

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

HPLC analýza daunorubicinu a jeho metabolitu

Diplomová práce

Hradec Králové 2013

Klára Adamíková

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

V Hradci Králové dne 8. května 2013

.....

Klára Adamíková

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. PharmDr. Petře Kovařikové, Ph.D. za veškerou pomoc, trpělivost a poskytnutí cenných odborných rad, které jsem uplatnila během vypracovávání.

Práce byla vypracována za finanční podpory SVV 267 001.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	7
2.1.1. Stručná historie separačních metod	7
2.1.2. Princip chromatografie	8
2.1.3. Instrumentace kapalinové chromatografie	9
2.1.4. Detekce	12
2.1.5. Kvantitativní analýza	14
2.2. Úprava biologického materiálu	16
2.2.1. Přímý nástřik	16
2.2.2. Deproteinace	17
2.2.3. Extrakce organickými rozpouštědly	18
2.2.4. Extrakce na pevných fázích	20
2.3. Validace bioanalytických metod	21
2.4. Analyzovaná léčiva	25
2.4.1. Daunorubicin	26
2.4.2. Doxorubicin	27
2.4.3. Přehled vybraných studií zabývajících se analýzou antracyklinů v biologickém materiálu	28
3. CÍL PRÁCE	31
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1. Použitý materiál, pomůcky a technické vybavení	32
4.1.1. Chemikálie a biologický materiál	32
4.1.2. Pomůcky	32
4.1.3. Přístrojové vybavení	33
4.1.4. Další	33

4.2. Chromatografické podmínky.....	34
4.2.1. Výběr kolony a složení mobilní fáze.....	34
4.2.2. Další chromatografické podmínky	35
4.2.3. Příprava mobilní fáze	35
4.2.4. Příprava pracovních roztoků	35
4.2.5. Příprava standardních vzorků plazmy	36
4.3. Vývoj metody pro úpravu vzorků	37
4.3.1. Výtěžnost.....	37
4.4. Validace metody	37
4.4.1. Linearita.....	37
4.4.2. Přesnost	38
4.4.3. Správnost.....	38
4.5. Hodnocení stability v králičí plazmě	38
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	39
5.1. Vývoj chromatografických podmínek.....	39
5.2. Vývoj metody úpravy vzorku	46
5.2.1. Výtěžnost precipitace	46
5.3. Validace.....	47
5.4. Stabilita	51
6. ZÁVĚR	53
ABSTRAKT.....	54
ABSTRACT	55
POUŽITÁ LITERATURA	56
SEZNAM TABULEK.....	59
SEZNAM OBRÁZKŮ	59

1. ÚVOD

Vysokoučinná kapalinová chromatografie stále patří mezi dominantní separační metody v oblasti analýzy léčiv. Vyznačuje se značnou flexibilitou, neustálou modernizací, je dostatečně citlivá, rychlá a spolehlivá. Je tedy často využívána ke stanovení léčiv a jejich metabolitů v biologickém materiálu.

Daunorubicin se řadí mezi antracyklinová cytostatika, která jsou významná v léčbě hematologických malignit a některých solidních nádorů. Jejich společným nežádoucím účinkem je kardiotoxicita. Jednou z možností, jak zmírnit jejich toxické působení na myokard, je podání kardioprotektivního léčiva dexrazoxanu. Dále je možné změnit formulaci lékové formy, tzn. navázat cytostatikum na nosič, kterým může být např. lipozom.

Teoretická část diplomové popisuje princip HPLC, historický vývoj separačních metod, základní HPLC instrumentaci a principy kvantitativní analýzy. Dále je zaměřena na základní metody úpravy biologického materiálu před HPLC analýzou a validaci bioanalytických metod. Na závěr jsou shrnuty informace o analyzovaných léčivech a z vybraných studií, které se zabývají analýzou antracyklinů v biologickém materiálu.

V experimentální části je popsán vývoj metody ke stanovení daunorubicinu a jeho metabolitu daunorubicinolu v králičí plazmě za použití vnitřního standardu doxorubicinu. V návaznosti na to byla provedena pilotní validace metody zahrnující ověření linearity, přesnosti, správnosti a stability.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

V současnosti je vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) jednou z nejvíce progresivních metod, která nachází stále širší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv.

Metoda umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi. Analýza je rychlá, velmi citlivá (v závislosti na použitém detektoru) a je zapotřebí pouze malé množství vzorku. Při vhodně zvolených podmínkách lze zjistit totožnost léčiva, stanovit jeho obsah a odhalit přítomnost možných nečistot. To vše z jednoho nástřiku. Při stabilitních studiích lze HPLC využít ke sledování průběhu rozkladného procesu a vyvodit z hodnocení úbytku léčiva a současně vzniklých rozkladných produktů chemismus rozkladné reakce. HPLC se využívá také při analýzách přírodních léčiv v rostlinném materiálu. Důležitou oblastí analýzy léčiv v biologickém materiálu jsou farmakokinetické studie a terapeutické monitorování léčiv v tělních tekutinách (nejčastěji se jedná o krevní plazmu, sérum, moč). [1]

2.1.1. Stručná historie separačních metod

Některé pochody, které tvoří základ chromatografických metod, jsou známy již velmi dlouho. Příkladem může být využívání sorpčních vlastností některých zemin k čištění mořské vody v Aristotelových dobách. [2]

Samotnou chromatografii objevil ruský chemik a botanik Mikhail Tsvet (syn. Cvet, Tswett) na počátku 20. století při studiu pigmentů chloroplastů. Zjistil, že při filtraci jejich petrolejového roztoku skleněnou kolonkou naplněnou uhlíčanem vápenatým se směs začíná dělit na barevné proužky podle míry adsorpce složek na absorbent. Výsledek procesu nazval chromatogram a metodu chromatografickou. Se svými objevy však v té době neuspěl před botanickou společností a tato nová metoda

zůstala 25 let nevyužita. Až po publikování práce autorů Kuhn, Lederer a Winterstein v roce 1931 se chromatografie dočkala renesance a začala se hojně využívat. [2]

Za přeměnou kapalinové chromatografie v moderní a rychle se rozvíjející metodu stojí profesor C. Horváth z univerzity v Yale, který se proslavil se tím, že jako první sestavil HPLC instrument a zavedl pojem vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Tuto separační metodu pak uvedl na konferenci v roce 1970. [3]

Vývoj HPLC vyplynul z potřeby najít metodu pro dělení v kapalně fázi, která by byla komplementární k plynové rozdělovací chromatografii a současně dávala možnost kvantitativního hodnocení. HPLC je významná tím, že umožňuje dosáhnout v několika minutách dělení, které by jinak trvalo hodiny nebo i dny, popř. by to nebylo možné vůbec. [2]

2.1.2. Princip chromatografie

Obecně lze říct, že chromatografická separace je založena na transportu kapaliny (mobilní fáze) skrze porózní materiál (stacionární fáze). Mobilní fáze nese směs analytů, které různě interagují s povrchem stacionární fáze. Výsledkem celého procesu jsou různé časy migrace jednotlivých složek směsi. [3]

Látka se po vpravení do chromatografického systému rychle rozdělí mezi obě fáze ve snaze dosáhnout sorpční rovnováhy. Rovnováha je však neustále porušována tokem mobilní fáze.

Podle mechanismu interakce analyzované látky s pevným sorbentem lze chromatografické metody rozčlenit:

- a) adsorpční chromatografie
- b) rozdělovací chromatografie
- c) iontově výměnná chromatografie (IEC)
- d) gelová chromatografie
- e) afinitní chromatografie

[1]

2.1.3. Instrumentace kapalinové chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie se neustále rozvíjí díky stálému zlepšování a inovaci instrumentace. Pokroky se týkají nejen hardwaru přístrojů, ale také nových principů a jejich aplikací v této oblasti.

Mezi hlavní směry vývoje instrumentace pro kapalinovou chromatografii patří automatizace jednotlivých fází analýzy a celé techniky HPLC, miniaturizace kolon a celého zařízení, používání kombinací kolon, chromatografických technik a spojení HPLC se spektrálními technikami. [4]

Mezi základní prvky instrumentace HPLC, které se používají v současných komerčně dostupných přístrojích, patří:

Zásobníky mobilní fáze

Je zde uloženo potřebné množství rozpouštědla, které slouží ke kontinuálnímu zásobování HPLC systému mobilní fází. Zásobníky mohou být vybaveny filtry, které zabrání nasátí pevných nečistot do systému. [3]

Čerpadlo

Zajišťuje konstantní a kontinuální průtok mobilní fáze systémem. Nejmodernější čerpadla umožňují řízené mísení rozdílných rozpouštědel z různých zásobníků. [3]

Čerpadla pracující s konstantním průtokem využívají mechanického pohonu pístu v komoře, kde zdrojem hnací síly jsou elektromotory. Rozlišujeme čerpadla pracující na principu velkoobjemové injekční stříkačky s pístní komorou o objemu 100 – 500 ml a pístová čerpadla s malým objemem pístní komory (20 – 400 μ l), druhý typ se v současnosti používá mnohem častěji. Výhodou čerpadel s malým objemem pístní komory je možnost čerpat mobilní fázi bez přerušení toku, snadno a rychle vyměnit mobilní fázi a pracovat s gradientem. Je však velmi důležité před vstupem do čerpadla mobilní fázi dokonale odplynit. [4]

Degasser

Uvolňování molekul plynu v koloně nebo v cele detektoru může vážně narušit proces separace a znehodnotit tak chromatografický záznam. Proto je důležité odstranit plyny z mobilní fáze pomocí degasseru. Lze použít průtočný odplyňovač, kde mobilní fáze protéká porézní trubicí umístěné v evakuovaném prostoru, molekuly plynů tak prochází stěnou trubice do vnějšího prostředí. [4]

Dávkovač

Konstrukce zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony může významně ovlivnit účinnost separace.

Využívání techniky nástřiku injekční stříkačkou přes septum nebo při zastavení průtoku mobilní fáze (stop-flow dávkovače) je již nyní minulostí. Dnes se používají buď manuální smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů, nebo automatické dávkovače (autosamplery) umožňující nástřikovat vzorek do kolony bez přerušení toku mobilní fáze. Autosamplery jsou spojeny se zásobníkem, ve kterém jsou umístěny malé skleněné lahvičky (vialky) obsahující roztok vzorku. [3] [4]

Kolona

Kolona je srdcem HPLC systému. Probíhá zde separace analytů. Je místem, kde je mobilní fáze v kontaktu se stacionární fází, formuje fázové rozhraní mezi mobilní a stacionární fází. [3]

Kolony jsou převážně zhotoveny z trubic s hladkým vnitřním povrchem. Musí odolávat vysokým tlakům, chemickému působení mobilních fází a separovaných látek, zároveň však nesmí způsobovat rozklad analyzovaných látek. Rozměry kolon závisí na účelu použití a na velikosti částic náplně. Délka kolony se většinou pohybuje v rozmezí 5 – 15 cm, vnitřní průměr 3 – 5 mm, náplně obsahují částičky o průměru 3 – 5 μm . S rostoucí délkou kolony se úměrně zvyšuje účinnost separace, ale také doba analýzy a pracovní tlak. Účinnost separace a pracovní tlak naopak klesají s rostoucím čtvercem průměru částic náplně. [4]

Kolony jsou plněny vhodnými sorbenty (stacionární fází). Pro analýzu léčiv pomocí HPLC se nejčastěji používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze. Na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrnků jsou navázány různé

radikály, nejčastěji uhlíkové řetězce s 18, příp. 8 uhlíkovými atomy (jedná se o nepolární chemicky vázané fáze, tzv. reverzní fáze). Jako sorbenty se také používají silikagel a oxid hlinitý (polární sorbenty), či vhodné ionexy. [1]

Detektor

V podstatě všechny typy používaných detektorů v HPLC jsou koncentračního typu, tj. poskytují signál (odezvu) úměrný koncentraci detekovaných látek v eluentu. Lze je rozdělit do dvou skupin. Selektivní detektor poskytuje signál, který je úměrný koncentraci detekované komponenty v eluátu (např. spektrofotometrický a fluorimetrický detektor). Naproti tomu signál univerzálních (nespecifických) detektorů je úměrný celkové vlastnosti eluátu jako celku, tj. mobilní fázi a detekovaným složkám (např. refraktometrický detektor). [4]

Odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí. Je kladen důraz na vysokou citlivost a nízkou úroveň šumu. Odezva detektoru by měla být nezávislá na změnách tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty a umožňovat provedení gradientové eluce. [5]

V oblasti analýzy léčiv jsou nejčastěji užívanými detektory fotometrické pracující v ultrafialové, příp. i viditelné oblasti; následují detektory hmotnostní a fluorimetrické. Elektrochemické detektory se používají jen pro specifické aplikace a od užívání refraktometrických detektorů se dnes upouští. [4] Podrobněji viz kap. 2.1.4.

Zařízení pro zpracování dat

Počítačový systém (PC) umožňuje kontrolu veškerých parametrů nastavení HPLC přístroje (např. poměry organické a anorganické části v mobilní fázi, teplotu, nástřiky), také sbírá data z detektoru a monitoruje systémovou účinnost, což zahrnuje nepřetržité sledování složení mobilní fáze, teploty, zpětného tlaku atd. Kromě toho dovoluje kompletní zpracování naměřených dat (integrování, vyhodnocování atd.).

