

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

# DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vít Šesták

**Bioanalytické hodnocení nových potenciálních léčiv odvozených  
od thiosemikarbazonu I.**

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petra Kovaříková, PhD.  
Studijní program: FARMACIE

2012

Zde bych rád srdečně poděkoval svojí školitelce, PharmDr. Petře Kovaříkové, PhD. za její ochotu, vedení, trpělivost a rady při vypracovávání diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Jánů Stariatovi za pomoc při řešení technických i faktických obtíží, které vstaly v průběhu vypracovávání této práce. A dále oběma výše jmenovaným za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Tato práce byla financována z grantu Ministerstva zdravotnictví České republiky (NT 12403-3/2011) a grantů Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK FaF/B-CH/85510 a SVV 265 001).

Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal jsou uvedeny v seznamu literatury a řádně citovány. Dále prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 15.5.2012

Vít Šesták

# OBSAH

<b>POUŽITÉ ZKRATKY</b> .....	<b>5</b>
<b>ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>7</b>
1. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	7
1.1 Schéma kapalinového chromatografu.....	7
1.2 Mobilní fáze.....	10
1.3 Vybrané základní chromatografické parametry.....	11
2. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	12
2.1 Odstranění rozpouštědla a iontový zdroj.....	12
2.1.1 Ionizace elektrosprejem (electrospray ionization, ESI).....	13
2.1.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku ( atmospheric pressure chemical ionisation, APCI).....	13
2.2 Analyzátor.....	14
2.2.1 Kvadrupól.....	15
2.2.2 Iontová past.....	16
2.2.3 Analyzátor doby letu.....	16
2.2.4 Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací.....	17
2.3 Detekční módy.....	17
2.3.1 Sken celého spektra (Full Scan).....	17
2.3.2 Sken vybraného iontu (SIM - selective ion monitoring).....	18
2.3.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie a její záznam.....	18
3. ÚPRAVA VZORKŮ BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU.....	18
3.1 Precipitační deproteinace.....	19
3.2 Extrakce na pevné fázi.....	19
3.3 Extrakce kapalina-kapalina.....	20
4. CHELÁTORY ŽELEZA.....	20
4.1 Železo a nádorová onemocnění.....	20
4.2 Chelátory thiosemikarbazonového typu.....	21
4.3 Analyzované látky.....	22
4.4 Přehled publikovaných prací zabývajících se analýzou Dp44mT.....	23
<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>24</b>
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>25</b>
5. POUŽITÝ MATERIÁL, PŘÍSTROJE, POMŮCKY A CHEMIKÁLIE.....	25
5.1 Chromatografický materiál.....	25
5.2 Přístroje.....	25
5.3 Pomůcky.....	25
5.4 Chemikálie.....	26
6. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	27
6.1 Příprava zásobních roztoků.....	27
6.2 Příprava standardních roztoků.....	27
6.3 Příprava roztoků pro ověření linearity.....	27
7. VÝVOJ CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK.....	28
7.1 Výběr stacionární fáze, mobilní fáze a detekce.....	28
7.2 Výběr vnitřního standardu a jeho příprava.....	29
8. ÚPRAVA BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU A VÝVOJ METODY IZOLACE ANALYTŮ.....	30
8.1 Plasma.....	30
8.2 Moč.....	31
8.3 Feces.....	31
9. PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO OVĚŘENÍ LINEARITY.....	32
10. IN VIVO EXPERIMENT.....	32
<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>34</b>
11. VÝVOJ CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK.....	34
11.1 Výběr vnitřního standardu.....	34
11.2 Výběr mobilní fáze a profilu analýzy.....	34
12. VÝSLEDKY METOD IZOLACE ANALYTŮ Z BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU.....	35

12.1.	<i>Plasma</i> .....	36
12.2.	<i>Moč</i> .....	38
12.3.	<i>Feces</i> .....	39
13.	OVĚŘENÍ LINEARITY PRO STANOVENÍ ANALYTŮ V PLASMĚ.....	41
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>44</b>
	<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>46</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>47</b>
	<b>LITERATURA</b> .....	<b>48</b>

## Použité zkratky

AUC – area under the curve, plocha pod křivkou

DFO – desferrioxamin

EDTA – ethylendiaminetetraacetic acid, disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

$f$  – flow, průtok

HPLC – high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

*i.v.* - intravenózní

LLE – liquid-liquid extraction, extrakce kapalina-kapalina

MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

MS<sup>n</sup> – tandemová hmotnostní spektrometrie, kde  $n$  = počet fragmentací

NMR – nukleární magnetická rezonance

ot./min – otáčky za minutu

PBS – phosphate buffered saline, fosfátem pufovaný fyziologický roztok

PC – personal computer, osobní počítač

PEG – polyethylen-glykol

SIM – selective ion monitoring, selektivní sledování iontů

SPE – solid phase extraction, extrakce na pevné fázi

SRM – selective reaction monitoring, selektivní záznam reakce

$t'_R$  – redukovaný retenční čas

$t_M$  – mrtvý čas kolony

$t_R$  – retenční čas

UV-Vis – ultraviolet-visible, spektroskopie ve viditelné a ultrafialové oblasti

$V_R$  – retenční objem

## Úvod

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je moderní chromatografická metoda, která v posledních letech nabývá v oblasti analýzy léčiv na důležitosti. Její využití zahrnuje kvalitativní i kvantitativní stanovení, studium stability léčiv i analýzu léčiv a metabolitů v biologickém materiálu.

Hmotnostní spektrometrie (MS) patří mezi finančně náročnější, avšak velice selektivní detekční techniky vhodné pro spojení se separačními technikami. Její výhodou je selektivní detekce analytů na základě poměru jejich molekulové hmotnosti a náboje. Díky MS analýze lze provádět jak kvantitativní hodnocení tak i získat informace o chemické struktuře sledovaných analytů ve vzorku i s velmi nízkým obsahem analyzovaných látek.

Spojení HPLC/MS patří mezi nejpoužívanější instrumentální analytické metody, které lze využít při analýze vzorků z farmakokinetických studií léčiv. Jeho výhodou je především, selektivita, citlivost ale i nízká spotřeba rozpouštědel a analyzovaného vzorku.

I přes velký pokrok v protinádorové terapii stále existuje celá řada nádorových onemocnění, která jsou více či méně resistantní na konvenční terapii. Proto je zapotřebí vyvíjet nová léčiva, která by byla účinná vůči dosud špatně léčitelným onemocněním. Jeden z možných přístupů je nalezení léčiv s novým mechanismem účinku. Právě takovou skupinou jsou chelátory železa ze skupiny thiosemikarbazonů. Jedná se o lipofilní látky, které po proniknutí do buňky vážou ionty železa, čímž zamezují jejímu množení. Dp44mT je látka, která je výsledkem systematického výzkumu a vývoje chelátorů železa jako nových protinádorových léčiv, který probíhá na University of Sydney (výzkumná skupina prof. Richardsona). Tato látka svým unikátním mechanismem působení na nádorovou tkáň vykazuje selektivní toxicitu na buňky neoplasmat.

Zatím však chybí data ohledně osudu tohoto léčiva v organismu. Informace o jeho metabolismu nebo eliminaci jsou předmětem intenzivního výzkumu. Spojení HPLC/MS umožňuje detekovat a identifikovat hlavní metabolity tohoto léčiva jakož i provádět citlivé a selektivní stanovení parentní látky a jejích metabolitů v biologickém materiálu. Po pilotních *in vitro* a *in vivo* experimentech byly objeveny dva metabolity I. fáze, nicméně dá se předpokládat, přítomnost dalších produktů metabolismu v různém biologickém materiálu. Kromě toho nejsou dostupné informace o profilu plasmatických koncentrací této látky, jakož i data o způsobu její eliminace.

# Teoretická část

## 1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

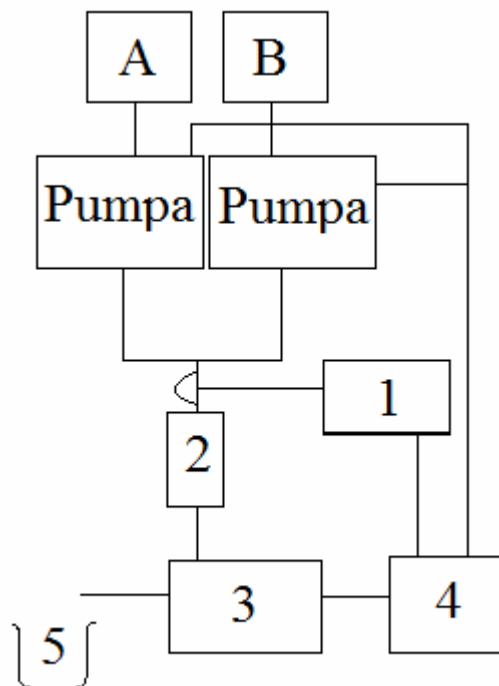
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC) je chromatografická separační metoda a jako taková je založená na různých rozdělovacích koeficientech analytů. To se projevuje rozdílnou afinitou analyzovaných látek k mobilní a stacionární fázi. Tím dochází k mnohonásobnému ustalování rovnováhy mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Každý analyt v závislosti na povaze stacionární a mobilní fáze a vlastní polaritě je pak vymýván rozdílnou rychlostí [1].

Historicky se HPLC vyvinula ze sloupcové kapalinové chromatografie. Kolony naplněné sorbentem s velikostí částic 100 – 200  $\mu\text{m}$  nebo více, kde mobilní fáze prochází kolonou jen díky gravitační síle a eluát je nutno sbírat po frakcích, však nesplňují nároky na moderní chemickou analýzu, především s ohledem na účinnost a rychlost separace. Pozdější rozvoj laboratorní techniky však umožnil zvýšení efektivity této metody. Konstrukce vysokotlakých pump, dávkovacích systémů, rozšíření palety pevných fází o vysoce selektivní sorbety, ale i velmi účinné a selektivní detekční techniky umožnili HPLC splnit vysoké nároky na moderní analytickou techniku s širokým škálou možných aplikací [2].

### 1.1 Schéma kapalinového chromatografu

Nejdůležitější součástí HPLC je kolona, na které probíhá vlastní separace. Dalšími komponentami jsou čerpadla, degasser, dávkovací systém (sampler), kolonový prostor a detektor. Mobilní fáze se nachází v přidruženém zásobníku [3].

Schematické znázornění je vyobrazeno na obr. 1.1.



Obr. 1.1: Schéma HPLC: A, B – zásobník mobilní fáze, 1 – autosampler, 2 – kolona, 3 - detektor, 4 – počítač, 5 – odpad [3]

#### 1.1.1. Vysokotlaké čerpadlo a degasser

Čerpadlo nasává mobilní fázi ze zásobníku přes filtr, aby bylo zamezeno možnému poškození kolony mechanickými nečistotami z rozpouštědla. Čerpadlo pumpuje mobilní fázi pod tlakem tak, aby bylo možné překonat odpor kolony, který je nepřímo úměrný velikosti částic sorbentu. Před vstupem do čerpadla musí být rozpouštědlo zbaveno plynů. Mobilní fáze může být odplyněna působením ultrazvuku či probubláním rozpouštědla heliem. Vhodnější a běžnější je však použití jemného filtru, který je zapojen před vlastní pumpou [3].

Pumpa je tvořena pístem a komorou, která je utěsněna teflonovou chlopní. Těmito chlopněmi prochází tělo pístu. Chlopeň na vstupní straně pumpy zamezuje zpětnému toku rozpouštědla do zásobníku. Chlopeň na výstupu umožňuje udržet tlak v chromatografu při nasávání do čerpadla. Píst musí být vyroben z materiálu, který odolá dlouhodobému působení mobilní fáze, která často obsahuje vysoké koncentrace solí a může mít, pokud to dovolí materiál kolony, extrémní pH. Proto jsou nejčastěji písty vyráběny z berylového skla (safírový píst). Aby se zamezilo výkyvům tlaku (tzv. pulzování), zapojují se paralelně dvě protichůdné čerpací hlavy a vytlačují mobilní fázi do tlumiče pulzů, který se při zvýšení tlaku roztáhne a naopak při jeho snížení svůj průměr zmenší [3].



Více paralelně zapojených čerpadel umožňuje mísení mobilní fáze těsně před vstupem na kolonu v libovolném poměru.

### 1.1.2. Autosampler

Ideální autosampler je počítačově řízené zařízení, které umožňuje přesně dávkovat a nastříkovat vzorek na kolonu, aniž by se výrazněji změnil tlak. K tomu se přibližují moderní autosamplery, kde se během nástřiku vzorku na kolonu jehlou proud mobilní fáze odkloní do přemosťující větve a po nástřiku se opět vrátí vše do původní pozice [3].

### 1.1.3. Chromatografická kolona

Stacionární fáze při HPLC je umístěna v krátkém a tenkém válci z kvalitní oceli, plastu, případně skla, a je zde uzavřena fritami. Nejběžnější kolony mají následující rozměry délka 5 – 25 cm, vnitřní průměr nejčastěji – 3, 4, 4.6 mm. Kolona je naplněna buď velmi jemnými částicemi stacionární fáze (1.5-5  $\mu\text{m}$  průměru) nebo tak zvaným monolitem, což je kompaktní jednolitá trojrozměrná porézní struktura tvořená z materiálu stacionární fáze. Zpočátku byl používán téměř výhradně čistý silikagel, který má však mnoho nevýhod, např.: je omezeno pH, při kterém může být analýza provedena, na hodnoty 2-8 nebo nevhodnost pro analýzu lipofilních látek. Proto došlo v průběhu let k rozšíření spektra sorbentů, které v některých ohledech samotný silikagel předčí. Tak se dnes, více než původní silikagel, používá alkylovaný silikagel, popř. je na hydroxyly silikagelu napojen uhlovodíkový řetězec s různými funkčními skupinami, aminokyselinami, alkylaryly, atp. Dále se využívá sloučenin hliníku, zirkonu, titanu nebo různých forem uhlíku. Další možností je použití stacionárních fází z polymerních materiálů vzniklých např.: kopolymerací styrenu a divinylbenzenu nebo monovinyl- a divinylmethakrylátu, etc. [4] Charakter některých stacionárních fází umožňuje i separaci enantiomerů.

