6th ed. Berlin: Akademie-Verlag, 1987, p.613.
- [28] HAMPL F., RÁDL S., PALEČEK J. *Farmakochemie*. 2.vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. 450s. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [29] Chapter 7 Nabumetone - CHEM345: *Applied Organic Chemistry II*. Department of Chemistry, Queen's University, Canada.]. [cit. 2011 05-05] Dostupné z: <<http://www.chem.queensu.ca/courses/10/CHEM345/nabumetone.pdf>>.
- [30] NOBILIS M., KOPECKÝ J., KVĚTINA J. et al. Comparative biotransformation and disposition studies of nabumetone in humans and minipigs using high-performance liquid chromatography with ultraviolet, fluorescence and mass spectrometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, roč. 32, s. 641–656.
- [31] NOBILIS M., HOLČAPEK M., KOLÁŘOVÁ L. et al.. Identification and determination of phase II nabumetone metabolites by high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2004, sv. 1031, s. 229–236.
- [32] NOBILIS M., JIRA T., LÍSA M. et al. Achiral and chiral high-performance liquid chromatographic determination of flubendazole and its metabolites in biomatrices using UV photodiode-array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2007, sv. 1149, s. 112–120.
- [33] NOBILIS M., VYBÍRALOVÁ Z., KŘÍŽOVÁ M. et al. Sensitive chiral high-performance liquid chromatographic determination of anthelmintic flubendazole and its phase I metabolites in blood plasma using UV photodiode-array and fluorescence detection. Application to pharmacokinetic studies in sheep. *Journal of Chromatography B*. 2008, sv. 876, s. 89–96.
- [34] KUČERA R., NOBILIS M., SKÁLOVÁ L. et al. Use of chiral liquid chromatography for the evaluation of stereospecificity in the carbonyl reduction of potential benzo[c]fluorene antineoplastics benfluron and dimefluron in various species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, sv. 37, s. 1049–1057.

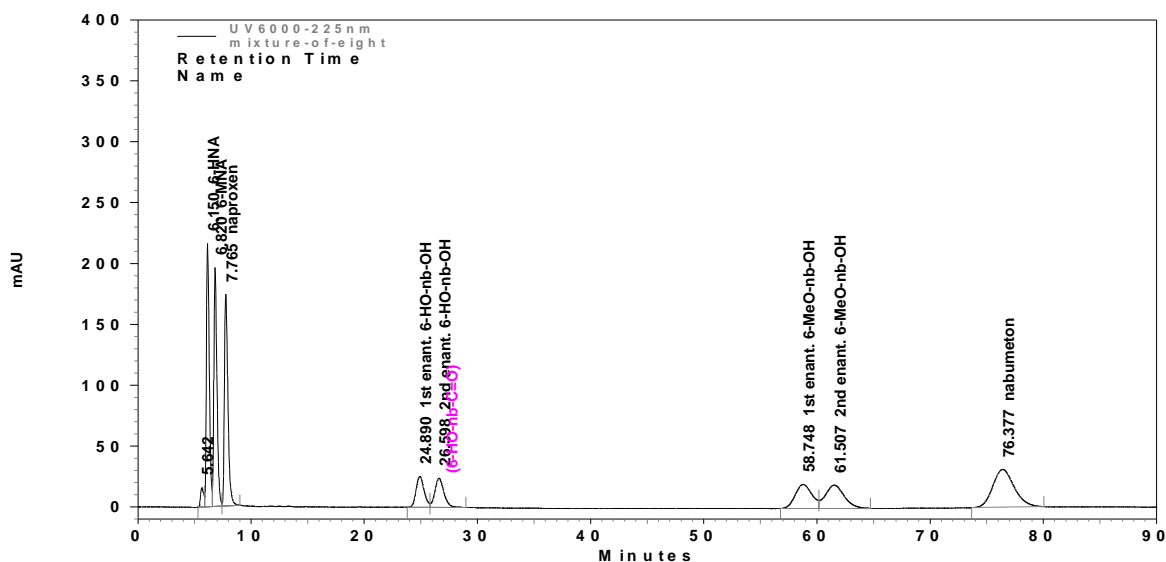
SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1	VOLBA MOBILNÍ FÁZE.....	I
PŘÍLOHA 2	KALIBRACE.....	IV
PŘÍLOHA 3	STABILITA	V
PŘÍLOHA 4	CHROMATOGRAMY INKUBOVANÝCH SUBSTRÁTŮ	VI

Příloha 1 Volba mobilní fáze

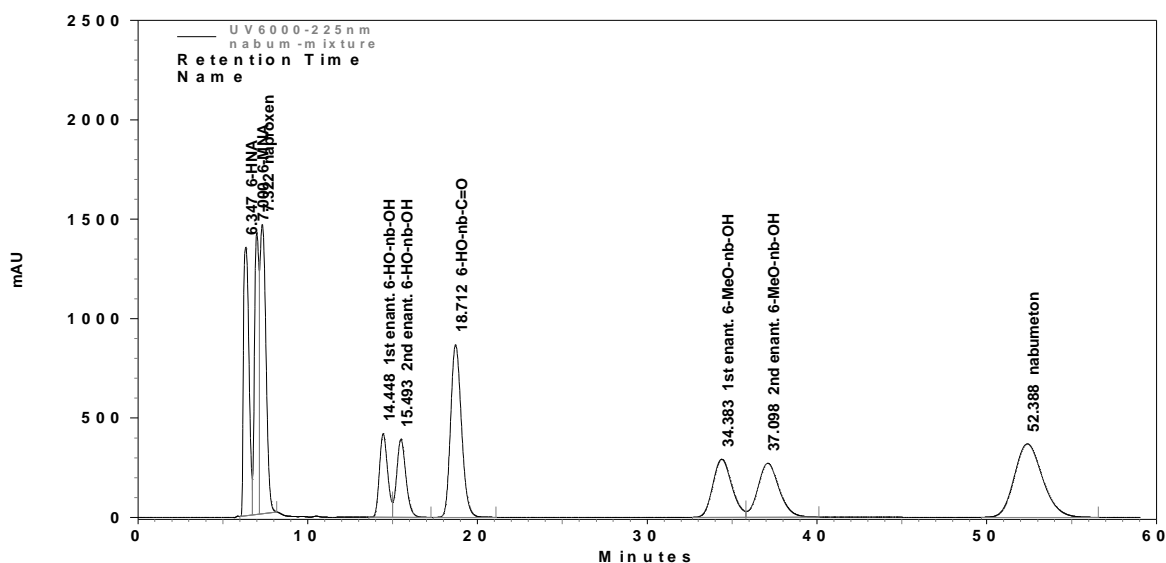
Následující chromatogramy znázorňují míru seprace analytů při použití mobilních fází o různých hodnotách pH a poměrech rozpouštědel.

Obr. 25 Mobilní fáze ACN-1M NaClO₄ pH 6,74 (4:6, v/v)



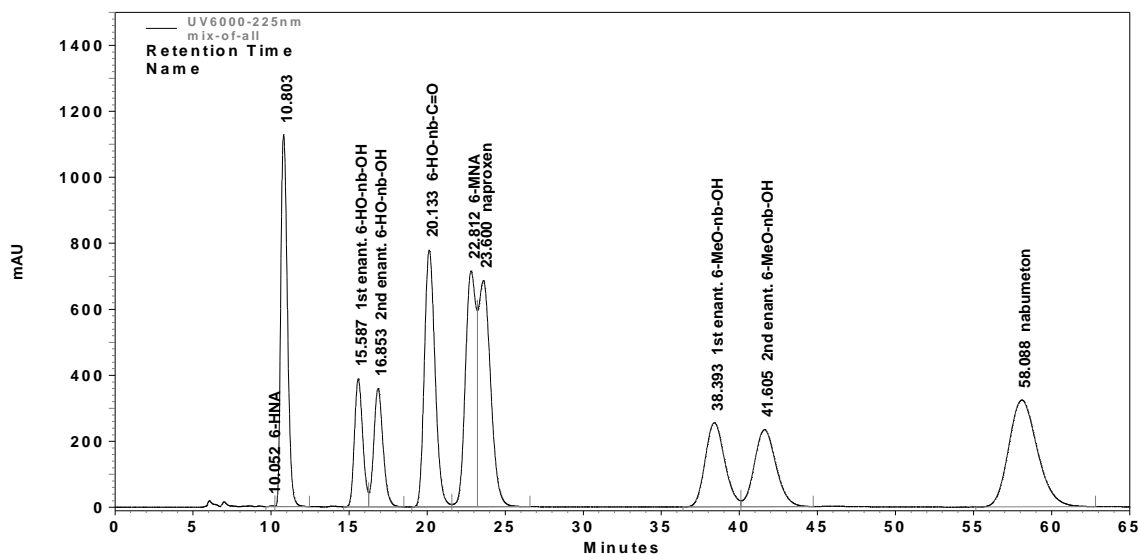
Pík O-desmetylovaného nabumetonu ($t_R=27-28$ min) kolidoval s (v pořadí druhým eluovaným) enantiomerem 6-HO-nb-OH.

Obr. 26 Mobilní fáze MeOH-1M NaClO₄ pH 6,74 (75:25, v/v)



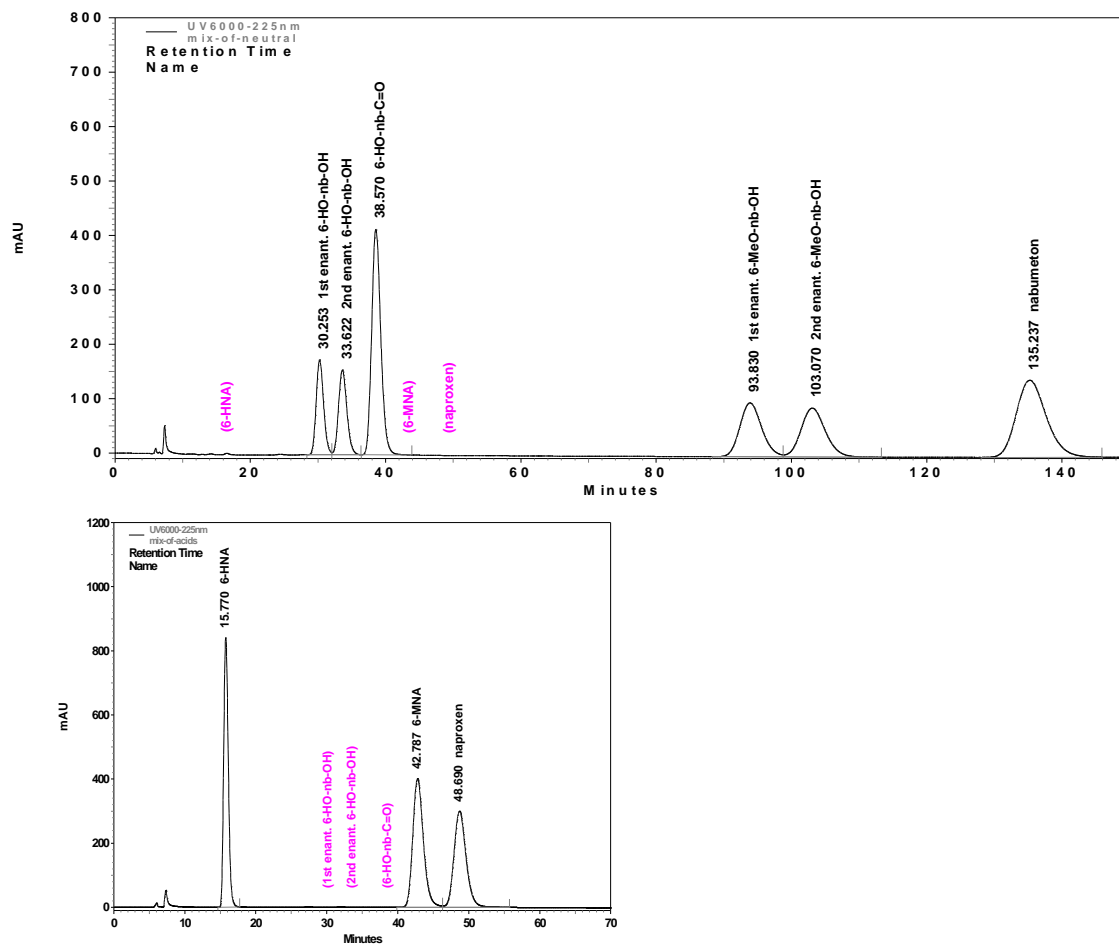
Kyseliny se hromadně eluovaly kolem 7.minuty, 6-MNA s naproxenem tvořila téměř jediný pík.

