

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

BIOANALYTICKÉ HODNOTENIE NOVÝCH POTENCIÁLNYCH  
LIEČIV ODVODENÝCH OD THIOSEMIKARBAZÓNU

II.

Diplomová práca

Vedúca diplomovej práce: PharmDr.Petra Kovaříková, Ph.D.

Hradec Králové 2012

Zuzana Kollárová

*Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.*

*V Hradci Králové, dňa 15.04.2012*

.....

*Zuzana Kollárová*

*Na tomto mieste diplomovej práce by som sa chcela poďakovať mojej školiteľke PharmDr. Petre Kovaříkovej, Ph.D. za jej odborné vedenie, podnetné návrhy a obrovskú trpezlivosť. Za podporu a užitočné rady patrí veľká vďaka aj Mgr. Jánovi Stariatovi. Tiež ďakujem spolužiakovi Vítovi Šestákovi, ktorého výsledky som uplatnila v mojom skúmaní.*

*Práca bola vypracovaná za podpory projektov GAUK FaF/B-CH/85510 a SVV 265 001.*

# Obsah

<b>1</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČASŤ.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) .....</b>	<b>9</b>
3.1.1	Charakteristika HPLC .....	9
3.1.2	Prístrojové vybavenie HPLC.....	11
3.1.3	Kvalitatívna HPLC analýza.....	13
3.1.4	Kvantitatívna HPLC analýza .....	14
3.1.5	Charakteristika separačného procesu .....	16
<b>3.2</b>	<b>Hmotnostná spektrometria v spojení s HPLC (HPLC-MS) .....</b>	<b>18</b>
3.2.1	Charakteristika MS .....	18
3.2.2	Prístrojové vybavenie MS.....	18
<b>3.3</b>	<b>Tenkvrstevná chromatografia (TLC) .....</b>	<b>20</b>
3.3.1	Charakteristika analytickej TLC.....	20
3.3.2	Preparatívna TLC chromatografia.....	21
<b>3.4</b>	<b>Úprava biologických vzoriek .....</b>	<b>22</b>
<b>3.5</b>	<b>Vybrané parametre validácie bioanalytických metód .....</b>	<b>24</b>
<b>3.6</b>	<b>Biokompatibilné chelátory železa .....</b>	<b>26</b>
3.6.1	Železo a jeho úloha v protinádorovej terapii .....	26
3.6.2	Vývoj chelátorov železa .....	27
3.6.3	Bp4eT.....	29
3.6.4	Štúdium metabolizmu liečiv .....	31
3.6.5	Metabolismus Bp4eT.....	32
<b>4</b>	<b>HLAVNÉ CIELE.....</b>	<b>34</b>
<i>I.</i>	<i>Optimalizácia HPLC podmienok pre separáciu Bp4eT a jeho hlavných metabolitov (semikarbazonového metabolitu a amidrazónu) .....</i>	<i>34</i>
<i>II.</i>	<i>Výber vhodného vnútorného štandardu pre kvantifikáciu Bp4eT .....</i>	<i>34</i>
<i>III.</i>	<i>Príprava a izolácia štandardov metabolitov Bp4eT pomocou TLC.....</i>	<i>34</i>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>Chemikálie a materiály .....</b>	<b>35</b>

<b>5.2</b>	<b>Inštrumentálne vybavenie .....</b>	<b>37</b>
5.2.1	HPLC, MS, SPE.....	37
5.2.2	TLC materiál.....	38
5.2.3	Ďalšie zariadenia a pomôcky .....	38
<b>5.3</b>	<b>Príprava roztokov .....</b>	<b>39</b>
<b>5.4</b>	<b>Optimalizácia oxidačných podmienok.....</b>	<b>40</b>
<b>5.5</b>	<b>Optimalizácia chromatografických podmienok pre analýzu Bp4eT a jeho metabolitov.....</b>	<b>41</b>
5.5.1	HPLC-UV .....	41
5.5.2	HPLC-MS .....	42
5.5.3	TLC separácia metabolitov Bp4eT .....	42
5.5.4	TLC izolácia chemických štandardov oxidácie Bp4eT .....	44
<b>5.6</b>	<b>Opakovateľnosť SPE extrakcie pre Bp4eT a vnútorný štandard.....</b>	<b>45</b>
5.6.1	Prevedenie testu opakovateľnosti SPE analýzy .....	45
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>46</b>
<b>6.1</b>	<b>Vývoj chromatografických podmienok pre analýzu Bp4eT a jeho metabolitov .....</b>	<b>46</b>
<b>6.2</b>	<b>Príprava, izolácia a identifikácia oxidačných produktov .....</b>	<b>49</b>
6.2.1	Príprava oxidačných produktov Bp4eT.....	49
6.2.2	Chromatografické podmienky pre TLC izoláciu metabolitov .....	50
6.2.3	Príprava chemických štandardov oxidácie a identifikácia oxidačných produktov Bp4eT .....	53
<b>6.3</b>	<b>Opakovateľnosť SPE extrakcie pre izoláciu Bp4eT z plazmy .....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVER .....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>58</b>
<b>10</b>	<b>POUŽITÁ LITERATÚRA .....</b>	<b>60</b>

## 1 Zoznam použitých skratiek

APCI (atmospheric pressure chemical ionization)	chemická ionizácia pri atmosférickom tlaku
APPI (atmospheric pressure photoionization)	fotoionizácia pri atmosférickom tlaku
Bp4eT	2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazón
DAD (diode array detectors)	detektory s diódovým poľom
DFO	deferoxamin
DNA (deoxyribonucleic acid)	deoxyribonukleová kyselina
DpT	di(2-pyridylketón)-3-thiosemikarbazón
Dp4eT	di(2-pyridylketón)-4-etyl-3-thiosemikarbazón
Dp4mT	di(2-pyridylketón)-4-methyl-3-thiosemikarbazón
Dp4pT	di(2-pyridylketón)-4-fenyl-3-thiosemikarbazón
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	disodná soľ kyseliny ethyléndiamintetraoctovej
EI (electron ionization)	elektrónová ionizácia
EMA (European Medicines Agency)	Európska lieková agentúra
ESI (electrospray ionization)	ionizácia elektrosprejom
FDA (Food and Drug Administration)	Ústav pre lieky a potraviny
GC (gas chromatography)	plynová chromatografia
HPLC (high performance liquid chromatography, high pressure liquid chromatography)	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

IC <sub>50</sub> (inhibiting concentration)	koncentrácia, ktorá vyvolá inhibíciu u 50% prípadov
IČ (infrared spectroscopy)	infračervená spektroskopia
LLE (liquid - liquid extraction)	extrakcia kvapalina-kvapalina
MS (mass spectrometry)	hmotnostná spektrometria
NMR (nuclear magnetic resonance)	nukleárna magnetická rezonancia
PIH	pyridoxal isonikotinoyl hydrazón
R <sub>f</sub> (retardation factor)	retenčný faktor
RNR (ribonucleotid reductase)	ribonukleotid reduktáza
ROS (reactive oxygen species)	reaktívne formy kyslíka
RSD (relative standard deviation)	relatívna smerodajná odchýlka
SIH	salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazón
SPE (solid - phase extraction)	extrakcia na pevnej fáze
TLC (thin layer chromatography)	tenkovrstevná chromatografia
UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography)	ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UV (ultra violet radiation)	ultrafialové žiarenie

## 2 ÚVOD

Thiosemikarbazóny predstavujú nové potenciálne antiproliferatívne liečivá s unikátnym mechanizmom účinku. Selektívne chelatujú železo, čím ovplyvňujú mnoho významných biomolekúl v bunčnom cykle. Zasiahnuté sú hlavne rýchlo proliferujúce bunky s akcelerovaným metabolizmom. K antiproliferatívnemu účinku prispieva ireverzibilná blokáda ribonukleotid reduktázy (RNR), enzýmu dôležitého pre tvorbu DNA. Thiosemikarbazóny vykazujú v komplexoch so železom významnú cyklickú redoxnú aktivitu, ktorá vedie k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS).

2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazón (Bp4eT), vyvinutý Prof. D. Richardsonom (University of Sydney, Austrália), je vedúcou štruktúrou v skupine thiosemikarbazónov odvodených od 2-benzoylpyridinu.

Táto práca bola zameraná na vývoj analytickej metódy vhodnej pre súčasnú detekciu parentnej látky Bp4eT a jej metabolitov. Štúdium metabolizmu látky má obrovský význam. Poskytuje poznatky o biotransformácií liečiva, jeho reálnej účinnosti, bezpečnosti a ďalšie iné. V literatúre doposiaľ neboli popísané biotransformačné pochody Bp4eT. *In vitro* inkubácia s mikrozomálnymi frakciami pečene odhalila, že metabolizmus v prvej fáze prebieha oxidačnou cestou a výsledkom sú dva metabolity, ktorých prítomnosť bola potvrdená aj v *in vivo* experimentoch. Preto, jedným z našich cieľov bolo pripraviť a izolovať chemické štandardy metabolitov a následne potvrdiť ich štruktúru.

Najviac využívanou metódou pri metabolických štúdiách je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, v spojení s hmotnostnou spektrometriou (HPLC-MS). Jedná sa o významný nástroj kvalitatívnej i kvantitatívnej analýzy. Je vysoko citlivá a poskytuje aj informácie o štruktúre analyzovaných látok. V diplomovej práci boli vyvinuté chromatografické podmienky HPLC-UV analýzy kompatibilné s HPLC-MS pre detekciu Bp4eT, jeho vnútorného štandardu a metabolitov.



## 3 TEORETICKÁ ČASŤ

### 3.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

#### 3.1.1 Charakteristika HPLC

Chromatografické metódy sa v súčasnosti s obľubou používajú pre kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu rôznych chemických zlúčenín, substancií, liečiv i liečivých prípravkov. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, niekedy označovaná aj ako vysokotlaková kvapalinová chromatografia, (oba názvy vystihuje tá istá skratka, HPLC), je jednou z najprogresívnejších analytických metód aplikovaných nielen vo farmaceutickom priemysle. <sup>(1) (2) (3)</sup>

Princíp HPLC spočíva v riadenom transporte kvapalnej fázy, nazývanej mobilná fáza alebo eluent, cez porézny materiál, tvoriaci stacionárnu fázu, tiež nazývaný sorbent. <sup>(4)</sup> Zmes komponentov - analytov, nesie mobilná fáza, aby sa zaručil ich uniformný transport a interakcie. <sup>(3) (5) (6)</sup>

Vzorka analytu je nastrieknutá do prúdu mobilnej fázy a spolu s ňou je vedená cez kolónu, kde je umiestnená stacionárna fáza. Úlohou mobilnej fázy je vymývanie, elúcia jednotlivých komponentov. Stacionárna fáza má naopak schopnosť rôznou silou spomaľovať analyty. Komponenty analyzovanej zmesi sa separujú v závislosti na rozdielnej afinite ku stacionárnej a mobilnej fáze, výsledkom je rozdielny retenčný čas. Tento čas je závislý na charaktere každého analytu a konkrétnych podmienkach chromatografickej analýzy. Najmenej zadržovaný je komponent, ktorý najmenej preferuje stacionárnu fázu. <sup>(7) (8)</sup>

Pre rôzne molekuly s veľmi malými rozdielmi v interakčných energiách je prítomnosť veľkého povrchu významná, pretože čím väčší je počet fázových prechodov molekúl analytu počas prechodu chromatografickou kolónou, tým vyšší je rozdiel v ich retenčnom čase. Optimálna chromatografická separácia je dosiahnutá variáciou vlastností mobilnej a stacionárnej fázy. <sup>(5) (6) (8) (9)</sup>

Eluované komponenty sú transportované k detektoru, ktorý ich zaznamená ako krivky zvonovitého tvaru, popísanou Gaussovou funkciou. Tieto signály sa nazývajú píky a poskytujú kvalitatívne i kvantitatívne informácie o komponentoch. <sup>(10)</sup>

### **Separáčné módy HPLC**

Separáčné módy HPLC systému sa rozlišujú na základe dominantného typu molekulárnych interakcií. Existujú tri základné typy molekulárnych síl. Polárne sily sú hlavným typom interakcií u HPLC s normálnou fázou, ktorej adsorbent je polárny. Disperzné sily sú prítomné u HPLC s reverzným usporiadaním s nepolárnou stacionárnou fázou a ionové sily u ióno-výmenného typu stacionárnej fázy HPLC. Rozoznávajú sa aj iné typy HPLC ako je chirálna HPLC, HPLC na báze vylučovacieho efektu gélu a ďalšie. <sup>(5) (6)</sup>  
(8) (10)

U HPLC systému s normálnou fázou je kolóna vyplnená oxidom kremičitým (silikagel, silica, SiO<sub>2</sub>) alebo oxidom hlinitým (alumina, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Husté osídlenie hydroxylovými skupinami robí povrch polárnym. Mobilná fáza pozostáva z nepolárnych rozpúšťadiel ako je hexán, heptán, tetrahydrofurán a dietyléter s malým prídavkom polárneho rozpúšťadla typu methanol, ethanol. Práve obmenou polárnej zložky mobilnej fázy sa dosiahne rozdielny stupeň retencie. Značný posun spôsobí aj 1% (v/v) rozdiel polárneho modifikátora. <sup>(11)</sup> Keďže HPLC s normálnou fázou používa hlavne nepolárne rozpúšťadlá, je metódou voľby u hydrofóbných zlúčenín, ktoré sú nerozpustné v polárnych a vodných rozpúšťadlách. <sup>(5)</sup>

Chromatografia s reverzným usporiadaním je najpoužívanejším typom separáčného módu HPLC v analýze liečiv. Je založená na slabých disperzných silách (hydrofóbných, alebo van der Waalsových). <sup>(12)</sup> Mobilná fáza je polárna, zatiaľ čo stacionárna fáza je nepolárna a najčastejšie tvorená modifikovaným oxidom kremičitým. Najbežnejším modifikátorom oxidu kremičitého sú alifatické uhľovodíkové reťazce s rôznym počtom uhlíkov (napríklad C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>), ktoré sú naviazané na hydroxylové skupiny oxidu kremičitého. Povrch u stacionárnej fázy je teda hydrofóbný a mobilná fáza je polárna, takže tu uplatnenie nachádzajú hlavne vodné roztoky methanolu, acetonitrilu a vodné zmesi pufrov. Reverzná fáza je schopná separovať široké spektrum zlúčenín, preto v súčasnosti patrí medzi najpoužívanejší separáčny mód. <sup>(5)</sup>

## Možnosti elúcie mobilnej fázy

Pri izokratickej elúcii je zloženie mobilnej fázy nemenné. Využitie nachádza pri separáciách analytov s podobnou afinitou k stacionárnej fáze. <sup>(5) (8)</sup>

U gradientovej elúcie sa elučná schopnosť mobilnej fázy postupne zvyšuje, čím sa urýchli vymývanie analytov so silnou afinitou k stacionárnej fáze. Uplatňuje sa pri analýzach kde sa jednotlivé komponenty separujú v značne dlhých intervaloch medzi sebou, alebo keď sú chromatografické píky príliš široké. <sup>(5)</sup>

### 3.1.2 Prístrojové vybavenie HPLC

HPLC je komplexný systém, skladajúci sa z jednotlivých modulov, ktoré sú zapojené za sebou.

