

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Bioanalytické metodické přístupy při sledování
osudu nového potenciálního léčiva v organismu
pomocí HPLC-PDA-MS-MS**

Disertační práce

Školitel: Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.

2007

PŘEMYSL CÍSAŘ

Na tomto místě bych rád poděkoval v první řadě svému školiteli doc. PharmDr. Milanu Nobilisovi, CSc., který mne během mého postgraduálního studia zasvětil do tajů xenobiochemických experimentů a tandemové instrumentálně-analytické techniky, do přípravy a izolace standardů očekávaných metabolitů 1. fáze biotransformace dimefluronu, který mne naučil zpracovat biomatrix, extrahovat analyty z biologického materiálu a z analýz těchto extraktů pomocí vysoceúčinné kapalinové chromatografie s UV-diode-array a hmotnostní spektrometrickou detekcí vytěžit maximum kvalitativních i kvantitativních informací o struktuře a koncentraci nalezených metabolitů dimefluronu.

Dále chci poděkovat pracovníkům Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv a zaměstnancům Ústavu experimentální biofarmacie AV ČR za to, že mi vytvořili příjemné prostředí k mé experimentální činnosti.

Docentu RNDr. Milanu Pourovi a docentu PharmDr. Jiřímu Kunešovi (Katedra anorganické a organické chemie, Univerzity Karlovy v Praze, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové) patří díky za proměření a interpretaci NMR spekter připravených standardů.

Za proměření a vyhodnocení hmotnostních spekter děkuji Ing. Lence Kolářové, PhD. a docentu Ing. Michalu Holčápkovi, PhD (Katedra analytické chemie, VŠCHT, Univerzita Pardubice).

Obsah

OBSAH	3
1. ÚVOD	6
2. CÍL DISERTACE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. BIOANALYTICKÉ ASPEKTY XENOBIOCHEMIE A ADME STUDIÍ	11
3.1.1. <i>Absorpce a distribuce xenobiotika při různých způsobech podání</i>	<i>12</i>
3.1.2. <i>Metabolismus a exkrece xenobiotika.....</i>	<i>15</i>
3.1.2.1. První fáze biotransformace xenobiotika.....	16
3.1.2.1.1. Oxidace xenobiotika	16
3.1.2.1.2. Redukce xenobiotika	17
3.1.2.1.3. Hydrolýza xenobiotika.....	18
3.1.2.1.4. Chirální inverze xenobiotika.....	18
3.1.2.2. Druhá fáze biotransformace xenobiotika	20
3.1.3. <i>Metody studia osudu xenobiotika v organismu</i>	<i>21</i>
3.1.3.1. Odhad způsobů biotransformace xenobiotika a syntéza standardů metabolitů 1. fáze metabolismu	21
3.1.3.2. Dekonjugací experimenty a jejich význam pro identifikaci a stanovení metabolitů 2. fáze biotransformace xenobiotika.....	22
3.1.3.3. Odběr a úprava vzorku biomatrice, způsoby extrakce analytů z biomatrice, derivatizační reakce	23
3.1.3.4. Význam separačních technik při studiu biotransformace xenobiotik v organismu	24
3.1.4. <i>Vývoj benzo[c]fluorenových antineoplastik.....</i>	<i>24</i>
3.2. ANALYTICKÁ ČÁST	29
3.2.1. <i>Vysoceúčinná kapalinová chromatografie [56 - 59].....</i>	<i>29</i>
3.2.1.1. Princip HPLC.....	30
3.2.1.2. Čerpadla	31
3.2.1.3. Dávkovací zařízení.....	32
3.2.1.4. Stacionární fáze využívané ve vysoce účinné kapalinové chromatografii [65 - 67].....	32
3.2.1.5. Charakteristika a požadavky kladené na mobilní fáze	37
3.2.1.6. Detekce ve vysoceúčinné kapalinové chromatografii	38
3.2.1.6.1. UV-VIS detektory.....	39
3.2.1.6.2. Fluorescenční detektor.....	41
3.2.1.6.3. Využití hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC	43
3.2.1.7. Způsoby stanovení analytu pomocí HPLC.....	50
3.2.2. <i>Příprava biologického vzorku k analýze</i>	<i>54</i>
3.2.2.1. Extrakce z kapaliny do kapaliny	54
3.2.2.2. Extrakce na pevných fázích	56
3.2.2.3. Mikroextrakce na pevné fázi	56
3.2.2.4. Deproteinace [93] a [94]	57

3.2.2.5.	Přímý nástřik	58
3.2.3.	<i>Validace bioanalytické metody</i>	58
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	62
4.1.	PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE	62
4.1.1.	<i>Chemikálie</i>	62
4.1.1.1.	Standardy a prekurzory připravené pro účely disertace	62
4.1.1.2.	Komerčně získané chemikálie	62
4.1.1.3.	Zásobní roztoky	63
4.1.1.4.	Použité tlumivé roztoky (pufry)	64
4.1.2.	<i>Přístrojové vybavení</i>	64
4.1.2.1.	Chromatografické systémy	64
4.1.2.2.	Chromatografické kolony	65
4.2.	PŘÍPRAVA STANDARDŮ	66
4.2.1.	<i>Dimefluron</i>	66
4.2.2.	<i>O-Desmethylace dimefluronu</i>	68
4.2.3.	<i>N-Desmethylace dimefluronu</i>	69
4.2.4.	<i>N-Oxidace dimefluronu</i>	70
4.2.5.	<i>C7-Redukce karbonylu dimefluronu</i>	71
4.2.6.	<i>Homodimefluron (vnitřní standard pro HPLC stanovení)</i>	72
4.2.7.	<i>Převedení na hydrochlorid</i>	73
4.2.8.	<i>NMR</i>	73
4.2.9.	<i>MS</i>	73
4.3.	ANALYTICKÁ ČÁST	74
4.3.1.	<i>Vývoj bioanalytické metody</i>	74
4.3.2.	<i>Příprava vzorků k analýze</i>	77
4.3.2.1.	<i>Extrakce z trusu</i>	77
4.3.2.2.	<i>Vodný extrakt z trusu</i>	77
4.3.2.3.	<i>Moč</i>	77
4.3.2.4.	<i>Inkubace</i>	77
4.4.	BIOTRANSFORMAČNÍ STUDIE	78
4.4.1.	<i>Biotransformace u samic</i>	79
5.	DISKUSE A ZÁVĚR	82
6.	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	85
6.1.	SEZNAM PUBLIKACÍ PŘIJATÝCH DO TISKU VE VĚDECKÝCH ČASOPISECH	85
6.1.1.	<i>Disposition study of a new potential antineoplastic agent dimefluron in rats using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection</i>	85
6.1.2.	<i>Use of chiral liquid chromatography for the evaluation of stereospecificity in the carbonyl reduction of potential benzo[c]fluorene antineoplastics benfluron and dimefluron in various species</i>	101

6.1.3.	<i>Comparison of different stationary phases for bioanalytical studies of biologically active compounds.....</i>	<i>111</i>
6.1.4.	<i>Determination of low contents of fempiverine bromide by extraction spectrophotometry</i>	<i>123</i>
6.2.	PRÁCE PUBLIKOVANÉ NA KONFERENCÍCH	128
6.3.	ŘEŠENÉ GRANTY	130
6.3.1.	<i>Grantová agentura Univerzity Karlovy.....</i>	<i>130</i>
6.3.2.	<i>Fond rozvoje vysokých škol.....</i>	<i>130</i>
7.	SUMMARY	131
8.	POUŽITÁ LITERATURA	132

1. Úvod

Předložená disertační práce patří svým zaměřením do oblasti **bioanalýzy farmak**. Cílem bioanalýzy je poskytnout validní analytické informace o přítomnosti a kvantitativním zastoupení léčiva a jeho metabolitů v organismu. Bioanalýza našla uplatnění v nejrůznějších praktických aplikacích. V následujících odstavcích si dovoluji připomenout alespoň ty nejdůležitější.