Obr. 27 Mobilní fáze MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (75:25, v/v)



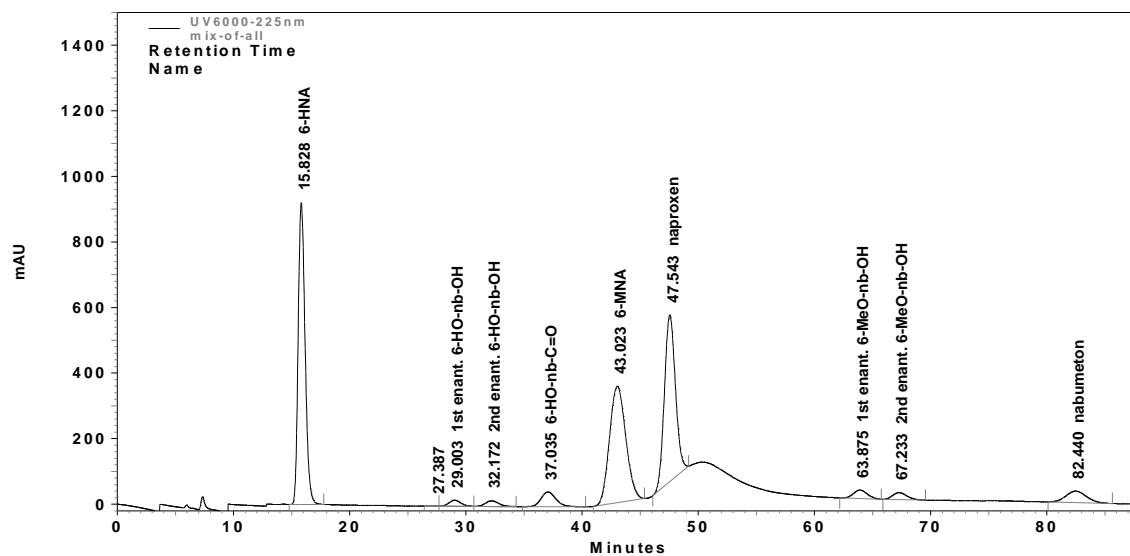
Nepodařilo se separovat 6-MNA od naproxenu.

Obr. 28 Mobilní fáze MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (65:35, v/v)



Tato fáze by požadovanou míru separace (až na baselinu) poskytla, avšak doba analýzy 140 min nebyla přijatelná.

Obr. 29 Gradient mobilní fáze: 0-35.min. MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (65:35, v/v), do 40.min. přechod na MeOH-1M NaClO₄ pH 3 (75:25, v/v)



Použití gradientu jsme vzhledem k vzniklé vlně (driftu) na baselině vyhodnotili jako nevhodné.

Příloha 2 Kalibrace

Následujících tabulky uvádějí poměry ploch píků analytu/I.S. naměřených na jednotlivých koncentračních hladinách při 225 a 265 nm, a z nich vypočtené parametry lineární regresní rovnice. Nabízejí tak možnost jejich porovnání.

Tab. 6 Kalibrace standardních roztoků redukováných nabumetonových metabolitů

	kalibr. úroveň	konc. ($10^{-5}M$)	(-)-6-HO-nb-OH		(+) -6-HO-nb-OH		(+) -6-MeO-nb-OH		(-)-6-MeO-nb-OH	
			265 nm	225 nm	265 nm	225 nm	265 nm	225 nm	265 nm	225 nm
poměr A(an.)/A(I.S.)	I	0,005	0,011920	0,004075	0,003023	0,003569	0,004413	0,005300	0,012548	0,014396
	II	0,01	0,045718	0,010436	0,008447	0,009573	0,011280	0,013193	0,021390	0,024600
	III	0,025	0,015473	0,021936	0,017971	0,023551	0,026503	0,033261	0,038224	0,044574
	IV	0,05	0,030017	0,043870	0,032061	0,047017	0,051206	0,066283	0,058828	0,078468
	V	0,1	0,086496	0,089456	0,067815	0,095259	0,097343	0,129574	0,111535	0,143880
	VI	0,25	0,153223	0,222279	0,164684	0,239659	0,242353	0,329535	0,260166	0,350252
	VII	0,5	0,304546	0,435952	0,327554	0,471417	0,474611	0,646386	0,501216	0,678005
	VIII	2,5	1,399580	1,590700	1,590990	1,890910	2,224070	2,689540	2,315140	2,855620
parametry regresní rovnice $y = k \cdot x$	k		0,563669	0,652333	0,637426	0,767978	0,893080	1,088969	0,931021	1,155725
	R ²		0,997924	0,991733	0,999933	0,996275	0,999666	0,997459	0,999298	0,997555

Tab. 7 Kalibrace standardních roztoků 6-HNA, 6-HO-nb-CO, 6-MNA a nabumetonu

	kalibr. úroveň	konc. ($10^{-5}M$)	6-HNA		6-HO-nb-CO		6-MNA		nabumeton	
			265 nm	225 nm	265 nm	225 nm	265 nm	225 nm	265 nm	225 nm
poměr A(an.)/A(I.S.)	I	0,01	0,009553	0,010848	0,009019	0,011977	0,010553	0,011183	0,011540	0,011631
	II	0,02	0,018256	0,022226	0,018735	0,024891	0,020170	0,022273	0,023608	0,024025
	III	0,05	0,044618	0,054669	0,047660	0,062186	0,049304	0,055110	0,052154	0,062461
	IV	0,1	0,091192	0,109740	0,089473	0,118903	0,098453	0,110239	0,102899	0,127130
	V	0,2	0,178989	0,217477	0,182152	0,243181	0,194340	0,221185	0,199255	0,248810
	VI	0,5	0,438942	0,520837	0,451801	0,595426	0,454135	0,516184	0,489653	0,618246
	VII	1	0,842781	0,939982	0,910339	1,151980	0,946677	1,051490	1,019860	1,278840
	VIII	5	4,031530	2,450080	4,112360	2,992350	4,477400	3,238040	4,607430	4,857940
parametry regresní rovnice $y = k \cdot x$	k		0,808695	0,534525	0,827185	0,650271	0,897827	0,678980	0,926381	0,990609
	R ²		0,999780	0,949429	0,999333	0,952600	0,999825	0,978271	0,999396	0,994458

Příloha 3 Stabilita

Tab. 8 Stock-solution stabilita analytů

	1. den		30. den		rozdíl konc. (%)
	A(an.)/A(I.S.)	konc (10^{-5} M)	A(an.)/A(I.S.)	konc (10^{-5} M)	
6-HNA	0,894142	1,105661	0,853682	1,055629	-4,5
(-)-6-HO-nb-OH	0,300894	0,533813	0,304546	0,540292	1,2
(+)-6-HO-nb-OH	0,318492	0,499654	0,327554	0,513870	2,8
6-HO-nb-CO	0,927676	1,121486	0,910339	1,100527	-1,9
6-MNA	0,957348	1,066295	0,946677	1,054409	-1,1
(+)-6-MeO-nb-OH	0,484478	0,542480	0,474611	0,531431	-2,0
(-)-6-MeO-nb-OH	0,497548	0,534411	0,501216	0,538351	0,7
nabumeton	1,054988	1,138828	1,019860	1,100908	-3,3

Tato tabulka dokumentuje naměřené hodnoty koncentrací u 10^{-5} M vzorků připravených z buď čerstvých zásobních roztoků analytů nebo z těchto roztoků po 30 denním skladování v lednici (při teplotě 4-6°C). U vypočítaného koncentračního rozdílu znaménko mínus před číslovkou značí úbytek daného analytu s časem.

Tab. 9 Post-preparative stabilita analytů

	A(an.)/A(I.S.)			rozdíl po 17hod. (%)	rozdíl po 34hod. (%)
	0.hod	17.hod	34.hod		
6-HNA	0,894142	0,843125	0,736764	-5,1	-15,7 (-17,6)
(-)-6-HO-nb-OH	0,300894	0,309100	0,293977	0,8	-0,7 (-2,3)
(+)-6-HO-nb-OH	0,318492	0,315903	0,291254	-0,3	-2,7 (-8,6)
6-HO-nb-CO	0,927676	0,936058	0,886045	0,8	-4,2 (-4,5)
6-MNA	0,957348	0,926596	0,826762	-3,1	-13,1 (-13,6)
(+)-6-MeO-nb-OH	0,484478	0,493532	0,485859	0,9	0,1 (0,3)
(-)-6-MeO-nb-OH	0,497548	0,502243	0,510402	0,5	1,3 (2,6)
nabumeton	1,054988	1,081617	1,034616	2,7	-2,0 (-1,9)
16.min.	0,000000	0,071440	0,139053	7,1	13,9
42.min.	0,000000	0,053255	0,147452	5,3	14,7