**Zásobníky mobilnej fázy**, spravidla z kovu, skla alebo plastu, sú spojené s pumpami plastovými kapilármi.

**Pumpy** zabezpečujú konštantné a kontinuálne prúdenie mobilnej fázy zo zásobníkov na kolónu. Pracujú v rozmedzí tlakov 1 – 40 MPa.

Aby boli dosiahnuté správne výsledky analýzy a zachovaná funkcia čerpadla, je nutné odstrániť plyny z mobilnej fázy. Manuálne sa plyny odstraňujú ultrazvukom, vákuom alebo prebublávaním s héliom. **Degasser** odstraňuje rozpustené plyny mobilnej fázy automaticky a to tak, že mobilná fáza je vedená cez poréznu trubicu v evakuovanom priestore. <sup>(13)</sup>

**Injektorom** sa nastrekuje roztok analytu do prúdu mobilnej fázy pred vstupom na kolónu. **Autosampler** (automatický dávkovač) je spojený so zásobníkom vzoriek. Umožňuje naprogramovať nástrek požadovaných objemov vzoriek z rôznych vialiek. Vlastné dávkovanie prebieha pomocou viaccestných (väčšinou šesťcestných) ventilov alebo pomocou niekoľkých trojcestných ventilov. Riziko kontaminácií vzoriek (crossover, cross contamination) sa zníži použitím vnútorného aj vonkajšieho oplachu ihly. <sup>(13)</sup>

**Kolóna** je miestom separácie zložiek analytu. HPLC kolóny sa vyrábajú najčastejšie z nerezovej ocele, ale aj zo skla a titánu. Dĺžka klasických analytických kolón súvisí s veľkosťou častíc adsorbentu. Čím menšie sú častice, tým kratšia je kolóna. Dĺžka sa pohybuje medzi 10 - 15 cm a vnútorný priemer je 2,1 - 4,6 mm u analytických kolón, a 25 - 50 cm a vnútorný priemer 8 - 10 mm u preparatívnych kolón. Hlavným zameraním vývoju chromatografických metód v posledných rokoch bola práve snaha zvýrazniť a zväčšiť medzipovrchový kontakt separačnej plochy.

**Detektor** je zariadenie pre neustále zaznamenávanie špecifických fyzikálnych (alebo aj chemických) vlastností eluentu z kolóny. Zmena určitých vlastností eluentu, napríklad, prítomnosť molekuly analytu poskytuje elektrický signál, ktorý je vyhodnotený softvérom. Detektor by sa mal vyznačovať univerzálnosťou, citlivosťou a lineárnou závislosťou jeho odozvy na koncentrácií analytu. Výber detektoru určuje fyzikálno-chemický charakter analytu a požiadavky na citlivosť analýzy. UV detektor s fixnou vlnovou dĺžkou monitoruje a zaznamenáva UV absorbancie vo vybraných vlnových dĺžkach. UV (-VIS) detektor s premenlivou vlnovou dĺžkou umožňuje meniť vlnovú dĺžku podľa potreby, či meranie pri viacerých vlnových dĺžkach. Scanning detektory dokážu dokonca snímať v priebehu niekoľkých sekúnd celé absorpčné spektrum analytu v maxime jeho píku. Detektory s diódovým poľom (DAD) sú založené na súčasnom meraní signálu veľkého počtu malých fotodiód. Tak dokážu snímať spektra analytov po celý čas ich elúcie, poprípade zistiť koelúciu zložiek analytu. <sup>(14)</sup> Z iných detektorov sa používajú fluorescenčné, elektrochemické, vodivostné, refraktometrické a hmotnostné.

Získané merania vyhodnocuje **chromatografický softvér**. Jeho úlohou je zároveň kontrola zadaných parametrov HPLC ako je: kontrola zloženia mobilnej fázy, teplota na kolóne, tlak, nastrieknuté množstvo analytu. Ďalej získava data z detektoru a monitoruje výkon systému. <sup>(2) (3) (5) (7) (15)</sup>

### 3.1.3 Kvalitatívna HPLC analýza

Signál prístroju sa zaznamenáva ako pík. Píky poskytujú kvalitatívne i kvantitatívne informácie o molekulách analytu. Kvalitatívnou vlastnosťou molekuly je jej **retenčný čas**, ktorý je vyjadrený ako čas od nástreku látky na kolónu po maximum jej chromatografického píku. Jedná sa o relatívnu veličinu, ktorá závisí na zložení mobilnej fázy, prietokovej rýchlosti a type stacionárnej fázy, avšak pri identických chromatografických podmienkach je pre danú substanciu konštantná.<sup>(16)</sup>

**Retenčný faktor  $k$**  = kapacitný faktor  $k'$ , alebo hmotnostný distribučný objem  $D_m$ , je definovaný ako podiel množstva analytu v stacionárnej fáze  $n_s$  k množstvu v mobilnej fáze  $n_m$ , pričom sa množstvo vypočíta ako koncentrácia násobená objemom  $C \times V$ , v ktorom je látka rozpustená.<sup>(15) (17)</sup>

$$k = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = \frac{C_s / C_m}{V_s / V_m}$$

[1]

Retenčný faktor sa dá vypočítať aj z hodnoty retenčného času:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

[2]

$t_R$  predstavuje retenčný čas, alebo vzdialenosť kolmice spustenej z maxima píku od začiatku merania,  $t_0$  je počiatkový čas merania.

Z hodnoty retenčného času sa vypočíta aj **retenčný objem  $V_R$** , pričom platí:

$$V_R = t_R \times v$$

[3]

$t_R$  je retenčný čas,  $v$  je prietoková rýchlosť mobilnej fázy.<sup>(8)</sup>

### 3.1.4 Kvantitatívna HPLC analýza

Pre kvantitatívne stanovenie množstva sa použije výpočet plochy pod píkom, prípadne výška píku. Výška píku ako kvantitatívny parameter sa môže použiť len pri symetrických píkoch. Presnosť analýzy závisí od rozsahu šumu, stanovenia presného začiatku a konca píku, s dostatočným počtom dátových bodov definujúcich tvar píku.<sup>(8)</sup>

#### Metódy kvantitatívnej analýzy

Pri stanovení množstva analytu vo vzorku je možné použiť viacero postupov kvantitatívnej analýzy.

Pri použití **metódy vonkajšieho štandardu** sa porovnáva odozva píku skúmaného roztoku s odpovedajúcou odozvou u porovnávacieho roztoku štandardu. Najprv sa nastriekne roztok analyzovaného vzorku, signál sa zaznamená a až potom nasleduje nástrek vonkajšieho štandardu a jeho detekcia.

$$A_{VZ}/n_{VZ} = A_{ST}/n_{ST} \Rightarrow n_{VZ} = A_{VZ}/A_{ST} \cdot n_{ST}$$

[4]

$A_{VZ}$  je plocha píku u skúmaného roztoku,  $A_{ST}$  je plocha píku u porovnávacieho roztoku štandardu,  $n_{VZ}$  je množstvo látky vo vzorke skúmaného roztoku a  $n_{ST}$  je množstvo štandardu v porovnávacom roztoku.

**Metóda vnútorného štandardu** spočíva v prídavku rovnakého látkového množstva vnútorného štandardu k skúmanému roztoku a k porovnávaciemu roztoku. Vnútorný štandard by mal napodobňovať správanie hodnoteného analytu vo vzorke, pretože sa často stáva, že počas prípravy vzorky analytu (napríklad procesom reakcie, filtrácie, extrakcie a iným) dochádza ku kvantitatívnym stratám. Vhodne zvolený vnútorný štandard pridaný pred prípravou vzoriek môže tieto straty kompenzovať. Následne sa porovnáva pomer plôch stanovovanej látky a vnútorného štandardu u skúmaného roztoku a porovnávacieho roztoku.<sup>(18) (19)</sup>

$$c_{VZ} = \frac{A_{VZ} \times A_{IS}}{A_{IS} \times A_{ST}} \times c_{ST}$$

[5]

$A_{VZ}$  je plocha pod píkom u skúmaného roztoku,  $A_{ST}$  je plocha pod píkom u porovnávacieho roztoku,  $A_{IS}$  je plocha píku vnútorného štandardu,  $c_{VZ}$  je koncentrácia vzorky analytu v skúmanom roztoku,  $c_{ST}$  je koncentrácia štandardu v porovnávacom roztoku.

Vnútorný štandard by mal spĺňať nasledovné parametre:

- mal by byť štruktúrne podobný analytu,
- mal by sa eluovať samostatne, v blízkosti analytu, jeho pík by nemal interferovať s píkmi analytu,
- jeho chemické správanie by malo byť podobné správaniu analytu,
- mal by byť pridávaný v takej koncentrácii, aby výsledkom bol pík porovnateľnej výšky, alebo plochy pod píkom,
- nemal by byť prítomný v pôvodnej vzorke,
- mal by byť stabilný, nereaktívny vo vzťahu ku zložkám vzorky, výplni kolóny, alebo mobilnej fáze,
- požaduje sa, aby bol dostupný v dostatočnej čistote.<sup>(15)</sup>

**Metóda normalizácie** spočíva vo vypočítaní percentuálneho obsahu skúmanej látky z celkovej plochy všetkých píkov, ktorá tvorí 100 %.

$$A_1 + A_2 + A_3 = 100\%$$

[6]

$$A_1 = x \%$$

[7]

**Kalibračným postupom** sa stanoví obsah skúmanej látky na základe kalibračných závislostí koncentrácie a odozvy.<sup>(15)</sup>

$$y = kx + q \Rightarrow x = \frac{y - q}{k}$$

[8]

pričom  $y$  je veľkosť odozvy,  $x$  je koncentrácia analytu,  $k$  reprezentuje sklon priamky a  $q$  je konštanta popisujúca podmienky merania.<sup>(20)</sup>

### 3.1.5 Charakteristika separačného procesu

**Krátkodobý šum** sú kolísavé zmeny základnej línie v neprítomnosti analytu. Pomer signálu k šumu sa vyjadruje ako:

$$S/N = \frac{2H}{h} \quad [9]$$

$H$  je výška píku meraná od jeho vrcholu k extrapolovanej základnej línii, ktorá sa sleduje na vzdialenosti rovné dvadsatine výšky píku,  $h$  je rozpätie šumu signálu.

**Zdnlivý počet teoretických úrovní  $N$**  vyjadruje účinnosť kolóny. Platí preň matematický vzťah:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad [10]$$

Kde  $t_R$  znamená retenčný čas a  $w_h$  je šírka píku v jeho polovičnej výške.

**Výškový ekvivalent teoretického poschodia  $H$**  slúži k porovnaniu účinnosti kolón rôznych dĺžok. Je mierou pozdĺžneho rozmiestnenia eluovanej zóny na jednotkovú mieru migrácie. Počet teoretických úrovní je proporčný k dĺžke kolóny.<sup>(14)</sup>

$$H = \frac{L}{N} \quad [11]$$

$L$  je dĺžka kolóny v metroch,  $N$  je počet teoretických úrovní.

**Faktor symetrie píku  $A_s$**  vyjadruje osovú súmernosť píku. Má akceptovateľné hodnoty od 0,8 - 1,5. Ideálna je hodnota 1,0. Pri vyššej hodnote ako 1,0 dochádza k javu zvanému chvostovaniu píkov („tailing“) a pri nižšej hodnote je pík rozmytý vpredu („fron-



ting“ píku).<sup>(4) (15)</sup> Chvostovanie vzniká keď niektoré komponenty sú pútané k stacionárnej fáze silnejšie, napríklad vznikajú vodíkové mostíky a dané molekuly zostávajú pozadu. Opačný jav (tzv. fronting), môže nastať keď niektoré molekuly zo skupiny sú spomaľované inak, ako by sa očakávalo, napríklad pri príliš veľkom množstve vzorky analytu.<sup>(21)</sup>

$$A = \frac{W_{0,05}}{2d}$$

[12]

$W_{0,05}$  označuje šírku píku v jednej dvadstine jeho výšky,  $d$  je vzdialenosť medzi kolmicou spustenou z vrcholu píku a vzostupnou časťou píku v jednej dvadstine jeho výšky.

Selektivita metódy je vyjadrená **relatívnou retenciou**  $r$ , ktorá je mierou separácie dvoch zložiek zmesi. Liekopisné články používajú nekorigovanú relatívnu retenciu  $r_G$ .

$$r_G = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

[13]

$t_{R1}, t_{R2}$  sú retenčné časy dvoch susedných píkov.

**Rozlíšenie** je kvantitatívne vyjadrenie chromatografickej separácie dvoch po sebe sa eluujúcich zložiek zmesi.

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

[14]

$w_{h1}, w_{h2}$  sú šírky píkov v polovici ich výšky,  $t_{R1}, t_{R2}$  sú retenčné časy dvoch susedných píkov.<sup>(1) (2) (3) (15)</sup>

## 3.2 Hmotnostná spektrometria v spojení s HPLC (HPLC-MS)

### 3.2.1 Charakteristika MS

Hmotnostná spektrometria sa uplatňuje hlavne ako detektor pre GC a HPLC. Spojenie HPLC-MS predstavuje silný analytický nástroj pre kvalitatívne i pre kvantitatívne hodnotenie liečiv, ich metabolitov i zlúčenín prítomných v nízkych koncentráciách. <sup>(5) (22) (23)</sup>

Výhodami MS analýzy je:

- schopnosť stanoviť molekulovú hmotnosť z ktorej je možné určiť elementárne zloženie zlúčeniny,
- identifikácia rôznych fragmentov molekuly,
- schopnosť detekovať veľmi malé koncentrácie analytov,
- vysoká citlivosť. <sup>(13)</sup>

Princíp MS spočíva v ionizácii chemických zlúčenín, čím sa generujú ionizované molekuly a molekulové fragmenty, ktoré sú následne rozdelené podľa pomeru hmotnosti a veľkosti náboja ( $m/z$ ).