[1] [3]

2.1.4. Detekce

Výběr detektorů je velmi důležitý, ovlivní citlivost a selektivitu chromatografické analýzy. Zde je uveden přehled nejvíce používaných detektorů. [1]

Spektrofotometrické detektory

Jsou nejčastěji používány při HPLC analýze léčiv zejména pro svoji citlivost (10^{-9} až 10^{-10} g/ml) a také proto, že je lze používat při gradientové eluci. Proměřují absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu, který protéká celou detektorem. Využívá se především UV oblast spektra, mnohem méně oblast viditelná a nejméně infračervená oblast spektra. V praxi se tedy uplatňují především UV detektory, příp. UV-VIS detektory. [1]

Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance (A):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Mezi nejužívanější UV detektory patří:

- a) **UV detektor s fixní vlnovou délkou** – nejčastěji 254 nm nebo 280 nm, při nichž absorbuje většina léčiv; jednoduchá konstrukce, dnes již omezené použití
- b) **UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou** – měnitelná podle potřeb konkrétní analýzy
- c) **scanning UV detektor** – snímá během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva
- d) **detektor diodového pole** (diode array detector) – současná detekce a integrace signálů při několika vlnových délkách; trojrozměrná projekce; snímání celého spektra v reálném čase bez přerušení chromatografické separace; porovnání spektra s knihovnou spekter; vypočítání čistoty píku (identifikace látky)

[1] [4] [5]

Fluorimetrické detektory

Jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního). [5] Tyto detektory se používají u léčiv (příp. u jejich rozkladného produktu nebo metabolitu), která vykazují přirozenou fluorescenci. Látky, které nevykazují fluorescenci, lze v některých případech reakcí s derivatizačními činidly převést na fluoreskující deriváty.

Fluorescenční detektory jsou sice méně univerzální než UV detektory, avšak jsou citlivější (10^{-9} až 10^{-12} g/ml) a selektivnější. Lze je také použít pro gradientovou eluci. [1]

Konstrukce detektoru umožňuje zachycení maximálního množství fluorescenčního záření vznikajícího v cele detektoru násobičem, přičemž toto čidlo musí být chráněno před dopadem excitačního záření. Tohoto se dosahuje kombinací interferenčních filtrů, násobič je umístěn kolmo na zdroj excitačního záření. Detektory jednoduché konstrukce používají rtuťové výbojky a interferenční filtr jako zdroj monochromatického excitačního záření a detekují fluorescenční záření současně při všech vlnových délkách po oddělení zbytku rozptýleného excitačního záření. Fluorimetrické detektory moderní konstrukce umožňují nastavit délku excitačního i emitovaného záření použitím monochromátoru, současně lze programovat tyto vlnové délky v průběhu eluce k dosažení maximální citlivosti pro každou separovanou látku.

Některé fluorimetrické detektory umožňují měřit v průtokové kyvetě detektoru excitační fluorescenční spektra při konstantní vlnové délce emitovaného fluorescenčního záření nebo emisní fluorescenční spektra při nastavené vlnové délce excitačního záření. Měření spekter se uskutečňuje buď v systému "stop-flow" nebo u některých detektorů i bez zastavení toku mobilní fáze, jsou potom obdobou detektorů diodového pole spektrofotometrických detektorů. [5]

Elektrochemické detektory

Slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce, která probíhá na rozhraní elektroda – eluent. Hodnota elektrochemické veličiny je závislá na koncentraci analyzovaného léčiva.

Voltametrický, amperometrický a polarografický detektor využívá schopnosti léčiva se redukovat a oxidovat. Elektrochemické detektory jsou značně citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), avšak nelze je použít při gradientové eluci. [1]

Refraktometrické detektory

Měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony. Avšak pro své nevýhody je minimálně využíván pro analytické hodnocení léčiv. Má výrazně menší citlivost (10^{-6} g/ml), značnou teplotní závislost odezvy a není možné je použít k detekci při gradientové eluci. [1] [4]

Hmotnostní spektrometrie

V poslední době je hojně využíváno spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (MS), které je velmi užitečné pro identifikaci a strukturní analýzu.

Molekuly léčiva v plynném stavu jsou v hmotnostním spektrometru ionizovány, nabitě částice jsou poté v magnetickém či vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje a je zaznamenáno hmotnostní spektrum, tzn. četnost iontů ve vztahu k poměru – hmotnost/počet nábojů.

Spojení HPLC-MS je vysoce selektivní a citlivé, avšak finančně velmi náročné. [1] [4]

2.1.5. Kvantitativní analýza

Cílem kvantitativního stanovení je nalézt vztah mezi plochou nebo výškou píku a množstvím eluované látky. Plochy píků lze nejpřesněji vyhodnotit pomocí chromatografického softwaru. Mezi největší chyby ve vyhodnocování píků patří nepřesné určení základní linie na chromatogramu. [5]

Metoda vnějšího standardu

Koncentrace stanovované složky se určí porovnáním odezvy píku složky ve zkoušeném roztoku a odpovídající odezvy naměřené pro porovnávací roztok. [6]

Metoda vnitřního standardu

Ke zkoušenému a porovnávacímu roztoku se přidají stejná množství látky, kterou lze rozlišit od zkoušené látky (vnitřní standard, IS). Na vnitřní standard jsou kladeny následující požadavky. Jednak by to měla být strukturně blízká látka přidaná v podobné koncentraci, musí být stabilní a mít odlišný retenční čas vzhledem ke stanovované látce, avšak měl by se eluovat v blízkosti stanovované látky. Vnitřní standard nesmí reagovat se zkoušenou látkou a nesmí obsahovat nečistoty s retenčním časem podobným retenčnímu času zkoušené látky. [1] [6]

Koncentrace zkoušené látky se určí porovnáním poměrů ploch píků a nebo výšek píků stanovované látky a vnitřního standardu pro zkoušený roztok a odpovídajícího poměru pro roztok porovnávací. [6]

Metoda normalizace

Obsah jednotlivých složek zkoušené látky se vypočítá z plochy příslušných píků jako procento celkové plochy všech píků na chromatogramu. Výjimkou jsou píky rozpouštědel, píky jakýchkoliv přidaných činidel a píky, jejichž plocha je pod limitem zanedbatelnosti, tyto píky se zanedbávají. [6]

Kalibrační postup

Stanoví se vztah mezi měřeným nebo vyhodnocovaným signálem (y) a množstvím (koncentrace, hmotnost atd.) stanovované látky (x) a vypočítá se kalibrační funkce. Výsledky analýzy se vypočítají ze změřeného nebo vyhodnoceného signálu stanovované látky pomocí inverzní funkce. [6]

2.2. Úprava biologického materiálu

Získaný biologický materiál představuje z analytického hlediska velmi komplikovanou směs. Léčiva a jejich metabolity jsou zde obvykle přítomny v nízkých koncentracích a naopak vzorek obsahuje velké množství endogenních látek, které působí rušivě na průběh analýzy a následné vyhodnocování. Neupravené vzorky jsou většinou nevhodné pro chromatografickou analýzu, a proto je třeba vzorky nejprve předčistit a případně zakonzentrovat.

Výběru metody k úpravě vzorku je potřeba věnovat odpovídající pozornost. Záleží nejen na chemické struktuře, polaritě, rozpustnosti, ionizaci analytu, ale i na druhu biologického materiálu. Nejčastěji se analýza provádí v plazmě, séru, moči, případně v plné krvi. [7] [8]

2.2.1. Přímý nástřik

V ojedinělých případech lze vzorek přímo nastříknout na chromatografickou kolonu. Přímého nástřiku bez předchozí úpravy se využívá u stanovení látek, které fluoreskují nebo absorbují v ultrafialové oblasti, při použití vhodné vlnové délky totiž přítomné nečistoty neinterferují. Tuto metodu však nelze použít v případě, že biologický materiál obsahuje vysoké koncentrace proteinů. Naopak koncentrace analyzované látky musí být relativně vysoká, protože je možné nastříknout malé množství vzorku (10 – 50 μ l).

Opakované přímé nastříkávání biologických tekutin se nedoporučuje, analytická kolona může být rychle znehodnocena neeluovatelnými komponentami ze vzorku, což se projeví vzestupem tlaku a změnou separačních vlastností. Tento nepříznivý jev může zpomalit použití předkolony, její častá výměna prodlouží použitelnost kolony. [7] [9]

2.2.2. Deproteinace

Deproteinací odstraníme bílkoviny přítomné v biologickém materiálu. Tato metoda je používána pro svoji jednoduchost a rychlost, ale má i svá omezení. Nevýhodou deproteinace je vysoký obsah endogenních látek ve vzorku a jeho zředění. [7]

Odstranění proteinů může být provedeno řadou postupů, např. precipitací chemickými činidly, ultrafiltrací, či denaturací pomocí enzymů. Při volbě deproteinační techniky je třeba zohlednit chemické složení analyzované látky, její stabilita, vazba na proteiny a precipitační výtěžnost. [7] [10]

Precipitace

Precipitace proteinů vhodnými deproteinačními činidly patří mezi nejjednodušší metody úpravy vzorku. Zabrání se tím vysrážení bílkovin na chromatografické koloně při styku vzorku s mobilní fází, která obsahuje organická rozpouštědla nebo koncentrovanější pufrů. Po centrifugaci je část čirého supernatantu nastříknuta na kolonu. Pokud je však analyzovaná látka ve vzorku přítomna v nízkých koncentracích, je vhodné supernatant odpařit a odparek rozpustit v minimálním množství mobilní fáze a až poté nastříknout na chromatografickou kolonu. [7]

Jako deproteinační činidlo lze použít organická rozpouštědla, např. acetonitril, methanol, ethanol nebo aceton. Velmi účinné jsou silné kyseliny, např. kyselina trichloroctová, trifluoroctová, chloristá, chlorovodíková. K deproteinaci se také využívají soli těžkých kovů, např. síran zinečnatý a hydroxid litný, wolframian sodný a chlorid rtuťnatý. [7] [10]

Ultrafiltrace

Touto technikou jsou proteiny z biologického materiálu separovány přechodem přes semipermeabilní membránu. Moderní ultrafiltrační membrány jsou schopny zachytit více než 99 % sérových proteinů. Výhodou metody je získání bezproteinového ultrafiltrátu bez naředění a bez jiných iontů z deproteinačních činidel. Tento způsob deproteinace je však vhodný pouze pro stanovení látek, které

nejdou významně vázány na proteiny a nevykazují specifickou vazbu na použité membrány. [7]

2.2.3. Extrakce organickými rozpouštědly

Proces extrakce je závislý na řadě faktorů, především na fyzikálně chemických vlastnostech rozpouštědla, pH vodné fáze, vzájemném poměru fází, způsobu a době trvání extrakce a také na způsobu předchozího zpracování vzorku. [10]

Volba rozpouštědla

Rozpouštědlo je zvoleno podle charakteru extrahované látky. Hydrofobní látky se lépe rozpouštějí v nepolárních roztocích (s nízkou dielektrickou konstantou), naopak pro hydrofilní látky jsou vhodné roztoky polárních látek (s vysokou dielektrickou konstantou). Cílem je zvolit rozpouštědlo, příp. jejich směs, ve kterém se bude extrahovaná látka nejlépe mísit. Je tedy důležité, aby se rozpouštědlo co nejméně míšilo s vodou a nereagovalo s extrahovanou látkou. Výhodou jsou těkavé látky, které je snadné v případě nutnosti odpařit. Čistota používaných extrakčních činidel je zajištěna redestilací, či komerčně dostupnými rozpouštědly. [10]

Rozpouštědla	Relativní permitivita ϵ (dielektrická konstanta)	Bod varu (°C)
n-Hexan	1,88	68,7
Benzen	2,24	80
Toluen	2,30	111
Diethyleter	4,33	35
Chloroform	4,80	61
Ethylacetát	6,11	77
Acetonitril	37,5	82
Ethanol	25,8	78
Methanol	33,6	65
Voda	80,4	100

Tab. 1. Mixotropní řada vybraných rozpouštědel [7]

Vliv pH vodné fáze

Vyšší selektivity a především výtěžnosti extrakce je možné dosáhnout pomocí úpravy pH biologického materiálu. Při nižším pH (> 5) se méně disociují a tudíž lépe extrahují látky kyselé povahy. Naopak při pH vyšším (< 7) lépe přecházejí do rozpouštědla látky bazické.