Protože selektivita separace a její rychlost je ovlivněna teplotou, je při HPLC kolona uložena v termostatu, který zajišťuje udržování teploty na nastavené hodnotě [3].

#### 1.1.4. Detektor

Po nastříknutí vzorku na kolonu dochází k separaci analytu. Oddělené analyty jsou unášeny mobilní fází do detektoru. Vysokoučinná kapalinová chromatografie klade na detektory vysoké nároky:

- Citlivost – (ng/ml - µg/ml)
- Reprokovatelnost a linearita odezvy
- Nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci
- Univerzálnost – detekuje všechny požadované složky

Tyto požadavky splňuje několik typů detektorů a proto, v závislosti na povaze analytů, lze využít například UV-Vis, fluorometrické, elektrochemické nebo refraktometrické detekční techniky. V moderní analýze se stále častěji využívá spojení s hmotnostním spektrometrem. Z detektoru jsou data odváděna do připojeného PC, kde jsou dále zpracovávána a vyhodnocována softwarem [3].

### ***1.2 Mobilní fáze***

Pro analýzu polárních analytů lze využít tzv. normálního módu, kdy stacionární fází je silikagel a mobilní fází jsou často poměrně nepolární rozpouštědla, jako je hexan, chloroform, diethylether, ale i acetonitril nebo methanol a jejich směsi.

Při použití tzv. reverzní fáze, kdy stacionární fáze je nepolární, je nejčastější použití vodných roztoků mírně polárních organických rozpouštědel jako mobilní fáze. Těmito rozpouštědly jsou pak v praxi často methanol, acetonitril nebo tetrahydrofuran. Pro separaci látek kyselých, bazických nebo například látek nesoucích náboj se často přidávají vodné roztoky solí, slabých kyselin, bazí nebo pufrů pro udržení požadovaného pH a úpravu míry ionizace analytů [5].

Pro separaci komplikovaných směsí je možno použít gradientovou eluci. To znamená, že je v průběhu analýzy plynule měněna koncentrace nepolární složky nebo pH mobilní fáze. Tím je možné zkrátit dobu takovéto analýzy a zlepšit ostrost píků nebo míru rozdělení látek.

### 1.3 Vybrané základní chromatografické parametry

Při identifikaci analytu separovaného na chromatografické koloně je nezbytné znát retenční čas nebo retenční objem. Retenční čas je definován jako doba od nástřiku na kolonu po maximum daného píku. Retenční objem lze vypočítat podle vzorce (1)

$$V_R = t_R \cdot f, \quad (1)$$

kde  $V_R$  je retenční objem,  $t_R$  je retenční čas a  $f$  je objemová rychlost průtoku mobilní fáze.

Mrtvý čas kolony je doba, od nástřiku látky, která není zadržována stacionární fází, na kolonu do okamžiku detekce maximální koncentrace této látky. Tuto veličinu je možné použít k výpočtu redukováného retenčního času, podle vzorce (2):

$$t'_R = t_R - t_M, \quad (2)$$

kde  $t'_R$  je redukovaný retenční čas,  $t_R$  je retenční čas analytu a  $t_M$  je mrtvý čas kolony. Redukovaný retenční čas je doba, kterou stráví analyt adsorpcí na stacionární fázi.[1]

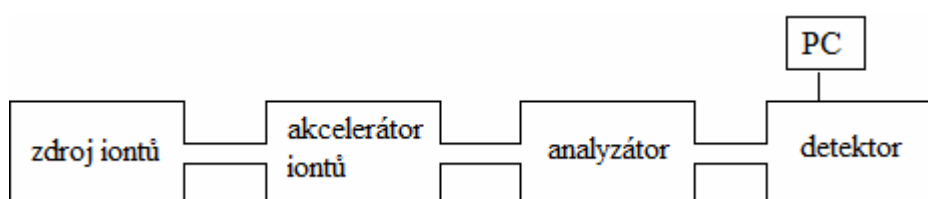
Pro kvantifikaci analytu je důležité znát plochu pod píkem (AUC – area under the curve). Dnes jsou již všechny softwary vybaveny nástrojem pro počítačovou integraci.

Pro identifikaci analyzované látky lze postupovat tak, že se porovnájí retenční charakteristiky standardů a analytů měřených za daných chromatografických podmínek. Nejpřesnějším postupem identifikace analytu je ale metoda standardního přídatku, kdy je do zanalyzovaného vzorku přidán standard látky a pak je provedena druhá analýza. Pokud se jedná o identickou látku, bude mít shodné fyzikálně chemické vlastnosti, tzn. bude na koloně vykazovat stejné chování. Z toho vyplývá, že by se měla výrazně zvětšit plocha pod křivkou.

Pouhá shoda retenčního času za daných chromatografických podmínek není zárukou, že se jedná o jednu látku. Proto je nutné prokázat, že nedochází k separaci původního analytu a přidaného standardu ani po výrazné změně chromatografických podmínek. I v případě stejného chování na koloně je vhodné použít i jinou analytickou metodu, která by umožnila získat přesnější informace o struktuře.

## 2. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda používaná k měření poměru hmotnosti a počtu nábojů analytů v iontové podobě (ať už kladných nebo záporných) v plynném skupenství ( $m/z$ ). Tyto ionty se tvoří v iontovém zdroji nabitím elektrickým nábojem. Dále jsou tyto ionty urychlovány, tříděny v analyzátoru a detekovány v detektoru. Z detektoru jsou informace převáděny do PC, kde jsou vyhodnocovány (Obr. 2.1). Výstupní informace jsou jak kvalitativní povahy (molekulová hmotnost, informace o struktuře z pozorovaných fragmentových iontů), tak kvantitativní (AUC). Hmotnostní spektrometrie poskytuje vysokou citlivost detekce iontů a tak lze detekovat i stopová množství analytů (piko až femtomoly) [6].



Obr. 2.1: Schéma hmotnostního spektrometru[3]

### 2.1 Odstranění rozpouštědla a iontový zdroj

Při HPLC/MS je nezbytné odstranit většinu mobilní fáze vycházející z kolony tak, aby nedošlo k zahlcení analyzátoru a detektoru. Mobilní fáze může být odstraněna několika různými způsoby. Je možné odklonit část proudu eluátu z HPLC a pouze částí dovolit, aby vstoupila do analyzátoru. Toto je však možné pouze za předpokladu, že koncentrace analytu je dostatečně vysoká, aby bylo možné ho ve zlomku objemu (a tedy i ve zlomkovém množství) detekovat. Druhou možností je využít sníženého tlaku, zvýšené teploty nebo elektrického napětí [3][7].

Aby mohl být eluát analyzován v hmotnostním spektrometru, je nutné převést neutrální molekuly na nabitě molekulární ionty. Způsobů ionizace analytů existuje celá řada. Starší metody vyžadovali k ionizaci použití vakua, modernější a šetrnější metody však probíhají za atmosférického tlaku. Pro spojení HPLC-MS v moderní analýze léčiv jsou nejdůležitější dvě (tzv. měkké) ionizační techniky – ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [8][7].

### 2.1.1. Ionizace elektrosprejem (*electrospray ionization, ESI*)

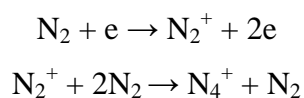
Elektrosprej je moderní ionizační technika využívající k odpaření rozpouštědla a tvorbě iontů za atmosférického tlaku proudu plynu a elektrického napětí. Při použití této techniky téměř nedochází k fragmentaci, a proto se řadí mezi tzv. měkké ionizační techniky.

Analyzovaný vzorek je přiveden do kovové kapiláry, na kterou je vloženo elektrické napětí v řádu jednotek kilovoltů. Pomocí proudu inertního plynu dochází k rozprášení analyzovaného roztoku na velice drobné kapénky, které na svém povrchu nesou náboj. Jak se postupně rozpouštědlo odpařuje (díky proudu dusíku, který je přiváděn do odpařovací komory), dochází k zahušťování náboje na povrchu kapénky. V určitém bodě převažují odpudivé síly částic nesoucích náboj nad přitažlivými silami molekul rozpouštědla a dojde k rozpadu této kapénky. Tento proces se opakuje až do úplného odpaření rozpouštědla, takže zbude jen samostatný ion analytu, který je dále přiváděn do akcelérátoru a analyzátoru [7].

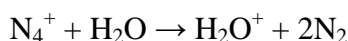
### 2.1.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (*atmospheric pressure chemical ionisation, APCI*)

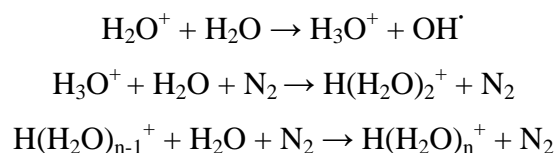
Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je další ionizační metodou vhodnou pro použití v analýze léčiv. Nicméně je nutné počítat s tím, že APCI nelze použít u termolabilních analytů.

Při spojení s HPLC je eluát přiveden do rozprašovače, který pomocí inertního plynu rozptýlí analyzovaný roztok do jemného aerosolu. Aerosol je vstřikován do vyhřívané komory (cca 400°C), kde dochází k desolvataci. V ionizační komoře je přítomný zdroj elektrického koronálního výboje. V přítomnosti reakčního plynu (dusík nebo vzduch) dochází při kontaktu s elektrony k tvorbě primárních iontů následujícími reakcemi:



Tyto primární ionty dále kolidují s volnými molekulami odpařeného rozpouštědla, což v případě vody vede k následujícím reakcím:

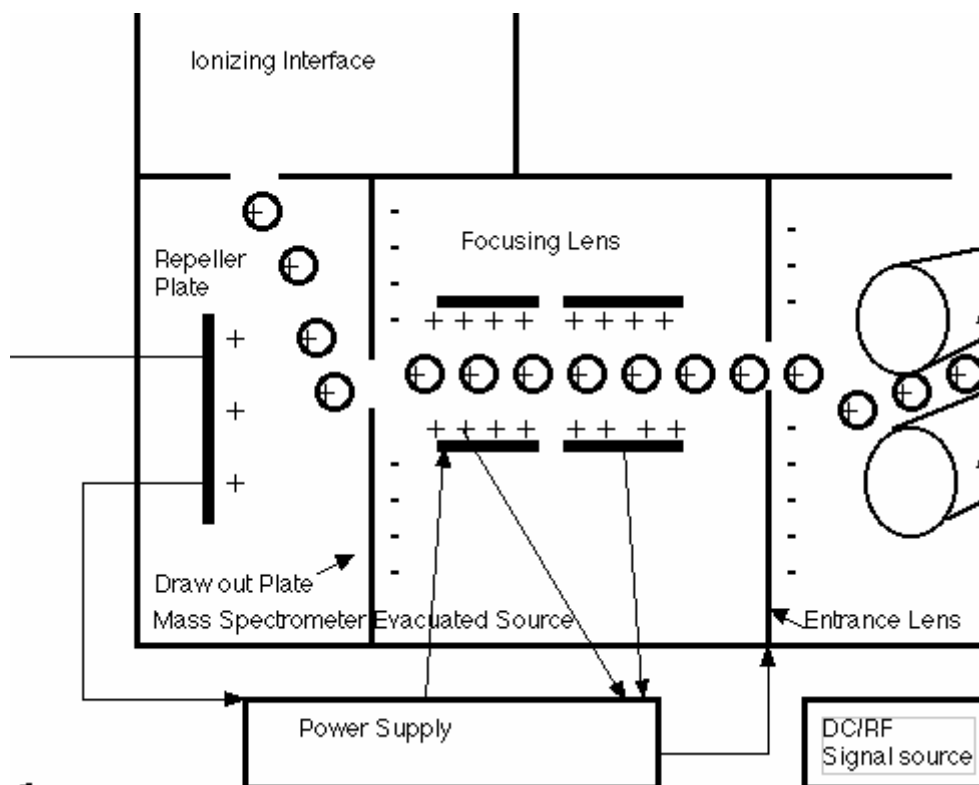




Molekuly analytu se sráží s takto vzniklými sekundárními ionty. Tím dochází k nabití molekul a vzniku iontů. Tato ionizační technika je velice účinná a poměrně šetrná, protože při dochází jen k minimální fragmentaci [9][7].

## 2.2 Analyzátor

Srdcem hmotnostního spektrometru je právě analyzátor. Jeho funkcí je co nepřesnější selekce iontů podle poměru  $m/z$  a následné umožnění průchodu vybraných iontů do detektoru. Na pomezí iontový zdroj - analyzátor dochází k přesunu iontů z oblasti s atmosférickým tlakem do části s vysokým vakuem. Mezi výstupem z iontového zdroje a vstupem do analyzátoru je soustava elektromagnetických čoček, které usměrňují ionty do jemného paprsku (obr. 1.3) [3].