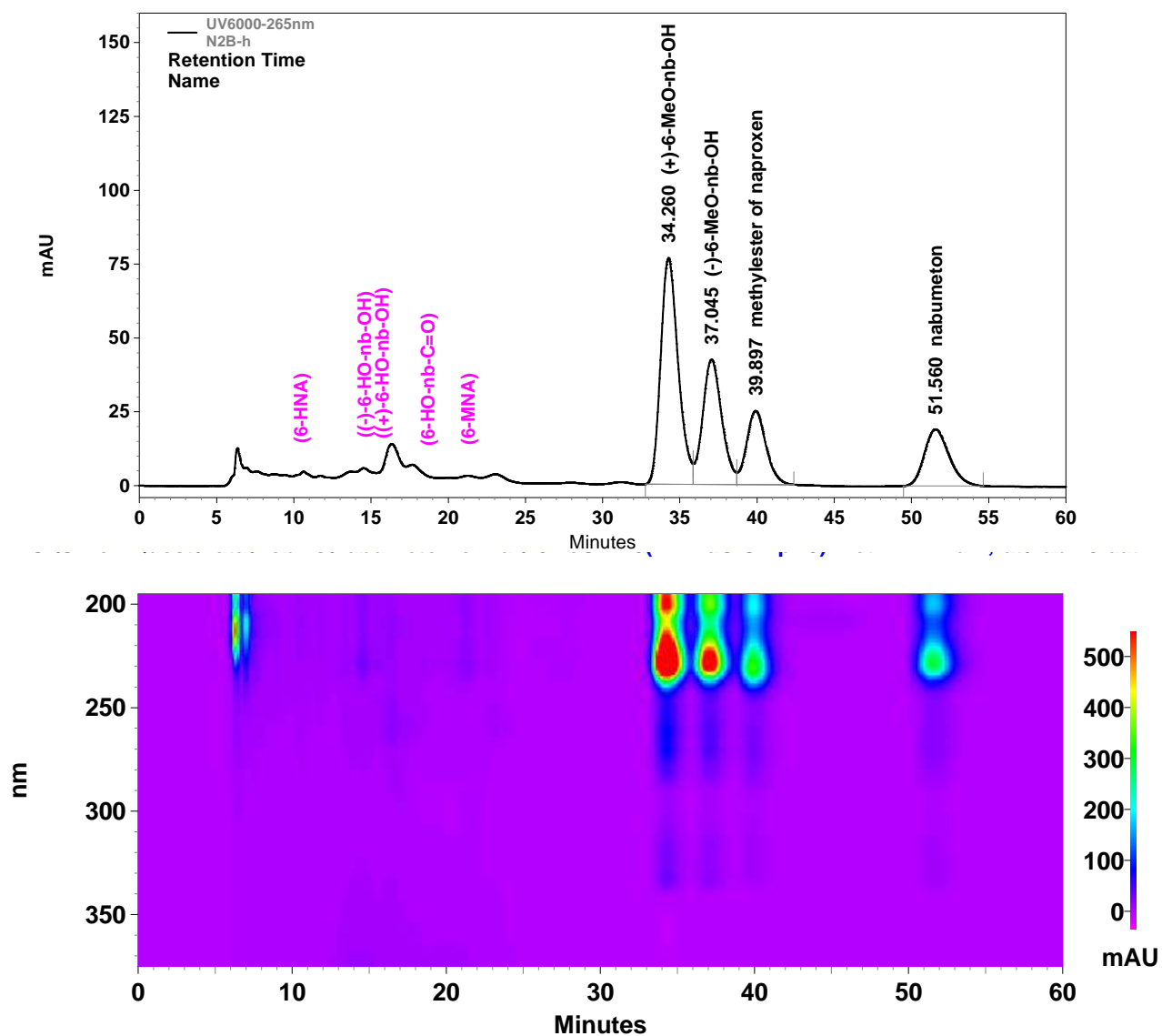
Rozdíly udávají, o kolik % se po daném čase změnila plocha píku analytu oproti ploše píku I.S. Čísla uvedená v závorce u rozdílu po 34 hod. vyjadřují již přímo procentuální rozdíly v koncentracích, kterou ale nelze u neznámých píků vypočítat, a proto výsledky vztahujeme k ploše I.S. Znaménko mínus značí úbytek daného analytu s časem.

Příloha 4 Chromatogramy inkubovaných substrátů

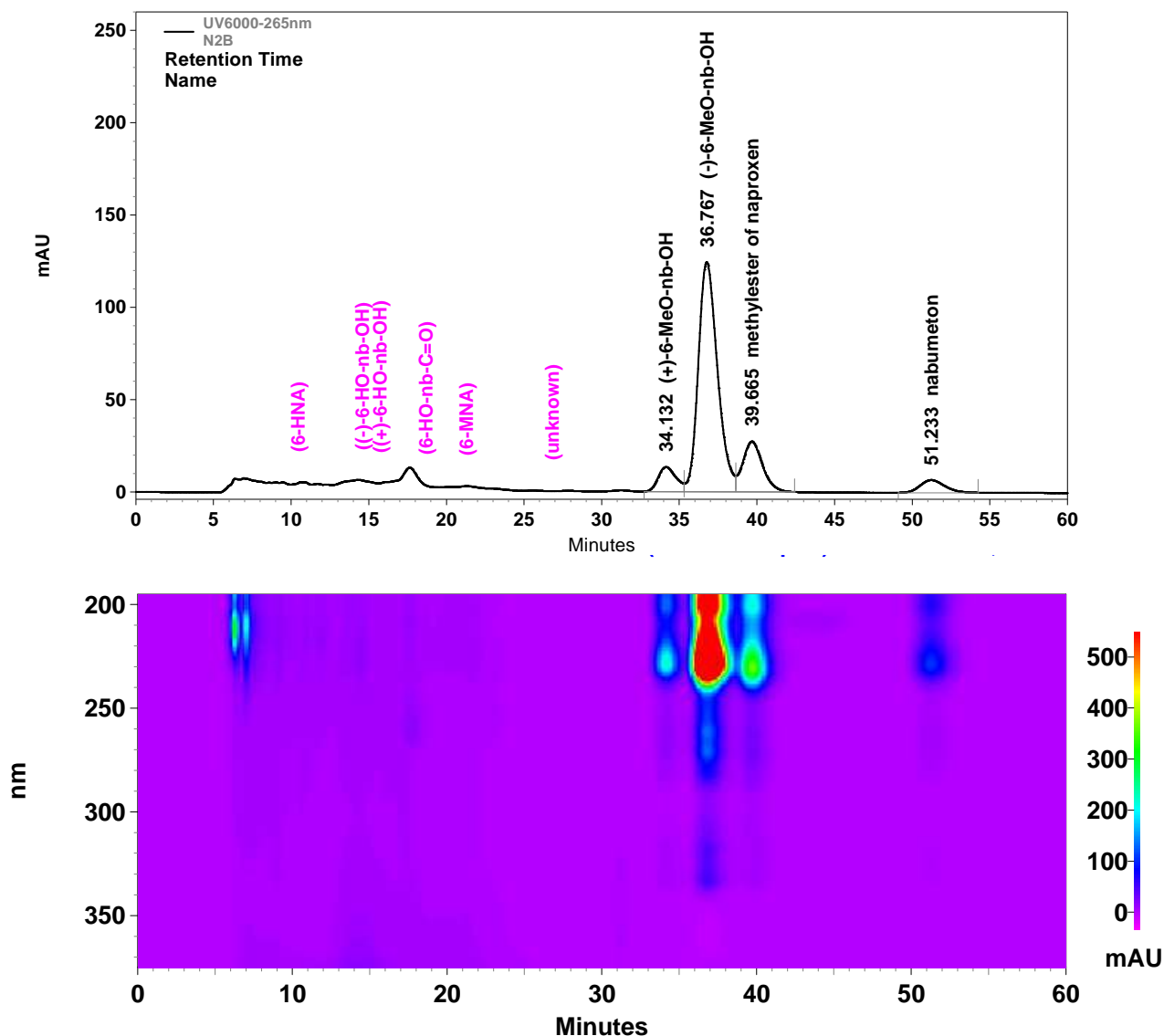
U vzorků s nabumetonem, 6-HO-nb-CO a 6-MeO-nb-CO byla použita detekce a vyhodnocení při 265 nm, pro 6-HO-nb-OH při 225 nm.