Teoreticky lze vypočítat vhodné pH vodné fáze z disociační konstanty pKa podle Henderson-Hasselbachovy rovnice. Obecně je konstanta definována:

$$\text{pro kyseliny} \quad K_a = \frac{[A^-] \cdot [H^+]}{[AH]}$$

$$\text{pro baze} \quad K_a = \frac{[B] \cdot [H^+]}{[BH^+]}$$

příčemž	[AH]	koncentrace nedisociované kyseliny
	[A ⁻]	koncentrace disociované kyseliny
	[B]	koncentrace nedisociované báze
	[BH ⁺]	koncentrace disociované báze
	[H ⁺]	koncentrace vodíkových iontů
	pKa	záporný logaritmus konstanty Ka

[10]

Vzájemný poměr fází

Vhodně zvoleným poměrem vodná : organická fáze lze zlepšit extrahovatelnost látky. Vyššího výtěžku extrakce lze obvykle dosáhnout větším množstvím rozpouštědla. Zároveň však větší objem rozpouštědla s sebou nese určité nevýhody, např. zředění vzorku nebo obtížnější odběr organické fáze ze směsi. Nejvhodnější poměr vodné a organické fáze je 1:5 až 1:10. [10]

Způsob a doba trvání extrakce

Intenzita extrakce a doba třepání musí být adekvátní, aby látka co nejdokonaleji přešla do rozpouštědla. Doba extrakce by neměla být příliš dlouhá, aby nevznikly těžko odstranitelné emulze. Podmínky extrakce a její výtěžnost se zjišťuje především empiricky. Aby byla zajištěna reprodukovatelnost procesu, musí probíhat za konstantních podmínek. [10]

2.2.4. Extrakce na pevných fázích

Extrakce na pevnou fázi (SPE, Solid phase extraction) je metoda, která v poslední době nabývá na významu. Svou podstatou je velmi podobná extrakci kapalina-kapalina (LLE), jedná se také o rozdělení rozpuštěných látek mezi dvě fáze, avšak zde je druhou fází pevný nosič. [8]

Použitím SPE se můžeme vyhnout řadě problémů spojovaných s LLE, např. SPE má minimální spotřebu organických rozpouštědel, která jsou často řazena mezi jedovaté látky, ničící ozónovou vrstvu, atd. Je to metoda přesná, časově nenáročná, jednoduchá, s dobrou výtěžností a reprodukovatelností srovnatelnou s extrakcí provedenou organickými rozpouštědly. Je možné ji automatizovat použitím vakuového systému, který umožňuje souběžně stanovit 8 – 12 vzorků. SPE se často používá pro zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek. [7] [8]

Principem SPE je sorpce analytu na tuhou fázi z fáze kapalně, přičemž interakce mezi analytem a tuhou fází musí být silnější než s kapalnou fází, ve které je rozpuštěný analyt. Sorbent je uložen v trubičkách z polypropylenu nebo ze skla, či slisován se skleněnými vlákny do disků. Při výběru sorbentu je jedním z hlavních kritérií polarita analyzovaného léčiva. Komerčně je dostupná celá řada sorbentů, např. chemicky obrácené vázané fáze na bázi silikagelu, normální fáze a iontově výměnné fáze. Výsledkem SPE je analyt v roztoku, který obsahuje minimum interferujících látek a je v dostatečné koncentraci. [8]

Proces extrakce zahrnuje několik kroků. Nejprve je potřeba sorbent aktivovat (tzv. kondicionace), nejčastěji methanolem, poté je nutné extrakční kolonku promýt vodou. Tím je vytvořeno vhodné prostředí pro navázání analytu na sorbent. Nyní se aplikuje vzorek, který prochází přes pevnou fázi. Následuje promývání pevné fáze vodou, čímž se odstraní zbytky matrice z pevné fáze. Finálním krokem je eluce analyzovaných látek organickým rozpouštědlem, při které dochází k desorpci látky z pevné fáze. [11]

V celé řadě případů se ukázalo, že metoda extrakce na pevnou fázi je vhodná a spolehlivá alternativa k extrakci kapalina-kapalina. [8]

2.3. Validace bioanalytických metod

Validace je proces, kterým se ověřuje vhodnost analytické metody pro daný účel. Během validačního procesu se zjišťují klíčové charakteristiky metody. Cílem je tedy stanovit podmínky, za kterých je vypracovaná metoda použitelná, a garantovat spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo více laboratořích. [1]

Dokument FDA „Guidance for industry – Bioanalytical Method Validation“ poskytuje informace k validaci bioanalytických metod, které nachází uplatnění v klinické farmakologii, ve studiích biologické dostupnosti, bioekvivalence a farmakokinetiky. Metodiku lze také použít pro nehumánní farmakologicko-toxikologické studie a preklinické zkoušky léčiv.

Podle účelu použití metody se rozlišuje validace úplná, částečná nebo zkřížená validace. Úplná validace se vztahuje pro nové bioanalytické metody nebo nové struktury léčiv. Částečná validace se provádí pro již validované metody, v jejichž metodice byly provedeny změny. Zkřížená validace porovnává validační parametry dvou a více bioanalytických metod, ze kterých byla získána data.

Chemická analýza biologických materiálů musí splňovat určité požadavky. Mezi základní parametry, které je třeba ověřit, patří správnost, přesnost, selektivita, citlivost, reprodukovatelnost a stabilita. Validace vyvíjené metody obvykle zahrnuje stanovení selektivity, správnosti, přesnosti a výtěžnosti, kalibrační křivky a stability. [12]

Selektivita (selectivity)

Selektivita je schopnost jednoznačně zhodnotit analyt v přítomnosti jiných komponent, jejichž přítomnost lze očekávat. Tento parametr se dokládá výsledky z analýzy standardu a pak vzorků matrice bez analyzované látky, tzn. blankových vzorků.

Potencionálními interferujícími látkami mohou být endogenní látky, metabolity, produkty degradace, nečistoty z výroby, exogenní xenobiotika atd. [12]

Správnost (accuracy)

Správnost analytického postupu vyjadřuje shodu mezi získanými hodnotami a hodnotou správnou, referenční.

Zjistí se opakovanými analýzami vzorků, které obsahují známé množství analytu. Je potřeba provést nejméně pět měření na koncentraci a doporučují se nejméně tři koncentrace v očekávaném rozsahu. Průměrná hodnota by měla být v rozmezí 15 % správné hodnoty, výjimkou je limit kvantifikace (LLOQ), u něhož by se naměřená hodnota neměla lišit o více než 20 %. [12]

Přesnost (precision)

Přesnost vyjadřuje míru shody mezi výsledky série měření, které jsou získávány opakovaně z jednoho homogenního vzorku. Obvykle je vzorek minimálně pětkrát analyzován kompletním postupem, který zahrnuje i přípravu vzorku, ve třech koncentračních úrovních. Přesnost je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD), neboli variační koeficient (CV) těchto pěti stanovení. Koeficient variace by neměl přesáhnout 15 % kromě limitu kvantifikace, kde je tolerováno 20 %. [12]

Relativní směrodatná odchylka je vyjádřena následujícím vzorcem, kde (SD) představuje směrodatnou odchylku a (\bar{x}) průměr naměřených hodnot:

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

Směrodatná odchylka je definována následujícím vzorcem, (n) představuje počet měření a (x_i) jednotlivé výsledky měření:

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$$

[13] [14]

Podle podmínek opakování lze přesnost rozlišit na tři úrovně: opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost.

O **opakovatelnost** (repeatability) se jedná v případě, kdy je metoda prováděna za naprosto stejných podmínek (stejný způsob, použitá činidla, přístroj i pracovník).

Naopak **mezilehlá přesnost** (intermediate precision) představuje metodu, která umožňuje variabilitu v rámci laboratoře, tzn. analýza probíhá s různými činidly, různé dny, s jinými pracovníky i přístroji, avšak v jedné laboratoři se stejným homogenizovaným vzorkem.

Reprodukovatelnost (reproducibility) spočívá v metodě, kterou lze použít v různých laboratořích, provedení je shodné jako u mezilehlé přesnosti. [1] [12]

Výtěžnost (recovery)

Výtěžnost popisuje efektivitu extrakce analytické metody. Odezva detektoru na množství analytu extrahovaného z biologické matrice se porovnává s odezvou standardů, které představují 100% výtěžnost. Výsledky jsou získávány z analýz extrahovaných vzorků na třech koncentračních úrovních (nízká, střední a vysoká).

Výtěžnost extrakční procedury nemusí dosahovat 100 %, je však podstatné, aby byla stálá, přesná a reprodukovatelná jak pro analyty, tak pro vnitřní standard. [12]

$$\text{výtěžnost (recovery)} = \frac{100 \cdot \text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

[1]

Kalibrační křivka (calibration/standard curve)

Kalibrační křivka vyjadřuje závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu. Měla by být sestrojena pro každý analyt ve vzorku. Počet a koncentrace standardů používaných k sestrojení křivky by mělo odpovídat charakteru závislosti odezva/koncentrace a také předpokládanému rozsahu koncentrace ve studii.

Kalibrační křivka by měla zahrnovat vzorek matrice (blank sample), vzorek matrice s vnitřním standardem (zero sample) a šest až osm nenulových standardů pokrývají očekávané koncentrační rozpětí, včetně limitu kvantifikace. [12]

Limit kvantifikace (lower limit of quantification, LLOQ) představuje nejnižší koncentraci látky, která je stanovitelná s dostatečnou přesností (do 20 %) a správností (v rozsahu 80 – 120 %), pík analytu by měl být identifikovatelný, oddělený a reprodukovatelný. Signál analytu by měl být alespoň pětinásobný v porovnání k signálu blankového vzorku.

Při sestřování kalibrační křivky je potřeba zohlednit, aby čtyři ze šesti nenulových standardů (včetně LLOQ a standardu nejvyšší koncentrace) splňovaly požadavek na maximálně 20% odchylku u LLOQ a 15% odchylku u koncentrace standardů. [12]

Stabilita (stability)

Stabilita léčiv v biologických tekutinách je ovlivněna skladovacími podmínkami, chemickými vlastnostmi léčiva, jeho lékovou formou a maticí.

Stabilitní studie by měly zhodnotit stabilitu analyzovaných látek během určitého časového úseku. Rozlišujeme dlouhodobé studie, ve kterých jsou vzorky po stanovenou dobu zamrazeny, a krátkodobé, ve kterých jsou analyty uchovány za laboratorní teploty.

Hodnoceným parametrem je tedy pokles koncentrace analyzované látky v čase. [12]

Test způsobilosti (system suitability test)

Test způsobilosti analytického systému je součástí validace analytické metody. Jeho podstatou je definování určitých kritérií, která musí být splněna. Není totiž možné přesně definovat všechny podmínky, za kterých má být metoda použita, aby výsledky byly spolehlivé. Proto při každém novém použití metody není nutné opakovat celou validaci. Při splnění požadovaných kritérií se předpokládá, že dříve provedená validace platí. [1]

2.4. Analyzovaná léčiva

Cytostatikum daunorubicin patří společně s doxorubicinem do skupiny antracyklinů. Cílem jejich působení je zasáhnout DNA v jádře buňky. Mechanismus účinku antracyklinů spočívá v jejich schopnosti interkalace, tedy ve schopnosti se vmezeřit mezi páry bazí DNA a zablokovat tím funkci zejména topoizomerázy II. Tak je uskutečněna inhibice replikace a transkripce DNA a RNA.

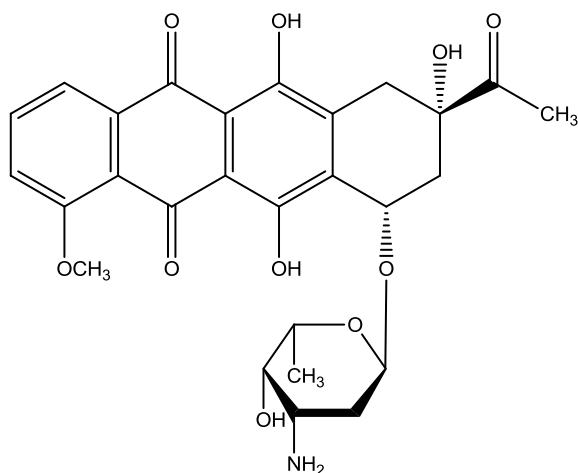
Bohužel však v přítomnosti antracyklinů vznikají reaktivní sloučeniny kyslíku, které vedou k peroxidaci lipidů a následnému poškození myokardu. Typické pro toto poškození jsou změny v subcelulární struktuře myokardu, tj. pomalá ztráta myofibril a vakuolizace buněk. V tomto ději se významně uplatňují ionty železa dostupné z myoglobinu a hemoglobinu. [15] Klinicky se antracyklinová kardiotoxicita projeví buď akutně (arytmie, komorové dysfunkce v průběhu nebo ihned po podání) nebo jako časná toxicita v závislosti na dávce cytostatika (kardiomyopatie), či jako pozdní toxicita (městnavé srdeční selhání za 4 – 20 let po poslední dávce). Antracykliny patří mezi nejčastější chemoterapeutika, která způsobují kardiovaskulární komplikace, možnost rozvoje kardiomyopatie je tedy limitujícím faktorem jejich použití. [15] [16].

V klinické praxi je dostupné jediné léčivo – dexrazoxan, které je schopno chránit myokard před toxickým působením antracyklinů. Díky své struktuře je prolečivem, které je metabolizováno na chelatačně aktivní metabolit. Tím se omezí tvorba komplexů železa s antracykliny, které jsou zodpovědné za vznik kyslíkových radikálů. [17] Další z možností, jak omezit kardiotoxicitu těchto cytostatik, je jejich navázání na nosiče, které vhodným způsobem mění farmakokinetiku léčiva, prodlužují terapeutický účinek a omezují nežádoucí účinky. Nejčastěji se používá enkapsulace cytostatik v lipozomech, či pegylace cytostatik, příp. lipozomů. Jako příklad klinického použití jsou lipozomální daunorubicin, lipozomální doxorubicin a pegylovaný lipozomální doxorubicin. Lipozomy prodlužují dobu cirkulace cytostatika a chrání jej před chemickou a enzymatickou degradací v cirkulaci.