Výsledné hmotnostné spektrum je závislosť množstva iónov na pomere  $m/z$ . Navyše, MS s vysokým rozlíšením a presným určením hmoty dokáže určiť elementárne zloženie jak parentnej látky tak aj iónových fragmentov. <sup>(24)</sup>

### 3.2.2 Prístrojové vybavenie MS

Na prevedenie neutrálnych molekúl analytu na nabitú časticu je potrebný **iónový zdroj**. Najčastejšie sa využíva elektrónová ionizácia (EI), ionizácia elektrosprejom (ESI), chemická ionizácia za atmosférického tlaku (APCI), a fotoionizácia za atmosférického tlaku (APPI). Elektrónová ionizácia je tvrdá ionizačná technika rozsiahlej fragmentácie prebiehajúca za vákua. Využíva sa viac v spojení s GC než s HPLC. Najviac používanou technikou pre spojenie HPLC-MS je ionizácia elektrosprejom. Je šetrnejšia, pretože prebieha pri atmosférickom tlaku. Výsledkom jemnej ionizačnej techniky sú ióny, ktoré poskytujú informácie o molekulárnej hmotnosti a štruktúre analytu. <sup>(5) (15)</sup>

**Hmotnostný analyzátor** slúži k rozdeleniu iónov v plynnej fáze podľa pomeru hmotnosti a náboja ( $m/z$ ). K tomu sa používajú analyzátory typu lineárnych iónových pascí, sférických iónových pascí, kvadrupólov, trojitých kvadrupólov analyzátorov doby letu, iónovej cyklónovej rezonancie s Fourierovou transformáciou, magnetických analyzátorov, alebo vysoko presného Orbitrapu. <sup>(15) (25)</sup>

Ióny po separácií sú zaznamenané **detektorom**. **Softvérom** sa určuje, prípadne dopočíta ich relatívna intenzita.

Nevýhodami využitia HPLC-MS je ich vysoká cena, vysoké nároky na zručnosti a skúsenosti operátora a vysoké technické nároky na mobilnú fázu, ktorej všetky zložky musia byť prchavé. <sup>(15)</sup>

### 3.3 Tenkovrstevná chromatografia (TLC)

#### 3.3.1 Charakteristika analytickej TLC

Tenkovrstevná chromatografia (TLC) je rýchlou analytickou metódou používanou na separáciu komponentov zmesí. Princípom separácie je rozdelenie jednotlivých látok medzi mobilnú fázu rozpúšťadla a stacionárnu fázu, ktorá je tvorená adsorbentom nanesenom v tenkej vrstve na **dosku** zo skla, plastu, alebo hliníkovej fólie. **Adsorbent** je z porézneho materiálu ako oxidu kremičitého, oxidu hlinitého či celulózy. Na TLC doske sa približne 1,5 cm od spodného okraja vyznačí štartovacia línia. Analyzovaná látka sa naniesie kapilárou na jedno miesto na štartovacej línii, pričom plošné prevedenie umožňuje súbežnú analýzu viacerých analytov vedľa seba. Po nanesení vzoriek sa TLC doska vloží do **vyvíjacej komory**, ktorou je zvyčajne sklenený kontajner uzavretý vekom. Komora obsahuje mobilnú fázu - **rozpúšťadlo** a celý systém je vopred nasýtený jeho parami. Z rozpúšťadiel sa používa napríklad hexán, pentán, benzín, toluén, dichlórmetán, dietyléter, ethylacetát, acetonitril, acetón, methanol, triethylamín, alebo kyselina mravčia a octová. Nakoniec sa systém zavrie vekom a mobilná fáza začne vzlínať. <sup>(13) (26)</sup>

Aby bolo možné výsledky TLC hodnotiť je potrebné jednotlivé škvrny vizualizovať. Často sa pridáva malé množstvo fluorescenčnej látky do adsorbentu. Pod UV lampou fluoreskuje celý adsorbent okrem miest, kde sa zadržal komponent, tie „zhášajú“. Využíva sa taktiež postrek TLC dosky vhodným detekčným činidlom. Po detekcii je možné stanoviť retenčný faktor ( $R_f$ ), ktorý je pomer vzdialenosti škvrny od štartu k vzdialenosti čela od štartu. Jedná sa o bezrozmernú veličinu, jej hodnoty siahajú od 0 do 1, pričom vzdialenosť čela od štartu je rovná 1. Čelom na vyvíjacej doske sa rozumie línia, ktorú vytvorilo rozpúšťadlo počas vzlínania. Keď čelo dosiahne 1-2 cm pod horný okraj dosky, analýza sa preruší a doska sa ponechá vysušiť. Podľa povahy testovaných látok sa používajú rôzne vhodné vyvíjacie sústavy. <sup>(26)</sup>

### 3.3.2 Preparatívna TLC chromatografia

Preparatívna TLC chromatografia využíva rovnaké stacionárne aj mobilné fázy ako analytická TLC. Rozdiel je predovšetkým v rozmeroch a hrúbke adsorbentu dosky. Obvykle prebieha preparatívna TLC na doskách s rozmerom 20cm × 20cm, ale aj 25cm × 50cm, s hrúbkou vrstvy adsorbentu až 3 mm. Ďalší rozdiel v porovnaní s analytickým prevedením je, že sa koncentrovaný roztok látky nanáša v súvislej vrstve čím vzniká 2 až 3 mm široký prúžok.

Preparatívnej TLC často prechádza analytická TCL, na ktorej sa odskúša vhodnosť použitia stacionárnej i mobilnej fáze. <sup>(26)</sup>

### 3.4 Úprava biologických vzoriek

Biologické vzorky sú komplikované zmesi organických a anorganických látok. Prítomné zlúčeniny sú napríklad voda, bielkoviny, sacharidy, lipidy, soli a ďalšie. <sup>(15)</sup> Medzi najčastejšie analyzované materiály patrí plazma, moč, sérum, krv, mozgomiešny mok alebo stolica.

Pre úpravu vzoriek z biologického materiálu sa najčastejšie využívajú tieto techniky:

- **deproteinácia**
  - precipitačná deproteinácia
  - ultrafiltrácia
  - enzýmová deproteinácia
- **extrakcia kvapalina- kvapalina (LLE)**
- **extrakcia na pevnej fáze (SPE).** <sup>(15)</sup>

Vývoj techník prebieha smerom k minimalizácií a automatizácií. SPE extrakcia umožňuje oboje. Navyše má dobrú výťažnosť a reprodukovateľnosť. Práve preto je najčastejšie využívanou metódou pre úpravu vzoriek pred HPLC analýzou. <sup>(24)</sup>

#### SPE extrakcia

Komponenty analyzovaného roztoku sa pri SPE extrakcii zadržiavajú v závislosti na ich charaktere a type použitého sorbentu. Podľa vlastností analytu sa zvolí vhodný sorbent tak, aby došlo k retencii balastných látok na sorbente, alebo naopak, k zadržiavaniu analytu. V prvom prípade sa vymýva analyt, v druhom prípade sa vymývajú nečistoty z biologického materiálu a až následne, vhodne zvoleným rozpúšťadlom, dôjde k elúcií analytu. <sup>(27) (28)</sup>

Typický SPE sorbent pozostáva z 40-60 µm veľkých častíc silikagélu, na ktoré je naviazaný uhľovodíkový zvyšok ako butyl, oktyl, oktadecyl, cyklohexyl, alebo fenyl. <sup>(24)</sup> Sorbent je naplnený do polypropylenového obalu minikolónky, tvarom pripomínajúcom injekčnú striekačku. Sústava SPE je napojená na vývevu a celý proces extrakcie prebieha pri zníženom tlaku. Nasledovný princíp extrakcie uvádza prípad, pri ktorom dochádza k zadržiavaniu analytu, pričom balastné látky sú vymývané.

1. aktivácia sorbentu,
2. nanosenie vzorky,
3. vymytie balastov,
4. izolácia analytu.

Pevná fáza sorbentu sa najprv musí aktivovať premytím vhodným rozpúšťadlom (zvyčajne metanolom, alebo acetonitrilom), ktorý navlhčí výplňový materiál a solvuje funkčné skupiny sorbentu. Po aktivácii sorbentu sa kolónka premyje vodnou fázou za účelom odstránenia zvyškov organického rozpúšťadla, ktoré by mohlo zapríčiniť precipitáciu proteínov prítomných vo vzorku, a tým upchanie SPE kolónky. Nanesie sa analyt a následne vodou alebo vhodným pufrom zmyjú balastné látky z biologického materiálu. Nakoniec sa organickým rozpúšťadlom eluuje finálny roztok vzorku.<sup>(27) (28)</sup>

### 3.5 Vybrané parametre validácie bioanalytických metód

Za základné smernice pre proces validácie sa považujú:

- Dokument amerického Úradu pre lieky a potraviny (FDA): Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation<sup>(18)</sup>
- Dokument Európskej liekovej agentúry (EMA): Guideline on validation of bioanalytical methods<sup>(19)</sup>

Hlavným cieľom validácie je zaistiť že metóda je schopná poskytovať správne a spoľahlivé výsledky pri analýzach, pre ktoré je určená. Preto je validácia dôležitá pre každý vývoj metódy a mala by byť opakovaná keď sa metóda mení.<sup>(18) (19) (29)</sup>

Základné parametre pre validáciu bioanalytických metód sú správnosť, selektivita, presnosť, kalibračná krivka, stabilita a kvantifikačný limit. Doplnujúce parametre zahŕňajú určenie spodného limitu detekcie, výťažnosť, opakovateľnosti a robustnosti.<sup>(19) (30)</sup>

**Správnosť (accuracy)** analytickej metódy popisuje blízkosť priemeru hodnôt získaných touto metódou k skutočnej koncentrácii analytu. Správnosť je stanovená opakovanými meraniami vzoriek obsahujúcich známe množstvo analytu. **Selektivita (selectivity)** je schopnosť analytickej metódy odlišovať a kvantifikovať analyt za prítomnosti iných komponentov vo vzorke. Pre selektivitu by mali byť premerané slepé vzorky a selektivita metódy by mala byť potvrdená meraním vzorky so spodným kvantifikačným limitom.<sup>(18) (19) (31)</sup>

**Presnosť (precision)** popisuje vzájomnú blízkosť opakovaných meraní analytu. Matematickým vyjadrením presnosti je relatívna smerodajná odchýlka RSD (variačný koeficient CV)<sup>(18) (19)</sup>:

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

[15]



$\bar{x}$  je priemer nameraných hodnôt a  $SD$  je smerodajná odchýlka pre počet jednotlivých meraní a ich jednotlivé výsledky  $x_i$  definovaná ako:

$$SD = \frac{\sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}}{n - 1}$$

[16]

**Kalibračná krivka (calibration curve)** je vzťah medzi odpoveďou prístroja a známou koncentráciou analytu (viz vzorec [8], kapitola 3.1.4). **Spodný limit kvantifikácie (lower limit of quantification)** je najnižšia koncentrácia analytu, ktorú môže bioanalytická metóda spoľahlivo odlíšiť od šumu pozadia. **Výťažnosť (recovery)** analytu v teste je odpoveď detektoru získaná pridaním určitého množstva analytu do biologického materiálu, následne extrahovanom a porovnanom s odpoveďou detektoru pre skutočnú koncentráciu čistého štandardu. <sup>(18)</sup> <sup>(19)</sup>

## 3.6 Biokompatibilné chelátory železa

### 3.6.1 Železo a jeho úloha v protinádorovej terapii

Nádorové onemocnenia dnes patria medzi najčastejšie príčiny úmrtia. Predmetom mnohých štúdií je práve ich výskum a nájdenie vhodnej terapie.

Železo, okrem iného, je nenahraditeľné pre proliferáciu normálnych, tak i rakovinových buniek. Pri nedostatku železa, bunky nedokážu prejsť z G<sub>1</sub> fázy do S fázy bunecného cyklu.<sup>(32)</sup> Schopnosť zastaviť rast rakovinových buniek pomocou chelátorov železa bola preto priznávaná najmä zamedzeniu dostupnosti železa bunke a následne inhibíciou RNR. Významná je aj redoxná aktivita železa v komplexoch s thiosemikarbazónmi, ktorá vedie k tvorbe ROS. V malej miere k účinku prispieva vlastná redoxná aktivita voľného železa.<sup>(33)</sup>

V poslednej dobe však existujú dohady že sa jedná iba o zlomok účinkov a v skutočnosti je za výsledný efekt zodpovedná kaskáda bunecných reakcií spôsobených vychytávaním železa.<sup>(34)</sup> Nedávno sa začal aktívne skúmať účinok chelátorov na transkripciu génov. Nedostatkom železa sú značne ovplyvnené gény ako napríklad tumor supresívny gén p53, p21<sup>CIP1/WAF1</sup>, cyklíny, cyklín-dependentné kinázy a HIF-1 $\alpha$ . Najnovšie výskumy ukázali aj vplyv na tieto gény: BNIP3, CITED2, EGR1, ERO1L, GDF15, HIG2, PNR1, PPM1D.<sup>(34)</sup>

Mechanizmus účinku chelátorov železa je teda komplexný. V prvom rade ide o selektívnu chelatáciu železa, čím bunky prichádzajú o podstatnú súčasť mnohých biomolekúl, a obmedzujú sa ich bunecné fyziologické funkcie ako syntéza DNA a mitochondriálna respirácia. Najviac zasiahnuté sú proliferujúce rakovinové bunky, keďže ich metabolizmus je niekoľkokrát akcelerovaný v porovnaní s normálnymi bunkami.