Nabumeton s cytosolem

Obr. 30 Nabumeton s lidským cytosolem



Obr. 31 Nabumeton s potkaním cytosolem

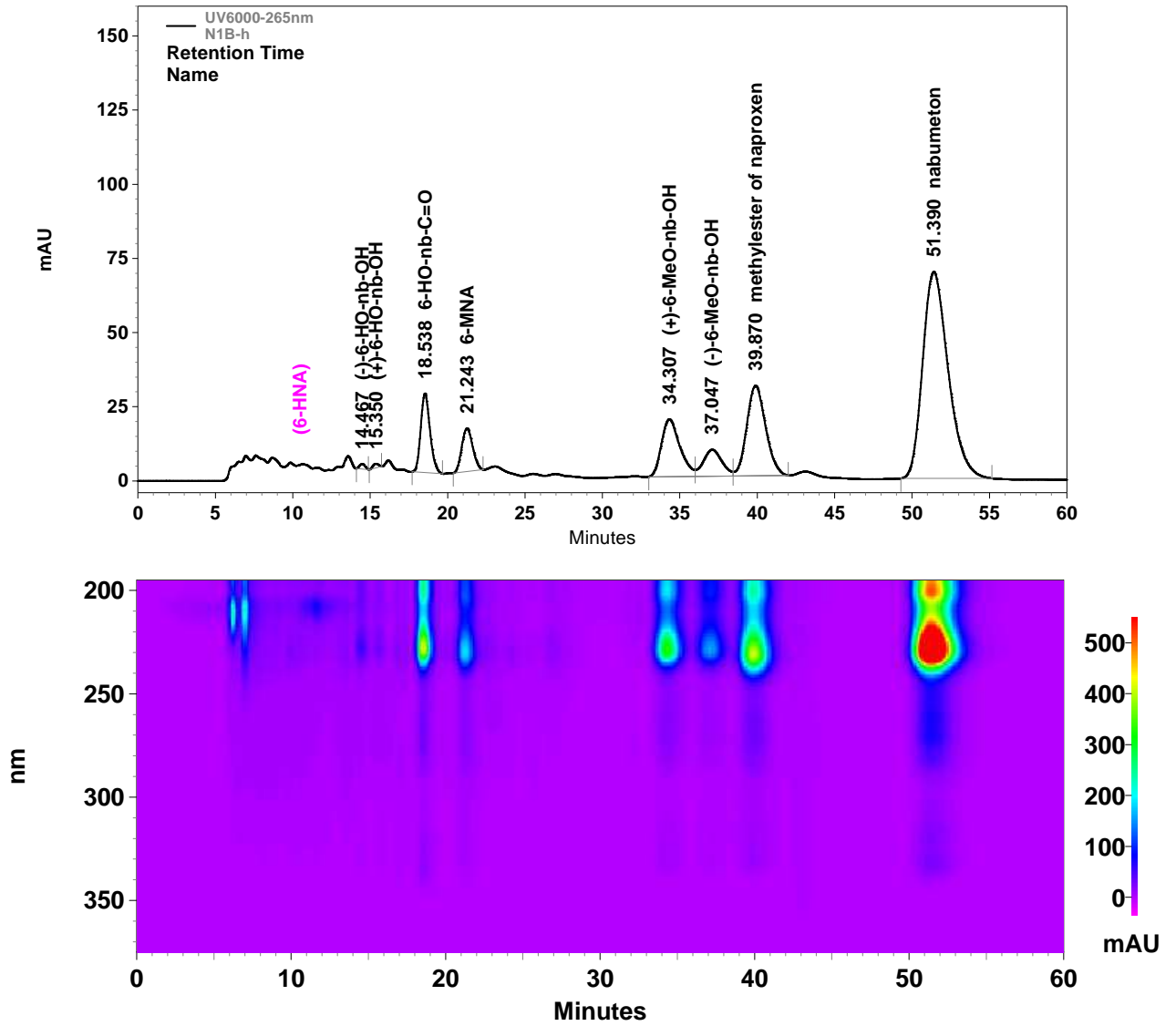


Tab. 10 Nabumeton s cytosolem - data k Obr. 30 a Obr. 31

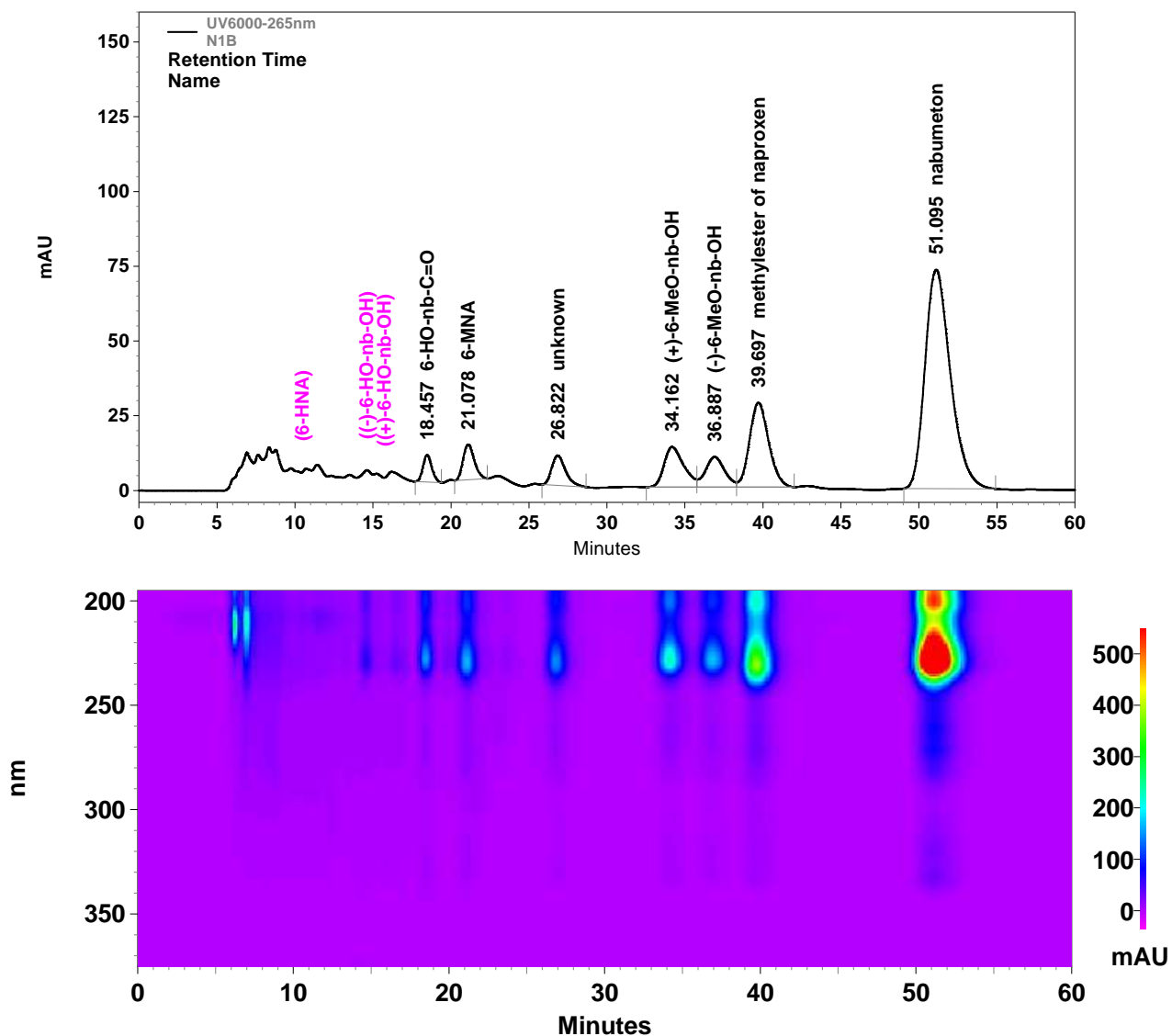
	potkaní cytosol					lidský cytosol				
	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. ($10^{-5}M$)	en. poměr	ee(%)	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. ($10^{-5}M$)	en. poměr	ee(%)
6-HNA										
(-)-6-HO-nb-OH										
(+)-6-HO-nb-OH										
6-HO-nb-CO										
6-MNA										
(+)-6-MeO-nb-OH	1067878	0,438144	0,4906	9,4	81,2	6055195	2,752264	3,0818	63,3	26,7
(-)-6-MeO-nb-OH	10725543	4,400627	4,7267	90,6		3652022	1,659951	1,7829	36,7	
methylester naproxenu	2437276					2200078				
nabumeton	754678	0,309640	0,3342			2138947	0,972214	1,0494		

Nabumeton s mikrosomy

Obr. 32 Nabumeton s lidskými mikrosomy



Obr. 33 Nabumeton s potkaními mikrosomy

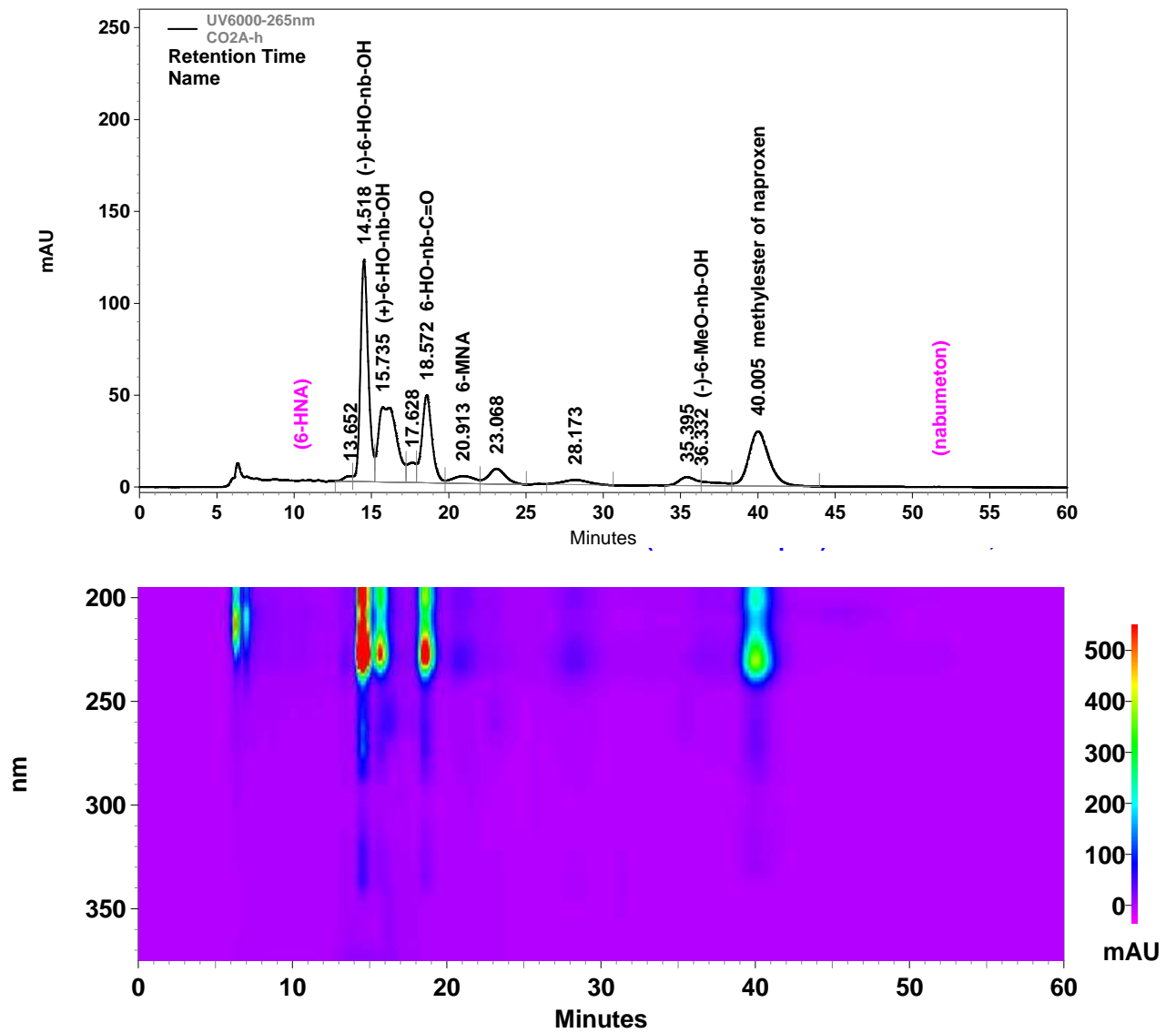


Tab. 11 Nabumeton s mikrosomy - data k Obr. 32 a Obr. 33

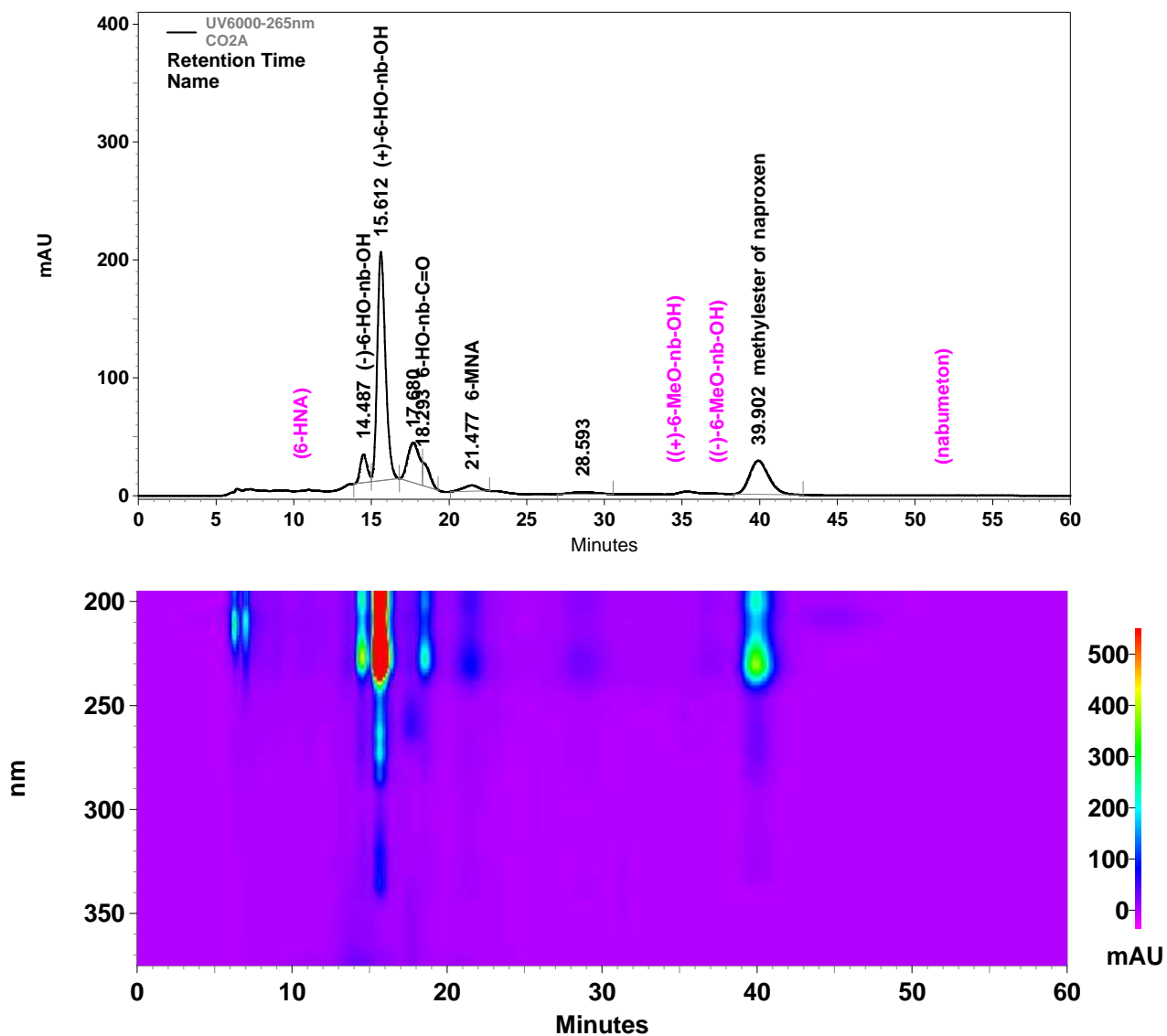
	potkaní mikrosomy					lidské mikrosomy				
	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. ($10^{-5}M$)	en. poměr	ee(%)	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. ($10^{-5}M$)	en. poměr	ee(%)
6-HNA										
(-)-6-HO-nb-OH					17,5	43118	0,016722	0,0297	57,3	14,5
(+)-6-HO-nb-OH						36376	0,014107	0,0221	42,7	
6-HO-nb-CO	355214	0,146901	0,1776			1110559	0,430685	0,5207		
6-MNA	589503	0,243793	0,2715			716346	0,277806	0,3094		
unknown	618893	0,255947								
(+)-6-MeO-nb-OH	1179345	0,487726	0,5461	58,7	17,5	1599260	0,620208	0,6945	69,0	38,0
(-)-6-MeO-nb-OH	863776	0,357221	0,3837	41,3		749119	0,290515	0,3120	31,0	
methylester naproxenu	2418047					2578586				
nabumeton	8293147	3,429688	3,7022			7988250	3,097919	3,3441		