[18] [19]

2.4.1. Daunorubicin

Daunorubicin je produkován určitými kmeny *Streptomyces coeruleorubidus* nebo *Streptomyces peuceticus*. Je to oranžovočervený krystalický hygroskopický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě a v methanolu, těžce rozpustný v ethanolu 96%, prakticky nerozpustný v acetonu. Bývá skladován ve vzduchotěsných obalech chráněný před světlem. [6]

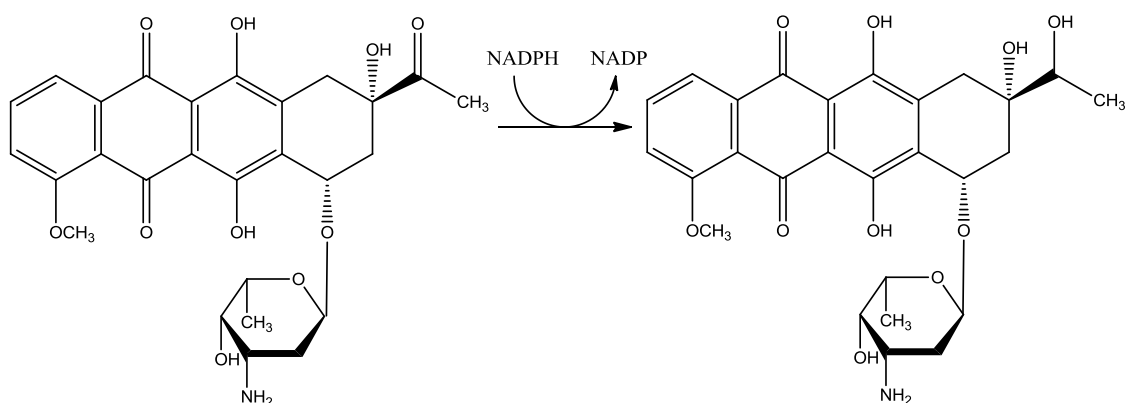


Obr. 1. Chemický vzorec daunorubicinu

Sumární vzorec daunorubicin-hydrochloridu: $C_{27}H_{30}ClNO_{10}$

Molární hmotnost daunorubicin-hydrochloridu: M_r 563,99 [6]

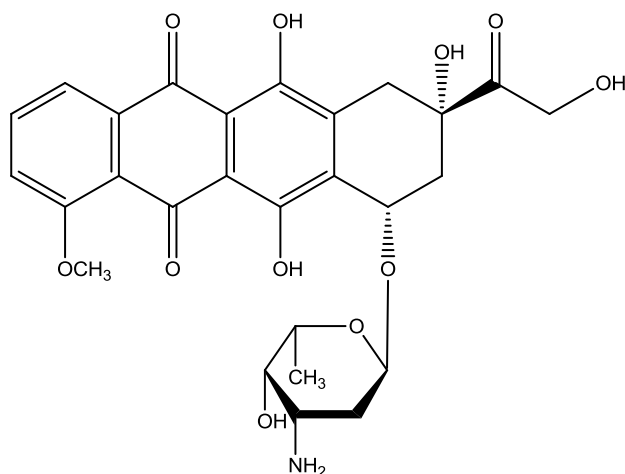
Daunorubicin je metabolizován ve velké míře v játrech cytoplazmatickými aldo-keto reduktázami. Hlavním aktivním metabolitem je daunorubicinol, který má antineoplastické účinky. [20]



Obr. 2. Metabolická přeměna daunorubicinu na daunorubicinol [21]

2.4.2. Doxorubicin

Doxorubicin byl izolován v roce 1969 ze *Streptomyces peuceticus*. Molekula je složena z chinonového aglykonu, který je odvozen od částečně hydrogenovaného tetracenu, a z bazického cukru daunosaminu, který je připojen glykosidickou vazbou v poloze 10. Díky konjugovanému systému aglykonu je chromoforem pro viditelnou oblast, to znamená, že se doxorubicin a látky jemu blízké vyznačují typickým červeným zbarvením. [17]



Obr. 3. Chemický vzorec doxorubicinu

Sumární vzorec doxorubicin-hydrochloridu: $C_{27}H_{30}ClNO_{11}$

Molární hmotnost doxorubicin-hydrochloridu: M_r 579,99 [6]

Protinádorových účinků doxorubicinu se v klinické praxi využívá při hematologických malignitách. Používá se k léčbě nehodgkinských lymfomů, Hodgkinovy choroby, mnohočetného myelomu, akutní lymfoblastové a myeloidní leukémie. Mezi další indikace doxorubicinu patří skupina solidních nádorů, např. karcinom prsu, ovaria, endometria, karcinom žaludku, osteosarkom, sarkom měkkých tkání, malobuněčný bronchogenní karcinom aj. [15] [17]

2.4.3. Přehled vybraných studií zabývajících se analýzou antracyklinů v biologickém materiálu

K. E. Maudens a kolektiv se zabývali vývojem a validací HPLC metody pro stanovení čtyř antracyklinů (doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, idarubicin) a jejich 13-S-dihydro metabolitů v plazmě a slinách.

Úprava biologického materiálu zahrnovala precipitaci proteinů ethanolem s následnou L-L extrakcí dichlormethanem.

Na kolonu Purospher Star RP-18 (5 μ m, 150 x 4,6 mm; Merck, Německo) bylo nastříknuto 50 μ l vzorku. Mobilní fázi tvořil 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí (složka A) a 0,1% roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu (složka B). Analýza proběhla za podmínek gradientové eluce: 0 – 7 min (24 – 30 % B), 7 – 14 min (30 – 58 % B), 14 – 15 min (58 – 95 % B), 15 – 20 min (95 % B), 20 – 24 min (95 – 24 % B), 25 min (24 % B). Průtok 1 ml/min byl v rozmezí 14. – 24. minuty zvýšen na 1,5 ml/min. K detekci látek byl použit fluorescenční detektor a excitační vlnová délka byla nastavena na 480 nm, emisní na 555 nm. [22]

Další studie, jejímž autorem je S. Fogli a kol., je zaměřena na vývoj metody vhodné pro terapeutické monitorování daunorubicinu, idarubicinu, doxorubicinu, epirubicinu a jejich metabolitů v lidské plazmě.

Vzorky plazmy byly nejprve extrahovány směsí chloroform/1-hepanol (9:1) a následně byla provedena reextrakce 0,1M kyselinou fosforečnou.

Byla zvolena kolona Supelcosil LC-CN (5 μ m, 250 x 4,6 mm; Supelco) a na ní bylo analyzováno 50 μ l vzorku. Mobilní fázi tvořil roztok 50mM dihydrogenfosforečnanu sodného a acetonitrilu (65:35, v/v), pH bylo upraveno na hodnotu 4 pomocí kyseliny fosforečné. Chromatografická analýza probíhala za izokratické eluce, průtok byl nastaven na 1 ml/min. Byl použit fluorescenční detektor s excitační vlnovou délkou 480 nm a emisní 560 nm. [23]

Autor Y. Yang vyvinul a validoval HPLC-MS metodu pro stanovení daunorubicinu v krysí plazmě.

Biologický materiál bylo nutné předem upravit precipitací proteinů. Nejprve byl přidán 70% roztok síranu zinečnatého, poté směs methanolu a acetonu (1:1, v/v).

K analýze byla použita kolona BetaBasic Phenyl (3 μ m, 50 x 2,1 mm; ThermoFinnigan), bylo nastříknuto 15 μ l vzorku. Mobilní fázi tvořila složka A (25 % acetonitril : 75 % voda : 0,1% kyselina mravenčí) a složka B (90 % acetonitril : 10 % voda : 0,1% kyselina mravenčí). Gradientová eluce probíhala za těchto podmínek: 0 – 0,5 min (10 % B), 0,5 – 2,7 min (10 – 25 % B), 2,7 – 2,9 min (25 – 95 % B), 2,9 – 3,0 min (95 – 10 % B). Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na 0,4 ml/min. Jako vnitřní standard byl použit doxorubicin a doxorubicinol. [24]

Tým autorů v čele s S. R. Urva využil HPLC pro hodnocení farmakokinetiky doxorubicinu v plazmě a tkáních po podání léčiva myším.

Vzorky plazmy i tkání byly upraveny precipitací 35% kyselinou chloristou (v/v).

Pro analýzu byla použita kolona Zorbax 300 SB C18 (5 μ m, 250 x 4,6 mm; Agilent Technologies), na níž bylo nastříknuto 10 μ l vzorku. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu (25 %) a vody s přísadkou 0,1% triethylaminu (75 %), pH bylo upraveno na hodnotu 3 kyselinou fosforečnou, průtok byl na konstantní hodnotě 1,2 ml/min. Fluorescenční detektor měl nastavenou excitační a emisní vlnovou délku na 480 nm a 560 nm. Daunorubicin byl vybrán jako vnitřní standard. [25]

Společným stanovením cytarabinu, daunorubicinu a etoposidu v lidské plazmě se zabýval M. Krogh-Madsen a kolektiv.

Analyzované látky byly separovány od interferujících substancí z plazmy extrakcí na pevných fázích za použití extrakčních kolonek, které byly promyty methanolem a 0,05M kyselinou chlorovodíkovou. Vzorky plazmy byly následně zředěny 0,05M HCl (1:1).

Na koloně Acclaim Polar Advantage II – C18 (3 μm , 150 x 4,6 mm; Dionex, Dánsko) bylo analyzováno 50 μl vzorku. Mobilní fáze byla tvořena složkou A (3 g/l dihydrogenfosforečnanu draselného, úprava kyselinou fosforečnou na pH 2,0) a složkou B (acetonitril). Analýza proběhla za podmínek gradientové eluce: 0 – 1,5 min (0 % B), 1,5 – 3 min (0 – 57 % B), 3 – 6,5 min (57 % B), 6,5 – 7 min (57 – 62 % B), 7 – 11 min (62 % B), 11 – 11,5 min (62 – 0 % B). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Byl využit jak UV (280 nm), tak i fluorescenční detektor, u něž byla nastavena excitace a emise prvních 10 minut na 230 nm a 328 nm (pro etoposid), pro zbývající 5,5 min změněna na 490 nm a 555 nm (pro daunorubicin). [26]

K. Sakai-Kato a kolektiv publikovali rychlou a citlivou metodu UHPLC k měření plazmatických koncentrací doxorubicinu a jeho metabolitů.

Vzorky plazmy byly upraveny 50% methanolem a síranem zinečnatým.

Analýza proběhla na koloně Capcell Pak C18 IF (2 μm , 50 x 2,0 mm; Shiseido Corp., Japonsko). Mobilní fázi tvořil 50mM fosfátový pufr (pH 2,0) a acetonitril v poměru 65:27 (v/v), průtok mobilní fáze systémem byl nastaven na 300 $\mu\text{l}/\text{min}$. Látky byly detekovány fluorescenčním detektorem s excitační vlnovou délkou 470 nm a emisní 590 nm. [27]

A. Bogason a kolektiv se zabývali souvislostmi mezi poškozením leukemických buněk a plazmatickými koncentracemi daunorubicinu u pacientů s akutní myeloidní leukémií.

Biologický materiál byl nejprve upraven precipitací 60% acetonitrem.

Pro HPLC analýzu byla použita kolona Phenyl- μ -Bondapak (5 μm , 150 x 3,9 mm; Waters Associates, USA). Mobilní fáze byla složena z 0,2% mravenčanu amonného o pH 4 a acetonitrilu (50 : 50, v/v), její průtok byl 1,5 ml/min. Analýza proběhla za podmínek izokratické eluce. Látky byly detekovány pomocí fluorescenčního detektoru s excitační vlnovou délkou 485 nm a emisní 560 nm. [28]

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo nalézt optimální podmínky pro HPLC analýzu daunorubicinu a jeho metabolitu daunorubicinolu v plazmě. Výsledná metoda byla následně pilotně validována s ohledem na linearitu, přesnost, správnost a stabilitu.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý materiál, pomůcky a technické vybavení

4.1.1. Chemikálie a biologický materiál

Daunorubicin hydrochlorid – Bellon Rhone-Poulenc, Francie

– Cerubidine® – inj., obsahuje 16,5 % daunorubicinu [29]

Daunorubicinol – Sigma-Aldrich, Německo

Doxorubicin – Sigma-Aldrich, Německo

Acetonitril – Sigma-Aldrich, Německo

Methanol – Sigma-Aldrich, Německo

Kyselina fosforečná – Chemapol, Praha, Česká republika

Kyselina chloristá – Sigma-Aldrich, Německo

Triethylamin – Sigma-Aldrich, Německo

Dihydrogenfosforečnan sodný – Sigma-Aldrich, Německo

Čištěná voda – získaná reverzní osmózou

Plazma králíčí – ZOO servis, Dvůr Králové, Česká republika

4.1.2. Pomůcky

Laboratorní sklo – Simax, Česká republika

Pipety, mikropipety – Eppendorf AG, Německo

Stříkačky – Medilab, Česká republika

Jehly – Medoject, Chirana T-injecta, Slovensko

Filtry – Millex-HV, Japonsko

Zkumavky, mikrozukumavky – Eppendorf AG, Německo

Vialky – Agilent Technologies, Evropa

Inserty – Agilent Technologies, Evropa

4.1.3. Přístrojové vybavení

Chromatografická sestava Prominence HPLC, Shimadzu, Japonsko

- složena z modulů: DGU-20A3, LC-20AD, SIL-20AC, CBM-20A, SPD-20A, CTO-20AC, RF-10AXL (fluorescenční detektor)

Chromatografický software: LC Solution Version 1.22 SP1

Kolony:

- LiChrospher RP – C18 (5 μm , 250 x 3 mm; Merck, Německo)
- Ascentis Express C18 (2,7 μm , 150 x 3 mm, Supelco, USA)
- Ascentis Express RP – fenylhexyl (2,7 μm , 150 x 3 mm, Supelco, USA)
- Ascentis RP – C18 (3 μm , 100 x 3 mm, Supelco, USA)
- Zorbax SB-Aq (3,5 μm , 150 x 4,6 mm; Agilent Technologies, USA)

Předkolona:

- Zorbax SB-Aq (5 μm , 21 x 12,5 mm; Agilent Technologies, USA)

4.1.4. Další

Analytické váhy – Sartorius AG, Německo

pH-metr – Eutech Instruments pH 510, Singapur

Vortex – Velp Scientifica, Evropa

Centrifuga – Thermo Electron Corporation, Francie

Vakuové zařízení – Mevasc – Medist, Slovensko

4.2. Chromatografické podmínky

4.2.1. Výběr kolony a složení mobilní fáze

Během vývoje metody bylo testováno celkem 5 kolon, na kterých bylo vyzkoušeno různé složení a poměry mobilní fáze.