První oblastí, kde bioanalýza nachází velmi široké uplatnění je **výzkum a vývoj nových potenciálních léčiv**. Během preklinického a následného klinického vývoje se zkoumá osud nového farmaka po podání do organismu laboratorních zvířat a člověka. Jedná se o tzv. ADME studie (z akronymu **A**bsorption-**D**istribution-**M**etabolism-**E**xcretion). Jak vyplývá z názvu, sledují tyto studie v závislosti na čase všechny fáze pohybu a přeměn léčiva v organismu (tj. farmakokinetiku léčiva), od jeho absorpce z místa podání, přes jeho distribuci krví do jednotlivých orgánů a k cílovým tkáním, až po eliminační fázi, která zahrnuje biotransformaci léčiva a jeho postupnou exkreci z organismu. Takový výzkum by byl nemyslitelný bez použití vhodné bioanalytické metody, která umožní identifikovat léčivo a jeho metabolity v poměrně složité biomatrici a stanovit jejich koncentrace. Výsledky bioanalytických studií přinášejí potřebné informace o koncentracích léčiva a jeho metabolitů v krevním oběhu, o jejich distribuci do jednotlivých částí organismu a zejména do okolí receptorů. Bioanalytické studie umožňují sledovat postupné přeměny parentní látky na metabolity 1. a 2. fáze biotransformace a jejich postupnou exkreci z organismu. Z farmakokinetických parametrů získaných na základě bioanalytických studií se dá odhadnout časové rozložení farmakodynamického účinku a toxikologického zatížení organismu.

In-line identifikace chemických struktur metabolitů nového potenciálního léčiva sofistikovanými průtokovými detektory (PDA, MS-MS) během vlastní bioanalýzy je předpokladem pro následnou syntézu standardů těchto metabolitů v dostatečném množství, aby bylo možné prozkoumat jejich farmakodynamický a toxikologický profil. Díky kvalitativním bioanalytickým výsledkům se mnohdy odhalí, že léčivo je ve skutečnosti „prodrug“ a teprve metabolit je účinnou strukturou, nebo, že za určitý toxický efekt je zodpovědný metabolit a nikoli parentní látka. Bioanalytické výsledky tak mohou zpětně ovlivňovat optimalizační modifikace struktury vyvíjeného léčiva vedoucí k potlačení tvorby nežádoucích metabolitů, ovlivnění farmakokinetiky nebo farmakodynamiky parentní látky.

Rovněž bilanční studie se neobejdou bez bioanalytických aplikací. Bilanční studií porovnáváme dávku testovaného léčiva podaného do organismu s molárním množstvím parentní látky a sumy všech metabolitů, které se hlavními cestami (močí, stolicí) vyloučí z organismu. Takto můžeme odhalit nežádoucí kumulaci parentní látky nebo metabolitu v některých orgánech nebo tkáních.

Druhou aplikační oblastí, kde intenzivně využíváme bioanalytické metody, je **vývoj nových generických léčivých přípravků**. Vyvine-li nějaká farmaceutická firma nové léčivo a připraví z něj vhodnou lékovou formu, považujeme tuto lékovou formu za originál. Originální léčivý přípravek je patentově chráněn většinou 20 let od přihlášení nové účinné látky. Cena originálního léčivého přípravku bývá značně vysoká, protože se do ní promítají náklady na výzkum a vývoj nové chemické struktury a její následné preklinické a klinické testování. Po ukončení patentové ochrany je léková substance přístupná jiným farmaceutickým firmám, které se zabývají výrobou generických preparátů. Cena generických preparátů je oproti originálu podstatně nižší (o 30 - 50%), protože zahrnuje pouze vývoj nové lékové formy z nakoupené substance účinné látky. Součástí vývoje nové generické lékové formy jsou takzvané **bioekvivalenční studie**, které využívají rovněž bioanalytické metody. Bioekvivalenční studií se prokazuje, zda nově vyvinutý testovaný generický lékový přípravek se chová po podání dobrovolníkům podobně jako referenční originální přípravek (nebo referenční přípravek jiné generické firmy, který úspěšně prošel bioekvivalenční studií a nejméně 10 let je používán v terapeutické praxi). Vhodnou bioanalytickou metodou můžeme zjistit, zda po podání testovaného i referenčního přípravku se dosáhne v organismu srovnatelná **biologická dostupnost (bioavailabilita)** účinné látky. Pokud je srovnatelná bioavailabilita prokázána statisticky na dostatečně velkém souboru dobrovolníků (například 24 - 36 dobrovolníků), mohou být oba přípravky (testovaný a referenční) považovány za **bioekvivalentní** a firma může po odevzdání průvodní dokumentace požádat regulační autoritu (u nás Státní ústav pro kontrolu léčiv - SÚKL) o povolení výroby a uvedení nově otestovaného lékového přípravku na trh.

Třetí významnou aplikační oblastí bioanalýzy je **terapeutické monitorování léčiv (Therapeutic Drug Monitoring, TDM)**. Jeho význam pro individualizovanou léčbu vyplývá z poznání, že jednotliví medikovaní pacienti mohou mít různý funkční stav orgánů podílejících se na absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci léčiva. Funkční

stav orgánů je ovlivňován genetickými faktory, stářím, patologickými procesy, současnou terapií jinými léčivy a řadou dalších vlivů. Nízké koncentrace léčiva v cílových tkáních mohou být například dosahovány po perorálním podání pacientům s malabsorpčním syndromem. Léková terapie v takových případech není dostatečně účinná. U pacientů s poškozením jater nebo ledvin můžeme zaznamenat naopak vyšší hladiny léčiva v důsledku jeho snížené biotransformace a exkrece. Pokud by v důsledku snížené eliminační funkce docházelo ke kumulaci léčiva v organismu pacienta, hrozí mu léková intoxikace. Všem těmto stavům poddávkování nebo předávkování léčiva můžeme zabránit pokud během léčby pacienta budeme v pravidelných intervalech monitorovat koncentrace léčiva případně jeho metabolitů v krvi pomocí vhodné bioanalytické metody. Na základě výsledků bioanalýzy pak můžeme upravit individuální medikaci konkrétního pacienta tak, aby se koncentrace léčiva v jeho organismu pohybovala v požadovaném terapeutickém rozmezí.

Kromě výše zmíněných farmaceutických aplikací nachází bioanalýza své uplatnění i v dalších oblastech, které již budu komentovat jen ve zkratce. **Forensní (soudní) analýza** využívá bioanalytické metody v odhalování toxikománie a zneužívání drog. Bioanalytickým zkoumáním tkání a tekutin získaných *post mortem* se prokazuje, čím byla způsobena intoxikace a jaké byly důvody úmrtí. Včasná **toxikologická bioanalýza** umožňuje odhalit příčiny otravy postiženého pacienta a nasadit rychlou a účelnou léčbu, kterou se odstraní následky intoxikace. Velmi citlivé a průkazné bioanalytické metody se používají při **odhalování dopingu ve vrcholovém sportu**. Veterinární a potravinářské laboratoře mohou bioanalytickými metodami monitorovat **léková rezidua v jatečném mase**. Aplikací bioanalýzy by se dalo nalézt ještě více, ty výše zmíněné považuji za nejdůležitější.

Bioanalýza (bioanalytika) má určitá specifika, kterými se liší od klasické farmaceutické analýzy. Farmaceutická analýza pracuje s roztoky léčiv a jejich směsí, případně s extrakty z lékových forem (tablet, čípků, mastí). Pro účely bioanalýzy se odebírají **reprezentativní vzorky biomatrice z živého nebo mrtvého organismu**. Bioanalytický vzorek většinou vychází z různě komplexní biomatrice a vyžaduje speciální úpravy a způsoby zpracování. Při nich se snažíme analyty obsažené ve vzorku s co největší výtěžností a pokud možno bez kvalitativních a kvantitativních změn (enzymatických, mikrobiálních nebo způsobených nevhodnou úpravou) převést do roztoku

rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel, která jsou kompatibilní s následnou instrumentální analýzou. Současně se snažíme, aby se do tohoto finálního roztoku dostalo co nejméně interferujících endogenních látek (eobiotik) z biomatrice. Toho dosahujeme řadou operací, mezi které řadíme přidavek vnitřního standardu, kterým se kontrolují ztráty analytů během následných operací, denaturaci (deproteinaci) biomatrice, centrifugaci, odpipetování nebo dekantace supernatantu, případnou derivatizaci analytů, extrakci, odpaření rozpouštědla a následnou rekonstituci extraktu v rozpouštědlech kompatibilních s vlastní instrumentální analýzou (nejlépe rekonstituce v používané mobilní fázi).