6-HO-nb-CO s cytosolem

Obr. 34 6-HO-nb-CO s lidským cytosolem



Obr. 35 6-HO-nb-CO s potkaním cytosolem

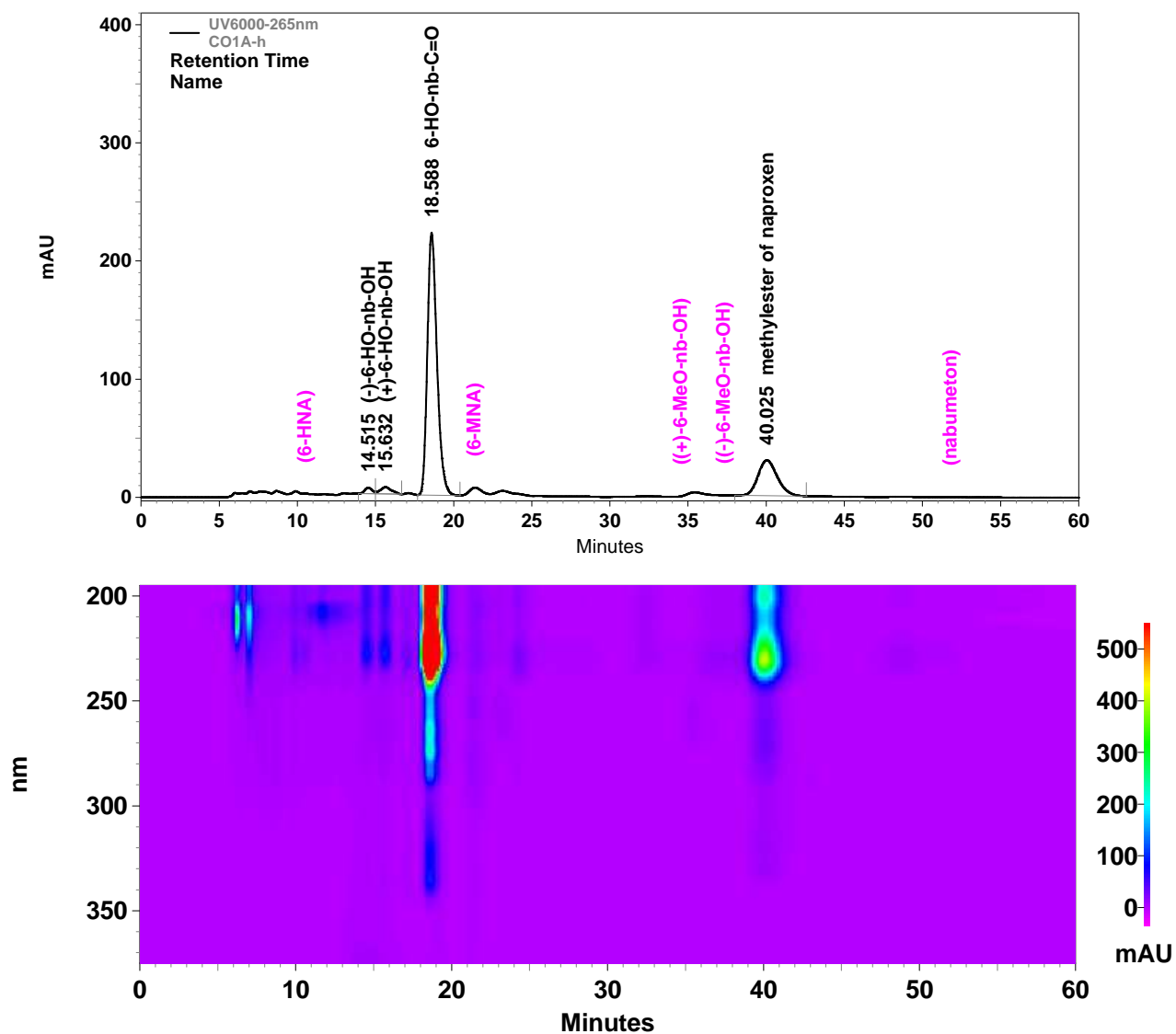


Tab. 12 6-HO-nb-CO s cytosolem - data k Obr. 34 a Obr. 35

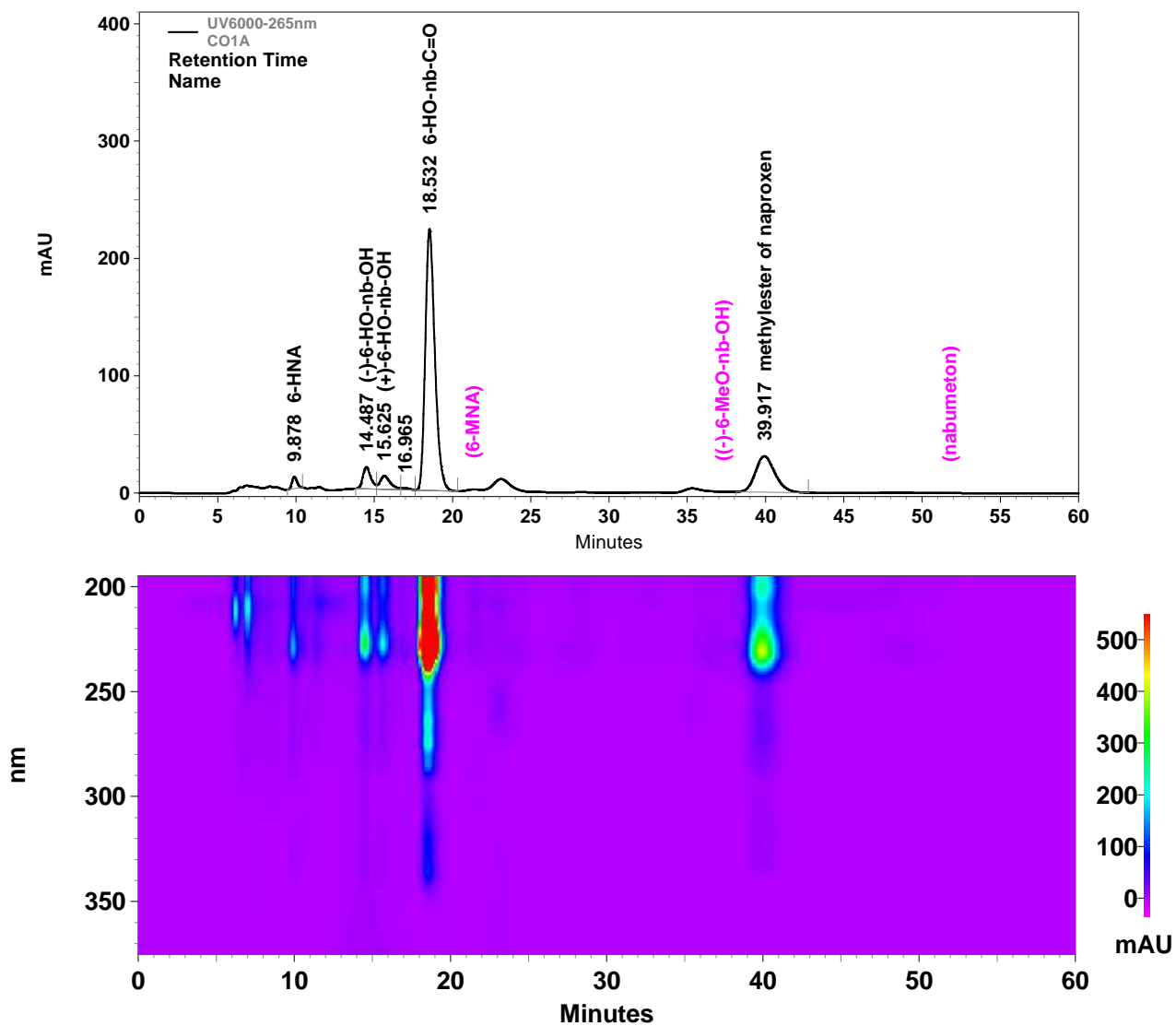
	potkaní cytosol					lidský cytosol				
	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. (10^{-5} M)	en. poměr	ee(%)	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. (10^{-5} M)	en. poměr	ee(%)
6-HNA										
(-)-6-HO-nb-OH	751551	0,307048	0,5447	10,6	78,7	4246189	1,563269	2,7734	58,7	17,3
(+)-6-HO-nb-OH	7136339	2,915570	4,5740	89,4		3383765	1,245760	1,9544	41,3	
6-HO-nb-CO	583129	0,238239	0,2880			2187460	0,805331	0,9736		
6-MNA	358216	0,146350	0,1630			399764	0,147176	0,1639		
(+)-6-MeO-nb-OH										
(-)-6-MeO-nb-OH						193425	0,071211	0,0765		
methylester naproxenu	2447665					2716225				
nabumeton										