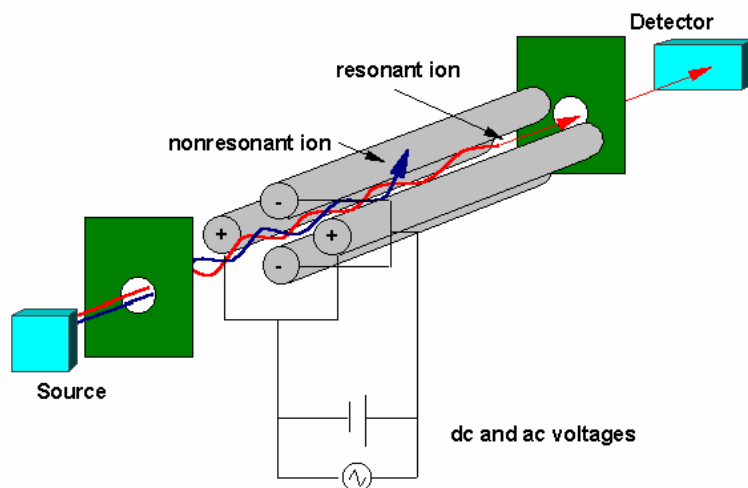


Obr. 1.3 Zaostrovací čočka (focusing lens) [3]

Po separaci iontů v analyzátoru dochází k detekci. Nejčastější způsob detekce je použití detekčního rohu. Po nárazu molekulárního iontu na povrch detektoru dochází k emisi elektronů, které dále naráží do povrchu detektoru a spouštějí lavinovou emisi sekundárních elektronů, které jsou nakonec zaznamenávány počítačem [3].

### 2.2.1. Kvadrupól

Historicky prvním typem analyzátoru používaným v HPLC/MS byl kvadrupól. Vlastní kvadrupól se sestává ze čtyř cylindrických kovových tyčí uchycených ve dvou keramických držácích takovým způsobem, že každá z protilehlých tyčí leží na jednom z ramen hyperboly. Na dvě protilehlé tyče je přivedeno napětí vyjádřené jako  $+(U+V\cos(\omega t))$ , kde  $U$  je stejnosměrné napětí a  $V\cos(\omega t)$  je napětí střídavé a na druhém páru tyčí je napětí  $-(U+V\cos(\omega t))$ . Podle frekvence napětí vloženého na kvadrupól je trajektorie iontů usměrněna do trojrozměrné sinusoidy a podle poměru  $m/z$  buďto ionty projdou analyzátozem a směřují k detektoru nebo s analyzátozem kolidují, ztrácí náboj, a tím i schopnost pohybovat se v elektromagnetickém poli a nelze je již detekovat [3][10] (obr.1.4)



Obr. 1.4: Schéma kvadrupólového analyzátoru [11]

Kvadrupóly lze zapojit i sériově a vytvořit tak například tzv. trojitý kvadrupól, který slouží k provádění tandemových MS analýz. V tomto případě první kvadrupól funguje jako

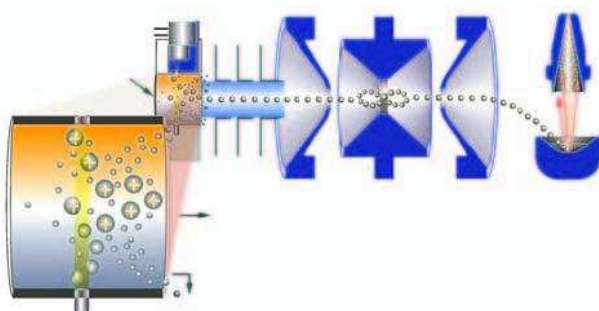
hmotnostní filtr a druhý jako kolizní cela, kde dochází ke kolizi iontů s inertním plynem, a jejich fragmentaci. Třetí kvadrupól pak, odvádí ionty specifických hmotností (resp. poměru  $m/z$ ) do detektoru (viz 2.3.3. *Tandemová hmotnostní spektrometrie a její záznam*) [3].

### 2.2.2. Iontová past

Iontová past je analyzátor s 10 až 100 násobně vyšší citlivostí než kvadrupól a proto získává mezi analytiky na oblibě. Její velkou výhodou je možnost provádět  $MS^n$  experimenty.

Iontová past se skládá z dvou hyperbolických elektrod a jedné prstencové elektrody taktéž s hyperbolickým průřezem, na které je vloženo jak stejnosměrné, tak střídavé napětí o velmi vysoké frekvenci. V iontovém zdroji vzniklé ionty jsou přivedeny do iontové pasti otvorem ve vstupní elektrodě. V prostoru mezi elektrodami jsou vhodným elektromagnetickým polem udržovány v třídimensionálním sférickém stabilním orbitu. Ven jsou ionty vypuzeny skrz otvor ve výstupní elektrodě podle vzrůstající hmotnosti se vzrůstajícím napětím na prstencové elektrodě a jsou směřovány do detektoru [12]. (obr. 1.5)

Když je ion zachycen v iontové pasti je možné ho přidavným zdrojem elektronů rozbít na specifické fragmenty, které mohou pomoci při identifikaci analyzovaného iontu [3].



Obr. 1.5: Schéma iontové pasti [13]

### 2.2.3. Analyzátor doby letu

Pro analýzu větších molekul, jako jsou například peptidy a proteiny, se nejlépe hodí použití analyzátoru doby letu (time of flight analyzator). Po ionizaci molekuly a po průchodu



zaměřovací čočkou se sleduje čas, za který dorazí iont k detektoru. Ten je závislý na  $m/z$ . Menší molekuly mají vyšší rychlost než molekuly větší. Rychlost se pohybuje okolo  $2 \cdot 10^7$  m/s [3].

#### 2.2.4. Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

Velice přesná měření  $m/z$  lze provádět na analyzátoru využívající iontovou cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací (rozlišení  $> 10^7$ ). Ionty z iontového zdroje jsou přivedeny do iontové pasti, která je pod velmi vysokým vakuem ( $10^{-10} - 10^{-11}$  mbar). Cela je vyrobena ze supravodiče, takže při teplotách blížících se absolutní nule (chlazení tekutým heliem a dusíkem) vykazuje velice velkou magnetickou indukci (běžně 4.7 – 13 T). Při styku s takto silným magnetickým polem se začne ion působením Lorentzovy síly pohybovat po kruhové trajektorii s frekvencí závislou na jeho  $m/z$ . Působením krátkého impulzu vysokofrekvenčního napětí přivedeného na excitační desky cely dojde k excitaci iontu a k zvětšení poloměru kruhu, po kterém se ion pohybuje.  $M/z$  určuje, při jaké frekvenci k této excitaci dojde. Když se změní frekvence, která ion excitovala, dojde k návratu iontu na původní trajektorii a excitují se částice s jiným  $m/z$  [14].

### 2.3 Detekční módy

#### 2.3.1. Sken celého spektra (Full Scan)

Sken celého spektra je jednou z možností je zaznamenávat všechny ionty vzniklé ionizací v požadovaném  $m/z$  rozmezí. Množství zaznamenaných komponent však vede k nižší citlivostí a velkému šumu na základní linii a proto není tento mód vhodný pro kvantitativní analýzu.

### 2.3.2. Sken vybraného iontu (SIM - selective ion monitoring)

Při selektivním sledování iontu (SIM) je monitorován jeden (nebo několik) vybraný ion o  $m/z$  místo celého hmotnostního spektra. To umožňuje skenovat vybrané  $m/z$  mnohokrát za sekundu, a tím zvýšit citlivost detekce (oproti skenu celého spektra) [3].

### 2.3.3. Tandemová hmotnostní spektrometrie a její záznam

Někdy pro identifikaci iontu nepostačuje znát retenční čas a molekulovou hmotnost, neboť vybraný iont nemusíme být schopni v komplikované směsi zachytit. V takovém případě lze použít HPLC/MS<sup>n</sup> experiment (kde  $n$  je počet fragmentací). Kolizní fragmentace je děj, kdy se ionty po srážce s těžkým atomem (např.: argon, xenon) nebo po dodání dostatečného množství energie štěpí a ztrácí část své molekuly. To lze zaznamenat několika způsoby v závislosti na typu analyzátoru. Lze provádět sken celého spektra nebo SIM mateřských i dceřiných iontů v různých kombinacích:

- Sken celého spektra mateřských i dceřiných iontů = skenovací mód neutrální ztráty
- Sken celého spektra mateřských/SIM dceřiných iontů = skenování prekurzorových iontů
- SIM mateřských/ sken celého spektra dceřiných iontů = skenování produktových iontů
- SIM mateřských i dceřiných iontů = selektivní monitorování reakce (SRM)

Obzvláště SRM lze využít při identifikaci analytů z velice komplexních směsí (biologický materiál), aniž by bylo nezbytné je dokonale zbavit balastů. Při tomto módu vlastně sledujeme pouze dceřinou hmotu, proto je potřeba znát, jak analyt fragmentuje [3].

## 3. Úprava vzorků biologického materiálu

Před vlastní analýzou vzorku biologického materiálu na systému HPLC/MS je nutné oddělit analyty od balastních látek, které by rušili stanovení nebo poškozovali kolonu, neboť jenom málo typů biologických matric (např. likvor, slzy nebo pot) je možné nastříknout na kolonu bez předchozí úpravy.

### ***3.1. Precipitační deproteinace***

Precipitace proteinů je relativně levnou, jednoduchou a široce využívanou technikou, která zahrnuje přidání kyselin, solí nebo s vodou mísitelných organických rozpouštědel. Po přidání, promíchání a odstředění lze čirý supernatant rovnou nastříknout na kolonu nebo ho lze zakoncentrovat odpařením a rekonstitucí požadovaným objemem rozpouštědla, nejlépe mobilní fáze. Tato metoda je navíc rychlá, avšak ve vzorku zůstávají přítomné soli a některé endogenní balasty, což může vést ke snížení selektivity analýzy [15][7].

### ***3.2. Extrakce na pevné fázi***

Podobně jako chromatografické metody, založené na různých afinitách analytů k mobilní a stacionární fázi, využívá metoda extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE) možnost adsorpce analytu na částice sorbentu a následné eluce vhodným rozpouštědlem. I zde lze použít mnoho různých typů pevných fází od normální fáze (silikagel) přes reverzní (alkylové, arylaklylové, polyolové, amidové,...) po iontové výměnné sorbenty. Tato metoda však není zcela vhodná pro hydrofilní analyty, které neobsahují vhodné aktivní místo použitelné pro iontově výměnnou extrakci [7].

Kolonky pro SPE jsou nejčastěji polypropylenové duté cylindry s otvorem pro nanesení vzorku a s otvorem pro odstranění eluátu. Jejich objemy se pohybují od 1 do 25 ml a množství sorbentu se pohybuje od 25 mg do 10 g. Nad a pod sorbentem jsou malé frity s póry 20  $\mu\text{m}$ , které brání pohybu velkých částic do prostoru se sorbentem a sorbentu pryč z kolonky. Na počátku je nutné sorbent aktivovat navlhčením rozpouštědlem vhodné polaritě. Při použití reverzní fáze to bývá nejčastěji methanol. Druhým krokem je ustálení kolonky propláchnutím vodným pufrem. To je nezbytné, aby nedošlo k precipitaci proteinů a k ucpání kolonky. Třetím krokem je nanesení vzorku a odstranění balastů promytím vodou nebo vhodným pufrem. Posledním krokem je eluce analytu nejčastěji organickým rozpouštědlem např. methanolem. Takto získaný methanolickeý roztok lze zkoncentrovat vysušením a rekonstitucí vhodným rozpouštědlem nebo je ho možné přímo nastříknout na kolonu. Protože na kolonkách s malými póry je vztlak tak velký, že gravitační síla již nestačí pro průtok kapaliny sorbentem, používá se tlakového gradientu (podtlakem na výstupní části kolonky nebo přetlakem na její vstupní části) [7].

### 3.3. *Extrakce kapalina-kapalina*

Extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction, LLE) je přímá extrakce biologického materiálu (nebo jeho vodné suspenze/roztoku) do s vodou nemísitelného rozpouštědla. Při LLE dochází k vytvoření rovnováhy v distribuci do obou vzájemně nemísitelných fází v závislosti na jejich polaritě. Tento vztah lze vyjádřit Nerstovou rovnicí (3):

$$k_d = c_{org}/c_{voda}, \quad (3)$$

kde  $k_d$  je rozdělovací koeficient,  $c_{org}$  je koncentrace látky v organické vrstvě a  $c_{voda}$  je koncentrace ve vodné vrstvě. V praxi je však množství extrahované látky závislé na podmínkách extrakce jako je teplota, pH vodné vrstvy nebo poměr extrahující a extrahované kapaliny. Proto lze zefektivnit extrakci kyselých látek snížením pH vodné vrstvy (a naopak u látek bazických) a tím zvýšit podíl elektroneutrálních molekul. Další možností pro zlepšení výtěžnosti extrakce bývá zvětšení množství extrahujícího rozpouštědla. Nicméně, lepší výtěžnosti bývá obvykle dosaženo opakovanou extrakcí.

Tato metoda není univerzální a lze s ní jen velmi těžko izolovat látky velmi polární nebo látky povrchově aktivní [7][1].

## 4. *Chelátory železa*

### 4.1. *Železo a nádorová onemocnění*

Železo je mikronutrient, který je v těle součástí mnoha metaloproteinů a účastní se řady životně důležitých biochemických dějů, jako například: vazba a přenos kyslíku, přenos elektronů nebo katalýza syntézy DNA [15]. Nezastupitelná funkce železa pro životně důležité pochody probíhající v těle je dána především jeho fyzikálně-chemickými a chemickými vlastnostmi, to je schopností tvořit komplexy s mnoha organickými ligandy a jeho redoxním potenciálem mezi  $Fe^{II}$  (ferro) a  $Fe^{III}$  (ferri), který je při neutrálním pH +772 mV [17].