HPLC analýza probíhala za konstantního složení mobilní fáze. Vodná složka obsahující 0,1% triethylamin (TEA) se neosvědčila. Byla proto nahrazena čištěnou vodou s fosfátovým pufrům a okyselena kyselinou fosforečnou, výsledné pH bylo 2,4. Organickou složku tvořil vždy acetonitril.

Pro stanovení daunorubicinu a jeho metabolitu byl zvolen optimální poměr anorganické a organické složky mobilní fáze **74:26** (v/v).

V následující Tabulce 2. je uveden přehled použitých chromatografických kolon, složení a průtok mobilní fáze v průběhu vývoje metody.

Kolona	Mobilní fáze	
	Anorganická složka A	Průtok (ml/min)
LiChrospher RP – C18 (5 μ m, 250 x 3 mm)	60 – 68 % H ₂ O + 0,1% TEA (pH = 3,0)	0,5
	40 – 75 % H ₂ O + H ₃ PO ₄ (pH = 2,4 – 3,0)	0,5
Ascentis Express C18 (2,7 μ m, 150 x 3 mm)	50 – 72 % H ₂ O + H ₃ PO ₄ (pH = 2,5)	0,15 – 0,3
Ascentis Express RP – fenylhexyl (2,7 μ m, 150 x 3 mm)	50 – 85 % H ₂ O + H ₃ PO ₄ (pH = 2,5)	0,3
	60 % H ₂ O + 0,1% TEA (pH = 3,0)	0,3
Ascentis RP – C18 (3 μ m, 100 x 3 mm)	72 % H ₂ O + H ₃ PO ₄ (pH = 2,7)	0,3
Zorbax SB-Aq (3,5 μ m, 150 x 4,6 mm)	70 – 75 % H ₂ O + H ₃ PO ₄ (pH = 2,4)	0,5 – 1,1

Tab. 2. Složení a průtok mobilní fáze v průběhu vývoje metody

4.2.2. Další chromatografické podmínky

Vlnová délka byla měřena fluorescenčním detektorem. Emisní a excitační vlnová délka byla zvolena 480 nm a 560 nm. Kolona byla termostatována na teplotu 25°C, autosampler byl chlazen na 15°C, aby se předcházelo degradaci vzorků. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1,1 ml/min, nástřik 40 µl vzorku. Během analýz byly vzorky nastříkovány na kolonu dvakrát, výsledné hodnoty byly zprůměrovány.

4.2.3. Příprava mobilní fáze

Pro stanovení daunorubicinu a jeho metabolitu byla použita mobilní fáze, kterou tvořila čištěná voda s fosfátovým pufrům a acetonitril v poměru 74:26 (v/v).

Anorganická část mobilní fáze byla připravena následujícím způsobem. Navážka 0,15 g fosfátového pufru byla rozpuštěna v čištěné vodě a doplněna do objemu 250 ml v odměrné baňce (= 5mmol pufr). Kyselinou fosforečnou (3 – 5 kapek) bylo upraveno pH na hodnotu 2,4. Poté byl roztok zfiltrován přes vakuum a naředěn čištěnou vodou v poměru 1:1.

4.2.4. Příprava pracovních roztoků

Při vývoji chromatografických podmínek byly použity zásobní roztoky daunorubicinu (DAU) o koncentraci 16,5 µg/ml; daunorubicinolu (DAU-OL) a doxorubicinu (DOXO) o koncentraci 100 µg/ml.

Pracovní roztoky analyzovaných látek byly připraveny naředěním podle uvedeného schématu v Tabulce 3. Pracovní roztok vnitřního standardu byl připraven v koncentraci 50 µg/ml.

	Koncentrace DAU	Koncentrace DAU-OL	Způsob přípravy pracovních roztoků
5.	16,5 µg/ml	100 µg/ml	1000 µl zásobního roztoku
4.	11,5 µg/ml	70 µg/ml	700 µl zásobního roztoku + 300 µl MeOH 50%
3.	8,2 µg/ml	50 µg/ml	500 µl zásobního roztoku + 500 µl MeOH 50%
2.	3,3 µg/ml	20 µg/ml	200 µl zásobního roztoku + 800 µl MeOH 50%
1.	1,6 µg/ml	10 µg/ml	100 µl zásobního roztoku + 900 µl MeOH 50%
0.	0,8 µg/ml	5 µg/ml	500 µl pracovního roztoku 1. + 500 µl MeOH 50%

Tab. 3. *Způsob přípravy pracovních roztoků*

4.2.5. Příprava standardních vzorků plazmy

Z pracovních roztoků jednotlivých látek byl odebrán 1 µl a přidán ke 200 µl králičí plazmy. Tímto způsobem byly připraveny standardní vzorky plazmy obsahující 4 ng/ml, 8 ng/ml, 16 ng/ml, 41 ng/ml, 58 ng/ml, 83 ng/ml DAU a 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 350 ng/ml, 500 ng/ml DAU-OL. Během analýz byl používán vnitřní standard DOXO v koncentraci 250 ng/ml ve standardním vzorku plazmy.

Vzorek plazmy byl dále upravován podle následujícího postupu:

- 200 µl plazmy + 1 µl pracovních roztoků analyzovaných látek (příslušné koncentrace) a vnitřního standardu (o koncentraci 50 µg/ml), vortex
- 600 µl MeOH (čistý), vortex
- centrifuga (10 000 otáček, 10 min)
- filtrace (stříkačka, jehla, filtr)
- zahustit N₂ do sucha
- 150 µl MeOH (50%)
- centrifuga (10 000 otáček, 10 min)
- 140 µl supernatantu do insertu
- nástřik na kolonu 40 µl

4.3. Vývoj metody pro úpravu vzorků

K úpravě biologického materiálu byla zvolena metoda deproteinace chemickým činidlem. Finálnímu zvolení deproteinačního činidla předcházely experimenty s čistým methanolem, či kyselinou chloristou v různém množství. K vysrážení proteinů bylo nakonec použito množství 600 μ l methanolu.

Zlepšení citlivosti metody bylo dosaženo tím, že po precipitaci byl odebrán supernatant, zfiltrován a zahuštěn dusíkem do sucha, následně byl rozpuštěn ve zředěném methanolu a po centrifugaci přenesen do insertu a nastříknut na kolonu.

Blankový vzorek obsahoval 200 μ l plazmy a 600 μ l methanolu. Pro výpočet extrakční výtěžnosti byl připraven blank, ke kterému bylo po extrakci přidáno po 1 μ l pracovních roztoků analyzovaných látek a vnitřního standardu.

4.3.1. Výtěžnost

Výtěžnost precipitace byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$\text{výtěžnost} = \frac{100 \cdot \text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

[1]

Nalezenou hodnotu představoval průměr ze dvou naměřených hodnot. Byl vztažen ke správné hodnotě, kterou tvořil blank s přidanými analyty. Výsledek byl vyjádřen v procentech.

4.4. Validace metody

4.4.1. Linearita

Linearita byla hodnocena v koncentračním rozmezí 4 – 83 ng/ml pro DAU; 25 – 500 ng/ml pro DAU-OL analýzou 6 kalibračních vzorků plazmy. Každý vzorek byl změřen dvakrát.

Vzorky byly připraveny následujícím způsobem: ke 200 μ l králičí plazmy bylo přidáno 1 μ l pracovního roztoku DAU a 1 μ l pracovního roztoku DAU-OL v příslušné koncentraci a 1 μ l pracovního roztoku vnitřního standardu DOXO o koncentraci 250 ng/ml. Podrobný popis přípravy vzorků je popsán v kap. 4.2.5.

4.4.2. Přesnost

Přesnost byla získána ze série měření vzorků tří koncentrací (DAU: 83 ng/ml, 41 ng/ml, 4 ng/ml; DAU-OL: 500 ng/ml, 250 ng/ml, 25 ng/ml), každou koncentrační hladinu tvořilo pět individuálně připravených vzorků.

4.4.3. Správnost

Správnost byla stanovena na základě analýzy pěti vzorků ve třech koncentračních úrovních. Vzorky byly připraveny ve stejných koncentracích jako při zjišťování přesnosti, tzn. DAU: 83 ng/ml, 41 ng/ml, 4 ng/ml; DAU-OL: 500 ng/ml, 250 ng/ml, 25 ng/ml.

4.5. Hodnocení stability v králičí plazmě

Stabilita analyzovaných látek v plazmě byla hodnocena za laboratorních podmínek a po zamrazení, použité koncentrace byly 83 ng/ml (DAU) a 500 ng/ml (DAU-OL).

Bylo připraveno 8 vzorků pro každý analyt. Vzorek obsahoval prázdnou králičí plazmu (1,8 ml) s přídavkem analyzovaných látek DAU nebo DAU-OL (9 μ l pracovního roztoku 5. o koncentraci 16,5 μ g/ml DAU, 100 μ g/ml DAU-OL). 3 vzorky byly vloženy na 24 hod do mrazáku (-20°C), 3 byly ponechány při laboratorní teplotě 30 min a 2 vzorky byly zpracovány a analyzovány hned. Ke vzorkům byl přidán 1 μ l vnitřního standardu a dále byly upraveny způsobem popsaným v kap. 4.2.5.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Vývoj chromatografických podmínek

Pro stanovení DAU a jeho metabolitu bylo potřeba najít vhodné chromatografické podmínky. Vycházelo se z již dříve publikovaných metod (viz kap. 2.4.3. Přehled vybraných studií).

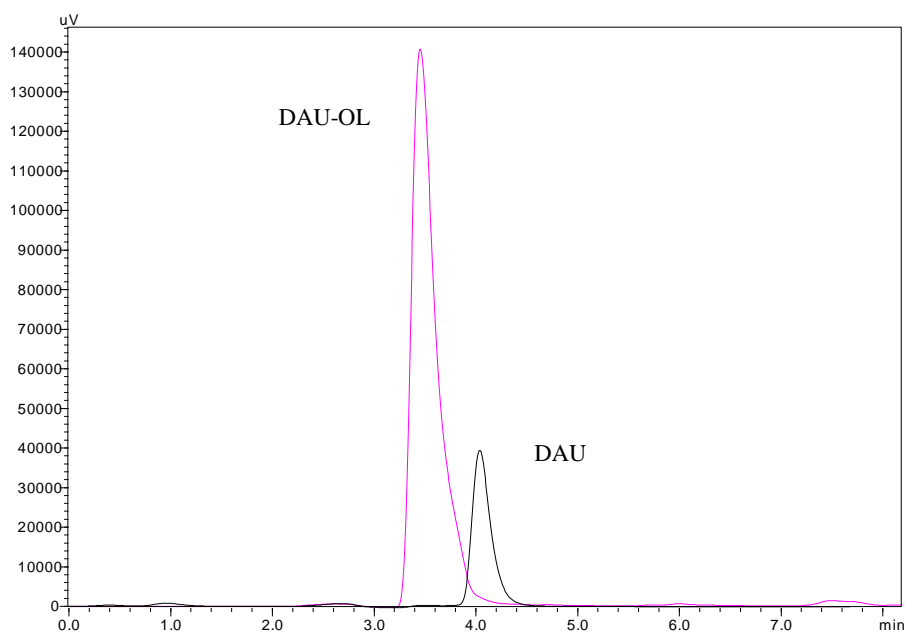
Na začátku vývoje byla zvolena emisní a excitační vlnová délka 480 nm a 560 nm na základě předchozích studií, např. [23] [25]; zůstala v průběhu analýz neměnná.

Cílem bylo nalézt optimální složení mobilní fáze tak, aby byla dosažena separace analyzovaných látek, výsledné chromatografické píky byly symetrické, ostré a zároveň aby analýza proběhla v krátkém časovém intervalu.

Bylo provedeno několik experimentů s různým složením mobilní fáze na jednotlivých kolonách, které vedly k výslednému složení – anorganická složka A (čištěná voda, fosfátový pufr, kyselina fosforečná) a organická složka B (acetonitril) v poměru 74:26.

Vycházelo se z publikované studie [25], ve které byla mobilní fáze tvořena čištěnou vodou s přísadkou 0,1% TEA (75 %), jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 3,0 kyselinou fosforečnou, a acetonitrem (25 %).

Na koloně LiChrospher RP – C18, Merck proběhla analýza zásobních roztoků DAU a DAU-OL v methanolu. Na Obrázku 4. je zobrazen chromatografický záznam analýzy, poměr vodné a organické složky byl 60:40. Lze vidět, že použití této mobilní fáze nevedlo k rozdělení analytů, bylo tedy nutné její složení změnit.



Obr. 4. Záznam analýzy zásobních roztoků DAU a DAU-OL v methanolu

Byla připravena nová mobilní fáze, její vodná složka byla tvořena čištěnou vodou okyselenou H_3PO_4 . Bylo zjištěno, že čím je pH vyšší, tím je dělení píků horší. Na druhou stranu nebylo možné jít pod pH 2 kvůli stabilitě stacionární fáze. Během testování byla používána vodná část mobilní fáze s pH v rozmezí 2,4 – 3,0. Aby byla zajištěna stálá hodnota pH v průběhu analýzy, byl k vodné složce přidán fosfátový pufr (5mmol).