Specifickou charakteristikou bioanalýz je potřeba současného stanovení parentního léčiva a řady metabolitů, které vznikly v živém organismu biotransformací podané látky. Musíme tedy napřed rozdělit směs xenobiotik (parentního léčiva, jeho metabolitů první a případně rovněž druhé fáze biotransformace a vnitřního standardu) a zbytkových balastů (eobiotik) do nepřekrývajících se koncentračních zón a následně jednotlivé koncentrační zóny detegovat. Těmto cílům dokonale vyhovuje **vysoceúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**. HPLC je sestava propojených přístrojů, které zabezpečují programovatelné mísení rozpouštědel v tzv. mobilní fázi, její pravidelný, kontinuální pohyb chromatografickou kolonou se stacionární fází na jejíž začátek se speciálním zařízením vnáší vzorek (směs analytů). V koloně dochází vzájemnými interakcemi analytů se stacionární a mobilní fází k rozdílné rychlosti pohybu různých typů molekul a tím i k jejich dokonalé separaci do úzkých koncentračních zón. Koncentrační zóny opouštějící kolonu vstupují do průtokových detektorů, kde jsou v nich obsažené analyty detegovány. Výhodou HPLC sestavy je, že může tandemově řadit několik detektorů pracujících na různých detekčních principech za sebou. Takto je možné získat nejen kvantitativní informace o množství analytu v každé protékající koncentrační zóně (například pomocí ultrafialového nebo fluorescenčního detektoru), ale i kvalitativní informace o typu chromoforu (PDA), o struktuře a molekulové hmotnosti neznámého analytu (MS, NMR), o redoxních vlastnostech (elektrochemický detektor), případně o chirálních vlastnostech analytů (polarimetrický, CD-detektor). Všechny tyto analytické informace získané z HPLC analýz s tandemovým spojením několika detektorů lze využít zejména při identifikaci a stanovení neznámých struktur metabolitů nových potenciálních léčiv.

2. Cíl disertace

Cílem této disertační práce bylo vyvinout a zvalidovat bioanalytickou HPLC metodu pro studium osudu potenciálního antineoplastika dimefluronu v laboratorních zvířatech (potkanech). Vyvinutá bioanalytická HPLC metoda bude využita v následných ADME studiích preklinického výzkumu tohoto potenciálního léčiva.

Protože dimefluron dosud nebyl v tomto směru podrobněji zkoumán, bylo nutné ke zmíněné bioanalytické problematice zaujmout komplexnější přístup. Naplní mé disertační práce bylo vyřešení následujících úkolů:

- Na základě chemické struktury dimefluronu a soudobých xenobiochemických znalostí o metabolismu podobných látek odhadnout, jaké budou cesty jeho biotransformace, a vytipovat struktury jeho pravděpodobných metabolitů.
- Připravit syntetické standardy očekávaných metabolitů 1. fáze biotransformace dimefluronu, purifikovat je pro analytické účely a potvrdit jejich strukturu spektrálními analýzami (PDA, NMR). Vybrat a případně syntetizovat vhodný vnitřní standard pro HPLC analýzy.
- S použitím standardů dimefluronu, jeho připravených metabolitů a vnitřního standardů vyvinout vhodnou HPLC metodu zaručující dostatečnou separaci výše zmíněných standardů a jejich selektivní a citlivou detekci.
- Vyvinout metodu zpracování a extrakce moči a stolice potkanů, kterým byl podán orálně dimefluron.
- S použitím photodiode-array a hmotnostní spektrometrické detekce identifikovat další metabolity dimefluronu (1. a 2. fáze biotransformace), jejichž syntetické standardy nebyly dostupné.
- Navrhnout základní přehled biotransformace dimefluronu, prostudovat eliminační fázi farmakokinetiky dimefluronu po perorálním podání potkanům a provést bilanční studii dimefluronu (porovnání podaného molárního množství dimefluronu *versus* eliminovaná suma dimefluronu a jeho metabolitů).
- Na základě dosažených výsledků vytvořit přehled základních informací o osudu dimefluronu v savčím organismu jako předpoklad dalších preklinických studií tohoto potenciálního léčiva.

3. Teoretická část

Předkládaná práce je zaměřena na bioanalýzu léčiv. Bioanalýza je komplexní obor využívající instrumentální analýzu k řešení (xeno)biochemické a farmakologické problematiky a zohledňující tudíž (xeno)biochemické a farmakologické aspekty a specifika v analytické práci. Identifikace a stanovení analytů v biologickém materiálu přináší analytikovi celou řadu problémů vyplývajících z povahy vzorku a potřebou oddělit majoritní balasty od minoritně zastoupených léčiv a jejich metabolitů, které jsou předmětem našeho analytického zájmu. Odběr biologického materiálu, způsob jeho uchování, specifické vlastnosti vyplývající z přítomnosti enzymatických systémů (tělu vlastních nebo mikrobiálních), problémy vyplývající z již zmíněné složitosti biomatrixe, ale i poněkud odlišný způsob vyhodnocování výsledků jsou překážkami, s kterými se bioanalytik musí vypořádat.

Ačkoli se jedná o obor, ve kterém se v každém kroku prolínají biologicko/biochemické i analytické principy, je vhodné pro přehlednost a z didaktických důvodů rozdělit kapitolu 3 na dva bloky. První se bude zabývat xenobiochemií a bude zahrnovat i informace o studovaném potenciálním léčivu dimefluronu. Druhý blok se bude zabývat instrumentální analýzou a jejím využitím v bioanalýze.

3.1. Bioanalytické aspekty xenobiochemie a ADME studií

Organismy, včetně lidského, se během života setkávají nejen s chemickými látkami, které potřebují pro svůj život, ale i s řadou látek, které nemohou využít jako živiny, ale s jejichž přítomností ve svém okolí se musí vypořádat. Takové látky označujeme jako xenobiotika, a patří mezi ně i léčiva. Osudem xenobiotik, jejich vlivem na organismus i jejich vzájemnými interakcemi a interakcemi s makromolekulami se zabývá **xenobiochemie**. Důležitou náplní xenobiochemie je systematické sledování vztahů mezi chemickými strukturami xenobiotik a typem jejich přeměny. Znalosti vztahů mezi chemickou strukturou sloučeniny a způsobem její biotransformace otevírají často nové cesty k pochopení mechanismu účinku léčiv. [1, 2]

Pro výzkum osudu léčiva v organismu je důležité získat přesná analytická data z jednotlivých zkoumaných tělesných kompartmentů. Protože xenobiochemie studuje celou cestu xenobiotika organismem, setkává se bioanalytik s celou škálou vzorků různé složitosti i charakteru, které je nutné zkoumat a vypracovat k nim vhodnou analytickou

metodu, jíž by dokázal stanovit i minimální koncentrace studovaného léčiva stejně jako jeho metabolitů v přítomnosti vysokých koncentrací komponent biomatrice.

Nejjednodušší pokusy se provádějí na subcelulární úrovni (s mikrosomální frakcí buněk nebo jiných subbuněčných struktur), případně na celulární úrovni (hepatocyty, enterocyty apod.). Analýza takových biomatricí je poměrně jednoduchá, ve vzorku je přítomno poměrně málo balastních látek. V jiných *in-vitro* experimentech se léčivo podává do perfundovaných orgánů. Nejvíce informací nám zpravidla poskytne experiment *in-vivo*, tedy podání léčiva živému organismu. Zde je důležité vybrat k odběru vhodnou biomatrici, jejíž analýza by nám poskytla potřebné informace. Dále je důležité dokázat vybraný materiál zpracovat takovým způsobem, aby při jeho přípravě k analýze nedocházelo ke ztrátě informací. Odebrané vzorky mohou být poměrně jednoduché, jako je moč, krev a její deriváty, ale i obtížněji zpracovatelné, jako je například tkáň orgánů. Pro rozhodování je důležité zmapovat úskalí, která nás při práci s jednotlivými materiály mohou potkat, a seznámit se s jednotlivými možnými biologickými materiály.

3.1.1. Absorpce a distribuce xenobiotika při různých způsobech podání

Absorpcí se rozumí průnik léčiva z místa podání do centrálního distribučního kompartmentu organismu, tedy krevního řečiště. Absorpce závisí na způsobech podání léčiva a na mechanismech jeho průniku přes biologické membrány.

Fyziologické cesty, kterými může organismus léčiva přijímat, jsou v podstatě trojí – gastrointestinálním traktem, dýchacím traktem nebo transportem přes kůži. Těmto cestám podání léčiva odpovídají vhodně vyvinuté lékové formy (např. tablety, kapsle, roztok, aerosol, transdermální lékové formy obsahující akceleranty penetrace, které usnadňují absorpci).

Další možnou cestou je invazivní vnesení xenobiotika přímo do některého tělesného kompartmentu (*intravenózní, intramuskulární, subkutanní či intraperitoneální podání*).

Nejčastější cesta podání léčiv je gastrointestinálním traktem. Touto cestou je podávána většina farmak [3]. Touto cestou tělo rovněž přijímá kromě léčiv i další xenobiotika obsažená ve stravě jako jsou konzervanty a stabilizační přísady, rezidua hnojiv, insekticidní a pesticidní rezidua a v neposlední řadě i různé potravní doplňky. V gastrointestinálním traktu dochází k absorpci s výjimkou hltanu a jícnu po celé jeho

délce od ústní dutiny až k rektu. K absorpci může docházet prostou difuzí přes membránu, aktivním i pasivním transportem nebo endocytózou.