### 3.6.2 Vývoj chelátorov železa

Chelatácia iónov železa v živých organizmoch je v súčasnosti jednou z progresívnych stratégií vo výskume a vývoji nových protinádorových liečiv.<sup>(35) (36)</sup> Ich účinnosť bola doložená v experimentálnych štúdiách a dokonca aj v klinických experimentoch.<sup>(37) (38)</sup>  
(39)

Štruktúra chelátorov umožňuje tvorbu komplexov s viacmocnými iónmi pomocou koordinačných väzieb. Prvotný výskum chelátorov železa bol zameraný hlavne pre ich použitie v terapii prebytku železa (iron overload).<sup>(40) (41)</sup> Touto poruchou trpia pacienti s genetickou poruchou vstrebávania železa, hemochromatózou, ale aj napríklad pacienti s defektom syntézy hemoglobínu, ktorí dostávajú pravidelnú transfúziu krvi. Nadbytok železa je skladovaný hlavne v pečeni, pankrease, ale aj srdci a vedie k zvýšenému podielu voľného železa. V plazme voľné železo prechádza stavom medzi oxidovanou a redukovanou formou. Takto pôsobí ako katalyzátor a produkuje množstvo hydroxylovaných radikálov vo Fentonovej reakcii<sup>(41)</sup>, ktoré sú zodpovedné za nevratné poškodenie endogénnych zlúčenín ako napríklad lipidov, proteínov a nukleových kyselín. Výsledkom je zlyhanie týchto orgánov a následne smrť.<sup>(42) (43)</sup>



#### *Fentonová reakcia vedúca k vzniku hydroxylových radikálov*

Protinádorové pôsobenie chelátorov železa bolo po prvý krát popísané u deferoxaminu (DFO), následne bol vyvinutý thiosemikarbazónový analóg Triapin (3-aminopyridin-2-karboxaldehydthiosemikarbazón), a ďalej deriváty arylhydrazónu, kde je vedúcou zlúčeninou látka pyridoxal isonikotinoyl hydrazón (PIH).<sup>(38)</sup> Počas výskumu chelátorov sa identifikovala štruktúra 2-pyridylketónu ako dôležitá pre protinádorovú aktivitu arylhydrazónov (séria PKIH) a thiosemikarbazónov (séria DpT).<sup>(44)</sup>

Rozdiely v štruktúre chelátorov ovplyvňujú tvorbu komplexov so železom, ktoré podporujú alebo zabraňujú tvorbe ROS v bunke. Kým prooxidatívne vlastnosti thiosemikarbazónov sú užitočné pre dizajn perspektívnych protirakovinových liečiv, antioxidačná povaha DFO je využívaná najmä pri terapii prebytku železa. <sup>(45)</sup>

**DFO**, produkovaný baktériou *Streptomyces pilosus*, preukázateľne spomaľuje nádorový rast. <sup>(45)</sup> Jeho aktivita je však obmedzená pre jeho krátky biologický polčas a hydrofilný charakter, ktorý je dôvodom slabej membránovej permeability a absorpcie. <sup>(38)</sup> <sup>(40)</sup> Podanie je náročné, vyžaduje dlhé periódy subkutánnej infúzie a to znižuje compliance pacientov. <sup>(45)</sup> Preto, ďalší vývoj bol zameraný na zvýšenie lipofility a membránovej permeability chelátorov. <sup>(40)</sup>

**Triapin (3-aminopyridin-2-karboxaldehyd thiosemikarbazón)** inhibuje enzým RNR. Bolo preukázané <sup>(46)</sup>, že železitý komplex Triapinu sa redukuje na reaktívny komplex železnatý. Vznik železnatého komplexu podnecuje tvorbu ROS a teda zničenie samotného RNR enzýmu. <sup>(42)</sup> Triapin je v súčasnosti predmetom klinických štúdií v terapii solídnych tumorov, metastázujúcej rakovine prsníkov, či leukémií. <sup>(41)</sup>

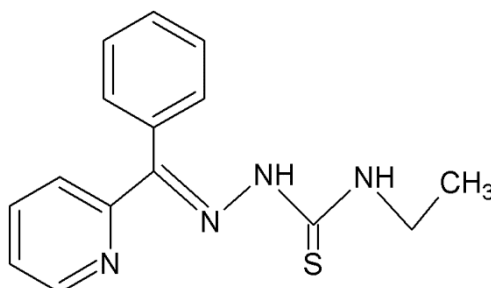
**PIH** je možné pripraviť Schiffovou kondenzáciou pyridoxalu s hydrazidom kyseliny isonikotínovej. PIH je účinný perorálne a s vysokou účinnosťou preniká do tkanív. Znižuje riziko kardiomyopatií spojených s Friedriechovou ataxiou. <sup>(45)</sup>

Analóg PIH, **SIH** vznikol nahradením pyridoxalu viacej hydrofóbnou salicylaldehydovou skupinou. SIH vykazuje protektívny účinok na srdce, bráni jeho oxidatívne poškodeniu. Mechanizmom účinku je redukcia tvorby ROS viazaním intracelulárneho železa a tým zabránenie jeho účasti vo Fentonovej reakcii. Napriek sľubným výsledkom, SIH má relatívne krátky biologický poločas a je náchylný na hydrolýzu. <sup>(45)</sup>

Séria **DpT** vykazuje vyššiu *in vitro* stabilitu v plazme v porovnaní s arylhydrazónovými predchodcami. Ich cytotoxicita je pripisovaná chelatácií železa vedúcej k inhibícii RNR, enzýmu obsahujúceho železo. K účinku prispieva redoxná aktivita železa a jeho vplyv na genovú transkripciu. <sup>(38)</sup> Ďalšie obmeny štruktúry viedli k nahradeniu 2-pyridyl štruktúry za **2-benzoylpyridin (BpT)** a odhalili ich vyššiu antitumorálnu aktivitu ako u ich

DpT predchodcov. Komplexy série BpT so železom vykazujú nižší redoxný potenciál než adekvátne komplexy DpT, čím sa zvyrazňuje ich redoxná aktivita. <sup>(37)</sup> <sup>(47)</sup> <sup>(48)</sup>

### 3.6.3 Bp4eT



Obrázok 1: štruktúra Bp4eT

2-benzoylpyridin-4-etyl-3-thiosemikarbazón, Bp4eT (Obrázok 1), ktorého analytické hodnotenie je predmetom tejto práce, je novým potenciálnym protirakovinovým liečivom z rodiny thiosemikarbazónových chelátorov železa. Tieto látky navrhnuté profesorom Richardsonom (University of Sydney, Austrália) vykazujú unikátny mechanizmus účinku. Experimenty *in vitro* aj *in vivo* odhalili vysokú antineoplastickú účinnosť BpT chelátorov. <sup>(37)</sup> Podanie týchto zlúčenín myšiam neindukovalo celkový nedostatok železa, nebolo ani pozorované žiadne narušenie hematologických a biochemických ukazovateľov. <sup>(38)</sup> Vzhľadom na nízke hodnoty  $IC_{50}$  je možné podať Bp4eT v nízkych dávkach. <sup>(45)</sup> Vďaka svojej vysokej antiproliferatívnej účinnosti, selektivite účinku a nízkej akútnej aj chronickej toxicite bol 2-benzoylpyridin-4etyl-3-thiosemikarbazón vybraný ako vedúca zlúčenina pre pilotné štúdie biotransformácie.

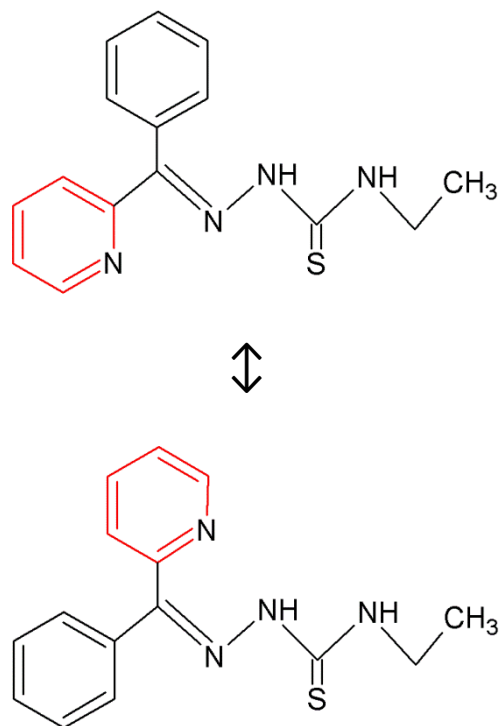
Fyzikálno-chemické vlastnosti:

- molekulová hmotnosť  $M_m = 284$  g/mol, <sup>(44)</sup>
- $\log P = 4,01$ , <sup>(49)</sup>
- vyskytuje sa vo forme interkonvertibilných izomérov *Z/E*, pričom v pevnej fáze prevažuje *Z* izomér a v kvapalnej fázy oba izoméry koexistujú,
- rozpustnosť vo vodných roztokoch je slabá. K roztoku Bp4eT je potrebný prídavok kosolventov. Napríklad zmes 1:1 PEG 300/0,14 mol/l

fyziológického roztoku výrazne zvýšila rozpustnosť a liečivo sa tak môže aplikovať intravenózne.<sup>(44)</sup>

Pre nové thiosemikarbazónové chelátory ale neboli doposiaľ popísané farmakokinetické vlastnosti. Pilotné štúdie, vedené profesorom Richardsonom (nepublikované data) naznačujú pomerne rýchlu elimináciu liečiva z organizmu. Z *in vitro* výzkumov prevedených na našej fakulte<sup>(49)</sup> je známe, že sa látka metabolizuje oxidáciou a výsledkom sú dva metabolity, pričom jeden z nich sa vyskytuje vo forme dvoch izomérov. Preto ďalším krokom je identifikácia týchto metabolitov.<sup>(37)</sup>

Kvantitatívna analýza Bp4eT je zložitá, hlavne pre skutočnosť, že existuje ako interkonvertibilný Z a E izomér (Obrázok 2). Analytický štandard E izoméru nie je dostupný a izolácia alebo syntéza je znemožnená jeho rýchlym prechodom v druhý izomér. Analýza na DAD detektore ukázala že každý izomér má absorpčné maximum v inej vlnovej dĺžke. Práve to robí celkovú kvantifikáciu oboch izomérov analyticky náročnou. Alternatívnou metódou kvantifikácie bolo využitie hmotnostnej detekcie.<sup>(22) (44)</sup>



Obrázok 2: štruktúra E a Z izoméru Bp4eT

### 3.6.4 Štúdium metabolizmu liečiv

Zvláštnu pozornosť počas výskumu a vývoja nových liečiv si vyžaduje štúdium eliminácie liečiva. Parentná látka sa môže vylučovať v nezmenenej forme, vtedy hovoríme o exkrécii, alebo môže podstúpiť premenu, tzv. biotransformáciu na metabolity.

Základným cieľom metabolizmu je premena lipofilných molekúl na molekuly s nižšou lipofilitou. Lipofilné látky s ľahkosťou prechádzajú membránami a sú schopné interakcie v mieste účinku, kým v procese metabolizmu sa stávajú hydrofilnejšie a to vedie k vylúčeniu najmä cez močové cesty.<sup>(24)</sup>

Prvá fáza metabolizmu materskej molekuly najčastejšie pozostáva z oxidácie, hydrolyzy, redukcie a hydratácie. Najdôležitejšou skupinou enzýmov tejto fázy metabolizmu u zvierat a ľudí sú cytochrómy P-450, ktoré sú zodpovedné za zavádzanie funkčných skupín ako OH, COOH, NH<sub>2</sub> a SH do molekuly liečiva. Tieto skupiny umožňujú odstránenie liečiva z tela, buď priamo, alebo cez konjugáciu, ktorá je hlavným procesom v druhej fáze metabolizmu. V oboch prípadoch sa stáva molekula viac polárnejšia, čím sa uľahčí jej eliminácia z tela.<sup>(24)</sup>

Hodnotenie metabolizmu *in vitro* zahrňuje najmä použitie preparátov pečene, ktoré sa odlišujú stupňom bunečnej integrity. Môžu sa použiť bunečné rezy, S9 mikrozomálna a cytosolická frakcia.<sup>(24)</sup> Identifikácia metabolizmu liečiv bola v minulosti založená na porovnávaní retenčných časov z ultrafialových (UV) spektrálnych dát a vysokoúčinnnej kvapalnej chromatografie (HPLC) izolovaného neznámeho metabolitu zo syntetizovanými štandardmi. Hmotnostná spektrometria (HPLC-MS) má schopnosť separovať molekuly s minimálnym štruktúrnym rozdielom a preto je významným nástrojom identifikácie metabolitov.<sup>(50)</sup>

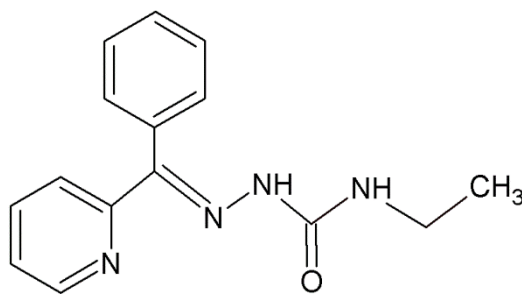
Získanie molekulárnej hmotnosti metabolitov je zvyčajne prvým a podstatným krokom procesu identifikácie.<sup>(24) (25)</sup> Chemické štruktúry metabolitov sú navrhnuté na základe MS fragmentácie. Konečná identita je potvrdená prípravou chemických štandardov potenciálnych metabolitov a napokon prebehne ich analýza pomocou NMR a IČ spektrometrie.

### 3.6.5 Metabolismus Bp4eT

Z chemickej štruktúry Bp4eT sa dá predpokladať jeho konverzia na hydrofilný metabolit. V prvej fáze metabolizmu by mohlo dochádzať k odštiepeniu etylovej skupiny, prípadne k vzniku N-oxidu. Okrem toho by mohlo dochádzať k štiepeniu iminovej väzby za vzniku príslušného thiosemikarbazidu a aromatického ketónu. V druhej fáze by mohlo dôjsť ku konjugácii s kyselinou glukuronovou alebo sírovou. <sup>(44)</sup>

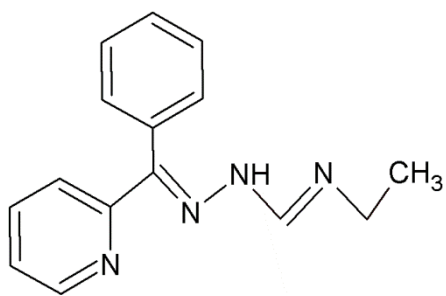
Na základe *in vitro* inkubácie s ľudskými a potkaními hepatocytárnymi mikrozómami a cytosolom (100 $\mu$ M, 37 °C, 60 min) a následnej HPLC-MS analýzy na kolóne Discovery® HS C18 (75  $\times$  4.6 mm, 3  $\mu$ m) boli navrhnuté možné metabolity vznikajúce oxidáciou thiokarbonylovej skupiny. <sup>(44)</sup> <sup>(49)</sup> Pri analýze zmesi po oxidácii Bp4eT boli detekované dva metabolity. Pre metabolit s hmotou  $m/z$  269, ktorý sa vyskytuje vo dvoch geometrických izoméroch (Obrázok 3), bol navrhnutý názov 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-semikarbazón (ďalej označovaný ako semikarbazón). Metabolit s hmotou  $m/z$  253 (Obrázok 4) bol nazvaný ako N<sup>3</sup>-ethyl-N<sup>1</sup>-[fenyl(pyridin-2-yl)methylen]-formamidrazón (ďalej referovaný ako amidrazón). <sup>(44)</sup> Oba metabolity boli nájdené aj v *in vivo* experimentoch, v plazme aj moči potkanov.

Následné určenie štruktúry štandardov bolo vykonané pomocou NMR a IR spektier.