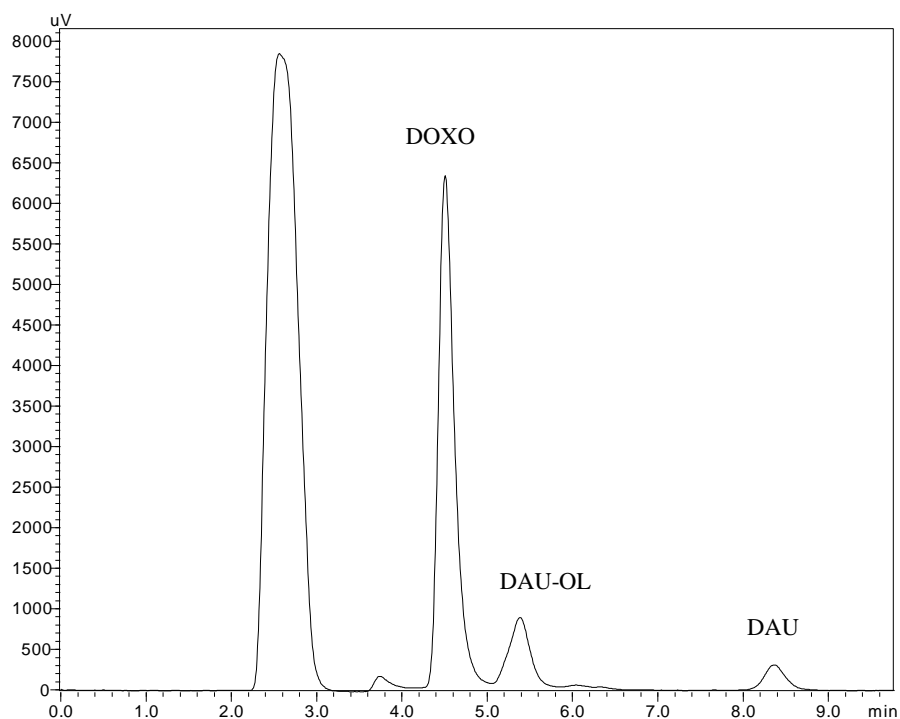
Na základě strukturní podobnosti a publikovaných metod, [24] [25], byl vybrán doxorubicin (DOXO) jako vnitřní standard.

Na koloně **LiChrospher RP – C18, Merck** byly postupně vyvinuty podmínky pro rozdělení analytů v zásobních roztocích, které byly aplikovány při analýze vzorků plazmy. Optimální poměr vodné a organické složky mobilní fáze byl 70:30.

Úprava biologického materiálu zahrnovala zkoušení různých deproteinačních činidel. K vysrážení proteinů bylo testováno 200 – 600 μl MeOH a 25 – 50 μl HClO_4 , pro další analýzy bylo zvoleno 600 μl MeOH.

Důvodem výměny kolony byl vysoký tlak (230 bar), který se nepodařilo snížit, a vysoká teplota (35°C). Také pík DAU nebyl ideální, špatně se dělil.

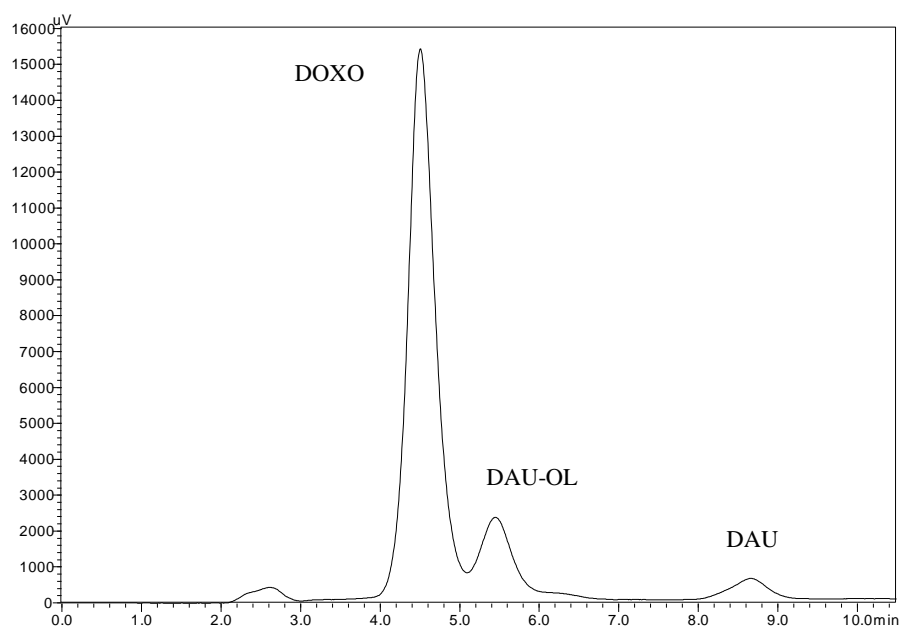
Na Obrázku 5. je zobrazen chromatografický záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO, poměr vodné (čištěná voda s fosfátovým puftrem) a organické (acetonitril) složky mobilní fáze byl 70:30.



Obr. 5. Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO I.

Na koloně **Ascentis Express C18, Supelco** proběhly analýzy jednotlivých látek v zásobních roztocích. Vodná část mobilní fáze (čištěná voda s fosfátovým pufrem) byla požívána v rozsahu 50 – 72 %, optimální dělení analytů proběhlo při 72 % složky A.

Obrázek 6. zobrazuje chromatogram analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO, poměr vodné a organické složky byl 72:28. Vnitřní standard a DAU-OL se nepodařilo dostatečně separovat, proto byla tato kolona vyměněna.

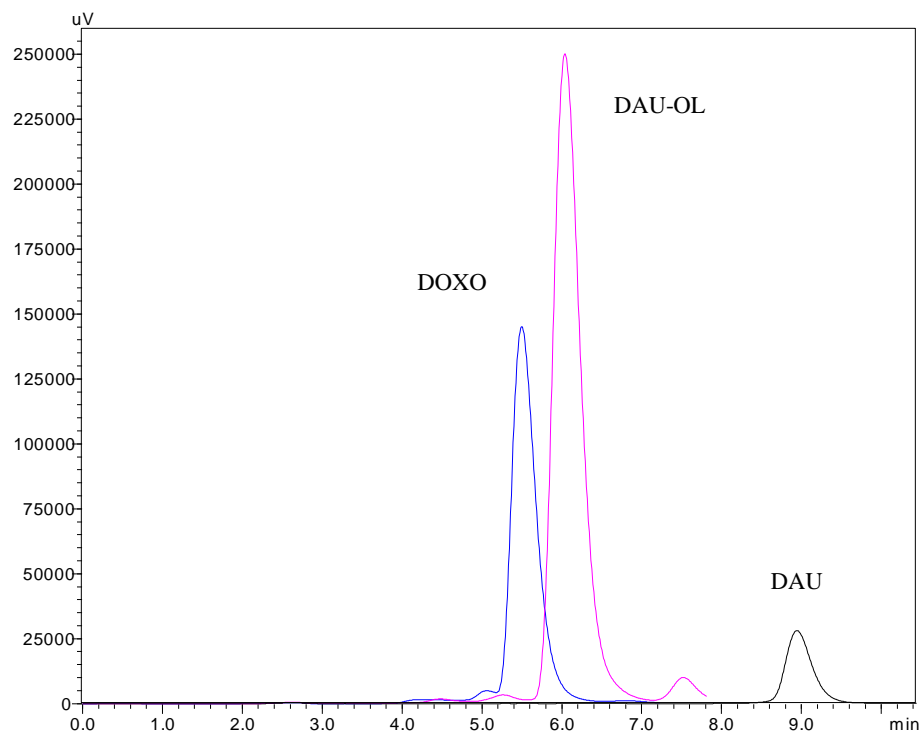


Obr. 6. Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO II.

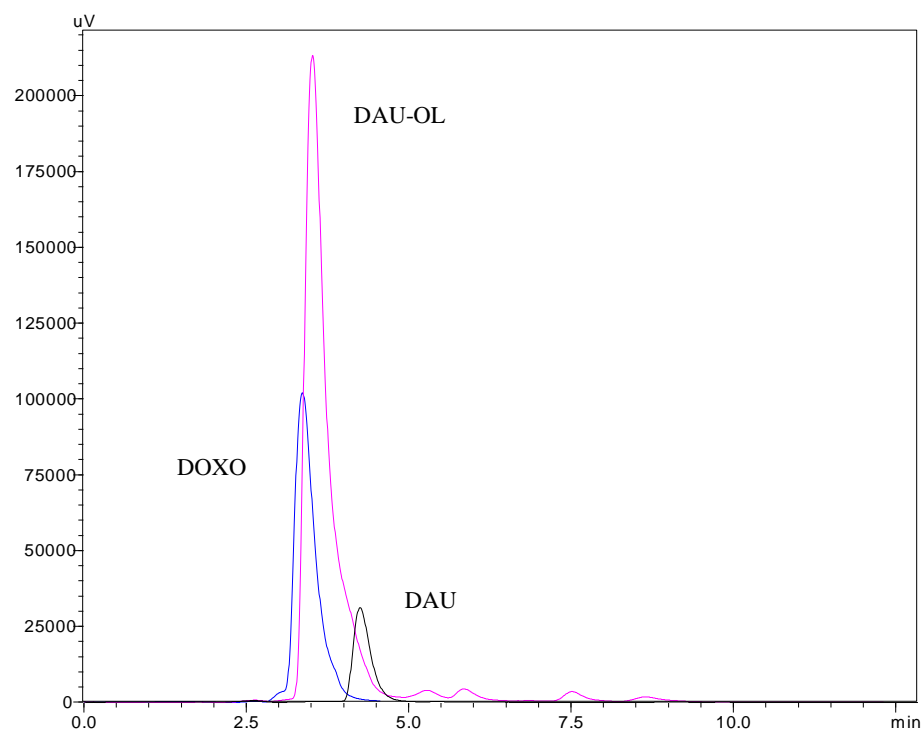
Ani další z testovaných kolon **Ascentis Express RP – fenylhexyl, Supelco** nebyla vhodná k separaci látek DOXO a DAU-OL. Při 85 % vodné složky píky DOXO a DAU-OL koeluovaly a snižování podílu vodné fáze nevedlo k lepšímu rozdělení. Ani výměna anorganické složky mobilní fáze, kterou tvořila čištěná voda s fosfátovým pufrem, za čištěnou vodu s přidavkem 0,1% TEA nepřinesla zlepšení.

Na Obrázcích 7. a 8. jsou chromatografické záznamy analýz zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO, poměr vodné a organické složky mobilní fáze byl 60:40.

Pro porovnání jsou zde chromatogramy analýz s mobilní fází, kterou tvořila vodná složka s přidavkem fosfátového pufru (Obr. 7.) a nebo vodná složka s přidavkem 0,1% TEA (Obr. 8.).

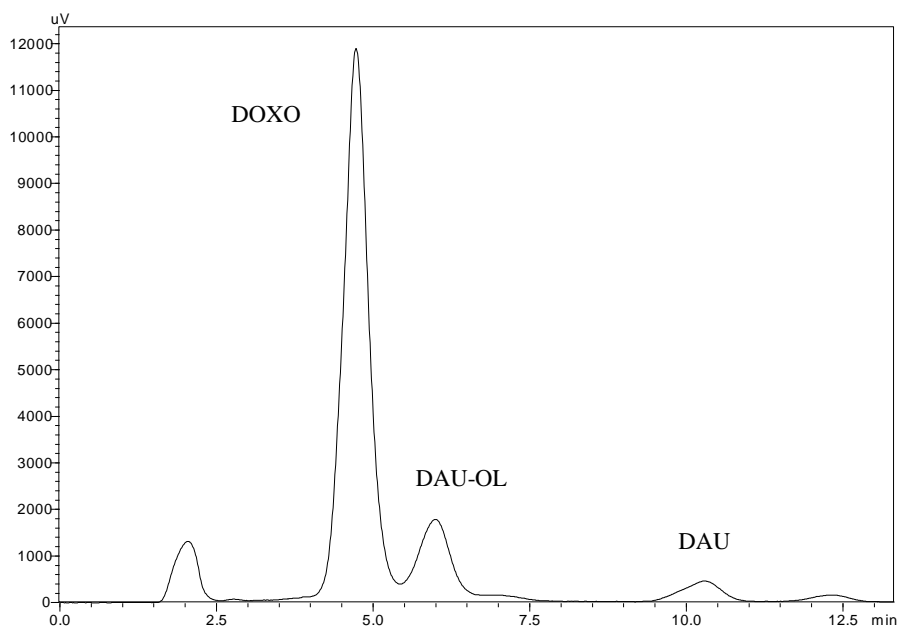


Obr. 7. Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO III.



Obr. 8. Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO IV.