Většina léčiv prochází do distribučního kompartmentu **prostou difuzí** přes membrány. Ta je ovlivněna jejich lipofilitou a hodnotou pK_a (pK_b) daného léčiva a hodnotou pH prostředí na obou stranách membrány. Lipofilita léčiva ovlivňuje transport přes lipidovou dvouvrstvu membrány. Hodnota aktuálního pH určuje množství látky v ionizované, respektive neionizované formě, podle Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice (viz Rovnice 1). Hodnota pH je důležitý determinant absorpce, protože prostou difuzí může procházet léčivo jen v neionizované formě (jako neutrální molekula) a dochází k ustalování dynamické rovnováhy koncentrací neutrálních forem molekul na obou stranách membrány.

Rovnice 1: Hendersonova-Hasselbachova rovnice

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad \text{pro slabé kyseliny}$$

$$pH = 14 - pK_b + \log \frac{[B]}{[BH^+]} \quad \text{pro slabé zásady}$$

Legenda: pH - záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů, pK_a - záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny, pK_b - záporný dekadický logaritmus disociační konstanty baze, [HA], $[A^-]$ koncentrace nedisociované a disociované formy (sůl) kyseliny při daném pH vodného prostředí, [B], $[BH^+]$ koncentrace nedisociované a disociované formy (sůl) baze při daném pH vodného prostředí

Facilitovaný pasivní transport je zprostředkován enzymy v buněčné membráně. Přenos molekul je veden ve směru koncentračního gradientu. Tímto mechanismem procházejí membránou většinou minerály a tělu vlastní a potřebné látky jako je například sodík, draslík a glukosa. [4, 5]

Další formou přenosu látek přes stěnu gastrointestinálního traktu je **aktivní transport**. Stejně jako u pasivního transportu se jedná o přenos zprostředkovaný enzymy v buněčné stěně, které přenášejí různé látky za spotřeby energie proti koncentračnímu

spádu. Je možné takto přenášet i léčiva, ale jen ta, která jsou strukturně podobná látkám, pro něž je transportní enzymatický systém určen.

Endocytózou se přes stěnu gastrointestinálního traktu přenášejí látky vysoké molekulové hmotnosti pomocí vezikul tvořených z buněčné membrány. Pro zvýšení efektivity se některé látky vážou na bílkoviny na povrchu buněčné membrány, čímž dojde k jejich zakoncentrování v místě tvorby vezikul.

Při **absorpci nějakého xenobiotika plícemi** je hlavním ovlivňujícím faktorem rozdíl parciálních tlaků xenobiotika v krvi a ve vdechovaném vzduchu.

Kůže je značně neprostupná lipofilní bariéra, kterou prochází zejména lipofilní léčiva (většinou pomalu). Při aplikaci léčiv se proto využívá akceleračních transdermálních penetračních činidel, které napomáhají průchodu léčiv přes kožní bariéru [3, 6].

Specifickou kapitolou je **injekční podání léčiv**. Při *intravenózní* aplikaci se fáze absorpce plně obchází, protože dochází k aplikaci rovnou do krevního řečiště. Absorpce po *intramuskulárním* a *subkutánním* podání závisí na difuzi léčiva konkrétní tkání, ta může být urychlena přidáním enzymu hyaluronidasy do injekčního bolu.

Po absorpci léčiva dochází k jeho **distribuci** krevním řečištěm do ostatních tělních kompartmentů (tkání, orgánů). V různých kompartmentech, včetně distribučního, se léčivo může vyskytovat volně nebo vázané na bílkoviny. Distribuce do tkání je závislá na povaze léčiva a na charakteru tkání (pH, lipofilita). Podle známého principu „*similia similibus solvuntur*“ mají například lipofilní xenobiotika afinitu k lipofilním tkáním. Závislost distribuce xenobiotika na pH kompartmentů lze opět popsat pomocí Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice. Léčivo se kumuluje na té straně membrány, kde se díky pH prostředí nachází ve větším množství v ionizované formě.

Léčivo absorbované z gastrointestinálního traktu může podléhat tzv. first-pass efektu (efekt prvního průchodu játry), kdy se část léčiva metabolizuje nebo transportuje do žlučových cest (nebo obojí). Pouze žíly odvádějící krev z ústní dutiny a část žil z rekta obchází průchod játry, čehož se využívá u podání léčiv podléhajících výraznému first-pass efektu (nitroglycerin). Některá léčiva podléhají tzv. enterohepatálnímu oběhu, kdy léčivo zpět vyloučené žlučí se znovu vstřebává (metabolit se může opět metabolizovat

pomocí střevních bakterií na původní léčivo) ze střeva do krevního oběhu a znovu projde játry.

Možnost podléhat first-pass efektu, popřípadě podléhat enterohepatálnímu oběhu, některá léčiva diskvalifikuje, ale u jiných přináší pozitiva, jako jsou prodloužení setrvání v organismu díky zpožděné absorpci nebo transformace prodrug na aktivní formu.

3.1.2. Metabolismus a exkrece xenobiotika

Aby obnovil homeostázu narušenou průnikem cizorodé látky, snaží se organismus samozřejmě xenobiotikum odstranit. Tento úkol řeší eliminační fáze. Eliminace se rozděluje na metabolismus (biotransformaci) a exkreci z organismu. Pro rychlejší exkreci z organismu se léčivo biotransformuje do hydrofilnějších forem.

V 1. fázi biotransformace dochází k vytvoření nebo odkrytí polárních skupin tak, aby se zvýšila rozpustnost léčiva ve vodě. Ačkoli počet chemických sloučenin, která se jako xenobiotika mohou dostat do organismu je neomezený, jejich přeměna v organismu se děje na základě relativně malého počtu chemických reakcí. Jsou to nejčastěji reakce oxidační, redukční a hydrolytické.

V druhé fázi dochází ke konjugaci xenobiotik (včetně léčiv a jejich metabolitů 1. fáze biotransformace) s některou endogenní (tělu vlastní) polární sloučeninou, což vede k dalšímu růstu hydrofilnosti xenobiotika. Takovými endogenními látkami mohou být kyselina glukuronová, kyselina sírová, glycin, glutathion a další.

Po biotransformaci dochází k exkreci hydrofilizovaných molekul z organismu. Většina látek je vylučována močí. Některé jsou vylučovány žlučí do střeva a následně odvedeny ve formě stolice z organismu, popřípadě se vracejí zpět do organismu enterohepatálním oběhem, jak už bylo popsáno výše. V neposlední řadě se některé látky mohou vylučovat i dechem, slinami, mateřským mlékem a potem.

Pro biotransformaci může tělo využít i hostujících bakterií v gastrointestinálním traktu. Zde je často účelné zjistit zda konkrétní léčivo biotransformuje organismus, jemuž je lék podán, nebo hostující bakterie. Pokud se biotransformace účastní mikroorganismy gastrointestinálního traktu, dochází často k tvorbě účinných forem léčiva (například přeměna sulfasalazinu na účinnou 5-aminosalicylovou kyselinu [7]) nebo ke štěpení vazby mezi xenobiotikem a eobiotikem vzniklé při 2. fázi biotransformace. Tento fakt je nutné vzít v úvahu zejména při podání určitých léčiv současně nebo těsně po léčbě

orálně podávanými širokospektrými antibiotiky, jejichž běžným vedlejším účinkem je likvidace střevní mikroflóry.

Metabolity 1. fáze biotransformace mohou vykazovat biologický účinek. Pokud farmakodynamický efekt nevykazuje parentní podaná látka, ale až metabolit, považujeme takovou látku za proléčivo (prodrug). Typickými příklady proléčiv jsou nabumeton, který je transformován v organismu na antiflogisticky účinnou 6-methoxy-2-naftyloctovou kyselinu [8], nebo již zmíněný sulfasalazin, který se redukuje na účinnou 5-aminosalicylovou kyselinu [7]. Metabolity 2. fáze biotransformace bývají většinou biologicky neaktivní, mohou se však konvertovat hydrolýzou zpět na aktivní metabolity 1. fáze biotransformace.

3.1.2.1. První fáze biotransformace xenobiotika

3.1.2.1.1. Oxidace xenobiotika

Biotransformační reakce tohoto typu jsou nejčastěji katalyzovány mikrosomálními oxidázami se smíšenou funkcí (mixed function oxydases, MFO systems), kde jako terminální enzym figuruje buď cytochrom P 450 (více jak 70 %) a nebo flavinová monooxygenasa [2, 8, 9].