6-HO-nb-CO s mikrosomy

Obr. 36 6-HO-nb-CO s lidskými mikrosomy



Obr. 37 6-HO-nb-CO s potkaními mikrosomy

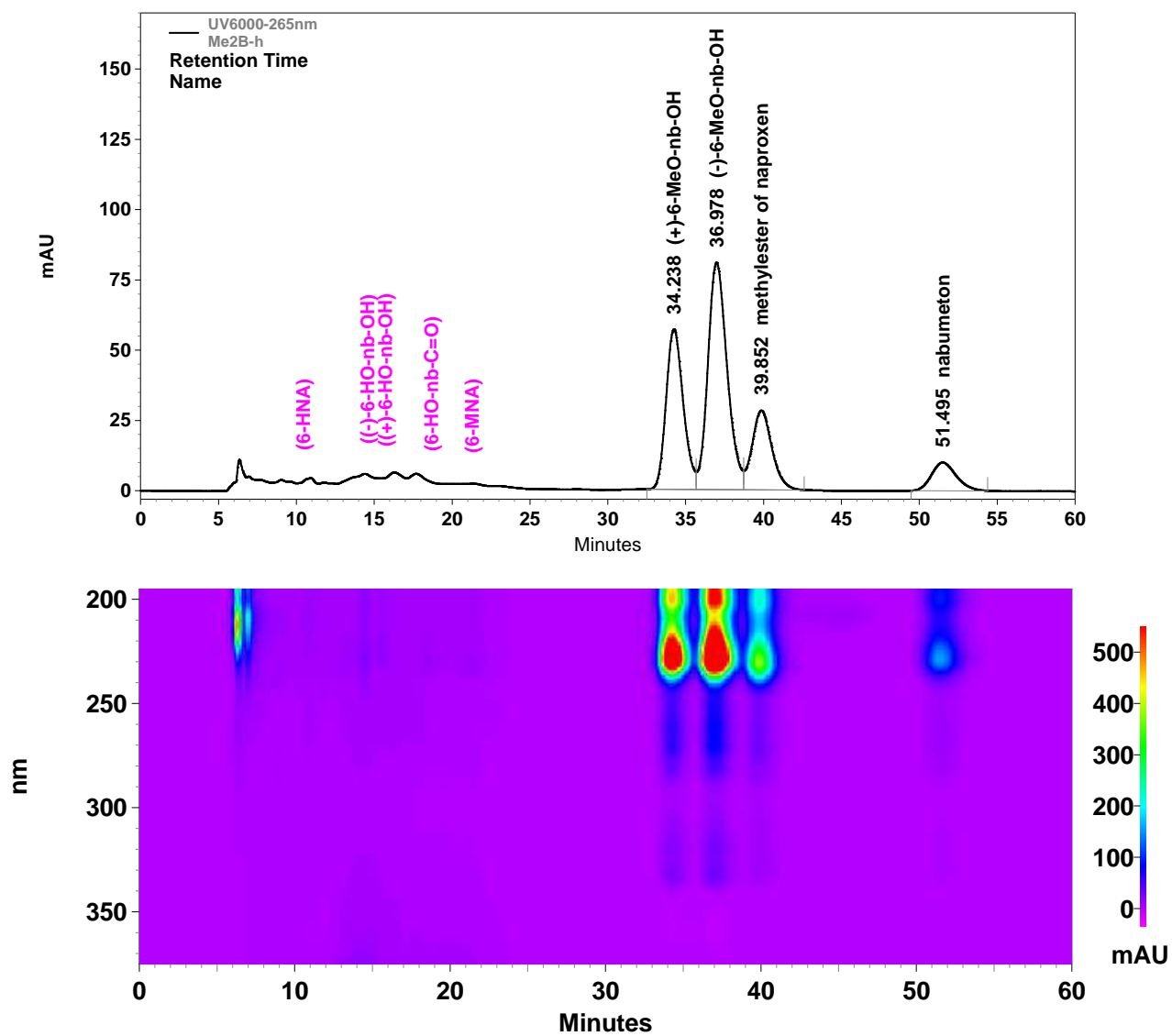


Tab. 13 6-HO-nb-CO s mikrosomy - data k Obr. 36 a Obr. 37

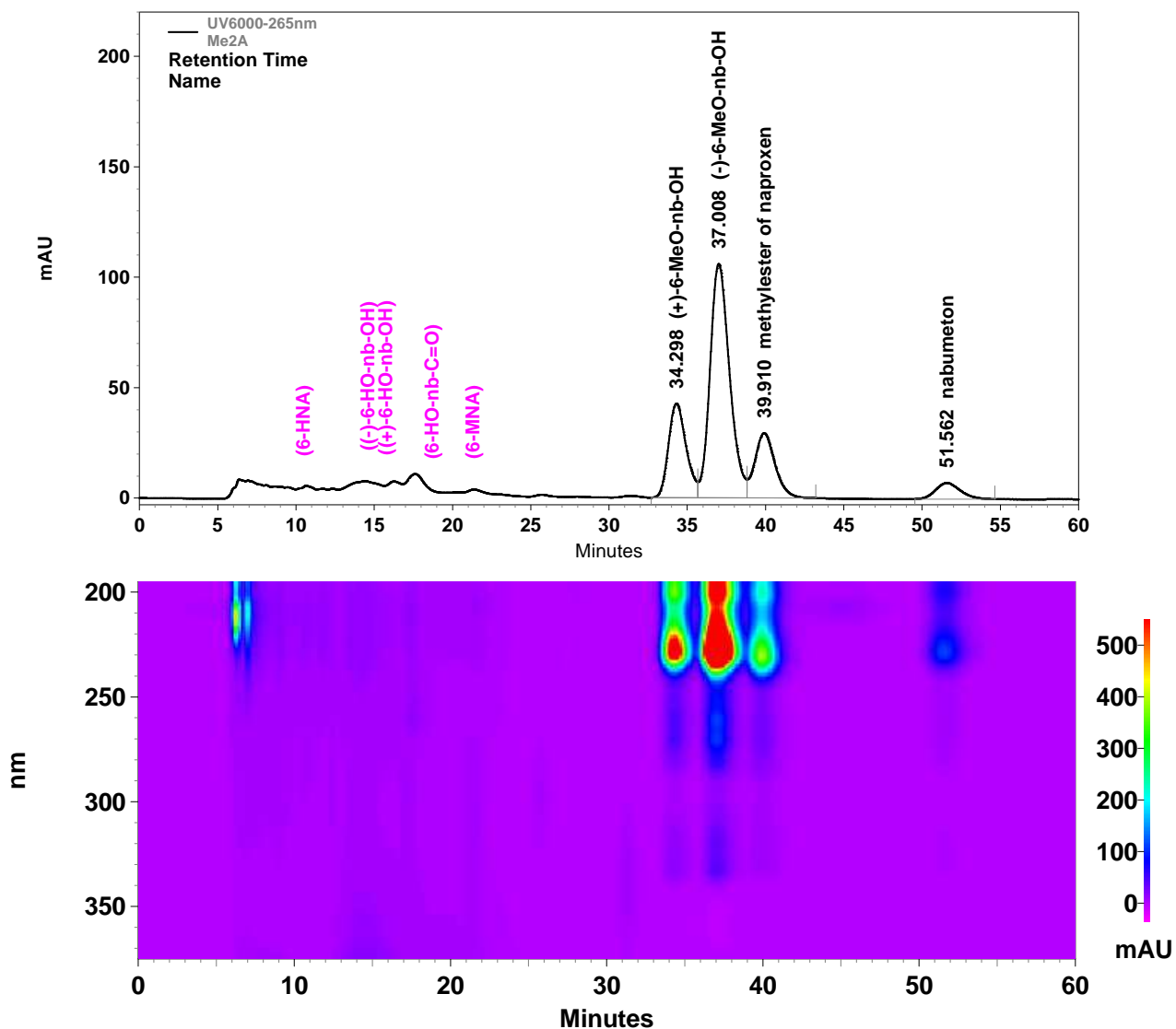
	potkaní mikrosomy					lidské mikrosomy				
	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. ($10^{-5}M$)	en. poměr	ee(%)	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. ($10^{-5}M$)	en. poměr	ee(%)
6-HNA	219849	0,082767	0,1023							
(-)-6-HO-nb-OH	660131	0,248521	0,4409	58,6	17,2	170686	0,065986	0,1171	39,7	20,6
(+)-6-HO-nb-OH	527436	0,198565	0,3115	41,4		292834	0,113208	0,1776	60,3	
6-HO-nb-CO	9466224	3,563774	4,3083			9459937	3,657168	4,4212		
6-MNA										
(+)-6-MeO-nb-OH										
(-)-6-MeO-nb-OH										
methylester naproxenu	2656236					2586684				
nabumeton										