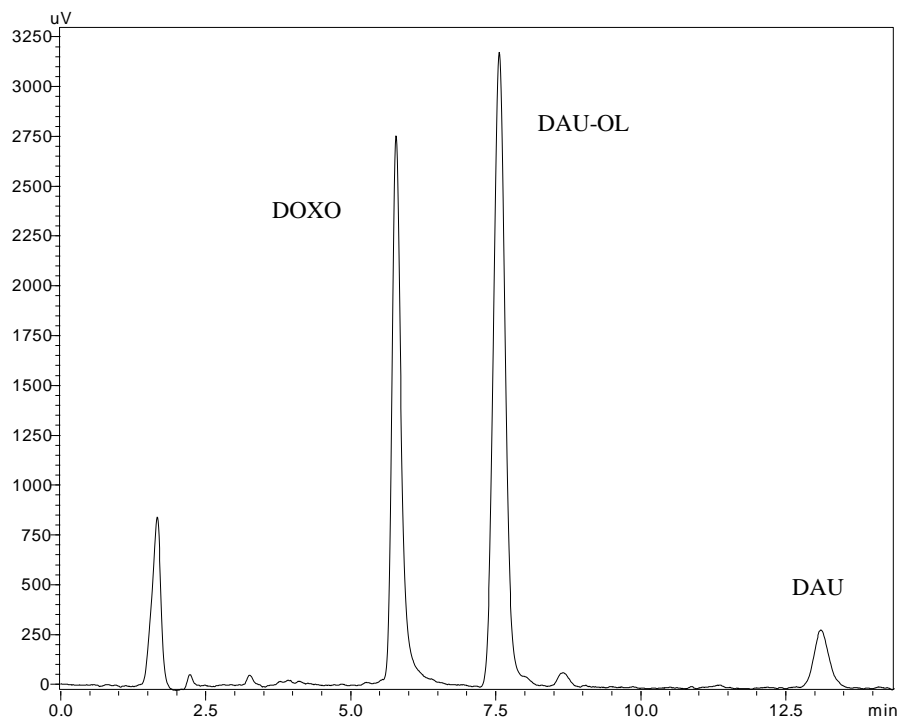
Analýza na koloně **Ascentis RP – C18, Supelco** nepřinesla lepší výsledky než na koloně **Ascentis Express C18, Supelco**. Byla provedena analýza jednotlivých látek v zásobních roztocích, poměr vodné a organické složky byl 72:28, výsledný chromatogram je na Obrázku 9.



Obr. 9. Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO V.

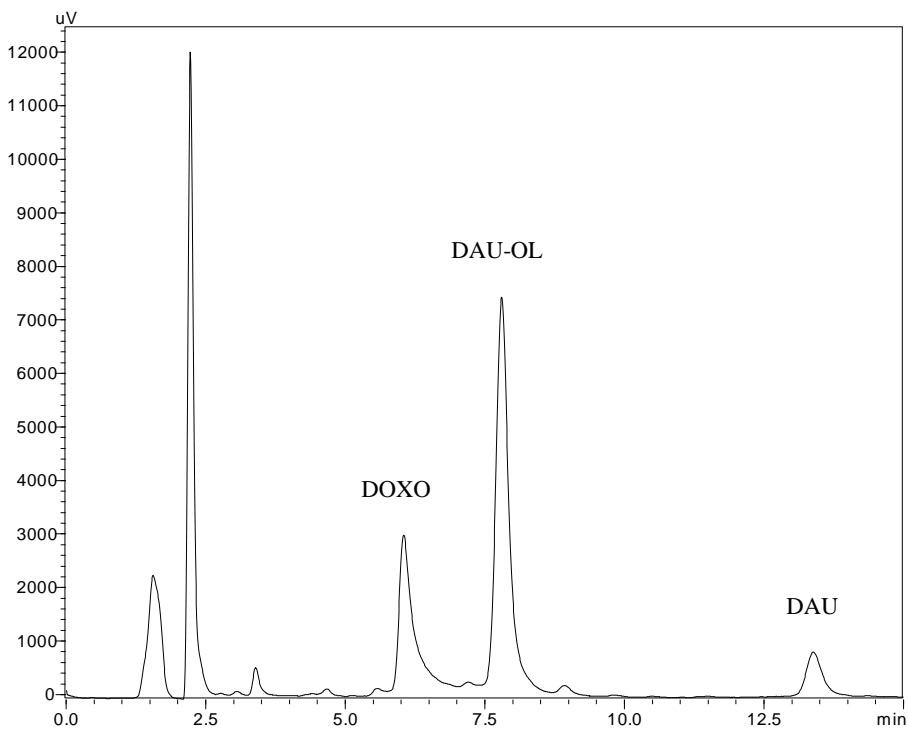
Na koloně **Zorbax SB-Aq, Agilent Technologies** nebyly nalezené podmínky pro analýzu zásobních roztoků (70 % vodné složky s fosfátovým pufrům) vhodné pro analýzu analytů v plazmě, píky se dostatečně nerozdělily. Následně bylo zjištěno, že optimální podmínky pro analýzu standardních vzorků plazmy jsou 74 % vodné složky (čištěná voda s fosfátovým pufrům) a 26 % anorganické složky (acetonitril). Analýza proběhla za 15 min. Na této koloně byla uskutečněna výsledná měření linearitu, přesnosti, správnosti a stability.

Na Obrázku 10. je zobrazen chromatografický záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO v methanolu, poměr mobilní fáze byl 74:26; retenční časy analytů jsou: DOXO: 5,8; DAU-OL: 7,6; DAU: 13,1.



Obr. 10. Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO VI.

Na Obrázku 11. lze vidět chromatografický záznam ze stanovení linearit standardních vzorků plazmy o koncentraci 41 ng/ml DAU, 250 ng/ml DAU-OL. Retenční časy analytů jsou: DOXO: 6,0; DAU-OL: 7,8; DAU: 13,4.



Obr. 11. Záznam analýzy standardních vzorků plazmy

5.2. Vývoj metody úpravy vzorku

Před samotnou HPLC analýzou bylo třeba standardní vzorky plazmy upravit tak, aby bylo možné izolovat DAU, DAU-OL a DOXO. Byla použita deproteinace chemickým činidlem (precipitace). Bylo také nutné vzorek zahustit do sucha pomocí dusíku.

Aby bylo možné vypočítat extrakční výtěžnost, bylo potřeba připravit porovnávací roztok, během analýzy se však ukázalo výhodnější připravit místo porovnávacího roztoku blank, do kterého se následně po extrakci přidaly analyty s vnitřním standardem.

5.2.1. Výtěžnost precipitace

K úpravě standardních vzorků plazmy bylo zkoušeno 200 – 600 µl methanolu a 25 – 50 µl kyseliny chloristé. Pro další analýzy bylo zvoleno 600 µl methanolu. Tabulka 4. nabízí přehled některých použitých deproteinačních činidel a jejich extrakční výtěžnost. Koncentrace analyzovaných látek byla 16 ng/ml DAU a 100 ng/ml DAU-OL, vnitřní standard byl používán v koncentraci 250 ng/ml.

Kolona	Deproteinační činidlo	Látky	Výtěžnost (%)
LiChrospher RP – C18, Merck	25 µl HClO ₄	DAU	14,92
		DAU-OL	20,61
		DOXO	23,83
	400 µl MeOH	DAU	83,47
		DAU-OL	73,27
		DOXO	61,88
	600 µl MeOH	DAU	63,31
		DAU-OL	75,53
		DOXO	50,38
Zorbax SB-Aq, Agilent Technologies	600 µl MeOH	DAU	69,35
		DAU-OL	75,83
		DOXO	74,17

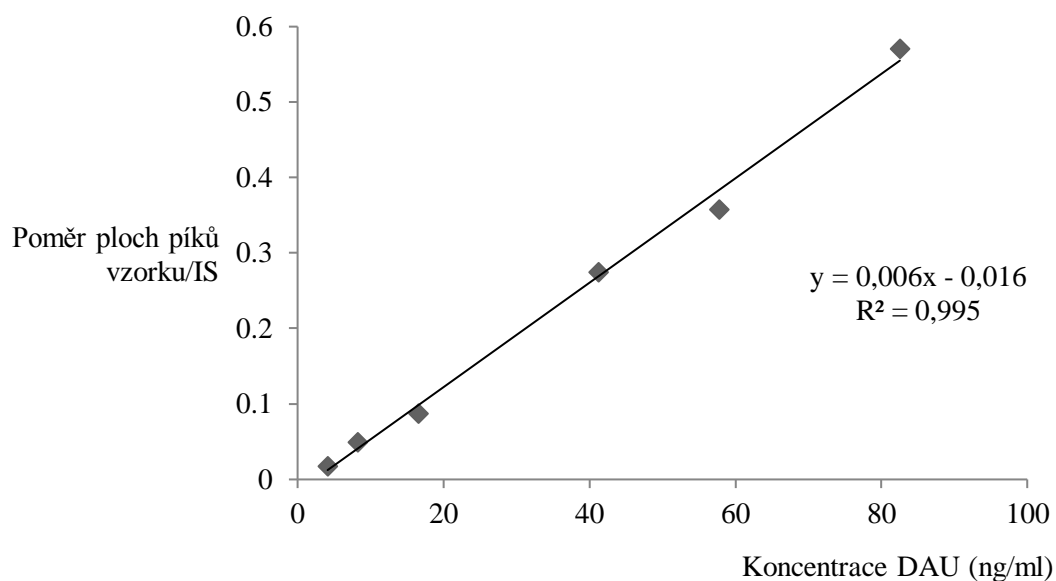
Tab. 4. Výtěžnost precipitace použitých deproteinačních činidel

5.3. Validace

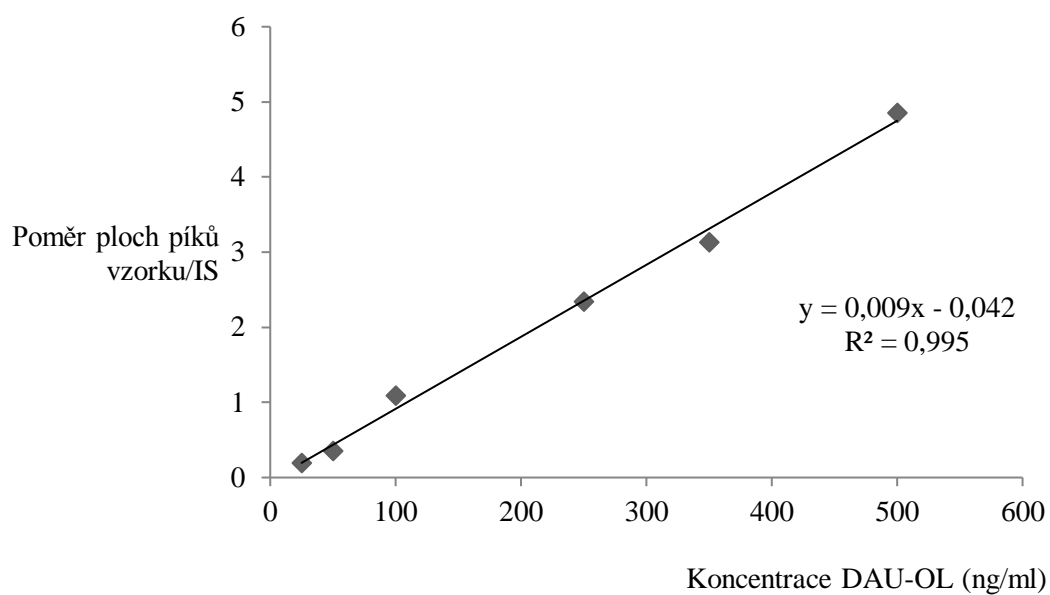
Linearita

Linearita byla stanovena v koncentračním rozmezí 4 – 83 ng/ml pro DAU; 25 – 500 ng/ml pro DAU-OL. Závislost poměrů ploch pík analytů a vnitřního standardu na koncentraci analytů v plazmě je znázorněna na Obrázcích 12. a 13. Pro DAU byla sestavena regresní přímka s rovnicí $y = 0,006x - 0,016$ a koeficient determinace (R^2) 0,995, pro metabolit DAU-OL byla sestrojena regresní přímka s rovnicí $y = 0,009x - 0,042$ a $R^2 = 0,995$.

Kalibrační křivky pro DAU a DAU-OL byly sestrojeny jako závislost poměru ploch pík analyzovaných látek a vnitřního standardu na koncentraci analytů v plazmě. Pomocí regresní přímky byla prokázána linearita, byla použita metoda nejmenších čtverců.



Obr. 12. Kalibrační křivka – stanovení DAU



Obr. 13. Kalibrační křivka – stanovení DAU-OL

Přesnost a správnost

Přesnost byla vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou vypočtenou pro každou koncentraci a analyzovanou látku zvlášť. Výsledky stanovení správnosti byly vyjádřeny vypočítanou výtěžností v procentech.

Výsledky stanovení přesnosti (opakovatelnosti) a správnosti jsou shrnuty v následujících Tabulkách 5. a 6., odpovídají požadavkům směrnice FDA.

Teoretická koncentrace v plazmě	Poměr plochy píků vzorek/IS (průměr ze 2 nástřiků)	Průměr poměru plochy píků vzorek/IS	Nalezená koncentrace (ng/ml)	SD	RSD	Výtěžnost (%)
83 ng/ml	0,3824	0,4320	74,67	0,04	10,38	89,96
	0,3925					
	0,4794					
	0,4318					
	0,4740					
41 ng/ml	0,2767	0,2531	44,85	0,03	11,62	109,40
	0,2264					
	0,2908					
	0,2453					
	0,2264					
4 ng/ml	0,0128	0,0137	4,96	0,001	9,53	120,23
	0,0147					
	0,0124					
	0,0155					
	0,0134					

Tab. 5. Přesnost a správnost metody pro stanovení DAU v plazmě

Teoretická koncentrace v plazmě	Poměr plochy píků vzorek/IS (průměr ze 2 nástřiků)	Průměr poměru plochy píků vzorek/IS	Nalezená koncentrace (ng/ml)	SD	RSD	Výtěžnost (%)
500 ng/ml	3,4768	3,9647	445,19	0,33	8,27	89,04
	3,8419					
	4,3424					
	4,0223					
	4,1401					
250 ng/ml	2,2167	2,0423	231,59	0,20	9,93	92,64
	1,8579					
	2,2942					
	1,9821					
	1,8609					
25 ng/ml	0,1579	0,1621	22,68	0,01	3,81	90,72
	0,1597					
	0,1577					
	0,1726					
	0,1628					

Tab. 6. Přesnost a správnost metody pro stanovení DAU-OL v plazmě

5.4. Stabilita

Stabilita látek byla hodnocena za laboratorní teploty po uplynutí 0,5 hodiny a po zamrazení vzorků po 24 hodinách. Stabilitní zkouška byla stanovena pro koncentraci 83 ng/ml DAU, 500 ng/ml DAU-OL.