K reakcím katalyzovaným těmito enzymy patří alifatická a alicyklická hydroxylace, dealkylace, oxidace izolované dvojně vazby, oxidace aromatických jader, *N*-oxidace, deaminace, sulfoxidace a desulfurace.

Při **dealkylačních reakcích** dochází, u etherů nebo aminů, k ataku C-H vazby α -uhlíku. Přes meziproduct obecného vzorce R-O-CH₂OH (R-NH-CH₂OH) dojde k odštěpení formaldehydu (aldehydu) a vzniku alkoholu, fenolu či aminu s nižším počtem substituentu. Při této reakci může samozřejmě dojít i k oxidaci nikoli koncového alkylu, ale uhlovodíkového řetězce mezi aminoskupinou a zbytkem molekuly léčiva. Pak na metabolitu léčiva zůstane aldehydická skupina a oddělí se amoniak (respektive amin). V tomto případě mluvíme o oxidačním desaminaci.

K **oxidaci izolované dvojně vazby** stejně jako k oxidaci aromatických jader dochází přes vysoce reaktivní meziproducty epoxidy, které působením epoxid-hydrolasy poskytují transdioly nebo se konjugují s glutathionem (viz 3.1.2.2). U aromatických jader se z epoxidů tvoří rovněž fenoly. Epoxidy (arenoxidy) mohou atakovat důležité nukleofilní makromolekuly, jako jsou DNA, RNA či bílkoviny.

Oxidací primárních a sekundárních aminů vznikají hydroxylaminy, které jsou meziprodukty dealkylace. **Oxidace terciárních aminů** a heterocyklů obsahujících dusík vede k tvorbě *N*-oxidů. Také *N*-oxidy vznikající z terciárních aminů mohou být meziprodukty dealkylačních reakcí. *N*-Oxidy vytvořené z terciárních aromatických aminů jsou poměrně stabilní polární látky. Pokud jsou ve sloučenině dva různé dusíky, pak je oxidován zpravidla jen jeden z nich.

V cytosolu buněk probíhají oxidace alkoholů, oxidace aldehydů a ketonů, oxidace alkyl- a arylalkylaminů a aromatizace alicyklického kruhu.

Oxidace alkoholů alkoholdehydrogenasou vede k tvorbě aldehydů. Mnohdy dochází k dalšímu zpracování produktů předchozích biotransformačních reakcí.

Oxidace aldehydů vede k tvorbě karboxylových kyselin (aldehyddehydrogenasou). Ketony se v organismu biotransformují redukcí alkoholdehydrogenasou na alkoholy, nebo dochází k oxidaci na karboxylové kyseliny za odštěpení jednoho z alkylových řetězců jako u methadonu nebo u nabumetonu, jenž se mění na účinnou 6-methoxy-2-nafthylactovou kyselinu [10].

K oxidaci alkyl- a arylalkylaminů monooxidasami dochází i v krevní plazmě (např. při zpracování tyrosinu).

3.1.2.1.2. Redukce xenobiotika

Redukční reakce jsou při biotransformačních změnách podobně významné jako reakce oxidační. Enzymy zprostředkující redukční reakce můžeme dělit do třech skupin dehydrogenáz/reduktáz (názvy uvádím v angličtině, aby byl zřejmý význam použitých zkratk: aldo-keto reductases (AKR) [11], medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR) [12], short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) [13]. K biotransformačním redukčním přeměnám patří redukce karbonylu, nitro a azoredukce, redukce *N*-oxidů a sulfoxidů a redukční dehalogenace.

Redukce karbonylu aldehydů vedou u aldehydů k tvorbě primárních alkoholů. Ketony se transformují na sekundární alkoholy. Pokud je keton nesouměrný, dochází při jeho redukcí ke vzniku chirálního centra v molekule xenobiotika. Redukce bývá často stereospecifická, preferuje se tvorba jednoho z enantiomerů. Tato stereospecificita je druhově závislá (viz 6.1.2).

Nitrosloučeníny se redukují přes nitroso sloučeniny a hydroxylaminy až na primární aminy. Sloučeniny s nitroskupinou mohou být i produktem metabolismu mikrosomální

oxidace aminoskupiny. Redukce azoskupiny vede k substituovanému hydrazinu a následně ke dvěma aminům.

N-oxidy vzniklé z parentního léčiva jsou vylučovány z organismu žlučí, dostávají se do střeva, kde jsou zpětně redukovány na terciární aminy a ty se vracejí portálním systémem zpět do jater. Tím dochází k udržování plazmatické hladiny terciárního aminu a prodloužení trvání účinku léčiva.

Redukční dehalogenace není častá. Dochází při ní k záměně halogenidu za vodík. Všechny halogeny reagují prakticky stejně s výjimkou fluoru (vazba C-F je příliš stabilní).

3.1.2.1.3. Hydrolýza xenobiotika

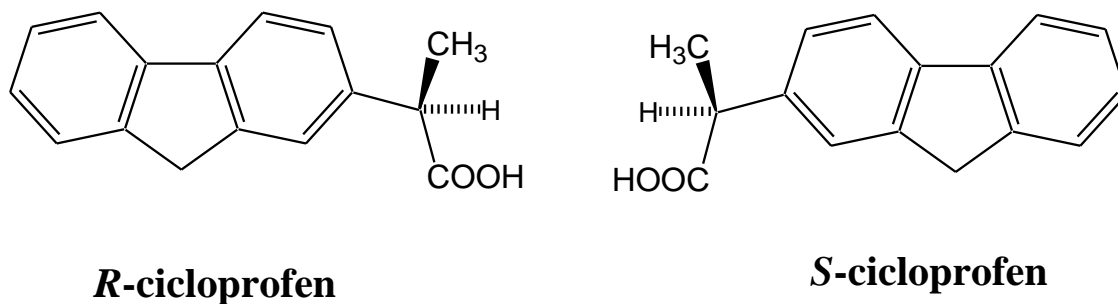
Hydrolýza esterů vede i k farmakologicky účinným produktům, jako například hydrolýza kyseliny acetylsalicylové, která se transformuje na kyselinu salicylovou. Dalším příkladem může být chloramfenikol sukcinát palmitát nebo pohlavní hormon cyproteron acetát. Hydrolýza esterů je jediná biotransformační reakce, která probíhá intenzivně i v krevní plazmě. Důležitým aspektem je, že štěpí některé produkty konjugace (2. fáze biotransformace).

Schopnost léčiv podléhat této přeměně v organismu je využívána při přípravě léčiv, kdy je předem počítáno s tím, že se esterová vazba rozštěpí. Je využito schopnosti esterové formy léčiva procházet přes membránu.

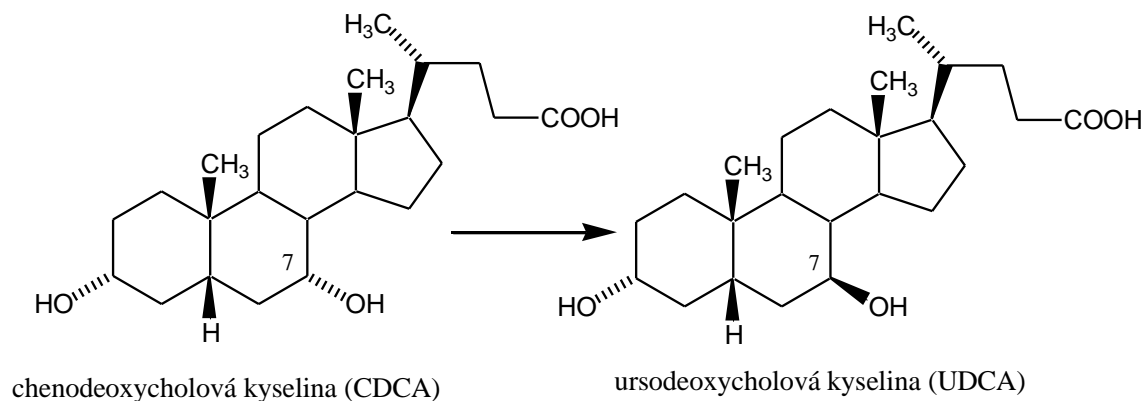
Dalšími hydrolytickými reakcemi jsou **hydrolýza amidů a dehalogenace**.