**Obrázok 3: oxidačný metabolit Bp4eT semikarbazón ( $m/z$  269), vyskytujúci sa vo dvoch geometrických izoméroch**





Obrázok 4: oxidačný metabolit Bp4eT amidrazón ( $m/z$  253)

## **4 HLAVNÉ CIELE**

- I. Optimalizácia HPLC podmienok pre separáciu Bp4eT a jeho hlavných metabolitov (semikarbazónového metabolitu a amidrazónu)*
- II. Výber vhodného vnútorného štandardu pre kvantifikáciu Bp4eT*
- III. Príprava a izolácia štandardov metabolitov Bp4eT pomocou TLC*

## 5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 5.1 Chemikálie a materiály

2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazón (Bp4eT),  
di(2-pyridylketón)-3-thiosemikarbazón (DpT),  
di(2-pyridylketón)-4-metyl-3-thiosemikarbazón (Dp4mT),  
di(2-pyridylketón)-4-etyl-3-thiosemikarbazón (Dp4eT),  
a di(2-pyridylketón)-4-fenyl-3-thiosemikarbazón (Dp4pT) boli získane od Prof. Richardsona (Sydney, Austrália).

Methanol, Merck, Nemecko.

Ethanol, Merck, Nemecko.

Triethylamin, Sigma- Aldrich, Nemecko.

Acetonitril, Merck, Nemecko.

Diethyléter, Sigma- Aldrich, Nemecko.

Tetrahydrofurán, Sigma-Aldrich, Nemecko.

Ethylacetát, Lachema, Česká Republika.

Chloroform, Penta, Česká Republika.

Acetón, Penta, Česká Republika.

Benzín, Lachema, Česká Republika.

Toluén, Penta, Česká Republika.

Mravenčan amónny, Sigma- Aldrich, Nemecko.

Disodná soľ kyseliny ethyléndiamintetraoctovej (EDTA), Sigma- Aldrich, Nemecko.

Čistená voda.

Použité chemikálie boli analytickej čistoty (p.a.).

Biologický materiál: prázdna králičia plazma- ZOO Servis, Dvůr Králové, Česká Republika.

## 5.2 Inštrumentálne vybavenie

### 5.2.1 HPLC, MS, SPE

Pre väčšinu experimentov bola použitá nasledujúca HPLC zostava: Shimadzu Prominence System (Duisburg, Nemecko), ktorý pozostával z DGU-20A3 degaséru, dvoch LC-20AD púmp, SIL-20AC autosampléru, CTO-20AC priestoru pre kolónu, a CBM 20A komunikačného modulu pripojeného na DAD detektor. Všetky data boli spracované v LabSolution softvéri firmy Shimadzu.

Pri overovaní identity izolovaných štandardov metabolitov bola HPLC zostava spojená online s MS detektorom umožňujúcim ionizáciu ESI a APCI a analýzu v iónovej pasci (LCQ Advantage MAX, ThermoScientific, USA).

Spracovanie biologického materiálu prebiehalo na membránovej vákuovej výveve VIPREP SPE (Supelco, Nemecko) a na kolónke DISCOVERY, DSC-PH 1mg/1ml (Supelco, Nemecko).

### 5.2.2 TLC materiál

Pre úvodné testy boli použité dosky hliníkovej fólie Silicagel 60 F<sub>254</sub>, 5cm × 10cm (Merck, Nemecko). Na následnú separáciu oxidačných produktov sme použili sklenené dosky s naneseným silikagélom Uniplate Silicagel GF, 20cm × 20cm (Analtech, Newark, USA).

Vyvíjanie chromatogramu prebiehalo v sklenených komorách uzavretých vekom.

### 5.2.3 Ďalšie zariadenia a pomôcky

Analytické váhy, Helago, Česká Republika.

Centrifuga, MLW Trigorplus, Nemecko.

Trepacie zariadenie, Unimed, Česká Republika.

UV lampa 254 nm, Camag, Švajčiarsko.

Ultrazvuková vaňa K10, Kraitex, Slovenská Republika.

Automatické pipety, Eppendorf, Nemecko.

### 5.3 Príprava roztokov

Zásobné roztoky (1mg/ml) Bp4eT a interných štandardov: DpT, Dp4eT, Dp4mT, Dp4pT boli pripravené rozpustením odpovedajúceho množstva pevnej substancie v methanole. Pracovné roztoky pre optimalizáciu podmienok HPLC (0,02 mg/ml) boli pripravené zriedením zásobných roztokov acetonitrilom a vodou v pomere 1:1.

Vzorky pred MS analýzu boli pripravené zriedením zásobného roztoku a zmesou acetonitrilu a vody (1:1) na výslednú koncentráciu 0,001 mg/ml.

Prvotná TLC analýza prebiehala s pracovnými roztokmi Bp4eT o koncentrácií 2 mg/ml. Zmes oxidačných produktov bola taktiež pripravovaná z tohto pracovného roztoku. Pre finálnu TLC analýzu boli používané pracovné roztoky Bp4eT koncentrácie 6 mg/ml.

## 5.4 Optimalizácia oxidačných podmienok

V úvodných analýzach bola zmes oxidačných produktov získaná zmiešaním zásobného roztoku Bp4eT s rovnakým množstvom 30% peroxidu vodíka. Oxidačný proces prebiehal 40 minút a zmes bola po nariedení na koncentráciu 0,02 mg/ml oxidačného metabolitu Bp4eT analyzovaná pomocou HPLC. Neskôr bol skúmaný vplyv času oxidácie (5, 10 a 30 min) a koncentrácie peroxidu vodíka (1%, 3% a 30%) na výsledné zloženie a pomer jednotlivých oxidačných produktov v zmesi.

Optimálna oxidácia bola prevedená zmiešaním 200  $\mu$ l Bp4eT (2 mg/ml) a rovnakého množstva 3% peroxidu vodíka a proces oxidácie trval 10 minút.

Bol preverený vplyv zvyškov peroxidu vodíka na chromatografický záznam. Pre tento účel boli po prebehnutých oxidáciách s peroxidom vodíka (po dobu 5 minút) oxidačné produkty vytrepané do toluénu. Na vytrepenie 0,5 ml oxidačného produktu bolo potrebné 1 ml toluénu. Na oddelenie vrstiev bola použitá centrifugácia pri otáčkach 10 000 x g po dobu 10 minút. Prídavok toluénu, trepanie a centrifugácia boli prevedené ešte raz. Výtrepky z hornej časti sa spojili a vzorka sa zakoncentrovala odfúkaním dusíkom do sucha. Následne bola pripravená testovacia vzorka pre analýzu na HPLC rozpustením suchej zmesi oxidačných produktov v zmesi acetonitril/voda (1:1).



## 5.5 Optimalizácia chromatografických podmienok pre analýzu Bp4eT a jeho metabolitov

### 5.5.1 HPLC-UV

#### Stacionárna fáza

Počas optimalizácie chromatografických podmienok boli testované kolóny:

- Discovery® HS C18 (75 × 4.6 mm, 3 µm), Sigma Aldrich, Nemecko.
- Synergi Polar® RP (150 x 3mm, 4 µm), Phenomenex, USA.

#### Mobilná fáza

Pri vývoji metódy bola zvolená izokratická elúcia. Skúmané boli rôzne kombinácie zloženia mobilnej fázy. Anorganickú časť reprezentoval 2 mmol/l **mravenčan amónny** bez úpravy pH (zložka A), pričom organická časť mobilnej fázy pozostávala zo zmesi **acetonitrilu a methanolu** (zložka B) .

Boli testované rôzne pomery miešania anorganickej a organickej zložky mobilnej fázy a menil sa aj pomer zloženia organickej fázy. Anorganická zložka (mravenčan amónny) sa nemenila.

Na kolóne C18 boli testované nasledujúce mobilné fázy:

- mravenčan amónny (2 mmol/l): acetonitril 50:50 (v/v),
- mravenčan amónny (2 mmol/l): zmes acetonitril/methanol (1:1); 40:60 (v/v),
- mravenčan amónny (2 mmol/l): zmes acetonitril/methanol (1:1); 43:57 (v/v).

Na kolóne Polar boli skúšané zmesi:

- mravenčan amónny (2 mmol/l): acetonitril 50:50 (v/v),
- mravenčan amónny (2 mmol/l): zmes acetonitril/methanol (1:1); 40:60 (v/v),
- mravenčan amónny (2 mmol/l): zmes acetonitril/methanol (1:1); 43:57 (v/v),
- mravenčan amónny (2 mmol/l): zmes acetonitril/methanol (1:3); 40:60 (v/v).

### **Vybrané podmienky pre HPLC analýzu Bp4eT a jeho metabolitov**

Pre HPLC-UV bola vybraná stacionárna fáza Discovery® HS C18 (75 × 4.6 mm, 3 µm) a mobilná fáza v zložení: mravenčan amónny (2 mmol/l): zmes acetonitril/methanol (1:1); 43:57 (v/v).

Týmito podmienkami bolo možné separovať jednotlivé zložky zmesi po oxidácií Bp4eT.

#### Ostatné chromatografické podmienky

Teplota v autosampleri bola 25°C, v prípade analýzy biologického materiálu bola teplota 20°C. Vzorky analytov boli nastrekované v množstve 20 µl. Pred každým nástrekom analytu bola nastrieknutá EDTA (20 mmol/l), taktiež v množstve 20 µl. Prietok mobilnej fázy bol 0,3 ml/min.

Detekcia prebiehala v rozsahu vlnových dĺžok 190 nm- 400 nm. Signály boli vyhodnocované pri vlnovej dĺžke 319 nm.

### **5.5.2 HPLC-MS**

Pre HPLC-MS analýzu bola použitá rovnaká stacionárna fáza a rovnaké zloženie mobilnej fázy ako v prípade HPLC-UV analýzy. Ionizácia bola prevedená elektrosprejom (ESI). MS data boli získané v pozitívnom móde za využitia plného skenovania (100-800 m/z).

### **5.5.3 TLC separácia metabolitov Bp4eT**

Pre pilotné experimenty bola použitá hliníková doska. Na základnú líniu boli nanosené tri vzorky: roztok Bp4eT, slepá vzorka a zmes po oxidácií Bp4eT. Ako pracovný roztok bol použitý koncentrovanejší roztok Bp4eT (2 mg/ml) rozpustený v ethanole (96%). Slepá vzorka bola pripravená zmiešaním 200 µl peroxidu vodíka 3% a 200 µl ethanolu (96%). Nanesené bolo množstvo 60 µl oxidačnej zmesi a z ostatných vzoriek 30 µl pomocou kapiláry. Vyvíjanie prebiehalo po dobu cca 10 minút.

## Mobilné fázy

Z mobilných fáz boli použité zmesi chloroformu, toluénu, triethylamínu, benzínu, ethylacetátu a tetrahydrofuránu v rôznych pomeroch aby boli dosiahnuté najlepšie výsledky separácie. Zmesi mobilných fáz boli napríklad:

- chloroform/toluénu/triethylamínu v pomere 8:8:1 (v/v/v),
- benzín/ethylacetát v pomere 2:1 (v/v),
- benzín/ethylacetát/triethylamín 2:1:0,174 (v/v/v),
- chloroform/tetrahydrofurán 20:1 (v/v),
- benzín/ethylacetát/triethylamín 1:1:0,116 (v/v/v),
- toluén/tetrahydrofurán 20:1 (v/v),
- chloroform/tetrahydrofurán 20:3 (v/v),
- benzín/acetón 2:1 (v/v),
- chloroform/toluén/triethylamín 11:5:1 (v/v/v),
- methanol/toluén/triethylamín 4:4:1 (v/v/v),
- chloroform/toluén/triethylamín 4:4:1 (v/v/v).

## Vyvinuté podmienky pre TLC separáciu štandardov metabolitov

Konečná separácia štandardov metabolitov prebiehala na preparatívnej sklenenej TLC doske. Zmes oxidačných produktov bola pripravená zmiešaním Bp4eT (6mg/ml) s 3% peroxidom vodíka a ponechaním po dobu 10 minút. Na základnú líniu boli rovnomerne aplikované 2 ml tejto zmesi. Chromatografická sústava bola vyvíjaná asi 45 minút. Ako finálna mobilná fáza pre TLC izoláciu štandardov metabolitov bola zvolená mobilná fáza v zložení **chloroform/toluén/triethylamín v pomere 4:4:1 (v/v/v)**.

#### 5.5.4 TLC izolácia chemických štandardov oxidácie Bp4eT

TLC dosky boli vizualizované pod UV svetlom pri 254 nm. Spodná časť škvry s retenčným faktorom  $R_f = 0,32$  bola zoškrabaná a rozpustená v zmesi acetonitril/voda 1:1 (v/v). Následne prebehla centrifugácia pri otáčkach 10 000 x g po dobu 10 minút. Silikagél z dosky bol usadený na dne a vrchná vrstva obsahujúca oxidačný produkt bola odobraná. Vysušením na vákuovej odparke bolo získané dostatočné množstvo chemického štandardu oxidácie Bp4eT amidrazónu s hmotou  $m/z$  253.

Metodika bola opakovaná pre škvry s retenčným faktorom  $R_f = 0,39$  a  $0,42$ , pričom po zoškrabaní, centrifugácií, odobraní vrchných vrstiev a ich vysušení boli získané štandardy jednotlivých izomérov semikarbazónu s hmotou  $m/z$  269.

Pre získanie väčšieho množstva chemických štandardov oxidácie Bp4eT bola izolácia prevedená na preparatívnej sklenenej TLC doske. Bol použitý rovnaký postup ako v prípade analytického prevedenia TLC. Zoškrabávané boli celé pásy s retenčnými faktormi 0,68; 0,78 a 0,84.

Potvrdenie štruktúry bolo prevedené pomocou fragmentov na MS, a konečná identifikácia prebehla na Katedre anorganickej a organickej chémie (UK, Hradec Králové) pomocou NMR a IČ spektier.

## 5.6 Opakovateľnosť SPE extrakcie pre Bp4eT a vnútorný štandard

Pre SPE extrakciu boli použité pracovné roztoky Bp4eT (2 mg/ml) a vnútorného štandardu Dp4pT (1 mg/ml) a prázdna králičia plazma. Pracovné roztoky boli pripravené rozpustením odpovedajúceho množstva pevnej substancie v acetonitrile. Vzorky pre SPE extrakciu boli pripravené tak, že do 142,5  $\mu$ l prázdnej plazmy sme pridali 7,5  $\mu$ l pracovného roztoku Bp4eT a 7,5  $\mu$ l pracovného roztoku vnútorného štandardu a výsledná koncentrácia Bp4eT bola 100  $\mu$ g/ml a Dp4pT 50  $\mu$ g/ml.

### 5.6.1 Prevedenie testu opakovateľnosti SPE analýzy

Extrakcia na pevnej fáze prebiehala následovne. Boli použité 1 ml SPE kolónky s fenylovou stacionárnou fázou. Na aktiváciu sorbentu bol použitý 1,0 ml methanolu, a následne 2 ml 2 mmol/l roztoku EDTA vo vode. Potom bola na kolónku nanosená vzorka. Nenaviazané zvyšky balastov boli vymyté použitím 1 ml roztoku 2 mmol/l EDTA, a nakoniec bola eluovaná vzorka analytu použitím 1 ml methanolu.