6-MeO-nb-OH s cytolelem

Obr. 38 6-MeO-nb-OH s lidským cytolelem



Obr. 39 6-MeO-nb-OH s potkaním cytosolem

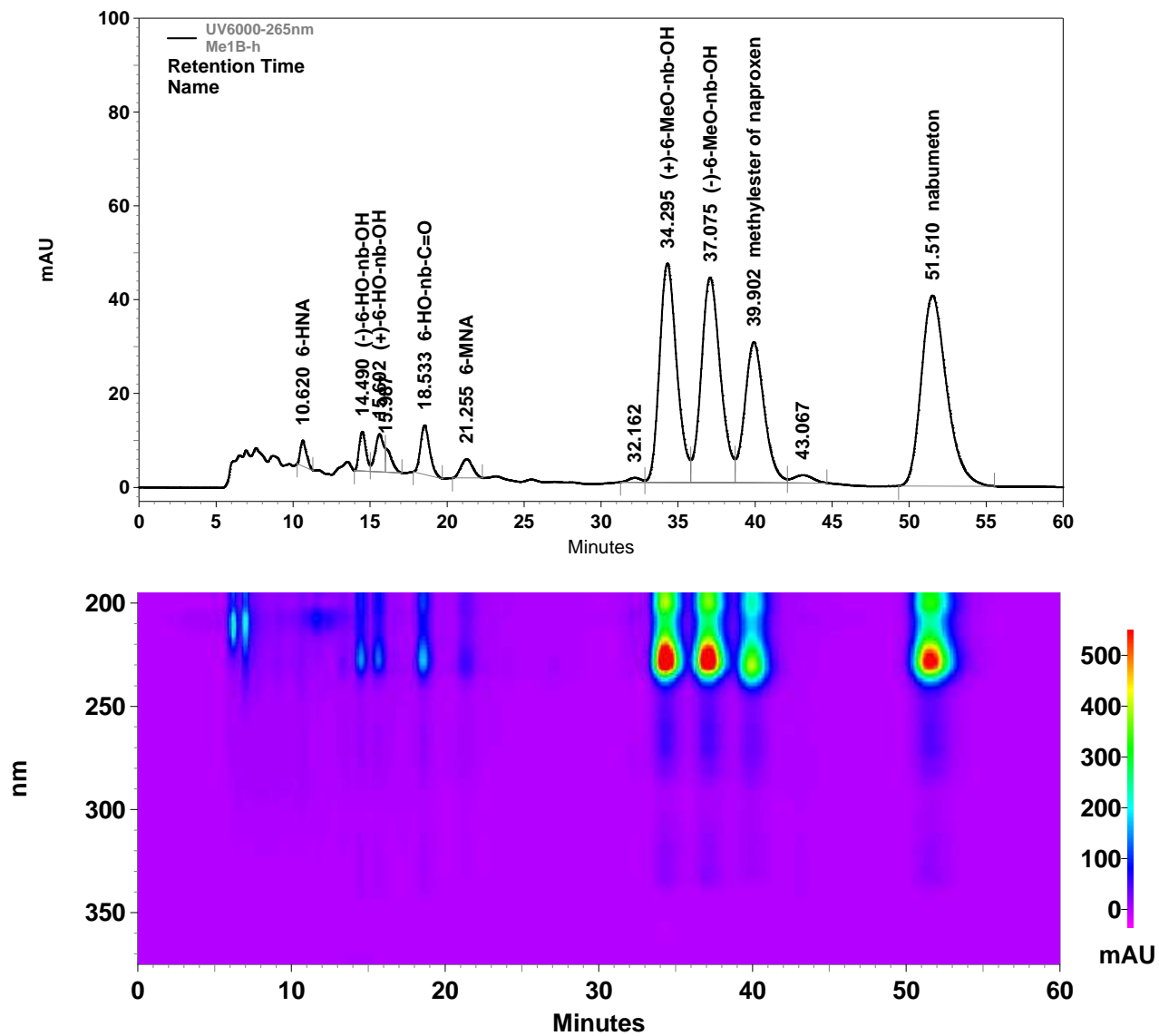


Tab. 14 6-MeO-nb-OH s cytosolem - data k Obr. 38 a Obr. 39

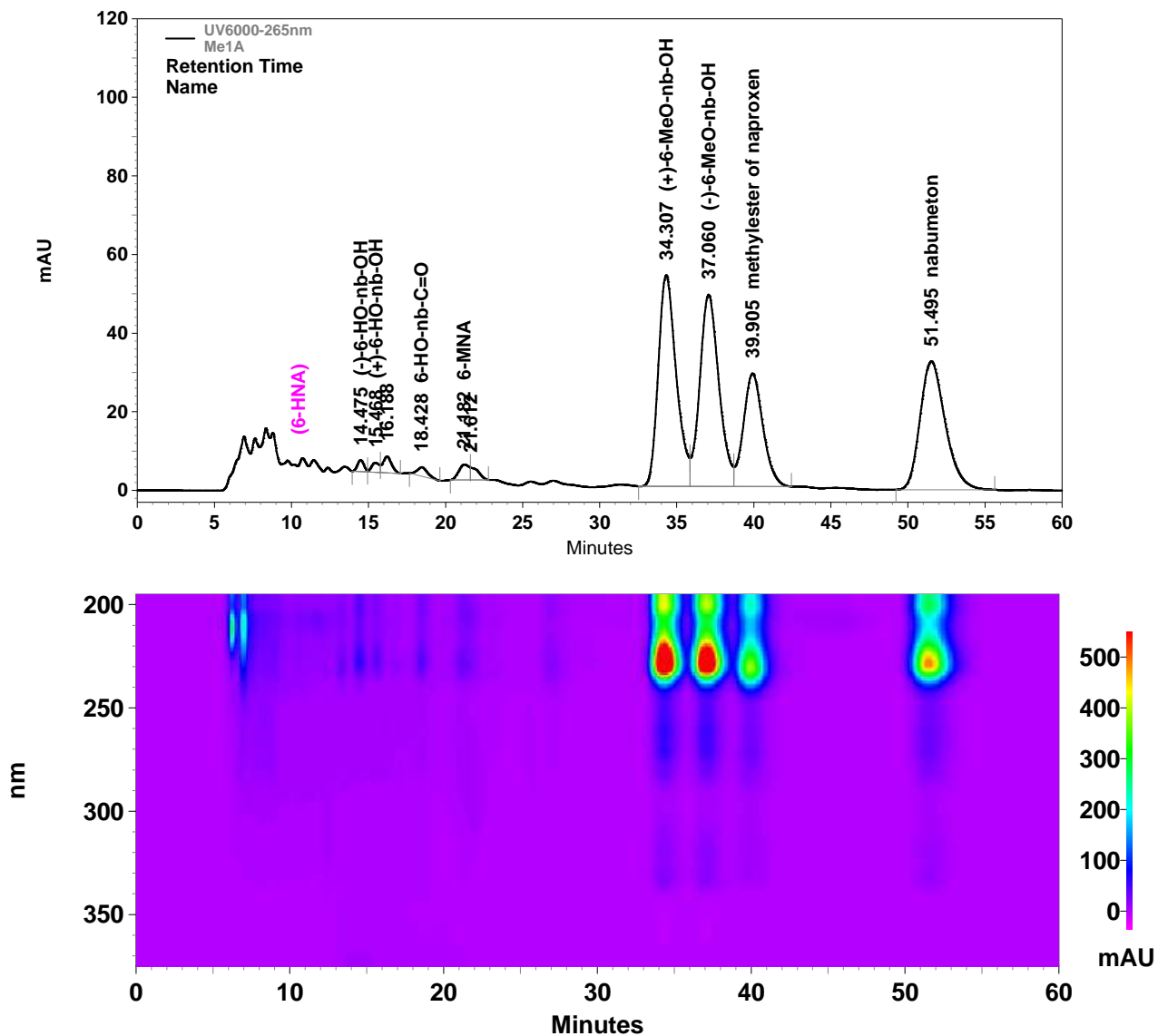
	potkaní cytosol					lidský cytosol				
	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. ($10^{-5}M$)	en. poměr	ee(%)	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. ($10^{-5}M$)	en. poměr	ee(%)
6-HNA										
(-)-6-HO-nb-OH					45,0					20,8
(+)-6-HO-nb-OH										
6-HO-nb-CO										
6-MNA										
(+)-6-MeO-nb-OH	3355772	1,265221	1,4167	27,5	45,0	4387053	1,742365	1,9510	39,6	20,8
(-)-6-MeO-nb-OH	9215849	3,474636	3,7321	72,5		6971541	2,768823	2,9740	60,4	
methylester naproxenu	2652321					2517872				
nabumeton	805259	0,303605	0,3277			1110861	0,441190	0,4763		

6-MeO-nb-OH s mikrosomy

Obr. 40 6-MeO-nb-OH s lidskými mikrosomy



Obr. 41 6-MeO-nb-OH s potkaními mikrosomy

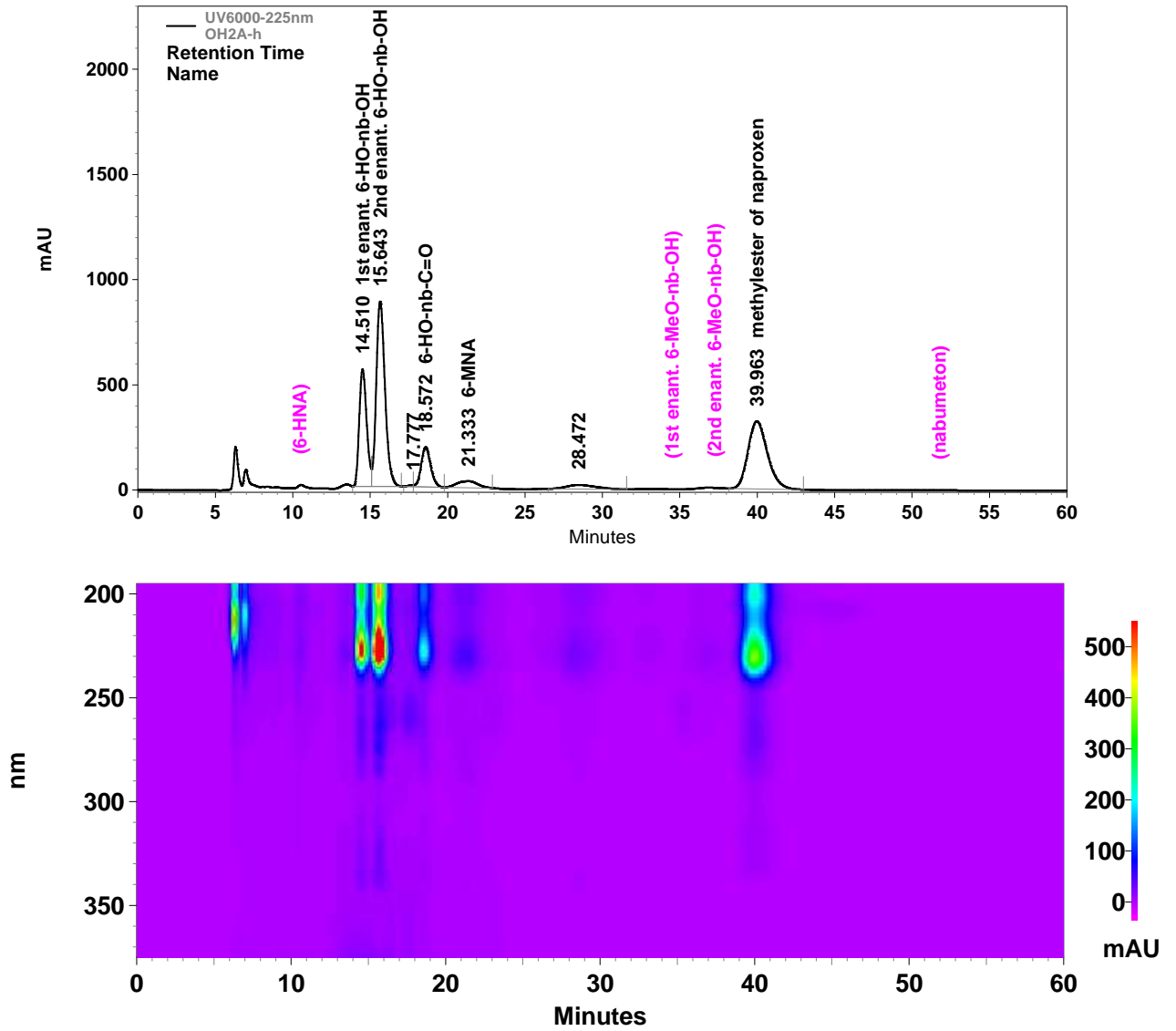


Tab. 15 6-MeO-nb-OH s mikrosomy - data k Obr. 40 a Obr. 41

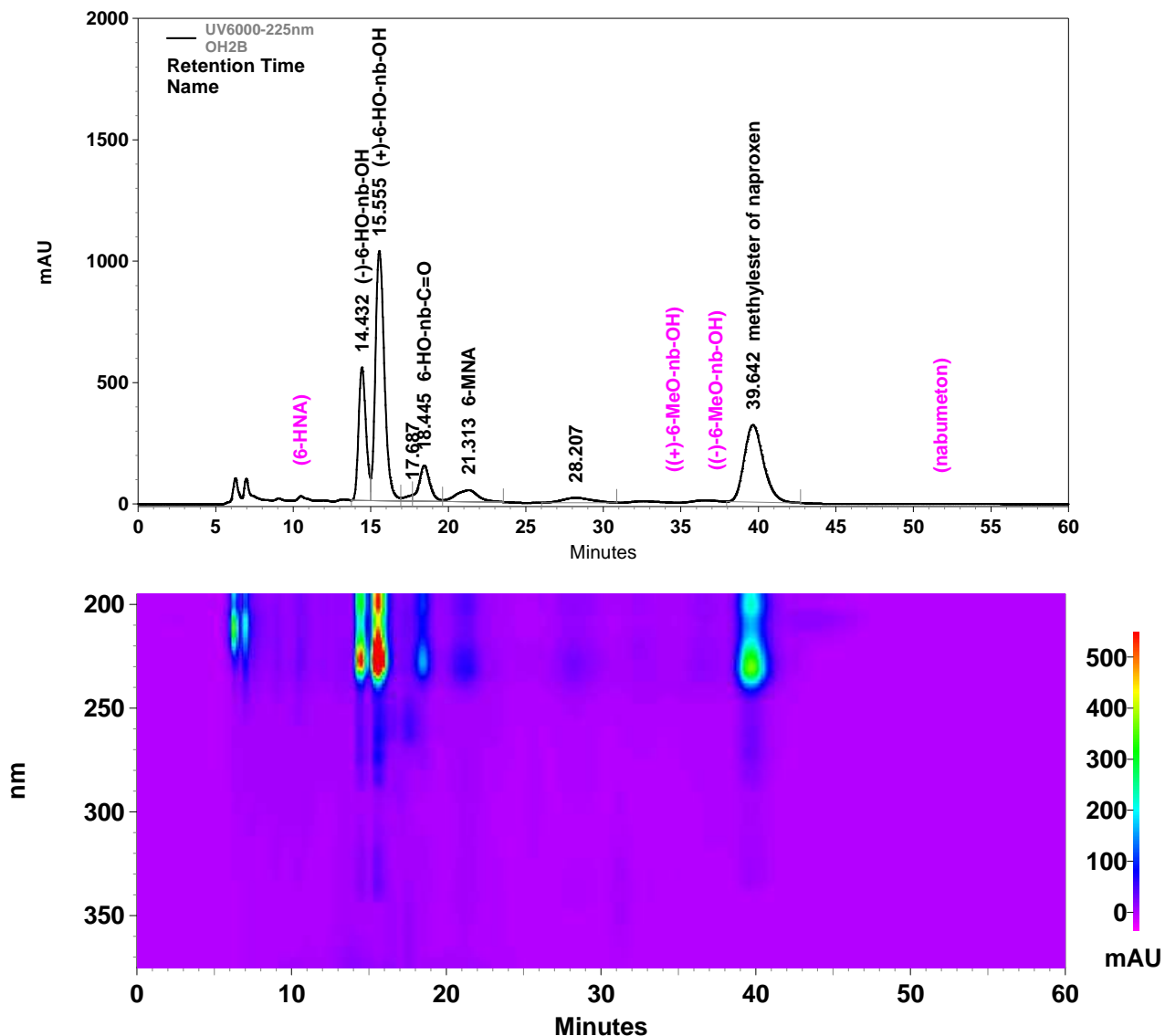
	potkaní mikrosomy					lidské mikrosomy				
	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. (10^{-5} M)	en. poměr	ee(%)	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. (10^{-5} M)	en. poměr	ee(%)
6-HNA						150267	0,056554	0,0699		
(-)-6-HO-nb-OH	85635	0,033754	0,0599	53,4	6,8	255637	0,096211	0,1707	48,7	2,7
(+)-6-HO-nb-OH	84592	0,033343	0,0523	46,6		304998	0,114788	0,1801	51,3	
6-HO-nb-CO	106540	0,041994	0,0508			431711	0,162478	0,1964		
6-MNA	185076	0,072950	0,0813			212873	0,080116	0,0892		
(+)-6-MeO-nb-OH	4359479	1,718335	1,9241	51,8	3,6	3641007	1,370322	1,5344	50,0	0,0
(-)-6-MeO-nb-OH	4227923	1,666481	1,7900	48,2		3795424	1,428438	1,5343	50,0	
methylester naproxenu	2537037					2657045				
nabumeton	3715083	1,464339	1,5807			4676417	1,760007	1,8999		