3.1.2.1.4. Chirální inverze xenobiotika

V roce 1976 byl popsán unikátní biotransformační proces, **chirální inverze** (-)-enantiomeru 2-(9*H*-fluoren-2-yl)propanové kyseliny (generický název cicloprofen) na její (+)-enantiomer [10]. Tento biotransformační proces byl zaznamenán u potkanů a opic, u potkanů probíhal rychleji. Po podání jednotlivé orální dávky 50 mg (-)-enantiomeru cicloprofenu na kg váhy bylo v potkaní plasmě nalezeno postupně 20 % (+)-enantiomeru (5 hodin po podání), 50 % (po 22 hodinách) a dokonce 79 % (+)-enantiomeru (po 48 hodinách) po podání (-)-enantiomeru).

Obr. 1: Chemická struktura R i S enantiomerů cicloprofenu

Také u látek, které mají ve své molekule větší počet asymetrických uhlíků, byla zaznamenána chirální inverze, případně konverze. Například kyselina chenodeoxycholová (3α , 7α -dihydroxy- 5β -cholan-24-ová kyselina, CDCA) se mění v malém množství u člověka na svůj 7β -epimer, kyselinu ursodeoxycholovou (3α , 7β -dihydroxy- 5β -cholan-24-ová kyselina, UDCA) [15].

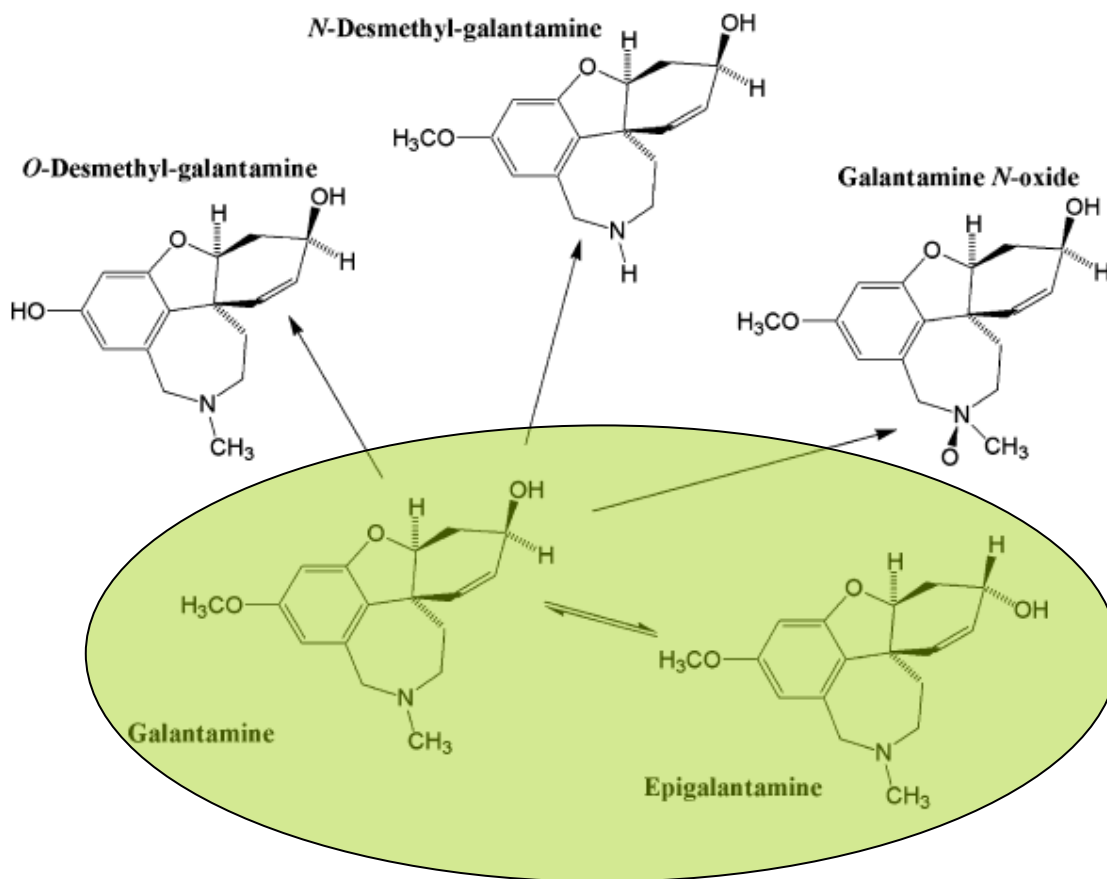
Obr. 2: Chemické struktury chenodeoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny

Posledním příkladem je alkaloid galantamin izolovaný z cibulí sněženky *Galanthus woronowi*, a později z rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. Galantamin se používá jako reverzibilní selektivní inhibitor acetylcholinesterasy a alosterický modulátor nikotinových acetylcholinových receptorů při léčbě Alzheimerovy choroby.

V savčím organismu je jedním z hlavních metabolitů epigalantamin [16], který vzniká enzymaticky výše zmíněnou chirální inverzí/konverzí.

Příklady dalších léčiv, které podléhají chirální inverzi, uvádí přehledný článek [17].

Obr. 3: Přehled biotransformace galantaminu v savčím organismu



3.1.2.2. Druhá fáze biotransformace xenobiotika

Druhá fáze biotransformace xenobiotika je konečným procesem přeměny léčiva v organismu. Při konjugaci dochází většinou k biodeaktivaci léčiva (xenobiotika) konjugací s některou tělu vlastní molekulou. Produkt konjugace (konjugát) má většinou zcela jiné vlastnosti než mateřské léčivo, zejména se odlišuje polaritou. Konjugačním reakcím podléhají jak samotná léčiva (pokud mají vhodnou funkční skupinu) tak i produkty 1. fáze biotransformace. Během 1. fáze biotransformace dojde k odkrytí nebo vytvoření skupiny, která teprve může podléhat konjugaci.

Jedna z nejčastějších cest 2. fáze biotransformace je **glukuronidace**, které se mohou účastnit látky s volnou skupinou obsahující kyslík (alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny), dusík (primární a sekundární aminy, amidy) či síru (thioly). Byly nalezeny i glukuronidy s vazbou C-C. Produkty glukuronidace, β -glukuronidy, jsou velmi dobře rozpustné ve vodě, proto se vylučují močí. Pro svou velkou molekulovou hmotnost se také výrazně exkretují žlučí. Ve střevě pak dochází vlivem bakteriálních glukuronidas

k rozštěpení glukuronidové vazby a opětovnému vstřebání léčiva (xenobiotika) či jeho metabolitů 1. fáze. Může tak docházet k prodloužení účinku v důsledku enterohepatální cirkulace (viz výše).

Druhou výraznou konjugační cestou, která velice často doprovází glukuronidaci, je **sulfátová konjugace**; vazba sulfátu přes kyslík (*O*-sulfáty) či dusík (*N*-sulfáty, neboli sulfamáty). Produkty s vazbou přes atom síry (*S*-sulfáty) nebyly dosud zaznamenány.

Další cestou je vznik merkapturové kyseliny z glutathionu. Tato cesta je též někdy nazývána **cysteinová konjugace**, protože dochází k navázání cysteinu. Pozorována byla u halogenovaných alkyl- a aralkyl- sloučenin, nenasycených alkenů, aromatických uhlovodíků (cestou přes epoxid) a *N*-aromatických sloučenin. Většina léčiv nepodléhá tomuto typu konjugace, více je tato reakce pozorována při expozici průmyslovými **xenobiotiky** (např. u pracovníků v chemickém průmyslu).

Methylace a **acylace** jsou jediné dvě reakce 2. fáze biotransformace, které vedou k mírnému zvýšení lipofility, na druhé straně však tyto reakce blokuji dráždivé funkční skupiny (-SH, -NH₂) a mají tedy detoxikační význam.

Methylace je reakce zprostředkovaná *S*-adenosyl methioninem. *N*-acetylderiváty vznikají **acetylací** aminoskupin jako jsou aniliny, sulfonamidy (na N⁴), hydrazidy nebo aminoskupiny v alicyklickém řetězci. Konjugace s glycinem (kyselina benzoová → kyselina hippurová), ornithinem (plazi a ptáci) a glutaminem (člověk, šimpanz, někteří další primáti) označujeme jako **peptidové**. Existuje celá řada dalších konjugačních reakcí, které se uplatňují buď druhově specificky, nebo byly zaznamenány jen u konkrétních jednotlivých léčiv, ale není cílem této práce seznámit se dopodrobna s každou biotransformační cestou.