Eluent bol následne zakoncentrovaný odfúkaním rozpúšťadla plynným dusíkom. Pevný zvyšok bol rozpustený v 100  $\mu$ l zmesi acetonitril/voda 1:1 (v/v) a ďalej analyzovaný na HPLC-UV za použitia chromatografických podmienok popísaných v kapitole 5.5.1. Plochy pod píkmi boli integrované a opakovateľnosť metódy vyjadrená relatívnou smerodajnou odchýlkou (RSD).<sup>(18) (19)</sup>

Smerodajná odchýlka bola určená ako pomer plôch pod píkom oboch izomérov Bp4eT k ploche pod píkom Dp4pT. Plocha pod píkmí izomérov Bp4eT bola integrovaná pri vlnovej dĺžke 330 nm a jednotlivé plochy oboch izomérov sčítané. Plocha pod píkom pre Dp4pT bola odčítaná pri vlnovej dĺžke jeho maxima, teda 337 nm.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 6.1 Vývoj chromatografických podmienok pre analýzu Bp4eT a jeho metabolitov

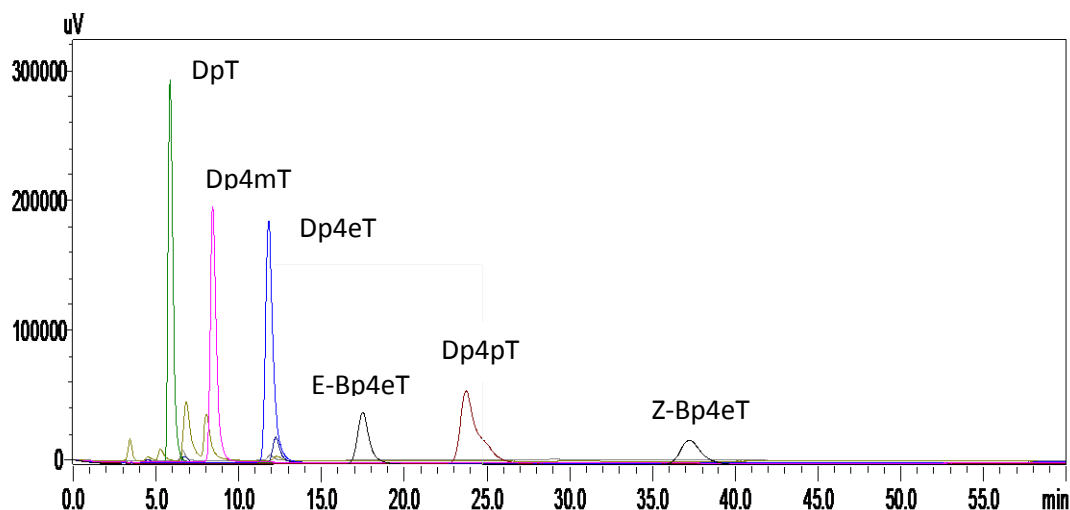
Táto štúdia bola zameraná na vývoj HPLC podmienok a analytické hodnotenie nového potenciálneho antiproliferatívneho liečiva Bp4eT a jeho metabolitov.

Pri vývoji HPLC metódy bolo možné vychádzať zo štúdie Stariat, J.; Kovaříková, P.; Klimeš, J.; Kalinowski, D.S.; Richardson, D.R. o vývoji LC-MS/MS metódy pre analýzu interkonvertibilných Z/E izomérov Bp4eT. <sup>(44)</sup>

Chromatografické podmienky pre HPLC-UV boli obmieňané s ohľadom na kompatibilitu s HPLC-MS prístrojom. <sup>(51)</sup> Preto napríklad, roztok EDTY nebol súčasťou mobilnej fázy, ale bol priradený pred každým nástrekom analytu. Jej úlohou bolo chelatovať možné nečistoty na kolóne.

V publikovanej práci <sup>(44)</sup> dosiahli autori uspokojivé výsledky pre separáciu izomérov Bp4eT pomocou kolóny Synergi 4u Polar RP. V našom prípade bola analyzovaná nielen parentná látka, ale aj testované vnútorné štandardy a zmes oxidačných produktov. Separácia bola dostatočná, no tvar píkov nevyhovoval. Pri mobilnej fáze pozostávajúcej z mravenčanu amónneho (2 mmol/l): acetonitril 50:50 (v/v) sa vyskytlo chvostovanie píkov a ani obmenou mobilnej fázy sa nepodarilo získať symetrické píky. Menilo sa zloženie a podiel organickej časti mobilnej fázy na 60 %, neskôr na 57 % zmesi acetonitril/methanol 1:1. Pozmenili sme aj pomer zložiek organickej fázy na zmes acetonitril/ methanol 1:3, pričom podiel organickej časti v mobilnej fáze bol 60 %. Tvar píkov na kolóne Polar ale stále nebol symetrický.

Ďalšie analýzy prebehli na kolóne C18. Píky boli na začiatku nesymetrické, objavuje sa chvostovanie a metóda je značne dlhá. Mobilná fáza pozostáva z mravenčanu amónneho (2 mmol/l): acetonitril 50:50 (v/v) (Obrázok 5). Chromatografický záznam ukazuje detekciu pri vlnovej dĺžke 319 nm.



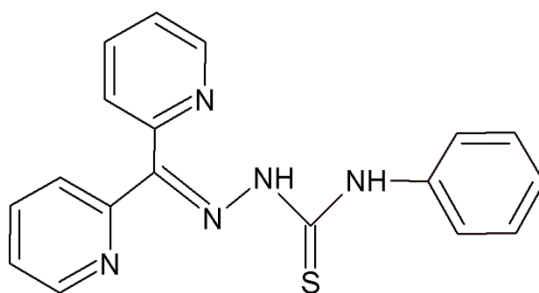
**Obrázok 5: Chromatografický záznam analýzy Bp4eT a vnútorných štandardov name-  
raný na kolóne C18. Retenčné časy: Bp4eT 17,5 a 37,2 min; DpT 5,9 min; Dp4mT 8,4  
min; Dp4eT 11,8 min; Dp4pT 23,7 min**

Analýza na kolóne C18 pri použití mravenčanu amónneho a zmesi acetonitril/methanol (1:1) v pomere 40:60 (v/v) síce poskytla súmerné píky, ale píky sú veľmi blízko pri sebe.

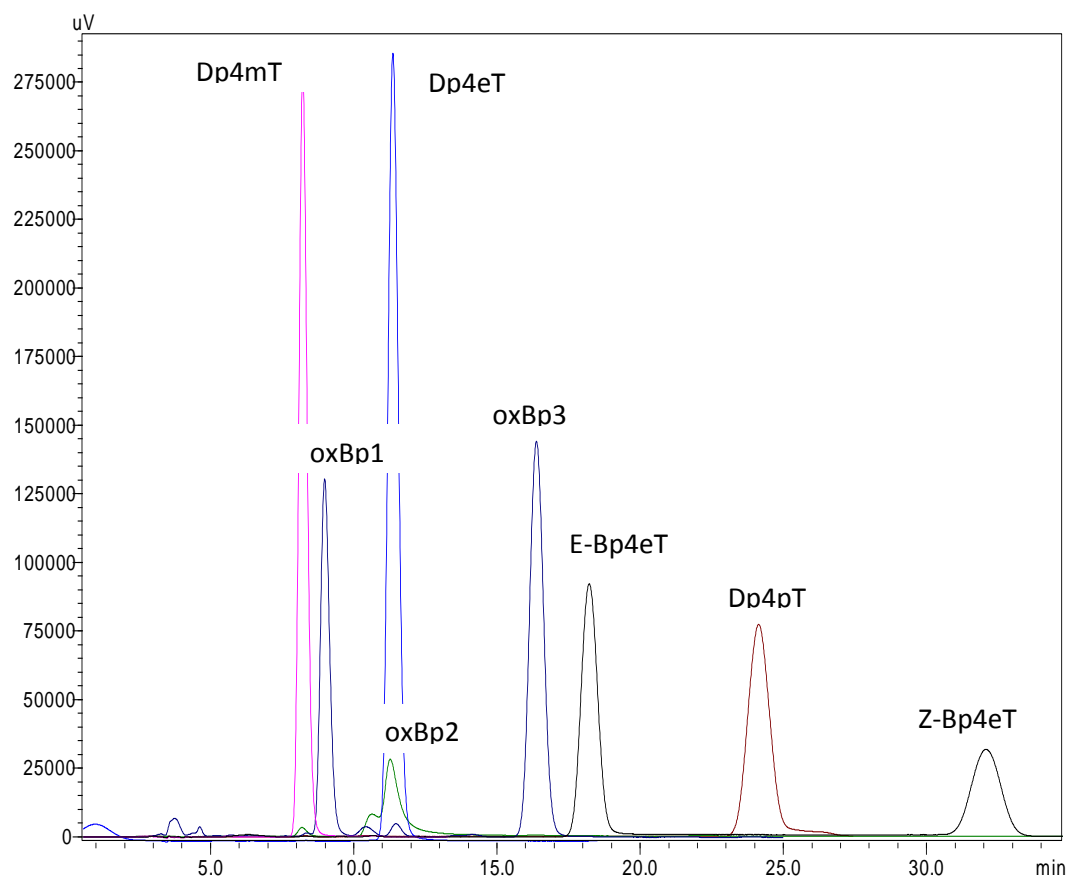
Aby bolo počas budúcich štúdií možné stanoviť množstvo Bp4eT a metabolitov v biologickom materiáli, je potrebné nájsť vhodný vnútorný štandard. Pre tento účel boli testované potenciálne interné štandardy, konkrétne: DpT, Dp4mT, Dp4eT, Dp4pT.

Z toho sa eluoval ako prvý DpT, Dp4mT, za nimi Dp4eT ešte pred izomérmi Bp4eT. Dp4eT má retenčný čas podobný retenčnému času jedného oxidačného produktu (Obrázok 7), preto nie je ako vnútorný štandard vhodný. Pík Dp4pT sa na chromatograme nachádza medzi izomérmi. Práve pre jeho elučný čas medzi dvoma izomérmi bol Dp4pT (Obrázok 6) vybraný ako budúci vnútorný štandard.

Na kolóne C18 sa podarilo dosiahnuť optimálne podmienky pre separáciu Bp4eT, testovaných vnútorných štandardov a zmesi oxidačných produktov. Ako finálne podmienky pre HPLC-UV chromatografiu bolo vybrané zloženie mobilnej fázy **mravenčan amónny (2 mmol/l): zmes acetonitril/methanol (1:1) 43:57 (v/v)** (Obrázok 7). Analýza je dlhšia ako sa očakávalo. Píky sú však symetrické a oddelené na základnú líniu. Keďže všetky súčasti mobilnej fázy sú prchavé je táto metóda vhodná aj pre analýzu na HPLC-MS .



Obrázok 6: Štruktúra Dp4pT



Obrázok 7: Chromatografický záznam analýzy Bp4eT, vnútorných štandardov Dp4mT, Dp4eT, Dp4pT a zmesi oxidačných produktov na kolóne C18. Retenčné časy: Bp4eT 18,3 a 32,0 min; Dp4mT 8,2 min; Dp4eT 11,3 min; Dp4pT 24,2 min; oxBp1 (semikarbazón) 9,0 min; oxBp2 (amidrazón) 11,2 min; oxBp3 (semikarbazón) 16,4 min



## 6.2 Príprava, izolácia a identifikácia oxidačných produktov

Snahou bolo vyvinúť podmienky separácie zmesi oxidačných produktov Bp4eT a získať štandardy metabolitov semikarbazónu s amidrazónu v takom množstve, aby bolo možné previesť ich charakterizáciu pomocou NMR a IČ spektier.

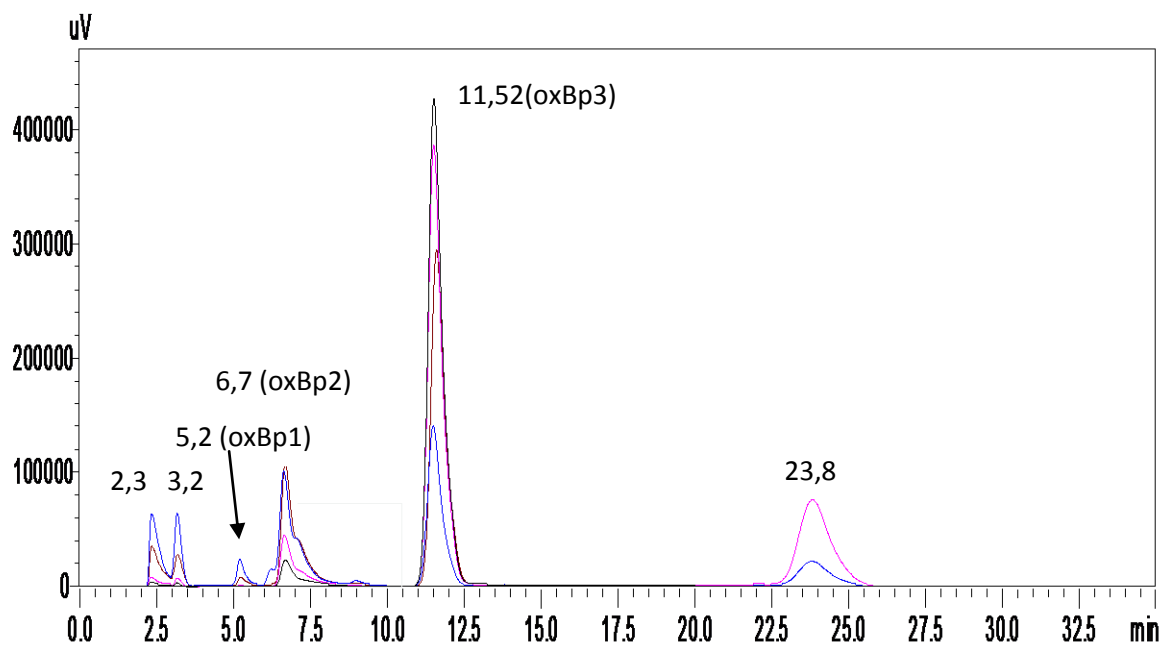
### 6.2.1 Príprava oxidačných produktov Bp4eT

Príprava oxidačných produktov bola zameraná na zachytenie skoro vznikajúcich oxidačných produktov. Jednoduchá oxidácia prebiehala zmiešaním zásobného roztoku Bp4eT (1 mg/ml) s 1%, 3%, 30% peroxidom vodíka (v pomere 1:1) na čas 5, 10, 30 minút. Následná analýza prebehla na HPLC-UV na kolóne C18 za použitia mobilnej fázy mravenčan amónny (2 mmol/l): zmes acetonitril/methanol (1:1) 50:50 (v/v). Ostatné chromatografické podmienky neboli pozmenené (Obrázok 8).