Podstatná část organického železa je vázána v proteinech za účasti hemu. Tak je tomu v případě hemoglobinu a myoglobinu. Kromě toho se část iontů železa vyskytuje v proteinech

navázaná na jejich funkční skupiny aminokyselin obsahující atomy síry, kyslíku nebo dusíku. Skladovací formou železa je jeho komplex s ferritinem, transportním proteinem je pak transferrin. Dvojmocná forma je charakteristická pro hemové železo, zatímco skladovací a transportní forma je trojmocná. To je důležité protože ferro forma se snadno hydrolyzuje a tvoří biologicky neaktivní koordinační sloučeniny. Za normálních okolností se pouze malý podíl celkového železa v organismu se vyskytuje v nevázané (volné, katalyticky aktivní) formě [18].

Ribonukleotid-reduktáza je jedním z metaloenzymů, které obsahují železo. Tento enzym katalyzuje *de novo* syntézu deoxyribonukleotidů a tím se stává podstatným článkem v množení buněk. Množení buněk a tedy i syntéza DNA probíhá v nádorových buňkách v porovnání s buňkami zdravé tkáně výrazně rychleji [19]. Díky tomu mají rychle proliferující nádorové buňky zvýšenou potřebu funkční ribonukleotid-reduktázy. Toho lze využít v terapii nádorových onemocnění snahou snížit dostupnost železa pro tento enzym a tím snížit jeho produkci. Ačkoliv byly chelátory železa primárně navrhovány pro terapii přetížení organismu železem (iron overload diseases), jako například  $\beta$ -thalasemie, byl u nich experimentálně prokázán také protinádorový účinek [20]. Antiproliferativní aktivita desferrioxaminu (DFO), toho času nejvyužívanějšího chelatačního činidla v medicíně, není vysoká, jelikož kvůli jeho značné hydrofilite prostupuje do buněk jen velmi omezeně, což ovlivňuje schopnost DFO chelatovat intracelulární ionty železa [21]. Další limitací pro praktické použití této látky jako antineoplastika je jeho poměrně krátký eliminační poločas [22]. Proto bylo potřeba hledat nové chelátory, které by měly v porovnání s DFO výhodnější farmakokinetické parametry.

#### **4.2. Chelátory thiosemikarbazonového typu**

Mezi lipofilnější látky, u nichž se dá předpokládat vyšší schopnost chelatovat intracelulární ionty železa, patří deriváty heteroaryl-karbaldehyd-thiosemikarbazonu [23].

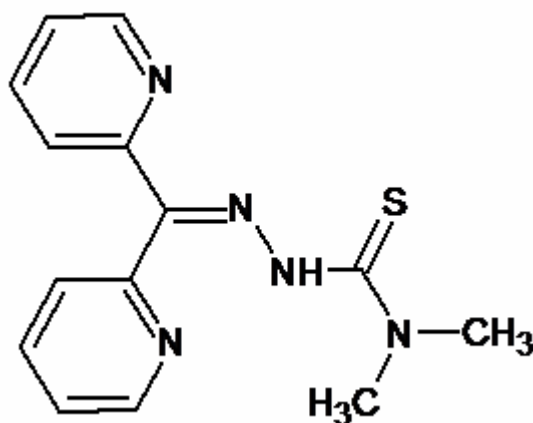
Di-(2-pyridyl)keton-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon (Dp44mT) (viz obr. 4.1) je sloučenina která vykazuje *in vitro* i *in vivo* mnohonásobně vyšší antineoplastickou aktivitu než desferrioxamin, což bylo potvrzeno experimenty, jak na 28 liniích nádorových buněk *in vitro* [24], tak *in vivo* s využitím myši s murinním karcinomem plic, ale i myši, kterým byly implantovány lidské nádorové tkáně [25]. Bylo také prokázáno, že Dp44mT má větší vliv na růst rakovinných buněk než na růst normálních fibroblastů a to víc než osmsetkrát ( $IC_{50} = 0,03 \mu M / >25 \mu M$ ) [25].

### 4.3. Analyzované látky

Pracovní název: Dp44mT

Chemický název: Di-(2-pyridyl)keton-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon

Chemická struktura:



Obr. 4.1 Chemická struktura Dp44mT

Sumární vzorec:  $C_{14}H_{15}N_5S$

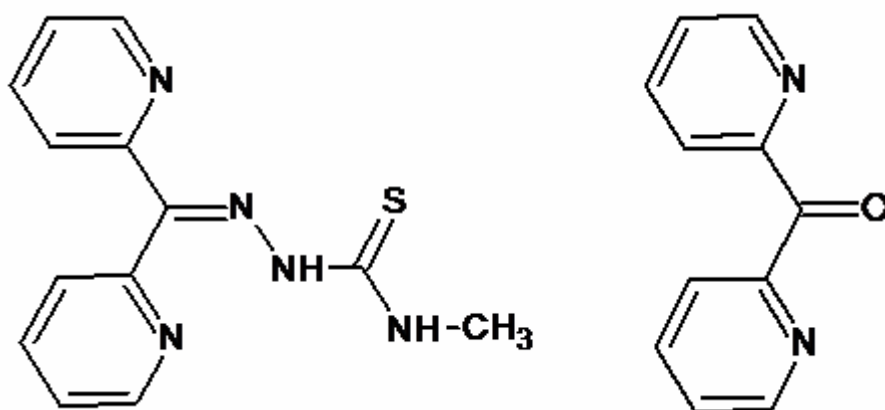
Relativní molekulová hmotnost: 285.37 [26]

logP: 2.19 [27]

Vlastnosti: Žlutooranžová krystalická látka, krystaly jehlovitého tvaru. Rozpustný v organických rozpouštědlech, špatně rozpustný ve vodě.

Mechanismus účinku: Látka proniká do buňky, kde chelatuje intracelulární železo. Relativní nedostatek železa vede k inhibici funkce ribonukleotid-reduktázy a tím i ovlivnění syntézy DNA. Kromě toho, komplexy chelátoru se železem cyklicky produkují kyslíkové radikály, čímž poškozuje citlivé buněčné struktury a způsobuje buněčnou smrt nádorové buňky. Buňky nádorů jsou výrazně citlivější k působení Dp44mT než buňky normálních tkání [20].

Metabolismus: V pilotních *in vitro* a *in vivo* studiích byly detekovány dva metabolity I. fáze. Prvním byl produkt demethylace koncového dusíku (di-(2-pyridyl)keton-4-methyl-3-thiosemikarbazon - Dp4mT). Druhým metabolitem byl produkt hydrolyzy semithiokarbazonové vazby (di-(2-pyridyl)keton - DpK) (viz obr. 4.2).



Obr. 4.2: Chemické struktury metabolitů Dp44mT detekovaných v pilotních *in vitro* a *in vivo* experimentech: Dp4mT a DpK

#### 4.4. Přehled publikovaných prací zabývajících se analýzou Dp44mT

Protinádorové působení Dp44mT bylo poprvé hodnoceno v roce 2004 [25], proto není v dostupné literatuře mnoho odkazů na analytické hodnocení této látky a jeho metabolitů. Pro analýzu této látky byla dosud použito pouze HPLC/UV.

V roce 2007 byla publikována práce, kde se autoři Mrkvičková et al., zabývali *in vitro* stabilitou Dp44mT. V této publikaci je popsána plně validovaná HPLC/UV metoda. Separace Dp44mT a DpK byla provedena na koloně Discovery HS F5 (250 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m, Supelco, Praha, Česká republika) za použití mobilní fáze o složení 2 mM EDTA a acetonitril (40:60, v/v) s průtokem 1.0 ml/min, při teplotě 40°C. Analyty byly detekovány při 275 nm a 260 nm. Tato práce ukázala, že Dp44mT je poměrně stabilní vůči alkalickému prostředí, avšak při pH 0.5 dochází po 4 hodinách k 23% hydrolyze. Oxidací 3% roztokem peroxidu vodíku došlo k úplné oxidaci Dp44mT za záměny kyslíku za síru thiokarboxylové skupiny. Dále byly provedeny testy stability za zvýšené teploty a po ozáření ultrafialovým zářením, vůči čemuž se zdá Dp44mT poměrně stabilní [28].

Autoři Stariat et al. vyvinuli bioanalytickou HPLC/UV metodu pro stabilitní studii Dp44mT v plasmě ze tří savců (králíka, prasete a člověka). Analyty byly izolovány extrakcí na pevné fázi. Separace byla provedena na koloně Discovery HS F5 (250 mm x 4 mm, 5  $\mu$ m, Supelco, Praha, Česká republika) za použití mobilní fáze s následujícím složením: vodný roztok octanu amonného (10 mM) s EDTA (2 mM, pH 4.5, upraveno kyselinou octovou) a acetonitrilu (62:38, v/v) při průtoku 1.0 ml a teplotě kolony 40°C. Analyt byl detekován UV-analyzátozem při 275 nm a 329 nm [29].

## **Cíl práce**

Cílem práce bylo vyvinout vhodnou chromatografickou metodu pro separaci Dp44mT a jeho dvou metabolitů, nalezení vnitřního standardu pro HPLC/MS analýzu, optimalizace extrakční metody Dp44mT metabolitů z plasmy, moči a feces a využití získaných informací pro pilotní ověření linearitu vztahu koncentrace analytů v plasmě – odezva detektoru.



## Experimentální část

### 5. Použitý materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie

#### 5.1. Chromatografický materiál

Chromatografická kolona - Discovery HS C18 (75 × 4.6 mm, 3 μm, Sigma Aldrich)

#### 5.2. Přístroje

Analytické váhy, Helago, Česká republika

Centrifuga, Trigon Plus, Česká republika

Hmotnostní spektrometr LCQ advance MAX (Thermo Finnigan) s iontovou pastí (ESI<sup>+</sup> ionizace) spojený s HPLC Shimadtu prominence sestavou

HPLC sestava Shimadzu Prominence -20A3 degasser, dvě LC-20AD pumpy, SIL-20AC auto-sampler, CTO-20AC column oven, CBM 20A komunikační modul připojený k PC s chromatografickým programem LC Solution 1.22 SP1, PDA detekce

PC s chromatografickým programem Thermo Finnigan Xcalibur software

Třepačka, Unimed, Česká republika

Ultrazvuková lázeň K10, Kraintek, Slovenská republika

Vakuové zařízení Supelco Visiprep, Německo

#### 5.3. Pomůcky

Eppendorfký 1,5 ml, 2ml se šroubovacím uzávěrem

Laboratorní sklo

Mikropipety, Eppendorf, Německo

Skleněné vialky pro HPLC

SPE kolonky, Supelco, Německo

Discovery DSC-18

Discovery DSC-Ph

#### 5.4. Chemikálie

2-benzoylpyridylketon-4-ethyl-3-thiosemikarbazon (Bp4eT), University of Sydney

2-benzoylpyridylketon-4-fenyl-3-thiosemikarbazon (Bp4pT), University of Sydney

2-hydroxy-1-naftylaldehyd thiosemikarbazon (NT), University of Sydney

2-hydroxy-1-naftylaldehyd-4-methyl-3-thiosemikarbazon (N4mT), U. of Sydney

Acetonitril, Sigma Aldrich, Česká republika

Benzen, Sigma Aldrich, Česká republika

Butan-1-ol, Lachema n.p., Československá republika

Chloroform, Sigma Aldrich, Česká republika

Di-(2-pyridyl)keton (DpK), Sigma Aldrich, Česká republika

Di-(2-pyridyl)keton-3-thiosemikarbazon (DpT), Katedra Farmaceutické Chemie a  
Kontroly Léčiv Farmaceutická Fakulta Univerzity Karlovy

Di-(2-pyridyl)keton-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon (Dp44mT), U. of Sydney

Di-(2-pyridyl)keton-4-fenyl-3-thiosemikarbazon (Dp4pT), University of Sydney

Di-(2-pyridyl)keton-4-methyl-3-thiosemikarbazon (Dp4mT), University of Sydney

Dichlormethan, Sigma Aldrich, Česká republika

Disodná sůl EDTA, Sigma Aldrich, Česká republika

Ethylacetát, Lach-Ner s.r.o., Česká republika

Kyselina chloristá, Sigma Aldrich, Česká republika

Kyselina octová, Fluka analytical, Německo

Methanol, Sigma Aldrich, Česká republika

Mravenčan amonný, Fluka analytical, Německo

n-hexan, Lachema n.p., Česká republika

Prázdňá hovězí plasma, Zooservis Dvůr Králové nad Labem, Česká republika

Prázdňá králičí plasma, Zooservis Dvůr Králové nad Labem, Česká republika

Prázdňá potkaní moč, Lékařská fakulta Hradec Králové Univerzity Karlovy, Česká re-  
publika

Prázdňá potkaní plasma, Lékařská fakulta Hradec Králové Univerzity Karlovy, Česká  
republika

Prázdné potkaní feces, Lékařská fakulta Hradec Králové Univerzity Karlovy, Česká republika

Toluen, Ing. Petr Švec - Penta, Česká republika

Ultračistá voda (Millipore purification system (Schwalbach, Německo))

## **6. Příprava roztoků**

### **6.1. Příprava zásobních roztoků**

Pro analýzu byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml. Dp44mT a Dp4mT byly obsaženy v jednom roztoku, zatímco DpK byl ve druhém roztoku. Všechny látky byly naváženy do odměrných baněk a rozpuštěny v acetonitrilu a poté byl objem roztoku doplněn po rysku stejným rozpouštědlem. Roztoky byly skladovány při teplotě -20°C.