3.1.3. Metody studia osudu xenobiotika v organismu

3.1.3.1. Odhad způsobů biotransformace xenobiotika a syntéza standardů metabolitů 1. fáze metabolismu

Se znalostí předchozích kapitol o biotransformaci se dají odhadnout možné cesty biotransformace. Je důležité mít na zřeteli, že při přeměně xenobiotika se může uplatňovat i několik výše popsaných cest metabolismu. Při syntéze standardů pravděpodobných metabolitů se využívají některé jednoduché a pokud možno jednoznačně probíhající reakce modifikující strukturu parentního léčiva (*N*-dealkylace, *O*-dealkylace, *N*-oxidace, hydrolýza, karbonylredukce) a vzájemné kombinace těchto

reakcí. Chceme-li však například získat arylhydroxyderivát parentní látky s hydroxylem v určité konkrétní poloze na aromatické části molekuly, musíme syntetizovat celou strukturu takového metabolitu *de novo*, tedy z vhodně modifikovaných prekursorů podobným postupem, jakým bylo syntetizováno léčivo. Taková syntéza může být několikastupňová a tedy značně náročná. Proto se často využívá izolace metabolitu z biomatrice, ve které byl takový metabolit vytvořen z parentního léčiva enzymatickou cestou (inkubace s izolovanými hepatocyty, produkce metabolitu izolovanými perfundovanými játry apod.). Požadovaný metabolit se ze směsi izoluje například preparativní TLC nebo semipreparativní HPLC pokud známe podmínky separace podobné struktury. Separované metabolity je možné po purifikaci podrobit strukturální analýze pomocí NMR nebo MS.

Pravidelně se kombinují všechny výše popsání principy.

3.1.3.2. Dekonjugační experimenty a jejich význam pro identifikaci a stanovení metabolitů 2. fáze biotransformace xenobiotika

Jak bylo řečeno výše metabolity 2. fáze biotransformace jsou vysoce polární látky. Jejich separace na reverzních fázích HPLC je díky tomu velice složitá. Velkou část jejich molekuly tvoří endogenní komponenta (např. kyselina glukuronová), která významně **ovlivňuje jejich polaritu**. Dnes se pro analýzu konjugátů často používají HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) kolony, které jsou schopné separovat v poměrně krátkém chromatografickém běhu parentní látku i její konjugáty (morfin, morfin-6-glukuronid, morfin-3-glukuronid) [18].

Finančně i přístrojově méně náročnou cestou je dvojitá analýza téhož vzorku. Nejprve analyzujeme nemodifikovaný vzorek, ve kterém očekáváme metabolity 2. fáze, tedy konjugáty. V druhé analýze podrobíme separaci vzorek inkubovaný s vybraným enzymem štěpícím vazbu vzniklou v 2. fázi biotransformace. Nárůst píků metabolitů 1. fáze biotransformace v druhé analýze ukazuje na prekurzury, z nichž konjugáty vznikly. Druh použitého enzymu odhaluje, kterou reakci konjugát vznikl. Mnohé z enzymů jsou však málo specifické a dokáží štěpit několik druhů vazeb vzniklých konjugací (účinek β -glukuronidasy a arylsulfatasy z *Helix pomatia* je prakticky identický na *O*-glukuronidy léčiv).

Strukturu metabolitů 2. fáze je možné řešit pomocí hmotnostní spektrometrie, ale pro prvotní identifikaci konjugátů výše zmíněná metoda postačí.

3.1.3.3. Odběr a úprava vzorku biomatrice, způsoby extrakce analytů z biomatrice, derivatizační reakce

Ze živého organismu lze odebrat vzorek krve, moče, trusu, synoviální tekutiny, mozkomíšního moku, slin, potu a vlasů. Vzorek by měl být reprezentativní. Následnými operacemi se vzorkem by nemělo dojít k narušení nebo zkrácení analytické informace. Pokud se jedná o **krev**, odebíráme venózní krev, z které můžeme získat sérum, plazmu nebo můžeme analyzovat plnou krev. Sérum se z krve připraví volnou sedimentací krevních elementů bez přítomnosti antikoagulačních látek, zatímco plazma se získá odstředěním po přidavku antikoagulačních látek (heparin, Na₃EDTA, lithné soli, citráty). Při odběru krve je tedy nutné vědět, zda budeme později analyzovat plazmu (přidáme antikoagulační látky) nebo sérum. Rozdíl obou typů vzorků z analytického hlediska je v zastoupení bílkovin, jichž sérum obsahuje výrazně méně, protože většina je sorbována v koagulačním koláči.

Moč je získávána neinvazivní cestou, proto se jí při analýzách v medicíně dává přednost (pokud to lze). Její odběr je spojen s několika riziky. Reprezentativnosti vzorků moče, lze dosáhnout pouze analýzou vzorku získaného z odběru za určitou časovou jednotku (většinou denní sběr), kdy je brán zřetel na celkové množství moče. Pokud se odebírá moč v jednom vzorku, může být získaná informace znehodnocena množstvím získané moče – při nadměrném příjmu tekutin dojde k tvorbě většího množství moče, a tím naředění vzorku. Odběry vzorků moče u lidí je možné svěřit do kompetence zkoumaného objektu, nebo u pacientů inkontinentních zavést katetr do močového měchýře. Při odběru vzorků moče pokusných zvířat, lze těmto zavést katetr stejně jako lidským objektům, ale je nutné v tomto případě zvíře narkotizovat (vnesejí dalšího xenobiotika), protože v bdělém stavu by se snažilo katetru zbavit. Druhou možností získání moče od pokusného zvířete je jeho umístění v metabolické kleci. Zvíře je umístěné na síťce, kterou propadává trus a protéká moč, trus a moč jsou následně samovolně separovány. V tomto případě není nutné zvíře uspat.

Odběr **trusu** může být u pokusného zvířete realizován v metabolické kleci nebo prostým odběrem z kotce, v kterém je zvíře umístěno. Stejně jako u moči je nutné realizovat sběr v časových intervalech. U lidských pokusných objektů se stejně jako u odběru moče můžeme spolehnout na spolupráci zkoumaných objektů.

Odběr **synoviální tekutiny** a **mozkomíšního moku** je invazivní. Z důvodů nebezpečí poškození míchy se provádí odběr mozkomíšního moku výlučně v terapeutických indikacích, a to lumbální punkcí.

Sliny, pot a vlasy jsou nereprezentativními biomatricemi. Výhodou jejich odběru je neinvazivnost. S výhodou se používají u screeningových vyšetření zejména na přítomnost zneužívaných látek. Vzorek vlasů lze analyzovat segmentálně. Vzhledem k tomu, že se jedná v podstatě o mrtvou tkáň je ve vlasech zachována informace o stavu organismu v době vzniku konkrétního segmentu.

Další úprava vzorku po odběru biomatrice spočívá v řadě operací: spikování vnitřním standardem, deproteinace, centrifugace, derivatizace (stability-increasing derivatization, lipophilicity-increasing derivatization, detection-oriented derivatization a jejich kombinace), extrakce (liquid-liquid extrakce (LLE), solid-phase extrakce (SPE), solid-phase mikroextrakce (SPME)), případně použití selektivního záchytu určitého typu molekul pomocí Molecularly Imprinted Polymers (MIPs). Podrobnosti k některým výše zmíněným operacím směřujícím ke zpracování biomatrice a vynětí analytů z ní jsou v kapitole 3.2.2.

3.1.3.4. Význam separačních technik při studiu biotransformace xenobiotik v organismu

Při biotransformaci xenobiotik vzniká řada metabolitů, které se velmi málo liší strukturálně od podaného xenobiotika. Separační techniky, které dokáží oddělit jednotlivé metabolity od parentní látky a balastů a zároveň stanovit množství jednotlivých analytů (tedy parentního léčiva i jeho metabolitů), jsou nezbytnou součástí výzbroje každého bioanalytika.