Vytrepanie oxidačnej zmesi do toluénu a teda odstránenie peroxidu vodíka nemalo zásadný vplyv na chromatografický záznam. Polárne balasty boli eluované na začiatku chromatogramu a neinterferovali s analyzovanými látkami. Preto sme sa rozhodli pripravovať zmes oxidačných produktov jednoduchým zaťažením materskej látky peroxidom vodíka.

Vzorka po 5 minútovej oxidácii 1% peroxidom vodíka vykazuje najväčší pík v čase 11,5 minút, ktorý odpovedá druhému izoméru semikarbazónu. Píky balastov a prvého izoméru semikarbazónu v čase 5,2 a amidrazónu v čase 6,7 boli zastúpené v omnoho menšom množstve, pričom pík amidrazónu bol najmenší. Domnievame sa, že oxidácia prebehla v malom rozsahu. Pri tej istej koncentrácii peroxidu vodíka a po 10 minútovej oxidácii, mal najväčší pík druhý izomér semikarbazónu v čase 11,5 minút, no píky prvého izoméru semikarbazónu a amidrazónu sú už vyššie ako pri 5 minútovej oxidácii. Oxidácia silnejším peroxidom vodíka vyústila vo väčší pomer oxidačných produktov s kratším elučným časom. Pri použití 3% peroxidu vodíka a oxidácii 5 minút sme už pozorovali väčší pík amidrazónu, no stále najväčší patrili druhému izoméru semikarbazónu, menšie píky patrili balastom a prvému izoméru semikarbazónu. Oxidácia po

dobu 10 minút 3% peroxidom vodíka vykazuje už menšie rozdiely medzi výškou píku druhého izoméru semikarbazónu a amidrazónu. Navyše píky na začiatku analýzy sú o mnoho menšie. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté oxidáciou parentnej látky Bp4eT v koncentrácií (1mg/ml) s **3% peroxidom vodíka po dobu 10 minút**.



**Obrázok 8: HPLC analýza zmesi oxidačných produktov pripravených rôznymi spôsobmi. Čierne píky: oxidácia 1% po dobu 5 minút, ružové píky: oxidácia 1% po dobu 10 minút, modré píky: oxidácia 3% po dobu 5 minút, hnedé píky: oxidácia 3% po dobu 10 minút**

## 6.2.2 Chromatografické podmienky pre TLC izoláciu metabolitov

Pri vývoji podmienok pre izoláciu metabolitov Bp4eT (semikarbazónu a amidrazónu) bolo našou snahou nájsť vhodné podmienky, ktoré umožnia ich oddelenie a izoláciu v čistom stave.

Podmienky prípravy oxidačnej zmesi sú uvedené v kapitole 6.2.1.

Prvé analýzy vykazovali málo viditeľné škvrnny pri použití zásobného roztoku Bp4eT 1 mg/ml, preto sme sa rozhodli použiť koncentrovanejší pracovný roztok Bp4eT a teda 2 mg/ml.

Analýza na HPLC-UV a HPLC-MS poskytla cenné informácie o čistote škvrnny, jej retenčnom čase a hmote v nej obsiahnutej.

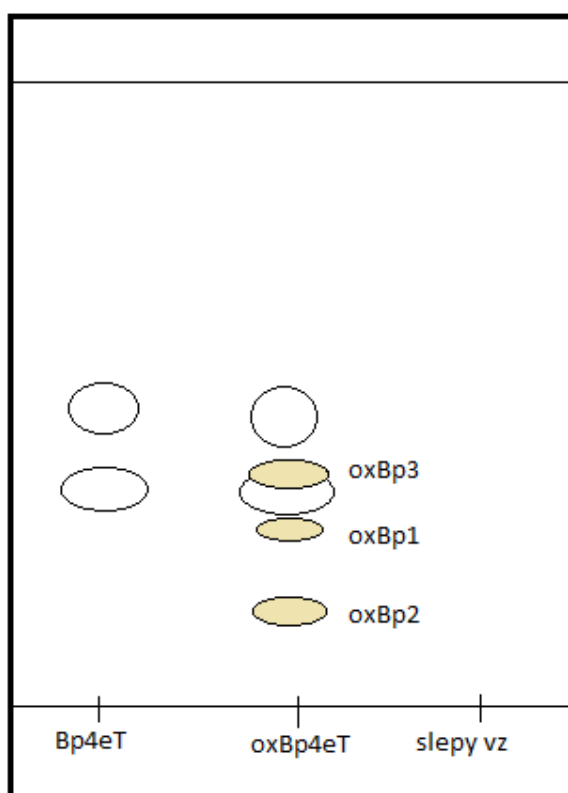
Amidrazón ( $m/z$  253) vykazoval na HPLC analýze (chromatografické podmienky viz kap. 6.2.1) pík s retenčným časom v okolí 6,6 – 6,7 minút. Analýza semikarbazónu ( $m/z$  269) na HPLC-MS potvrdila existenciu jeho dvoch izomérov, prvý s retenčným časom približne 5,2 minút a druhý v čase 11,5 minút (Obrázok 8).

Na HPLC-MS sme analyzovali škvrnny zo zmesi benzín/acetón 2:1 (v/v). Analýza škvrnny s  $R_f = 0,17$ ) ukázala prítomnosť čistej hmoty  $m/z$  269, jej retenčný čas bol **5,2** minúty z čoho sa dá usúdiť že ide o čistý prvý izoméru semikarbazónu. Škvrna s  $R_f = 0,11$  obsahovala prítomnosť oboch hmôt:  $m/z$  253 a  $m/z$  269 a javí 3 píky s časmi **5,2; 6,2; 8,9**. Prítomné sú teda oba izoméry semikarbazónu a medzi nimi hľadaný amidrazón hmoty  $m/z$  253.

Pri použití mobilnej fázy pozostávajúcej z chloroformu, toluénu a triethylamínu v pomere 8:8:1 (v/v/v) bolo pod UV svetlom detekovaných približne 5 škvrn. Škvrna s  $R_f = 0,31$  obsahovala hmotu  $m/z$  269, prislúchajúcu prvému izoméru semikarbazónu. Retenčný čas tejto škvrnny na HPLC bol 5,2 minút. Škvrna s  $R_f = 0,26$  obsahovala už obe žiadané hmoty a píky v čase 5,2; 6,5 a 9,0 minút.

Ďalej bola testovaná mobilná fáza: benzín/ethylacetát v pomere 2:1 (v/v) a v tomto prípade sa škvrnny držali na štarte. Pri mobilnej fáze benzín/ethylacetát/triethylamín 2:1:0,174 (v/v/v) škvrnny na začiatku chromatogramu neboli rozdelené. V ďalších analýzach sme sa snažili o minimalizáciu a pokiaľ možno vynechanie triethylamínu. Mobilná fáza chloroform/tetrahydrofurán 20:1 (v/v) poskytla zreteľne ohraničené škvrnny. Pod UV lampou sme však videli že škvrnny sú v inom poradí. Ďalej sme vyskúšali: toluén/tetrahydrofurán 20:1 (v/v); chloroform/tetrahydrofurán 20:3 (v/v); benzín/ethylacetát/triethylamín 1,5:1,5:0,174 (v/v/v); chloroform/toluén/triethylamín v pomere 11:5:1 (v/v/v), či zmes methanol/toluén/triethylamín v pomere 4:4:1 (v/v/v).

Ani jedna z predchádzajúcich metód neposkytla samostatnú škvrnu s obsahom čistého amidrazónu. Preto sme sa vrátili k analýze, kde bolo detekovaných najviac škvŕn: chloroform/toluén/triethylamín v pomere 8:8:1 (v/v/v) a skúsili sme pozmeniť pomer zložiek tak, aby mobilná fáza obsahovala chloroform/toluén/triethylamín v pomere 4:4:1 (v/v/v). Vyšší pomer triethylamínu k ostatným zložkám mobilnej fázy prispel k lepšej separácii škvŕn. Pri použití tejto mobilnej fázy sa nám podarilo izolovať **čistý amidrazón na spodnej časti štvrtej škvŕny s retenčným faktorom  $R_f = 0,32$  a zároveň aj čistý prvý izomér semikarbazónu s retenčným faktorom  $R_f = 0,39$  a druhý izomér semikarbazónu s retenčným faktorom  $R_f = 0,42$**  (Obrázok 9).



**Obrázok 9: TLC analýza Bp4eT, zmesi po oxidácii Bp4eT a slepej vzorky. Chromatografické podmienky: chloroform/toluén/triethylamín v pomere 4:4:1 (v/v/v). Retenčné faktory: amidrazón (oxBp2): 0,32; prvý izomér semikarbazónu (oxBp1): 0,39; druhý izomér semikarbazónu (oxBp3): 0,42**

### 6.2.3 Príprava chemických štandardov oxidácie a identifikácia oxidačných produktov Bp4eT

Cieľom bolo získanie štandardov oxidácie Bp4eT semikarbazónu a amidrazónu v takom množstve, aby bolo možné previesť ich charakterizáciu pomocou NMR a IČ spektier.

Pre prípravu štandardov bola použitá TLC chromatografiu vo veľkom formáte na sklenenej doske. Podmienky oxidácie sú uvedené v kapitole 6.2.1. Optimálne zloženie mobilnej fázy bolo chloroform/toluén/triethylamín v pomere 4:4:1 (v/v/v). Výsledkom boli oddelené pásy, z ktorých sme na základe predchádzajúcej separácie zoškrabali spodnú časť pásu s retenčným faktorom 0,68, pás s retenčným faktorom 0,78 cm a 0,84 cm.

Takto získané chemické štandardy boli predmetom identifikácie pomocou NMR a IČ spektier.

NMR a IČ spektra chemických štandardov oxidačných produktov semikarbazónu a amidrazónu odpovedali návrhom na štruktúru získaných pomocou HPLC- MS analýzy.

### 6.3 Opakovateľnosť SPE extrakcie pre izoláciu Bp4eT z plazmy

Vzorky biologického materiálu obsahujú množstvo balastných látok. Pred HPLC analýzou je nutné tieto balasty odstrániť jednak preto, aby neinterferovali s píkmi analytov ale taktiež aby nepoškodzovali chromatografický systém. Pre tento účel bola použitá extrakcia na pevnej fáze (SPE).

Opakovateľnosť SPE extrakcie pre izoláciu Bp4eT z prázdnej králičej plazmy bola overená analýzou šiestich vzoriek plazmy obsahujúcich Bp4eT (100 µg/ml) a vnútorný štandard Dp4pT (50 µg/ml).

Tabuľka uvádza plochy pod píkmi izomérov *E* a *Z* Bp4eT, plochu pod píkom Dp4pT a pomer týchto dvoch údajov, pričom každá hodnota pre danú vzorku roztoku je priemerom dvoch nástrekov.

	<b><i>E+Z</i></b>	<b>Dp4pT</b>	<b><i>E+Z/Dp4pT</i></b>
1.	7 537 028,00	2 665 950,50	2,83
2.	7 923 836,00	2 777 898,00	2,85
3.	7 986 778,00	2 782 160,50	2,87
4.	8 848 647,50	3 441 333,50	2,57
5.	8 877 818,00	2 366 001,00	3,75
6.	8 963 466,50	2 822 497,50	3,17
<b>Priemer</b>	<b>8 356262,33</b>	<b>2 809 306,83</b>	<b>3,00</b>
<b>SD</b>	<b>612 832,19</b>	<b>351 689,14</b>	<b>0,41</b>
<b>RSD</b>	<b>7,33</b>	<b>12,52</b>	<b>13,69</b>

**Tabuľka 1: plochy pod píkmi izomérov *E* a *Z* Bp4eT, plocha pod Dp4pT a ich vzájomný pomer**

Výsledné hodnoty relatívnej smerodajnej odchýlky sú pre plochy pod izomérmí Bp4eT približne 7,3 %; pre Dp4pT 12,5 % a pre ich vzájomný pomer 13,7 %. Hodnoty neprevyšujú 15 % čím sa dokazuje opakovateľnosť SPE extrakcie pre izoláciu Bp4eT z plazmy metódou popísanou v kapitole 5.6.

## 7 ZÁVER

V mojej diplomovej práci je popísaný vývoj chromatografických podmienok pre separáciu Bp4eT a jeho hlavných metabolitov. Jednotlivé kapitoly sa venujú výberu vnútorného štandardu a ďalej príprave a izolácií štandardov metabolitov štruktúry amidrazónu a semikarbazónu. Nakoniec je popísaný test opakovateľnosti SPE extrakcie pre Bp4eT z plazmy.

Za optimálne podmienky HPLC analýzy sme zvolili ako stacionárnu fázu kolónu s reverznou fázou Discovery® HS C18 (75×4,6 mm, 3µm) Phenomenex, USA, a mobilnú fázu zloženia mravenčan amónny (2 mmol/l): zmes acetonitril/methanol (1:1) 43:57 (v/v) bez úpravy pH. Prietok mobilnej fázy bol 0,3 ml/min. Detektorom bola UV lampa s DAD. Odozva detektoru bola zaznamenaná pri vlnovej dĺžke 319 nm.

Za vnútorný štandard sme zvolili Dp4pT pretože jeho elučný čas je práve medzi píkmi izomérov Bp4eT.

Ďalším experimentom boli pripravené štandardy metabolitov Bp4eT a to zaťažením parentnej látky 3% peroxidom vodíka po dobu 10 minút. Na separáciu oxidačných produktov bola použitá TLC sklenená doska Uniplate Silicagel GF (20cm × 20cm), Analtech, Newark, USA, pokrytú silikagélom a mobilnú fázu v zložení chloroform/toluén/triethylamín v pomere 4:4:1 (v/v/v).

Chemickú štruktúru separovaných produktov sme potvrdili pomocou HPLC-MS analýzy. Ionizácia bola prevedená elektrosprejom (ESI) a detektorom bola iónová pasca.

Po izolácií bola štruktúra metabolitov finálne charakterizovaná pomocou NMR a IČ spektier.

V závere bola potvrdená opakovateľnosť SPE extrakcie pre izoláciu Bp4eT z plazmy. Výsledky mojej analýzy prispeli k analytickej charakteristike a dôkladnému preskúmaniu zlúčeniny Bp4eT a jej oxidačných metabolitov.

## 8 ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra kontroly léčiv a farmaceutické chemie

Kandidát: Zuzana Kollárová

Školitel: PharmDr. Petra Kovaříková, PhD.