### **6.2. Příprava standardních roztoků**

Standardní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků na požadovanou koncentraci pomocí 50% roztoku acetonitrilu ve vodě (dále označován jako 50% acetonitril). Standardní roztoky byly využívány pro optimalizace chromatografické metody, k optimalizaci postupu extrakce analytů z biologického materiálu i k pre-validaci metody.

### **6.3. Příprava roztoků pro ověření linearity**

Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 200 µg/ml Dp44mT a Dp4mT v jednom roztoku a DpK v druhém roztoku. Odpovídajícím ředěním zásobního roztoku byla připravena koncentrační řada pracovních roztoků o koncentraci 150 µg/ml, 100 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml a 15 µg/ml pro Dp44mT, Dp4mT i DpK.

Pracovní roztok vnitřního standardu (100 µg/ml) byl připraven rozpuštěním substance v acetonitrilu.

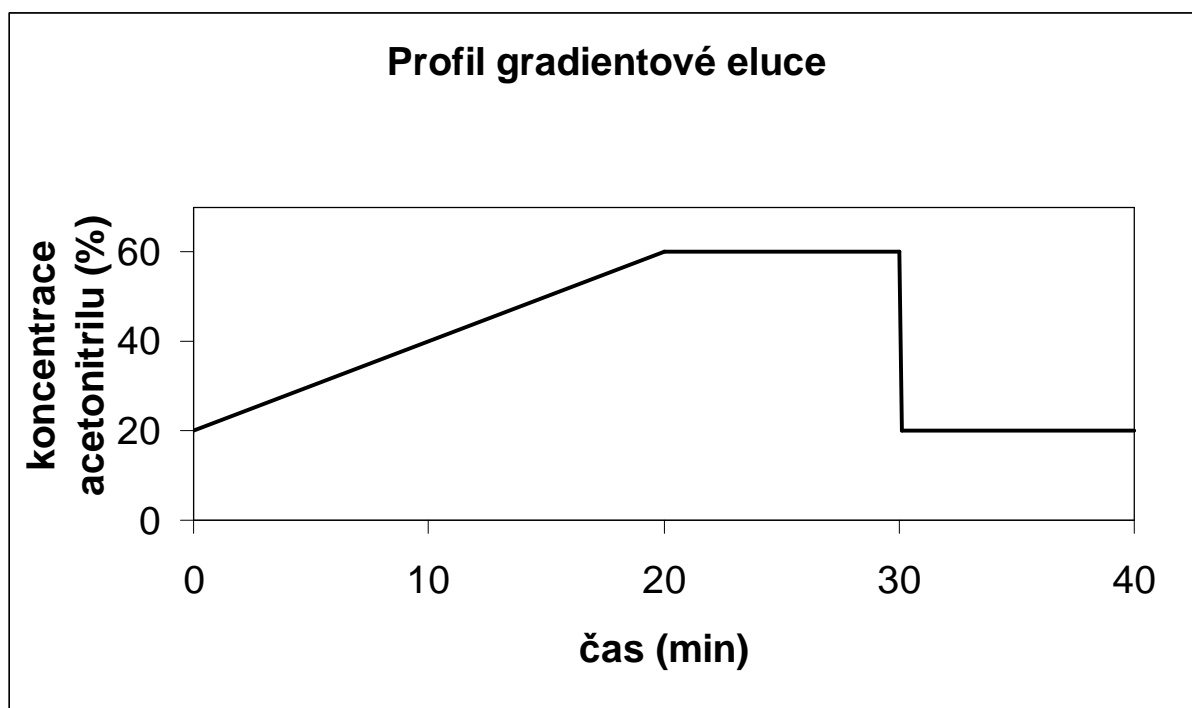
## 7. Vývoj chromatografických podmínek

### 7.1. Výběr stacionární fáze, mobilní fáze a detekce

Jako stacionární fáze byla zvolena kolona Discovery HS C18 (75 × 4.6 mm, 3 μm, Sigma Aldrich). Při hledání optimálního složení mobilní fáze byla testována směs 2 mM mravenčanu amonného a acetonitrilu v poměru 50:50 (v/v) a 55:45 (v/v) s rychlostí průtoku 0,3 ml/min. Pro další práci byla vybrána mobilní fáze se složením 2 mM mravenčan amonný: acetoniril (55:45, v/v).

Kvůli pravděpodobné iontové supresi balasty z biologického materiálu byla vedle izokratické metody vyvíjena i analytická metoda s gradientovou elucí. Testován byl následující eluční profil (Obr. 7.1):

- 0-20 min. 20-60% acetonitrilu, 20-31 min. 60% acetonitrilu, 31-31.1 min. 60 - 20% acetonitrilu, 31.1-40 min. 20% acetonitrilu



Obr. 7.1: Profil gradientové eluce

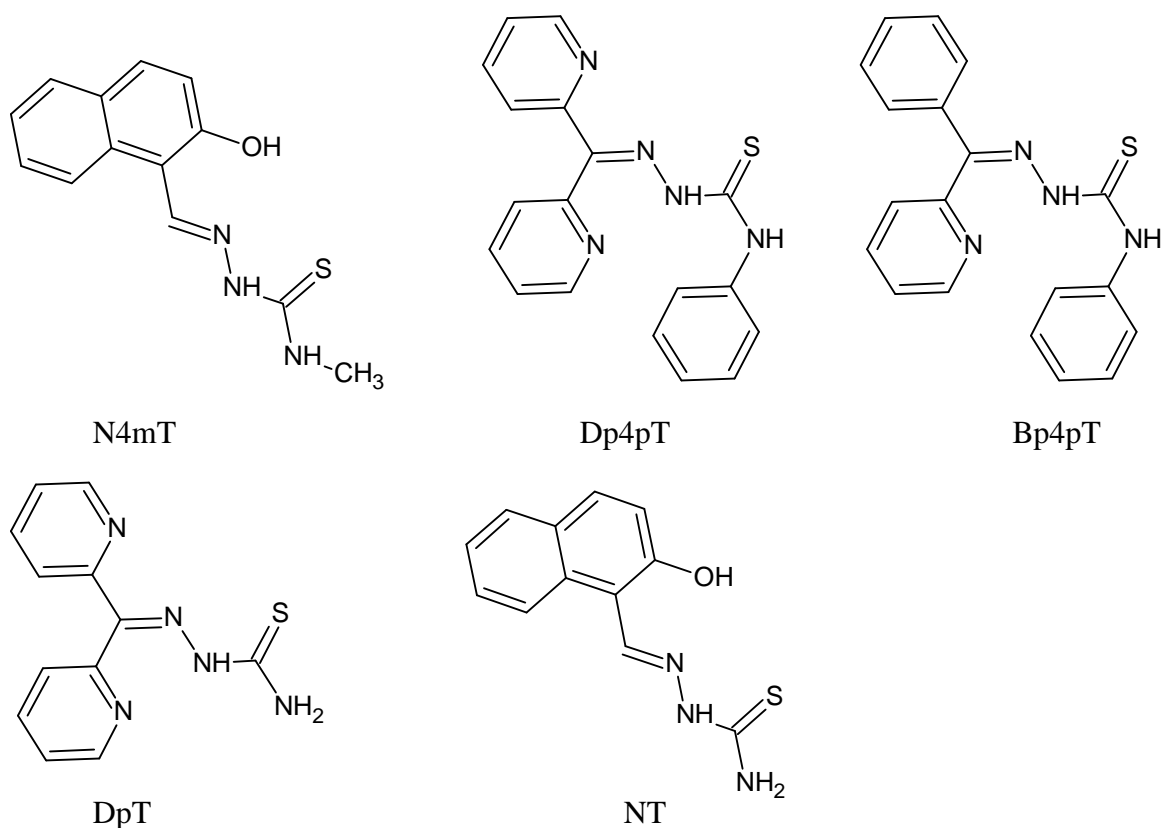
Při výběru vnitřního standardu byla použita UV-Vis detekce při 275 nm. Analýzy vzorků z biologického materiálu probíhaly za využití spojení HPLC a hmotnostního spektro-

metru s iontovou pastí v pozitivním módu za využití SIM, SRM, MS<sup>n</sup> (viz kapitola „Detekční módy“ i sken celého spektra v rozmezí 100-800 *m/z* ( full-scan).

Na kolonu, která byla temperována na 25°C, bylo vždy nastříknuto 10 µl vzorku.

## 7.2. Výběr vnitřního standardu a jeho příprava

Z několika dostupných, strukturně podobných látek byly testovány – Dp4pT, NT, N4mT, Bp4pT a DpT (chemické struktury viz. Obr. 7.2). První 4 látky byly již předem připraveny na spolupracujícím pracovišti (University of Sydney). DpT byl připraven v naší laboroři kondenzací komerčně dostupných surovin di-(2-pyridyl)ketonu s nadbytkem 3-semithiokarbazidu ve vodě, za příměsí několika kapek kyseliny octové. Po proběhnutí reakce (4 hodiny) došlo k vysrážení produktu, zatímco zbytek nezreagovaného 3-semithiokarbazidu zůstal rozpuštěný ve vodě. Sraženina byla odfiltrována a 3-krát promyta destilovanou vodou (5ml). Struktura a čistota DpT byla potvrzena HPLC analýzou, MS analýzou a NMR spektrem.



Obr. 7.2: Struktury látek testovaných jako vnitřní standard

## 8. Úprava biologického materiálu a vývoj metody izolace analytů

### 8.1. Plasma

K 197  $\mu\text{l}$  prázdné plasmy bylo přidáno 1  $\mu\text{l}$  standardních roztoků tak, aby výsledná koncentrace odpovídala 350 ng/ml pro parentní látku a metabolity a 500 ng/ml vnitřní standard (DpT). Dále bylo ke vzorku přidáno 20  $\mu\text{l}$  20 mM roztoku EDTA ve vodě (dále označováno jako 20 mM EDTA). Takto připravený vzorek byl promícháván na vortexu 10 minut. Pro izolaci analytů z plasmy a byly zkoušeny následující postupy:

- Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-liquid extraction, LLE) – Při tomto způsobu extrakce byla použita následující rozpouštědla: benzen, chloroform, toluen, ethylacetát. Po přidání 1 ml organického rozpouštědla byl vzorek 10 min třepán na třepačce. Pak byla za použití centrifugy oddělena organická a vodná vrstva (5 min., 10000 ot./min). 0,8 ml organické vrstvy bylo odpařeno pod proudem dusíku a odparek byl rekonstituován 100  $\mu\text{l}$  50% acetonitrilu a nastříknut na kolonu.
- Precipitace bílkovin – K deproteinaci byla použita kyselina chloristá v poměru k biologickému vzorku 20:1 (v/v) nebo acetonitril v poměru 1:3 (v/v). Kyselina byla zneutralizována ekvimolárním množstvím 26% amoniaku. Po přidání činidla byl vzorek 10 minut třepán na třepačce. Precipitát byl odstředěn (5 min, 10000 ot./min.), supernatantu byl poté odpařen pod dusíkem, rekonstituován 100  $\mu\text{l}$  50% acetonitrilu a nakonec analyzován.
- Extrakce na pevné fázi (Solid phase extraction, SPE) – Kolonky byly aktivovány 1 ml methanolu a následně promyty 1 ml 2 mM roztoku EDTA ve vodě (dále označován jako 2 mM EDTA). Na aktivované kolonky byl nanesen připravený vzorek plasmy. Následovalo promytí kolonky 1 ml 2 mM EDTA. Nakonec byly analyty eluovány 500  $\mu\text{l}$  methanolu. Rozpouštědlo bylo odpařeno proudem dusíku, odparek byl rozpuštěn ve 100  $\mu\text{l}$  50% acetonitrilu a byl analyzován.

## 8.2. Moč

K 295,5  $\mu\text{l}$  prázdné potkaní moči bylo přidáno 1,5  $\mu\text{l}$  standardních roztoků Dp44mT, Dp4mT, DpK a DpT, takže koncentrace analytů byla 350 ng/ml a koncentrace vnitřního standardu byla 500 ng/ml. Tyto vzorky byly použity pro extrakce následujícími způsoby:

- Zředění vzorku moči organickým rozpouštědlem – bylo použito 600  $\mu\text{l}$  acetonitrilu (poměr 1:2). Následně byl vzorek míchán na vortexu 10 minut. Po té byl vzorek odstředěn na centrifuze (5 min., 10000 ot./min.), bylo odebráno 500  $\mu\text{l}$  supernatantu a rozpouštědlo bylo odpařeno pod proudem dusíku. Zbytek byl rekonstituován 100  $\mu\text{l}$  50% acetonitrilu a nastříknut na kolonu.
- Extrakce na pevné fázi (Solid phase extraction, SPE) – Kolonky byly aktivovány 1 ml methanolu a promyty 1 ml 2 mM EDTA. Připravený vzorek moči byl nanesen na aktivované kolonky. Následovalo promytí kolonek 1 ml 2 mM EDTA a následná eluce analytů 500  $\mu\text{l}$  methanolu. Methanol byl odpařen pod dusíkovou atmosférou do sucha. Zbytek byl rozpuštěn ve 100  $\mu\text{l}$  50% acetonitrilu a analyzován.

## 8.3. Feces

Feces byly zmrazeny přidáním suchého ledu a rozetřeny ve třetí misce. Po vysublimování suchého ledu byly navážené feces smíseny se šestinásobným množstvím vody. Následovala hrubá dispergace, která byla provedena na vortexu mícháním po dobu 10 minut. Vzniklá suspenze byla vložena do ultrazvukové lázně, kde dále byla 15 minut desintegrována. Takto připravená suspenze sloužila jako blankový vzorek. Standardní vzorek byl připraven následujícím způsobem.