Výsledky jsou vyjádřeny poklesem koncentrace v čase, jsou uvedeny v Tabulkách 7. a 8.

Analyzovaná látka	Čas (hod)	Poměr plochy píků vzorek/IS (průměr ze 2 nástřiků)	Průměr poměru plochy píků vzorek/IS	Pokles koncentrace v čase (%)
DAU	0	0,3976	0,3978	100
		0,3980		
	0,5	0,3480	0,3564	89,60
		0,3639		
		0,3573		
	DAU-OL	0	4,0951	4,1049
4,1148				
0,5		3,9768	4,0009	97,47
		4,0018		
		4,0241		

Tab. 7. Pokles koncentrace DAU, DAU-OL za laboratorní teploty

Analyzovaná látka	Čas (hod)	Poměr plochy píků vzorek/IS (průměr ze 2 nástřiků)	Průměr poměru plochy píků vzorek/IS	Pokles koncentrace v čase (%)
DAU	0	0,3976	0,3978	100
		0,3980		
	24	0,3376	0,3425	86,11
		0,3513		
		0,3387		
	DAU-OL	0	4,0951	4,1049
4,1148				
24		3,0157	3,3260	81,02
		3,3921		
		3,5703		

Tab. 8. Pokles koncentrace DAU, DAU-OL v plazmě po zamrazení

Z výsledků stanovení stability za laboratorních podmínek je patrné, že úbytek množství DAU a DAU-OL není příliš výrazný (po 30 minutách byla změřená koncentrace DAU 89,6 % a DAU-OL 97,5 %).

Limitu 15 % však nevyhovuje stabilita látek po zamrazení (po 24 hodinách byl naměřen pokles koncentrace na 86,1 % DAU a 81,0 % DAU-OL), proto při dlouhodobém skladování je potřeba mít omezenou stabilitu.

6. ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byl popsán vývoj metody pro HPLC analýzu daunorubicinu a jeho metabolitu daunorubicinolu v králičí plazmě. Jako vnitřní standard byl použit doxorubicin.

Látky byly separovány na koloně Zorbax SB-Aq (3,5 μm , 150 x 4,6 mm; Agilent Technologies, USA). Mobilní fázi tvořila vodná složka obsahující čištěnou vodu s fosfátovým pufrem, okyselená kyselinou fosforečnou (výsledné pH = 2,4) a organická složka tvořená acetonitrilem v poměru 74:26 (v/v). Vlnová délka byla měřena fluorescenčním detektorem v rozmezí 480 nm a 560 nm.

Vzorky plazmy byly upraveny deproteinací za použití methanolu jako deproteinačního činidla. Metoda byla podrobena základním zkouškám validace s ohledem na linearitu, přesnost a správnost. Parametry vyhovovaly požadavkům směrnice FDA pro validaci bioanalytických metod. Při testování stability bylo zjištěno, že při dlouhodobém skladování bude zřejmě potřeba mít omezenou stabilitu.

Přínosem této práce je popsání podmínek, za kterých je možné analyzovat pomocí HPLC daunorubicin a jeho metabolit, čehož lze využít během výzkumu nových kardioprotektivních látek.

ABSTRAKT

V současné době patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) stále mezi dominantní separační metody, je široce využívána ve všech oblastech analýzy léčiv. HPLC umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi.

V této práci je popsán vývoj metody pro HPLC analýzu daunorubicinu (DAU) a jeho metabolitu daunorubicinolu (DAU-OL) v králičí plazmě. Analyzované látky byly nejprve odděleny od interferujících substancí v plazmě deproteinací. Z testovaných deproteinačních činidel byl vybrán methanol (600 μ l), jehož extrakční výtěžnost byla nejvyšší.

Separace DAU a jeho metabolitu byla dosažena na koloně Zorbax SB-Aq (3,5 μ m, 150 x 4,6 mm; Agilent Technologies, USA), mobilní fáze byla tvořena vodnou složkou, která obsahovala čištěnou vodu s fosfátovým pufrům, okyselená kyselinou fosforečnou (výsledné pH = 2,4), a organickou složkou tvořenou acetonitrilem v poměru 74:26 (v/v). Analýza proběhla za podmínek izokratické eluce během 15 minut, průtok mobilní fáze byl 1,1 ml/min a nástřik 40 μ l vzorku. Fluorescenční detektor měl nastavenou emisní a excitační vlnovou délku na 480 nm a 560 nm. Jako vnitřní standard byl použit doxorubicin.

Metoda byla pilotně validována s ohledem na linearitu (4 – 83 ng/ml pro DAU, 25 – 500 ng/ml pro DAU-OL), přesnost a správnost. Byla stanovena stabilita za laboratorních podmínek v průběhu 0,5 hodiny a po zamrazení vzorku během 24 hodin. Ukázalo se, že při dlouhodobém skladování je potřeba mít omezenou stabilitu.

Limitujícím faktorem používání antracyklinového cytostatika DAU je kardiotoxické působení. V klinické praxi je dostupné jediné léčivo dexrazoxan, které je schopné myokard chránit. Výsledky této práce mohou být uplatněny při vývoji nových kardioprotektivních látek během testování jejich účinnosti.

ABSTRACT

At present, the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is still the dominant separation method, it is widely used in all areas of drug analysis. HPLC provides qualitative and quantitative evaluation of the separated components.

This thesis describes the development of the method for HPLC analysis of daunorubicin (DAU) and its metabolite daunorubicinol (DAU-OL) in a rabbit plasma. The analyzed compounds were first separated from interfering substances in plasma due the deproteinization. For a precipitation was chosen methanol (600 μ l) with the highest extraction efficiency.

The separation of DAU and its metabolite was reached by Zorbax SB-Aq column (3,5 μ m, 150 x 4,6 mm; Agilent Technologies, USA), the mobile phase consisted of a mixture of water with phosphate buffer and phosphoric acid (pH 2,4) and acetonitril (74:26, v/v). The analysis ran at isocratic mode during 15 minutes. The mobile phase was delivered at a rate of 1,1 ml/min, an aliquot of 40 μ l was injected into the chromatographic system. The fluorescence detector was operated at an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 560 nm. Doxorubicin was used as an internal standard.

The methodology was validated with respect to linearity (4 – 83 ng/ml for DAU, 25 – 500 ng/ml for DAU-OL), precision and accuracy. The stability of this method was set in the laboratory conditions during 0,5 hours and after freezing the sample during 24 hours. It showed that for long-term storage is essential to keep a limited stability.

The limiting factor in the use of anthracycline chemotherapy drug DAU is cardiotoxic effects. In clinical practice is available only drug dexrazoxane, which is able to protect the myocardium. The results of this study can be applied to developing new cardioprotective agents during the effectiveness testing.

POUŽITÁ LITERATURA

1. **Klimeš, J., a další.** *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami.* Hradec Králové : Vydavatel RNDr. František Skopec, CSc. Nucleus HK, 2011. ISBN 978-80-87009-29-1.
2. **Mikeš, O. a kol.** *Laboratorní chromatografické metody.* Praha : Státní nakladatelství technické literatury, 1980.
3. **Kazakevich, Y. a LoBrutto, R.** *HPLC for Pharmaceutical Scientists.* New Jersey : John Wiley & Sons, Inc., 2007. ISBN-13: 978-0-471-68162-5. [Online] [Citace: 27. 2. 2013] http://books.google.cz/books?id=csAk-MpeTocC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
4. **Churáček, J. a kol.** *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod.* Praha : Academia, 1993. ISBN 80-200-0010-0.
5. **Douša, M.** HPLC.cz. [Online] [Citace: 5. 3. 2013] <http://www.hplc.cz/>.
6. **Ministerstvo zdravotnictví ČR.** *Český lékopis 2009.* Praha : Grada Publishing, a.s., 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.
7. **Klíma, J. a Grafnetterová, J.** *Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii.* Praha : Avicenum, 1987.
8. **Procházková, D.** Extrakce na tuhou fázi. *Sigma-Aldrich Co.* [Online] [Citace: 14. 3. 2013] <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>.
9. **Anderson, D. J.** High-Performance Liquid Chromatography (Direct Injection Techniques). *Analytical Chemistry.* 1993, 65 (12), stránky 434-443.
10. **Babjuk, J., Perlík, F. a Šídlo, Z.** *Bioanalytika léků.* Praha : Avicenum, 1990. ISBN 80-201-0083-0.
11. **Camel, V.** Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B.* 2003, 58, stránky 1177-1233.
12. **Biopharmaceutics Coordinating Committee.** Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. *FDA.* 2001. [Online] [Citace: 17. 4. 2013] <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
13. **Klemera, P. a Klemmerová, V.** *Základy aplikované statistiky pro studující farmacie.* Praha : Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-888-3.

14. **Karlíček, R., a další.** *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha : Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1453-3.
15. **Lincová, D. a Farghali, H.** *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha : Galén, 2002. ISBN 80-7262-168-8.
16. **Zvánovcová, I.** Dilatační kardiomyopatie po léčbě antracykliny. *Remedia*. 2003, 2, stránky 157-158.
17. **Hartl, J. a kol.** *Farmaceutická chemie IV*. Praha : Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1169-3.
18. **Petruželka, L.** Lipozomální doxorubicin. *Remedia*. 2007, 2, stránky 197-200.
19. **Klener, P. a Klener, P. jr.** *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha : Grada Publishing, a.s., 2010. ISBN 978-80-247-2808-7.
20. **U.S. National Library of Medicine.** DAUNORUBICIN. *Hazardous Substances Data Bank*. [Online] [Citace: 11. 3. 2013] <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+20830-81-3>.
21. **Bachur, N. R. a Huffman, D. H.** Daunorubicin metabolism: Estimation of daunorubicin reductase. *British Journal of Pharmacology*. 1971, 43, stránky 828-833.
22. **Maudens, K. E., a další.** Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva. *Journal of Chromatography B*. 2009, 877, stránky 3907-3915.
23. **Fogli, S., a další.** An Improved HPLC Method for Therapeutic Drug Monitoring of Daunorubicin, Idarubicin, Doxorubicin, Epirubicin, and Their 13-Dihydro Metabolites in Human Plasma. *Therapeutic Drug Monitoring*. 1999, 21 (3), stránky 367-375.
24. **Yang, Y.** Development and validation of a high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for quantification of daunorubicin in rat plasma. *Talanta*. 2007, 71, stránky 596-604.
25. **Urva, S. R., a další.** Sensitive high performance liquid chromatographic assay for assesment of doxorubicin pharmacokinetics in mouse plasma and tissues. *Journal of Chromatography B*. 2009, 877, stránky 837-841.
26. **Krogh-Madsen, M., Hansen, S. H. a Honoré, P. H.** Simultaneous determination of cytosine arabinoside, daunorubicin and etoposide in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2010, 878, stránky 1967-1972.

27. **Sakai-Kato, K., a další.** Rapid and sensitive method for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2012, 60 (3), stránky 391-396.
28. **Bogason, A., a další.** Inverse relationship between leukaemic cell burden and plasma concentrations of daunorubicin in patients with acute myeloid leukaemia. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2011, 71 (4), stránky 514-521.
29. **U.S. National Library of Medicine.** CERUBIDINE (daunorubicin hydrochloride) injection, powder, for solution. *DailyMed*. [Online] [Citace: 17. 4. 2013] <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=326cd915-5d90-46a5-9a27-af39b9ced7cc>.

SEZNAM TABULEK

Tab. 1.	<i>Mixotropní řada vybraných rozpouštědel</i>	18
Tab. 2.	<i>Složení a průtok mobilní fáze v průběhu vývoje metody</i>	34
Tab. 3.	<i>Způsob přípravy pracovních roztoků</i>	36
Tab. 4.	<i>Výtěžnost precipitace použitých deproteinačních činidel</i>	46
Tab. 5.	<i>Přesnost a správnost metody pro stanovení DAU v plazmě</i>	49
Tab. 6.	<i>Přesnost a správnost metody pro stanovení DAU-OL v plazmě</i>	50
Tab. 7.	<i>Pokles koncentrace DAU, DAU-OL za laboratorní teploty</i>	51
Tab. 8.	<i>Pokles koncentrace DAU, DAU-OL v plazmě po zamrazení</i>	52

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1.	<i>Chemický vzorec daunorubicinu</i>	26
Obr. 2.	<i>Metabolická přeměna daunorubicinu na daunorubicinol</i>	26
Obr. 3.	<i>Chemický vzorec doxorubicinu</i>	27
Obr. 4.	<i>Záznam analýzy zásobních roztoků DAU a DAU-OL v methanolu</i>	40
Obr. 5.	<i>Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO I</i>	41
Obr. 6.	<i>Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO II</i>	42
Obr. 7.	<i>Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO III</i>	43
Obr. 8.	<i>Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO IV</i>	43
Obr. 9.	<i>Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO V</i>	44
Obr. 10.	<i>Záznam analýzy zásobních roztoků DAU, DAU-OL a DOXO VI</i>	45
Obr. 11.	<i>Záznam analýzy standardních vzorků plazmy</i>	45
Obr. 12.	<i>Kalibrační křivka – stanovení DAU</i>	47
Obr. 13.	<i>Kalibrační křivka – stanovení DAU-OL</i>	48