Názov diplomové práce: **Bioanalytické hodnotenie nových potenciálnych liečiv odvodených od thiosemikarbazónu II.**

Maligné neoplazmy (rakovina) sú v súčasnosti štvrtou najčastejšou príčinou úmrtia. Preto terapia a nájdenie vhodnej liečby priťahuje pozornosť vedcov po celom svete. Nové potenciálne liečivo, 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazón (Bp4eT), vyvinuté prof. Richardsonom (University of Sydney, Austrália), bolo určené ako vedúca štruktúra 2-benzoylthiosemikarbazónovej série. Tieto zlúčeniny, známe ako chelátory železa boli vyvinuté pre liečbu metabolickej poruchy preťaženia železom. Len nedávne výskumy poukázali na ich antiproliferatívne vlastnosti a vysoko selektívny mechanizmus účinku v terapiách maligných neoplazmov.

Počas tejto štúdie boli vyvinuté optimálne podmienky pre HPLC-UV a HPLC-MS analýzu Bp4eT a jeho rozkladných produktov. Di(2-pyridilketón)-4-fenyl-3-thiosemikarbazón (Dp4pT) bol navrhnutý ako vnútorný štandard.

Predchádzajúce štúdie, počas ktorých bol Bp4eT inkubovaný s potkaními a ľudskými mikrozomálnymi frakciami pečene, potvrdili metabolizmus oxidačnou cestou a detekovali dva produkty prvej fáze metabolizmu. Analýza na HPLC-MS ukázala že oba metabolity sú produktmi oxidácie thiokarbonylovej skupiny. Prvý metabolit, identifikovaný ako 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-semikarbazón, má hmotu  $m/z$  269 a vyskytuje sa vo forme dvoch *E/Z* izomérov, druhý metabolit,  $N^3$ -ethyl- $N^1$ -[fenyl(pyridin-2-yl)methylen]-formamidrazónu, má hmotu  $m/z$  253. Naším ďalším cieľom bolo izolovať a pripraviť chemické štandardy práve týchto dvoch metabolitov. Izolácia bola prevedená na TLC. Ich identita bola potvrdená pomocou NMR a IČ spektier.



Nakoniec bola overené opakovateľnosť SPE extrakcie pre Bp4eT a vnútorného štandardu z plazmy.

## 9 ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Zuzana Kollárová

Supervisor: PharmDr. Petra Kovaříková

Title of diploma thesis: **Bioanalytical evaluation of new potential agents derived from thiosemicarbazone II.**

Nowadays, malignant neoplasms (cancer) are listed as the 4th most frequent cause of death. Therefore, its successful therapy and proper drug treatment attract scientific attention all over the world. New potent anticancer agent, 2-benzoylpyridine-4-ethyl-3-thiosemicarbazone (Bp4eT), developed by Prof. D. Richardson (University of Sydney, Australia) was identified as a leading compound of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series. These compounds, known as iron chelators, were originally developed to treat metabolic iron overload but recent investigations revealed their antiproliferative properties and highly selective mechanism of action in the therapy of malignant neoplasms.

In this study optimal conditions for HPLC-MS analysis of Bp4eT and its degradation products were developed. Also, di(2-pyridylketone)-4-phenyl-3-thiosemikarbazone (Dp4pT) was chosen as an internal standard.

Previous studies, during which Bp4eT was incubated with rat and human liver microsomal fractions, confirmed oxidative way of metabolism and revealed two phase I metabolites. HPLC-MS analysis detected that both of them resulted from the oxidation of thiocarbonyl group. First metabolite, identified as 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-semikarbazone, has the mass of 269  $m/z$  and is present in the form of two *E/Z* isomers, while the second, N<sup>3</sup>-ethyl-N<sup>1</sup>-[fenyl(pyridin-2-

yl)methylen]-formamidrazne, has the mass of 253  $m/z$ . Our further goal was to prepare chemical standards of these metabolites. Isolation of the chemical standards was performed by TLC. Their identification was confirmed using the NMR and IR spectra.

Finally, the reproducibility of the SPE extraction of Bp4eT and internal standard from plasma was confirmed.

## 10 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. **Český lékopis 2009.** Praha : Grada, 2009. 978-80-247-2994-7.
2. **Klimeš, J., a kol.** *Kontrola léčiv I.* Praha : Karolinum, 2002. Stránky 1-149. 80-246-0419-1.
3. **Klimeš, J., a kol.** *Kontrola léčiv II.* Praha : Karolinum, 2004. Stránky 1-94. 80-246-0818-9.
4. **Coufal, P.** High Performance Liquid Chromatography, HPLC. [Online] 28. 7. 2004. [Citace: 1. 3. 2012.] [web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html](http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html).
5. **Kazakevich, Y. a LoBrutto, R.** *HPLC for pharmaceutical scientists.* New York : John Wiley & Sons, Inc., 2007. Stránky 4-529. 978-0-471-68162-5.
6. **Snyder, L.R., Kirkland, J.J. a Glajch, J.L.** *Practical HPLC method development.* New York : John Wiley & Sons, Inc., 1997. Stránky 21-433. 978-0-471-00703-X.
7. **Karlíček, R. a kol.** *Analytická chemie pro farmaceuty.* Praha : Karolinum, 2009. Stránky 1-281. 978-8-024-61453-3.
8. **Snyder, L.R., Kirkland, J.J. a Dolan, J.W.** *Introduction to Modern Liquid Chromatography.* New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2010. Stránky 3-319, 662-715. 978-0-470-16754-0.
9. **LoBrutto, R., Jones, A., Kazakevich, Y.V., McNair, H.M.** Effect of the eluent pH and acidic modifiers in high-performance liquid chromatography retention of basic analytes. *J. Chromatogr. A.* 2001, Sv. 913, stránky 173-187.
10. **Meyer, V.R.** *Practical High Performance Liquid Chromatography 4th edition.* New York : John Wiley & Sons, Inc., 2004. Stránky 1-357. 978-047-0-09377-1.
11. **Pan, L., LoBrutto, R., Kazakevich, Y.V., Thompson, R.** Influence of inorganic mobile phase additives on the retention, efficiency and peak symmetry of protonated basic compound in reversedphase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2004, Sv. 1049, stránky 63-73.
12. **Kazakevich, Y.V. a McNair, H.M.** Low energy interactions in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1999, Sv. 872, stránky 49-59.
13. **Settle, F.** *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry.* Upper Saddle River : Prentice Hall PTR, 1997. Stránky 147-164, 221-239, 589-667. 978-13-177338-0.
14. **Nikolin, B., Imamović, B., Medanhodžić-Vuk, S., Sober, M.** High Performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2004, Sv. 4, stránky 5-9.
15. **Klimeš, J., Sochor, J., Mokřý, M., Kastner, P., Pilařová, P.** *prezentácia a prednášky z Kontroly léčiv.* 2009-2010.
16. **Ahuja, S. a Dong, M.W.** *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC.* the United Kingdom : Elsevier, 2005. Stránky 20-216. 978-0-120-88547-6.

17. **Kazakevic, Y.V.** High-performance liquid chromatography retention mechanisms and their mathematical description. *J. Chromatogr. A.* 2006, Sv. 1126, stránky 232-243.
18. **FDA: Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).** *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation.* Rockville : U.S. Department of Health and Human Services, 2001.
19. **EMA.** *Guideline on validation of bioanalytical methods.* London : Comitee for Medicinal Products for Human Use , 2009. EMA/CHMP/EWP/192217/2009.
20. **Harvey, D.** *Modern Analytic Chemistry.* New York : McGraw-Hill Higher Education, 2000. Stránky 1-134. 978-0-072-37547-7.
21. **Skoog, D.A., West, D.M. a Holler, F.J.** *Fundamentals of analytical chemistry.* 8th Edition. 2004. Stránky 15-256. 978-0-030-35523-3.
22. **Holcapek, M., Kolárová, L. a Nobilis, M.** High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, Sv. 391, stránky 59-78.
23. **Gross, J.H.** *Mass Spectrometry.* 2nd edition. New York : Springer, 2008. Stránky 5-62. 978-3-642-10709-2.
24. **Evans, G.** *A handbook of bioanalysis and drug metabolism.* Florida : CRC Press, Taylor & Francis Group, 2004. Stránky 1-53,99-112,127-148. 978-0-415-27519-9.
25. **Korfmacher, A. W.** *Using mass spectrometry for drug metabolism studies.* 2nd edition. New York : CRC Press, Taylor and Francis Group, 2010. Stránky 99-112, 127-148. 978-1-4200-9220-2.
26. **Richtr, V. a Kraitr, M.** Tenkovrstvá chromatografie ve výuce chemie. [Online] 2004. [Citace: 11. 4. 2012.] [http://www.zcu.cz/fpe/kch/dokumenty/Priloha\\_III.pdf](http://www.zcu.cz/fpe/kch/dokumenty/Priloha_III.pdf).
27. **Krishnan, T.R. a Ibrahim, I.** Solid-phase extraction technique for the analysis of biological samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1994, Sv. 12, stránky 287-294.
28. **Thurman, E.M. a Mills, M.S.** *Solid- Phase Extraction Principles and Practice.* New York : John Wiley & Sons, Inc., 1998. Stránky 20-340. 978-0-471-61422-7.
29. **Bievre, P.D. a Guenzler, H.** *Validation in chemical measurement.* Berlin : Springer, 2005. Stránky 1-33. 978-3-540-20788-0.
30. **Peters, F.T. a Maurer, H.M.** Bioanalytical method validation-How,how much and why? [Online] 2008. [Citace: 10. 12. 2011.] [http://www.gtfch.org/tk/tk68\\_3/Peters.pdf](http://www.gtfch.org/tk/tk68_3/Peters.pdf).
31. **Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D.L., McDowall R.D.** Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, Sv. 17, stránky 193-218.
32. **Lovejoy, D.B a Richardson, D.R.** Novel "hybrid" iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate selective antiproliferative activity against tumor cells. *Blood.* 2002, Sv. 100, stránky 666-676.

33. **Stefani Ch., Punnia-Moorthy G., Lovejoy D.B., Jansson P.J., Kalinowski D.S., Sharpe P.C., Bernhard P.V., Richardson D.R.** Halogenated 2'-Benzoylpyridine Thiosemicarbazone (XBpT) Chelators with Potent and Selective Anti-Neoplastic Activity: Relationship to Redox Activity. *J. Med. Chem.* 2011, Sv. 54, stránky 6936-6948.
34. **Saletta, F., Kovacevic, Z a Richardson, D. R.** Iron chelation:deciphering novel molecular targets for cancer therapy. The tip of the iceberg of a web of iron-regulated molecules. *Future Med. Chem.* 2011, Sv. 3, stránky 1983-1986.
35. **Buss, J., Torti, F. a Torti, S.** The role of iron chelation in cancer therapy. *Curr. Med.Chem.* 2003, Sv. 10, stránky 1021-1034.
36. **Buss, J., Greene, B., Turner, J., Torti, F., Torti, S.** Iron Chelators in Cancer Chemotherapy. *Curr. Top. Med. Chem .* 2004, Sv. 4, stránky 1623-1635.
37. **Kalinovski, D.S., Yu, Y., Sharpe, P., Islam, M., Liao, Y., Lovejoy, D.B., Kumar, N., Bernhardt, P.V., Richardson, D.R.** Design, sythesis and characterization of novel iron chelators: structure-activity relationships of the 2- benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents. *J. Med. Chem .* 2007, Sv. 50, stránky 3716-3729.
38. **Richardson, D.R., Kalinowski, D.S., Lau, S., Jansson, P., Lovejoy, D.B.** Cancer cell iron metabolism and the development of the potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochem. Biophys. Acta .* 2009, Sv. 1790, stránky 702-717.
39. **Yu, Y., Rahmanto, Y.S., Hawkins, C.L., Richardson, D.R.** The potent and Novel Thiosemicarbazone Chelators, Dp44mT and Bp44mT, Affect Crucial Thiol Systems Required for Ribonucleotide Reductase Activity. *Mol. Pharmacol.* 2011, Sv. 79, stránky 921-931.
40. **Yu, Y., Wong, J., Lovejoy, D.B., Kalinowski, D.S., Richardson, D.R.** Chelators at the cancer coalface: desferrioxamine to Triapine and beyond. *Clin. Cancer Res.* 2006, Sv. 12, stránky 6876-6883.
41. **Kalinowski, D.S. a Richardson, D.R.** The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2005, Sv. 57, stránky 547-583.
42. **Popović-Bijelić, A., Kowol, Ch.R., Lind, M.E.S., Luo, J., Himo, F., Eneydy, É.A., Arion, V.B., Graeslund, A.** Ribonucleotide reductase inhibition by metal complexes of Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone) a combined experimental and theoretical study. *J. Inorg. Biochem.* 2011, Sv. 105, stránky 1422-1431.
43. **Allen, R.E a Myers, A.L.** Nutrition in toddlers, Iron in diet. *Am. Fam. Physician.* 2006, Sv. 74, stránky 1527-1532.
44. **Stariat, J., Kovaříková, P., Klimeš, J., Kalinowski, D.S., Richardson, D.R.** Development of an LC-MS/MS method for analysis of interconvertible Z/E isomers of the novel anticancer agent, Bp4eT. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, Sv. 397, stránky 161-171.

45. **Kovacevic, Z., Yu, Y. a Richardson, D.R.** Iron chelators to rescue. *Chem. Res. Toxicol.* 2011, Sv. 24, stránky 279-282.
46. **Gojo, I., Tidwell, M., Greer, J., Takebe, N., Seiter, K., Pochrom, M., Johnson, B., Sznol, M., Karp, J.E.** Phase I and pharmacokinetic study of Triapine, a potent ribonucleotide reductase inhibitor, in adults with advanced hematologic malignancies. *Leuk. Res.* 2007, Sv. 31, stránky 1165-1173.
47. **Kovacevic, Z., Kalinowski, D.S., Lovejoy, D.B., Yu, Y., Rahmanto, Y.S., Sharpe, P.C., Bernhardt, P.V., Richardson, D.R.** The medicinal chemistry of novel iron chelators for the treatment of cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011, Sv. 11, stránky 483-99.
48. **Stariat, J., Šesták, V., Vávrová, K., Nobilis, M., Kollárová, Z., Klimeš, J., Kalinowski, D., Richardson, D., Kovaříková, P.** LC-MS/MS identification of the principal in vitro and in vivo phase I metabolites of the novel thiosemikarbazone anticancer drug, Bp4eT. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, Sv. 403, stránky 309-321.
49. **Ramanathan, R.** *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Pharmacokinetics.* New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2009. Stránky 1-121. 978-0-471-75158-8.
50. **McMastr, M.C.** *LC/MS A Practical User's Guide.* New York : John Wiley & Sons, Inc., 2005. Stránky 9-85. 978-0-471-65531-7.
51. **Stariat, J., Kovaříková, P., Klimeš, J., Lovejoy, D.B., Kalinowski, D.S., Richardson, D.R.** HPLC methods for determination of two novel thiosemicarbazone anti-cancer drugs (N4mT and Dp44mT) in plasma and their application to in vitro plasma stability of these agents. *J. Chromatogr. B.* 2009, Sv. 877, stránky 316-322.