K 243,75  $\mu\text{l}$  suspenze feces bylo přidáno 2,5  $\mu\text{l}$  roztoku mateřské látky, metabolitů a 1,25  $\mu\text{l}$  vnitřního standardu, takže konečný objem byl 250  $\mu\text{l}$  a koncentrace byla 700 ng/ml pro Dp44mT, Dp4mT a DpK a 500 ng/ml pro vnitřní standard. K této suspenzi bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  20 mM EDTA. V rámci optimalizace extrakčního procesu byly zkoušeny následující postupy:

- Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-liquid extrakce, LLE) – Ke vzorku feces bylo přidáno 1 ml testovaného organického rozpouštědla (toluen, chloroform,

ethylacetát, dichlormethan, benzen, n-hexan, n-butanol). Vzorek byl 10 minut míchán na vortexu, 10 minut třepán na třepačce. Nakonec byla na centrifuze oddělena organická a vodná vrstva (5 minut, 10000 ot./min.). Bylo odebráno 800 µl organické vrstvy. Rozpouštědlo bylo odpařeno pod proudem dusíku, odparek byl rekonstituován 100 µl 50% acetonitrilu a analyzován.

- Precipitace organických zbytků ve feces kyselinou chloristou – k vodné suspenzi feces a analytů byla přidána kyselina chloristá v poměru 20:1. Vzorek byl promíchán na vortexu. Kyselina byla zneutralizována ekvimolárním množstvím 26% amoniaku. Vzorek byl odstředěn na centrifuze a supernatantu byl dále upravován extrakcí kapalina-kapalina dle výše uvedeného postupu s použitím dichlormethanu.

## **9. Příprava vzorků pro ověření linearity**

Do 197 µl plasmy byl přidán vždy 1 µl pracovních roztoků, takže vznikla řada vzorků plasmy o koncentracích 750 ng/ml, 500 ng/ml, 200 ng/ml, 100 ng/ml a 75 ng/ml Dp44mT, Dp4mT a DpK a 1 µl standardního roztoku vnitřního standardu. K takto připravenému vzorku bylo poté přidáno 20 µl 20 mM EDTA. Takto připravené vzorky byly podrobeny extrakci na pevné fázi na kolonkách DSC-Ph dle výše uvedeného postupu (viz. kapitola 8.1).

Linearita byla hodnocena metodou lineární regrese v programu Microsoft Excel za využití vnitřního standardu.

## **10. In vivo experiment**

V pilotním experimentu bylo podáno potkanovi Dp44mT (*i.v.* 1 mg / kg živé váhy) rozpuštěno ve formulaci složené z fyziologického roztoku:polyethylen-glykolu (PEG-300) a ethanolu (70:20:10, v/v/v). V definovaných časech byly odebírány vzorky plasmy. Na konci experimentu byla odebrána i moč a feces.

Vzorky byly odebírány odborným pracovníkem s kompetencí práce se živými zvířaty, Dr. M. Kunešem. Tyto vzorky byly využity k ověření přítomnosti metabolitů, které byly detekovány dříve po *in vitro* inkubaci léčiva s lidskými mikrosomy. Tyto vzorky biologického materiálu byly před HPLC-MS analýzou extrahovány postupem popsaném dříve. Pro vzorky



plasmy a moči byla využita SPE extrakce (viz. kapitola 8.1 a 8.2) a pro feaces LLE s využitím benzenu (kapitola 8.3)

# Výsledky

## 11. Vývoj chromatografických podmínek

### 11.1. Výběr vnitřního standardu

Při výběru vnitřního standardu bylo jasné, že by ideálně mělo jít o isotopicky značenou látku. Avšak pro finanční náročnost bylo rozhodnuto o použití jiné, strukturně podobné látky, která by opisovala chování analytu při extrakci i analýze. Mělo se jednat o látku, která by se dala snadno obstarat, a to ať už koupí u komerčních dodavatelů nebo snadnou syntézou z běžně dostupných prekurzorů. Dále bylo potřeba, aby došlo k dostatečné separaci na koloně a chromatogram obsahoval píky rozdělené až k základní linii.

Jelikož se v naší laboratoři pracuje s více látkami semithiokarbazonového typu byly z počátku testovány právě ony. Jmenovitě se jednalo o NT, N4mT, Bp4pT a Dp4pT. Avšak tyto látky, byť dostupné, nevyhovovaly svými retenčními časy, protože částečně nebo úplně koeluovaly s píky našich analytů, případně zbytečně prodlužovaly dobu analýzy. Proto jsme se rozhodli připravit další látku, u které byl předpoklad vhodného retenčního chování – DpT (postup viz. kapitola 7.2). Syntéza je značně jednoduchá, lze zajistit dostatečnou čistotu, chemická struktura je velice podobná mateřskému léčivu i jeho demetylovanému metabolitu a tudíž se dá očekávat, že jejich chování při extrakci budu podobné. Následnou HPLC analýzou jsem poté potvrdil, že tento vnitřní standard splňoval nejlépe naše požadavky (retenční čas, separace od ostatních analytů a strukturní podobnost).

Kromě toho HPLC/UV-Vis analýza ukázala, že DpT se při využití SPE extrahuje z plasmy ve výtěžku cca 90%. Jeho retenční čas za námi zvolených isokratických chromatografických podmínek byl 5.7 minuty.

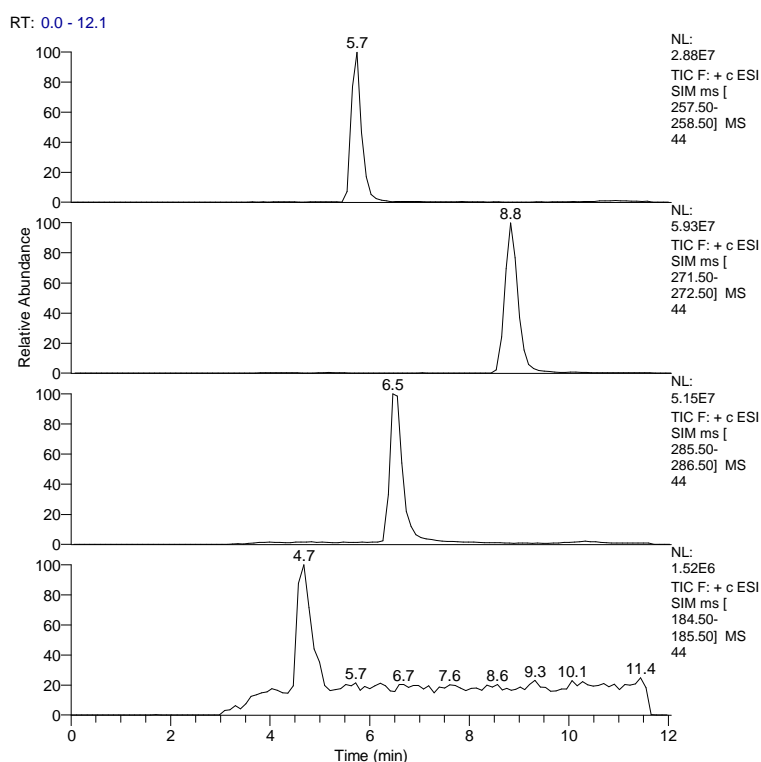
### 11.2. Výběr mobilní fáze a profilu analýzy

Ze dvou testovaných isokratických mobilních fází bylo zjištěno, že mobilní fáze tvořená mravenčanem amonným a acetonitrilem v poměru 55/45 (v/v) je pro analýzu Dp44mT a

jeho metabolitů vhodnější. Právě při tomto složení mobilní fáze došlo k separaci analytů tak, že byly píky odděleny až na základní linii a jejich symetrie byla za daných podmínek přijatelná.

Doba analýzy za těchto podmínek byla 12 minut. Poslední analyt ( Dp4mT) se eluoval v retenčním čase 8.9 minuty. (Obr. 11.1)

Pro separaci mateřské látky a jejích metabolitů z moči a feces se z důvodu značné iontové suprese biologickou matricí dle očekávání ukázala jako vhodnější gradientová eluce s následujícím profilem: 0-20 min. 20-60% acetonitrilu, 20-31 min. 60% acetonitrilu, 31-31.1 min. 60 - 20% acetonitrilu, 31.1-40 min. 20% acetonitrilu



Obr. 11.1: Chromatogram analýzy vzorku plasmy – c = 400ng/ml pro Dp44mT (6.5 min), Dp4mT (8.8 min), DpK (4.7 min) a 500 ng/ml pro DpT (5.7 min), Záznamy byly získány v SIM za použití  $[M+H]^+$ .

## 12. Výsledky metod izolace analytů z biologického materiálu

Protože výsledky této práce budou po další optimalizaci a validaci použity k dalšímu zkoumání osudu tohoto léčiva v organismu, bylo potřeba vyvinout metodu izolace analytů z biologického materiálu, aby nedocházelo k poškození kolony. Dále bylo nezbytné, aby tato metoda byla dostatečně selektivní pro parentní látku a její metabolity. Nejběžnější způsoby extrakce z biologického materiálu jsou: metoda extrakce na pevné fázi (SPE), extrakce kapa-

lina-kapalina (LLE), pro plasmu se dá někdy s výhodou využít precipitace plasmatických proteinů minerální kyselinou nebo organickým rozpouštědlem. Protože se jedná o poměrně komplexní matrice, je často problém vyvinout jednoduchou metodu extrakce, která by byla dostatečně účinná a dostatečně selektivní pro dané analyty. Zbytky matrice pak mohou komplikovat analýzu jednak iontovou supresí a jednak zvýšením šumu a tím způsobit obtížnější kvantifikaci analytů z chromatogramu. Proto je nezbytné vyvinout takovou metodiku, aby se dalo tomuto jevu zabránit nebo jej alespoň obejít

V této práci byly tedy jako extrakční metody byly testovány SPE, liquid-liquid extrakce, precipitační deproteinace minerální kyselinou, organickým rozpouštědlem a přímá extrakce do organického rozpouštědla.

## 12.1. Plasma

Pro demonstraci jsou hlavní výsledky testovaných postupů jsou uvedeny v tabulce 12.1.

<i>Výtěžnost analytů z plasmy v %</i>			
<i>Analyt</i>	Precipitace HClO <sub>4</sub>	LLE dichlormethan	SPE (DHC-Ph)
Dp44mT	0,80	0,84	94,31
Dp4mT	7,12	80,88	101,59
DpK	16,73	58,47	21,77

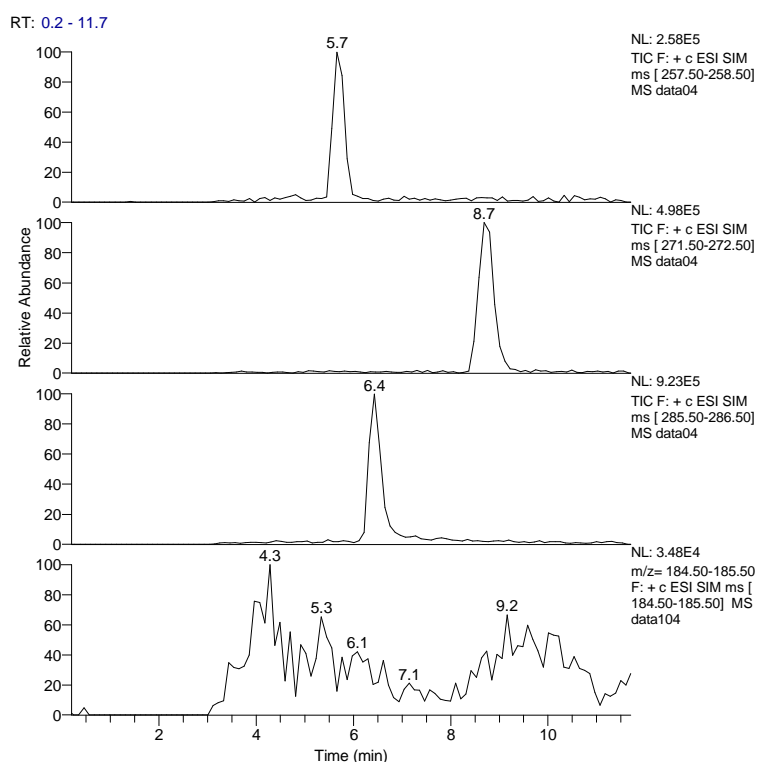
Tabulka 12.1: Výsledky extrakce z z plasmy

Jak je z tabulky 12.1 patrné, je metoda precipitační deproteinace nevhodná pro nízký výtěžek, který nepřesahuje ani v jednom případě 17%. Při využití precipitace acetonitrilem byla výtěžnost všech analytů ještě nižší (u žádného analytu nepřekročila výtěžnost<9%).

Při extrakci kapalina-kapalina (LLE) byly nejvyšší výtěžnosti získány při využití dichlormethanu. Pro oba metabolity byly výtěžnosti vyšší (Dp4mT=80%, DpK=58,5%) než v předchozím případě, ale parentní látka se touto metodou extrahovala jen v nepatrných množstvích, která nepřesáhla 1% očekávaného množství.

Pro další izolaci analyzovaných látek z plasmy se nejlépe osvědčila metoda SPE na kolonkách s fenylovým sorbentem, která zajistila dostatečný výtěžek všech sledovaných analytů kromě DpK (Dp44mT i Dp4mT >90%, DpK=21%).