6-HO-nb-OH s cytosolem

Obr. 42 6-HO-nb-OH s lidským cytosolem



Obr. 43 6-HO-nb-OH s potkaním cytosolem

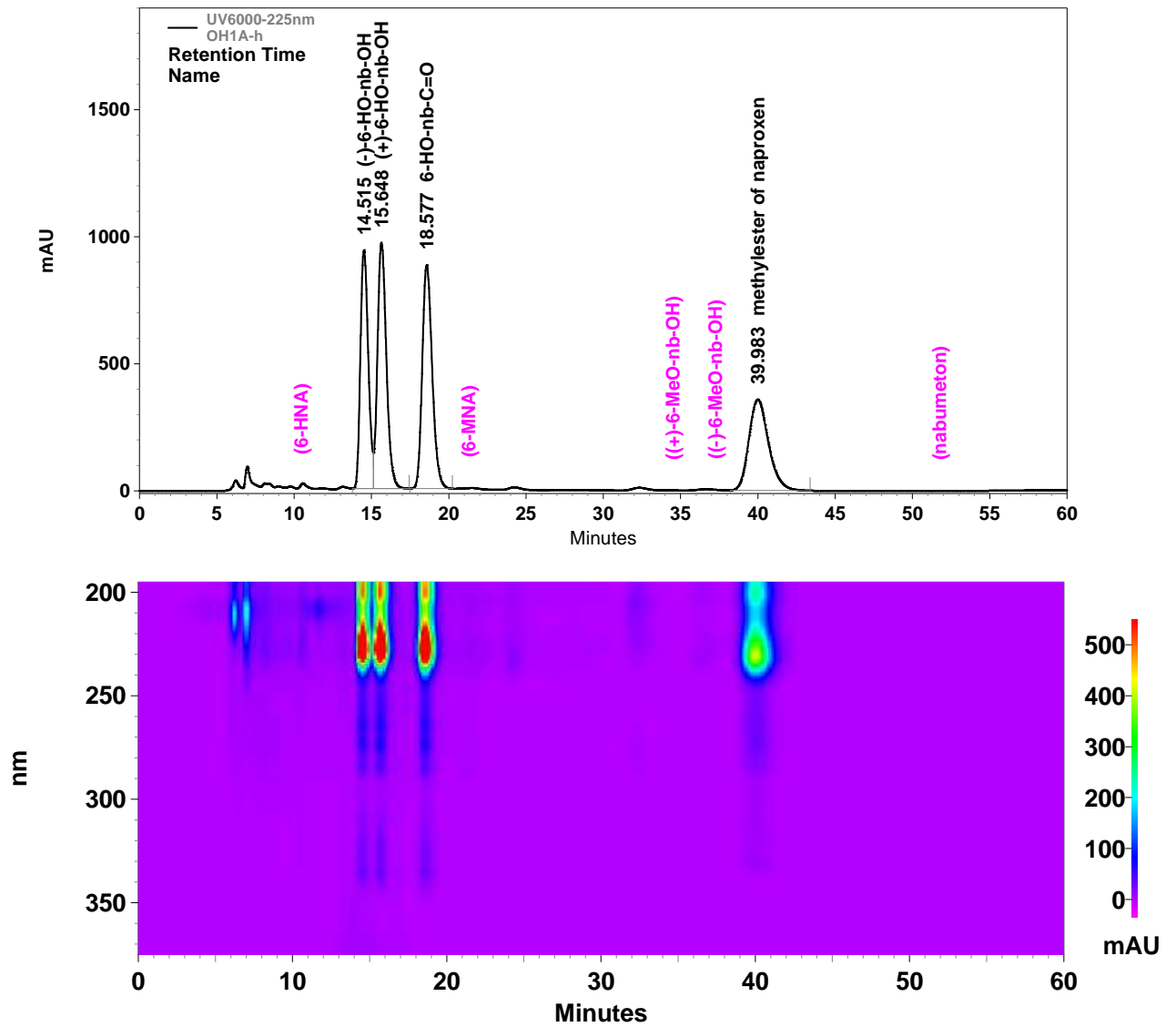


Tab. 16 6-HO-nb-OH s cytosolem - data k Obr. 42 a Obr. 43

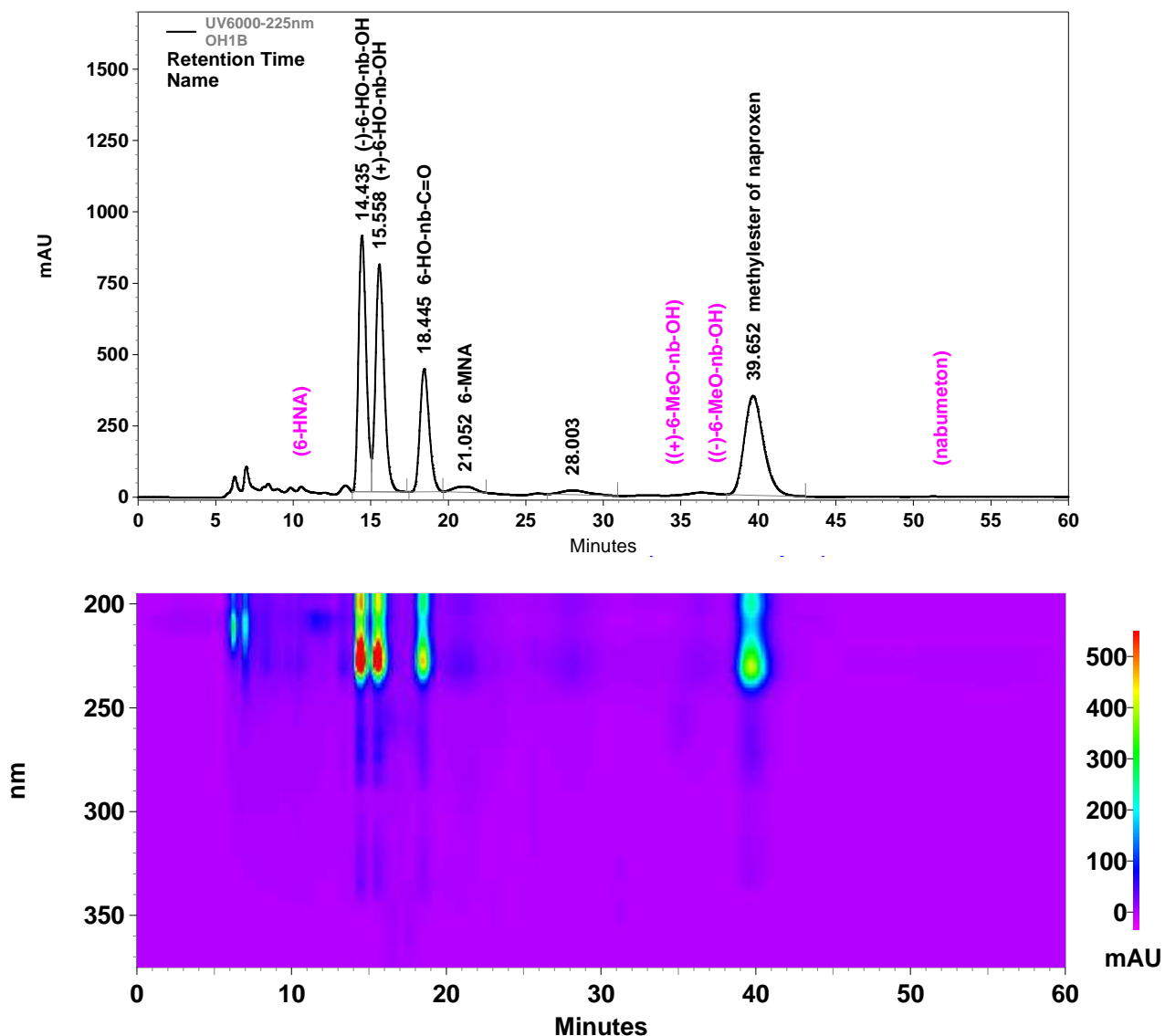
	potkaní cytosol					lidský cytosol				
	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. (10^{-5} M)	en. poměr	ee(%)	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. (10^{-5} M)	en. poměr	ee(%)
6-HNA										
(-)-6-HO-nb-OH	18207389	0,662106	1,0150	33,9	32,2	18633700	0,663239	1,0167	38,8	22,4
(+)-6-HO-nb-OH	41782706	1,519414	1,9785	66,1		34581515	1,230878	1,6028	61,2	
6-HO-nb-CO	7046206	0,256233	0,2205			8055774	0,286733	0,2467		
6-MNA	4694186	0,170703	0,1625			2888920	0,102827	0,0979		
(+)-6-MeO-nb-OH										
(-)-6-MeO-nb-OH										
methylester naproxenu	27499221					28095007				
nabumeton										

6-HO-nb-OH s mikrosomy

Obr. 44 6-HO-nb-OH s lidskými mikrosomy



Obr. 45 6-HO-nb-OH s potkaními mikrosomy



Tab. 17 6-HO-nb-OH s mikrosomy - data k Obr. 44 a Obr. 45

	potkaní mikrosomy					lidské mikrosomy				
	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. (10^{-5} M)	en. poměr	ee(%)	Area	Area (an)/(I.S.)	konc. (10^{-5} M)	en. poměr	ee(%)
6-HNA										
(-)-6-HO-nb-OH	30946102	1,025187372	1,5716	54,1	8,2	33104877	1,046812	1,6047	50,1	0,1
(+)-6-HO-nb-OH	30924208	1,024462064	1,3340	45,9		38875179	1,229275	1,6007	49,9	
6-HO-nb-CO	17895627	0,592849	0,5101			39249236	1,241103	1,0679		
6-MNA	1797260	0,059540	0,0567							
(+)-6-MeO-nb-OH										
(-)-6-MeO-nb-OH										
methylester naproxenu	30185801					31624468				
nabumeton										