SPE extrakce, jako nejvhodnější z dosud vyvinutých metod byla následně použita pro úpravu vzorku plasmy z *in vivo* experimentu. Obr. 12.1 ukazuje chromatogram analýzy ve vzorku plasmy který byl odebrán 60 minut po intravenózní aplikaci Dp44mT potkanům. Na záznamu byla detekována parentní látka (Dp44mT, t=6.4 min), i jeden z metabolitů (Dp4mT, t=8.7 min), a také přidáný vnitřní standard (DpT, t=5.7 min). Druhý metabolit (DpK) zde detekován nebyl



Obr. 12.1: Chromatogram – plasma –60 minut po i.v. aplikaci Dp44mT; Dp44mT (6.4 min), Dp4mT (8.7 min), a 500 ng/ml DpT (5.7 min), Záznamy byly získány v SIM za použití  $[M+H]^+$ .

## 12.2. Moč

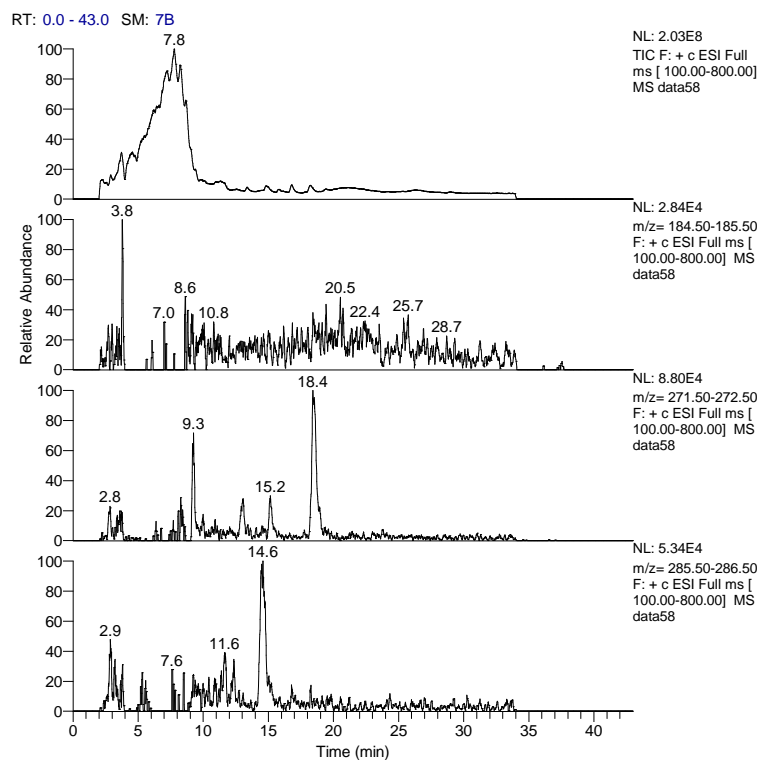
V případě analýzu vzorků moči byly všechny chromatografické podmínky s výjimkou gradientového profilu mobilní fáze totožné jako v případě analýzu vzorků plasmy. Gradientová eluce byla zvolena pro značnou iontovou supresi při analýze těchto vzorků za izokrtaických podmínek. Výsledky výtěžnosti SPE extrakce jsou uvedeny v tabulce 12.2.

Ani jeden ze zkoušených postupů nebyl vhodný pro kvantitativní extrakci analytů z moči. Postupem s nejlepšími výsledky však byla extrakce na pevné fázi (SPE), při které jsme dosáhli výtěžnosti okolo 30%. Při zředění vzorku moči organickým rozpouštědlem nedošlo k dostatečnému odstranění matrice, a proto nebylo možné tyto chromatogramy vyhodnotit.

<i>Výtěžnost analytů z moči v %</i>	
<i>Analyt</i>	SPE (DSC-Ph)
Dp44mT	25,51
Dp4mT	36,37
DpK	31,92

Tabulka 12.2: Výsledky extrakce z moči

Metoda SPE byla použita pro zpracování vzorku z *in vivo* experimentu, potkaní moči sebrané z metabolické klece za 24 hodin trvání pokusu. Na chromatografickém záznamu (Obr. 8.2) lze opět detekovat jak parentní látku (Dp44mT,  $t = 14.6$  min), tak i její demethylovaný metabolit (Dp4mT,  $t = 18.4$  min). Druhý metabolit, DpK v moči detekován nebyl.



Obr. 8.2: Chromatogram – moč 24 hodin po i.v. aplikaci Dp44mT; Dp44mT (14.6 min), Dp4mT (18.4 min), Záznamy byly získány v SIM za použití  $[M+H]^+$ .

### 12.3. Feces

Jako metody úpravy vzorků feces byly zkoušeny LLE a precipitace kyselinou chlorisilou s následnou LLE.

Výsledky LLE získané při použití vybraných rozpouštědel jsou uvedeny v tabulce 12.3.

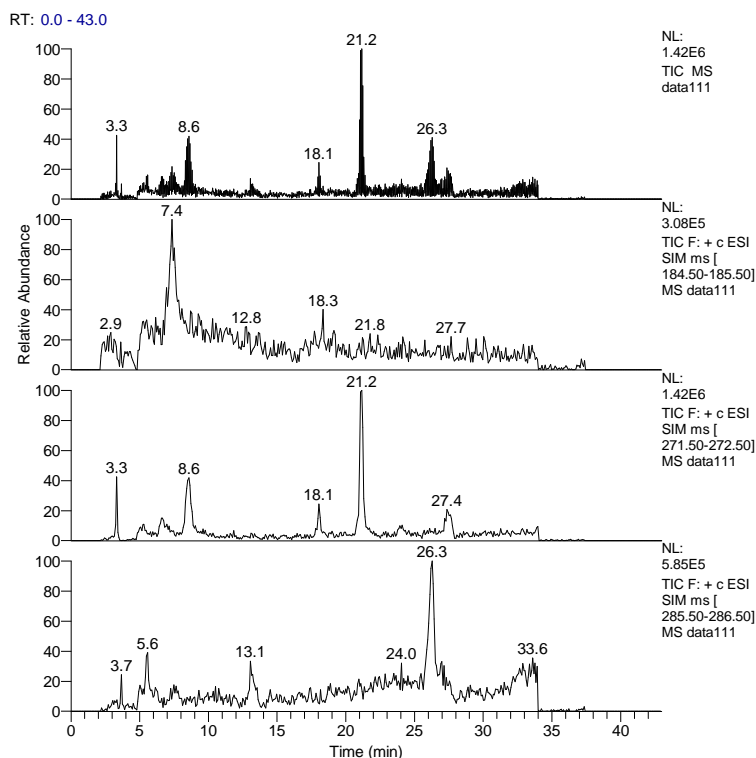
<i>Výtěžnost analytů z feces v %</i>				
<i>Analyt</i>	LLE dichlormethan	LLE Benzen	LLE Butan-1-ol	HClO <sub>4</sub> , 26% NH <sub>3</sub> , LLE
Dp44mT	63,65	97,21	21,70	0
Dp4mT	47,64	83,95	47,41	29,85
DpK	57,70	44,09	16,73	12,52

Tabulka 12.3: Výsledky extrakce z feces

Z tabulky 12.3 vyplývá, že nejúčinnější je extrakce kapalina-kapalina (LLE) suspenze do benzenu. Možnost precipitace organických zbytků v suspenzi feces kyselinou chloristou, s neutralizací 26% amoniakem a následnou LLE dichlormethanem se neukázala jako vhodný přístup. Při této metodě nebyl Dp44mT vůbec detekována a také ostatní analyty byly extrahovány v podstatně nižších výtěžnostech (<30%) než při samotné LLE benzenem nebo dichlormethanem. Nejvyšší výtěžnosti byly dosaženy při LLE dichlormethanem (63%, 47%, 57%) a benzenem (97%, 84%, 44%). Benzen vykázal vyšší účinnost extrakce nepolárnějších analytů, ale v porovnání s nimi vykazoval DpK výrazně nižší výtěžky. Pro analýzu vzorků u *in vivo* experimentů byly použity extrakce oběma rozpouštědly.

Chromatografický záznam analýzy vzorku z *in vivo* experimentu je přiložen jako obrázek 12.3. Lze na něm vidět oba metabolity (Dp4mT,  $t = 18.1$  min; DpK  $t = 7.4$  min). Dp44mT ve feces detekován nebyl.





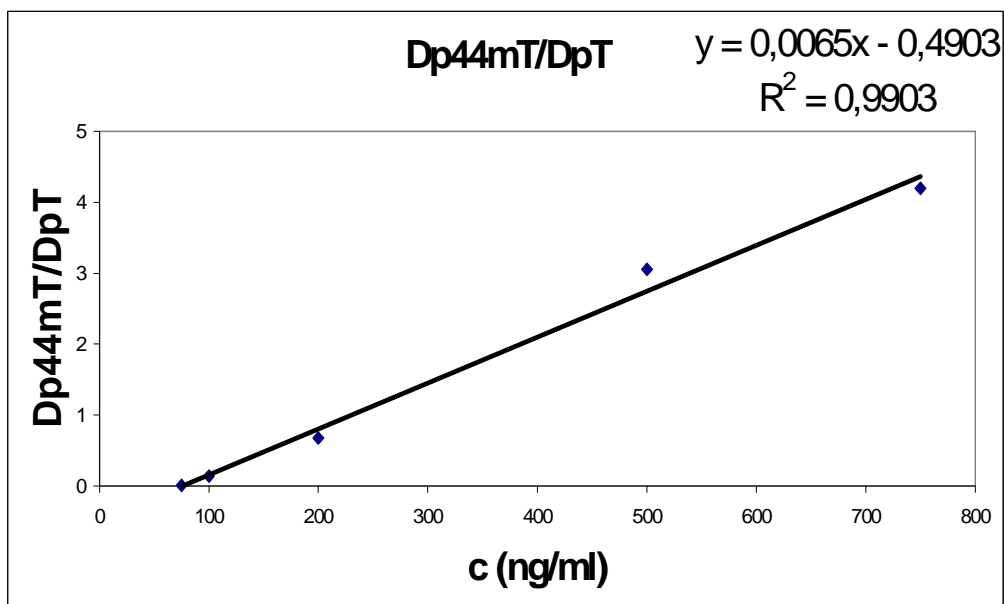
Obr. 12.3: Chromatogram – feces (LLE do dichlormethanu) 24 hodin po i.v. aplikaci Dp44mT; Dp4mT (18.1 min), DpK (7.4min), Záznamy byly získány v SIM za použití  $[M+H]^+$ .

Testovány byly i různé modifikace LLE. Byla zkoušena několikanásobná extrakce, kdy bylo odebrané množství rozpouštědla nahrazeno rozpouštědlem novým a vzorek byl znovu třepán. Následovalo odebrání 800  $\mu$ l organické vrstvy a celý postup se ještě jednou zopakoval. Všechny tři výtřepky byly spojeny a vysušeny proudem dusíku do sucha, rekonstituovány a analyzovány. Tento způsob však způsobil, že bylo extrahováno takové množství balastů, že to znemožnilo vyhodnocení analýzy. Zdá se ale, že na výtěžnost má vliv doba třepání na třepačce, protože zkrácení doby bylo doprovázeno snížením množství extrahovaného analytu.

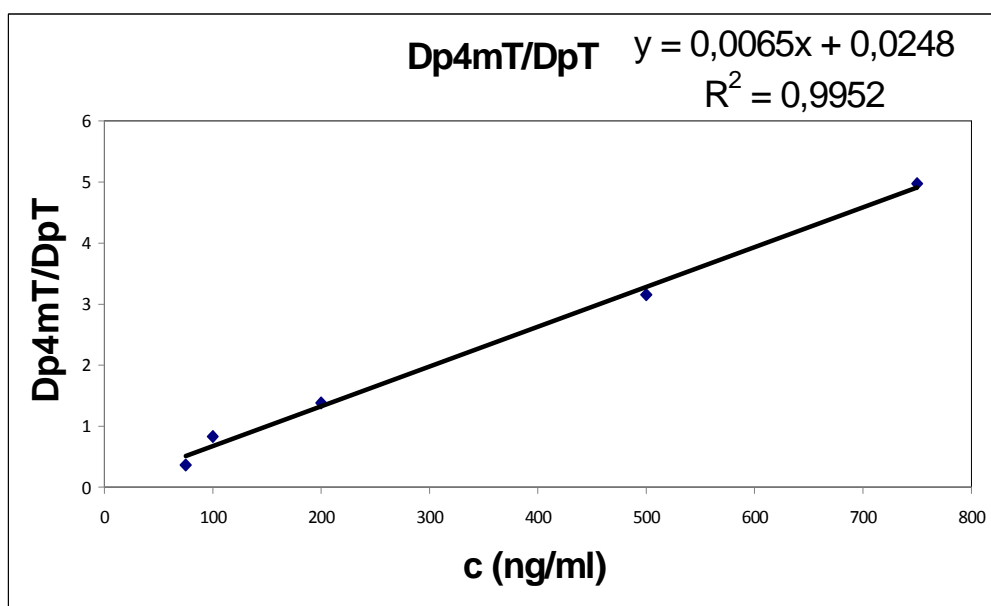
### 13. *Ověření linearity pro stanovení analytů v plasmě*

V procesu validace metody je nezbytné ověřit, že daná metoda je v zadaném koncentračním rozmezí lineární. Nejvíce vypovídající veličinou je poměr AUC analytu a vnitřního standardu. Výsledky jsou uvedeny na obr. 13.1, 13.2 a 13.3

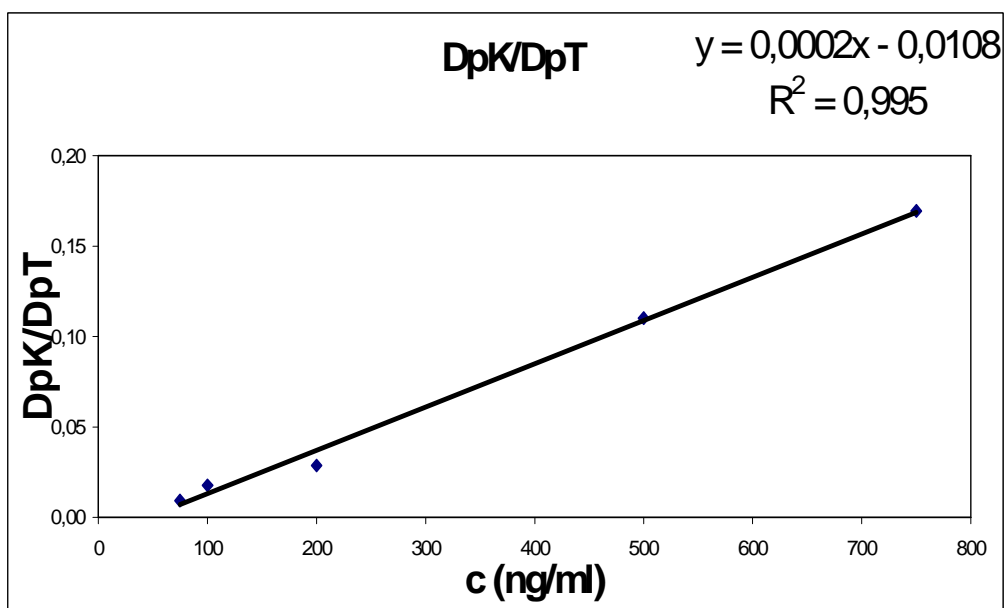
U všech sledovaných látek, jak Dp44mT, tak Dp4mT, tak i DpK, bylo v daném rozmezí dosaženo lineárního průběhu s koeficientem determinace přes  $R^2=0,9900$ .



Obr. 13.1: Kalibrační přímka pro poměr AUC Dp44mT a DpT a koncentraci v rozmezí 75 – 750 ng/ml



Obr. 13.2: Kalibrační přímka pro poměr AUC Dp4mT a DpT a koncentraci v rozmezí 75 – 750 ng/ml



Obr. 13.3: Kalibrační přímka pro poměr AUC DpK a DpT a koncentraci v rozmezí 75 – 750 ng/ml

## Závěr

V této práci byla vyvinuta vhodná separační metoda pro Dp44mT a jeho metabolity Dp4mT a DpK. Separace byla dosažena na reverzní C-18 fázi a, v závislosti na biologickém materiálu, ze kterého byly analyty izolovány byla využita izokratická nebo gradientová metoda. V případě plasmy bylo použito směsi 2 mM mravenčanu amonného a acetonitrilu (55/45, v/v), pro moč a feces byla vyvinuta gradientová eluce s profilem:

0-20 min. 20-60% acetonitrilu, 20-31 min. 60% acetonitrilu, 31-31.1 min. 60 - 20% acetonitrilu, 31.1-40 min. 20% acetonitrilu.

Gradientu bylo potřeba použít pro výraznou iontovou supresi způsobenou přítomností nečistot z biologického materiálu.

Druhým krokem této práce byl výběr vhodného vnitřního standardu. Ze zkoušených látek byla zvolena látka strukturně blízká, totiž di-(2-pyridyl)keton-3-thiosemikarbazon, která byla nasyntetizována z komerčně dostupných prekurzorů v naší laboratoři.

Dále bylo testováno několik možností izolace analytů z plasmy, moči a feces. Pro izolaci z plasmy a moči se z testovaných postupů pro Dp44mT, Dp4mT a DpK zdá nejvhodnější extrakce na pevné fázi s použitím fenylových kolonek. Pro feces byla vypracována metoda extrakce kapalina-kapalina, která ukazuje dobrou účinnost při izolaci Dp44mT a Dp4mT. Všechny metody se zdají být problematické, co se týče izolace DpK. Zde je možnost, že z důvodu vyšší polaritě má DpK nižší afinitu jak k fenylovým SPE kolonkám, tak k vysoce nepolárním rozpouštědlům jako je např. benzen než k prostředí biologické matrice. Toto pak vede k nízké výtěžnosti extrakce. Dále je možné, že díky polaritě této látky dochází k vyšší iontové supresi. Další možností je, že se DpK adsorbuje na částice precipitátu a tak je jeho dostupnost pro extrakční rozpouštědlo snižena. Je tedy možné, že k celkově nízké výtěžnosti DpK přispívají všechny výše diskutované možnosti určitým dílem. A proto bude tento jev předmětem budoucího zkoumání.

Posledním záměrem této práce bylo provést pilotní experiment, který by měl orientačně ověřit linearitu vztahu odezva MS detektoru a koncentrace analytu v plasmě pro danou metodu. Linearita byla ověřena v rozmezí 750 – 75 ng/ml a je vyjádřena jako poměr ploch píků analytu a vnitřního standardu v závislosti na koncentraci analytu.

V rámci této práce byly vyvinuté metody použity k potvrzení přítomnosti metabolitů odhalených v *in vitro* experimentu i ve vzorcích moči a feces z potkanů, kterým bylo intravenózně podáno Dp44mT. V moči bylo detekováno mateřské léčivo a demetylovaný meta-

bolit - Dp4mT. Ve feces parentní látka chyběla, ale byly zde přítomny oba očekávané metabolity (Dp4mT i DpK).

## Abstrakt

Mezi dynamická odvětví farmaceutického výzkumu patří bezesporu snaha o objevení nových antineoplastik, která by rozšířila paletu protinádorové léčby a/nebo zvýšila citlivost nádorů refrakterních na současnou terapii. Bylo prokázáno, že selektivní chelatace nitrobutanového železa (Fe) způsobuje selektivní toxický efekt na nádorové buňky. Biokompatibilní chelátory Fe odvozené od thiosemikarbazonu jsou v současnosti v centru pozornosti farmaceutického výzkumu. Mimo Triapinu, toho času ve 2. fázi klinického zkoušení, vedl systematický výzkum k objevu další generace chelátorů železa - di-(2-pyridyl)keton-3-thiosemikarbazony (DpTs). Na základě mnohých *in vitro* a *in vivo* experimentů, byl za vedoucí sloučeninu, vhodnou pro další výzkum, vybrán di-(2-pyridyl)keton-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon (Dp44mT).

Cílem této studie bylo vyvinout LC-MS metodu pro analýzu Dp44mT a jeho hlavních metabolitů 1. fáze v biologických materiálech (plasma, moč a feces). Pilotní *in vivo* experiment prokázal přítomnost dvou jeho metabolitů - di-(2-pyridyl)keton-4-methyl-3-thiosemikarbazon (Dp4mT) a di-(2-pyridyl)keton (DpK). Všechny analyty byly separovány na koloně Discovery HS C18 (75 x 4.6 mm, 3  $\mu$ m, Sigma Aldrich) za použití mobilní fáze složené z 2 mM roztoku mravenčanu amonného a acetonitrilu. Byl také syntetizován strukturální analog mateřského léčiva di-(2-pyridyl)keton-3-thiosemikarbazon (DpT), který byl využit při analýze jako vnitřní standard. Analyty byly izolovány ze vzorků plasmy a moči extrakcí na pevné fázi. Pro vzorky feces, byla vyvinuta metoda extrakce kapalina-kapalina. Byla ověřena linearita pro kvantifikaci Dp44mT a jeho metabolitů. Metoda využívaná v této práci bude plně validována a použita pro analýzu vzorků z farmakokinetického experimentu.

## Abstract

Development of novel anti-cancer drugs which would boost current therapeutic regimens and/or overcome the resistance against common chemotherapy ranks among the most progressive fields of modern drug discovery. Selective targeting of intracellular iron (Fe) has been recognized as a new strategy for anti-cancer drug development. Biocompatible Fe chelators structurally derived from thiosemicarbazone belong to the most intensively studied anti-cancer agents. Apart from Triapine, currently in phase II of a clinical trial, the systematic investigation led to development of a new generation of iron chelators – di-2-pyridylketone thiosemicarbazones (DpTs). Based on the outcomes of numerous *in vitro* and *in vivo* experiments and di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT) was selected as the lead compound for further development.

The aim of this study was to develop an LC-MS method for the analysis of Dp44mT and its main phase I metabolites in biological materials (plasma, urine and faeces). The pilot *in vivo* experiment revealed that di-2-pyridylketone (DpK) and Dp4mT are the main metabolites of this drug. All compounds were separated on Discovery HS C18 column (75 × 4.6 mm, 3 μm, Sigma Aldrich) using the mixture of 2 mM ammonium formate and acetonitrile as the mobile phase. The structural analog of the parent drug di-2-pyridylketone-3-thiosemicarbazone (DpT) was synthesized and used as an internal standard. The plasma and urine samples were treated by solid phase extraction while a liquid-liquid extraction using solvents of various polarities was tested for isolation of the compounds from faeces. Linearity of the method for the determination of Dp44mT and its main metabolites in plasma was tested. LC-MS method developed in this study will be fully validated and employed for the analysis of samples from the pharmacokinetic experiment.

## Literatura

- [1] Karlíček R. et al., *Analytická chemie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha, 2009
- [2] Churáček J., Jandera P., *Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*, Nakladatelství technické literatury, Praha, 1986
- [3] McMaster M. C., *LC/MS: A practical user's guide*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2005
- [4] Snyder L. A., Kirkland J. J., Dolan J. W., *Introduction to modern liquid chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2010
- [5] Churáček J., et al., *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*, Academia, Praha, 1993
- [6] Český lékopis 2009 (Pharmacopoea Bohemica), Grada Publishing, Praha 2009
- [7] National High Magnetic Field Laboratory, 1800 E. Paul Dirac Drive, Tallahassee, FL 32310 – 3706, USA,  
[http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization\\_esi.html](http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_esi.html), 20.4.2012
- [8] Evans G., *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*, CRC Press, 2004
- [9] Paul Gates, University of Bristol, Bristol BS8 1TS, UK,  
<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/apci-ionisation.html>, 20.4.2012
- [10] Brian M. Tissue, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061-0002, USA, <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html>, 21.4.2012
- [11] Brian M. Tissue, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061-0002, USA, <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/ms/graphics/quad-sch.gif>, 21.4.2012
- [12] Jonscher K. R., Yates III J. R., University of Washington at Seattle, *The Whys and Wherefores of Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*  
<http://www.abrf.org/ABRFNews/1996/September1996/sep96iontrap.html>, 21.4.2012
- [13] RigasLabs S.A., Sindos Industrial Area, Block no. 33A, PO Box: 1213, 570 22 Sindos, Thessaloniki, GREECE,  
[http://www.rigaslabs.gr/rigaslabs/files/image/ITQ\\_External\\_Ionization\\_Schematic.jpg](http://www.rigaslabs.gr/rigaslabs/files/image/ITQ_External_Ionization_Schematic.jpg), 21.4.2012
- [14] Paul Gates, University of Bristol, Bristol BS8 1TS, UK,  
<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/fticr-massspec.html>, 20.4.2012



- [15] Flanagan R.J., Morgan, P.E., Spenser E.P, Whelpton R., *Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review*, Biomed. Chrom. 20, 530-538, 2006
- [16] Aisen P., Enns C., Wessling-Resnick M., *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 33, 940–959, 2001
- [17] Papanikolaou G., Pantopoulos K., *Iron metabolism and toxicity*, Toxicol. Appl. Pharmacol. 202, 199-211, 2005
- [18] Trojan S. et al., *Lékařská fyziologie*, GRADA Publishing, Praha, 1997
- [19] Kolberg M., Strand K.R., Graff P., Anderson K.K., *Structure, function and mechanism of ribonucleotide reductases*, Biochim. Biophys. Acta 1699, 1-34, 2004
- [20] Hoke E.M., Maylock C.A., Shacter E., Free Radic. Biol. Med. 39, 403-411, 2005
- [21] Richardson D., Ponka P., Baker E., *The effect of the iron(III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell*, Cancer Res. 54, 685-689, 1994
- [22] Kalinowski D.S., Richardson D.R., *The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer*, Pharmacol. Rev. 57, 547-583, 2005
- [23] Buss J.L., Torti F.M., Torti S.V., *The role of iron chelation in cancer therapy*, Curr. Med. Chem. 10, 1021-1034, 2003
- [24] Whitnall M., Howard J., Ponka P., Richardson D.R. *A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 14901-14906, 2006
- [25] Yuan J., Lovejoy D.B., Richardson D. R., *Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment*, Blood 104, 1450-1458, 2004
- [26] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, CID = 10334137, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=10334137>, 23.4.2012
- [27] National Center for Biotechnology Information. PubChem BioAssay Database , BioAssay Aid = 439768, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?q=r&version=3.1&reqid=403768277874641933>, 23.4.2012
- [28] Mrkvičková Z., Kovaříková P., Klimeš J., Kalinowski D., Richardson D.R., *Development and validation of HPLC-DAD methods for the analysis of two novel iron chelators with potent anti-cancer activity*, J. Pharm. Biomed. Anal. 43, 1343-1351, 2007

- [29] Stariat J., Kovaříková P., Klimeš J., Lovejoy D.B., Kalinowski D., 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 877, 316-322, 2009