3.1.4. Vývoj benzo[c]fluorenových antineoplastik

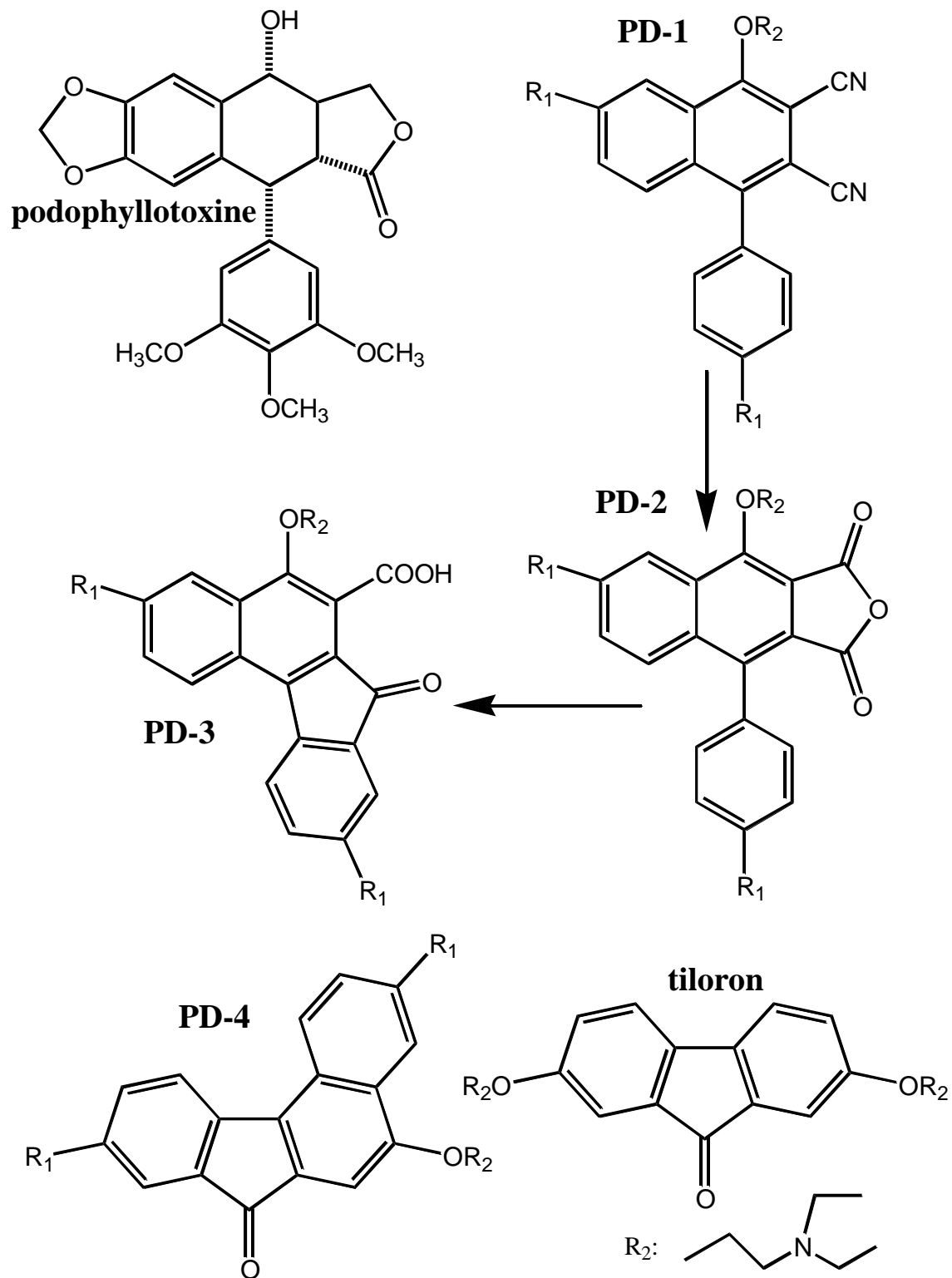
Koncem 70. a začátkem 80. let minulého století se Křepelka a spol. [19 - 22] zabývali syntézou a testováním antineoplastické aktivity řady derivátů vycházejících z 4-aryl-2,3-dikyano-1-naftolu (PD-1 na Obr. 4). Jak je zřejmé z Obr. 4, existuje značná strukturální příbuznost PD-1 a PD-2 s podophyllotoxinem, antimitotický účinným lignanem izolovaným z kořene noholistu štítnatého (*Podophyllum peltatum*, L.) [23, 24]. Hydrolýzou 4-aryl-2,3-dikyano-1-naftolu (PD-1) se tvořil anhydrid (PD-2) a intramolekulární Friedel-Craftsova acylací pak substituované benzo[c]fluoren-7-onové deriváty (PD-3, resp. jeho dekarboxylovaný produkt PD-4). Navázáním bazického

postranního řetězce do polohy 5 benzo[*c*]fluorenové struktury vznikly deriváty vykazující značnou strukturální podobnost s antivirotikem a antineoplastikem tiloronem [25] (srovnej Obr. 4 a Obr. 5).

Reprezentantem 1. generace bazických derivátů benzo[*c*]fluorenu s významným antineoplastickým efektem na řadu experimentálních nádorů se stal **benfluron**, hydrochlorid 5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-onu (viz Obr. 5) [21, 22, 26], který vykazoval zajímavé spektrum farmakodynamických vlastností v experimentech provedených *in vitro* a *in vivo* [27 - 30]. Osud benfluronu po jeho podání experimentálními zvířaty byl studován metodami tenkovrstvé chromatografie (TLC) [31 – 34, 36], vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [35 - 37], hmotnostní spektrometrie (MS) [38, 40] a nukleární magnetické resonance (NMR) [39] a porovnáním chromatografických a spektrálních vlastností nalezených metabolitů a jejich syntetizovaných standardů [40 - 42]. Během xenobiochemických studií byly identifikovány biotransformační produkty arylhydroxylace, *N*-desmethylace, *N*-oxidace, karbonyl redukce a také konjugáty s glukuronovou kyselinou [36, 37, 42 - 45]. Částečně byly rovněž charakterizovány enzymy podílející se na biotransformaci benfluronu [46]. Studie eliminace benfluronu a jeho metabolitů po orálním podání parentní látky potkanům ukázala, že hlavním a převažujícím metabolitem 1. fáze biotransformace benfluronu ve stolici a moči potkanů je 9-hydroxybenfluron (9-hydroxy-5-(2-dimethylamino)ethoxy-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on), který je ve 2. fázi biotransformace konjugován s glukuronovou kyselinou [36, 37, 45].

Vzhledem k výrazné tvorbě a zastoupení 9-hydroxybenfluronu v organismu byly testovány farmakodynamické účinky tohoto metabolitu benfluronu [27 – 30, 32]. V primárním *in vitro* screeningu na buňkách myši P388 leukemie i buňkách Ehrlichova ascitického karcinomu byla prokázána dvakrát vyšší účinnost 9-hydroxybenfluronu v porovnání s referenčním benfluronem [28]. Jantová a Horáková [30] dokonce předpokládají na základě svých výsledků, že benfluron je prodrug účinného 9-hydroxybenfluronu.

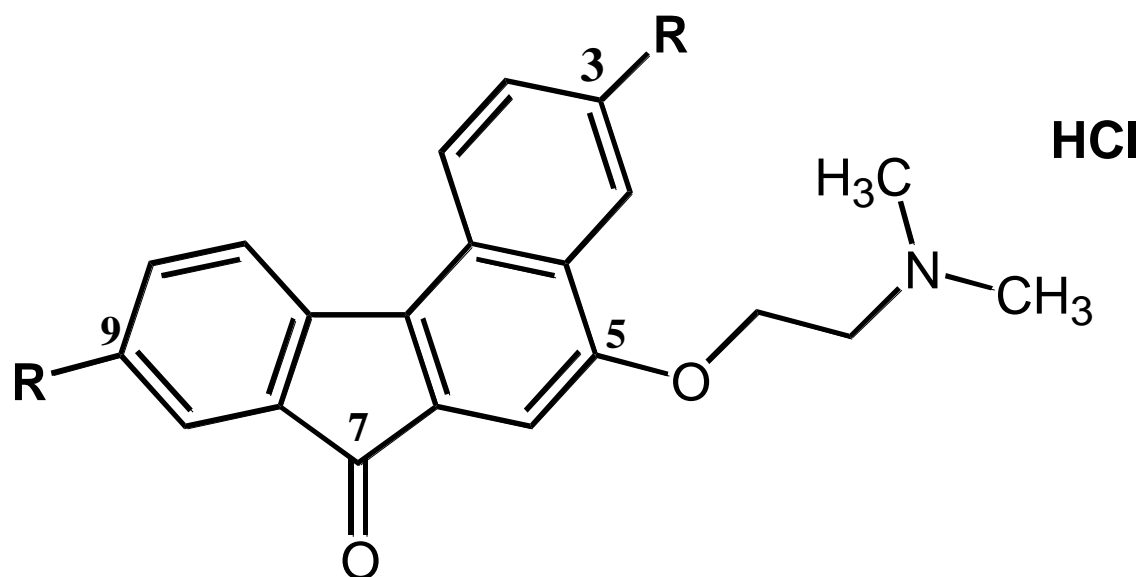
Obr. 4: Podophyllotoxin jako přírodní předloha 2,3-dicyano-4-aryl-1-naftolu (PD-1), jeho hydrolýza na anhydrid (PD-2) a intramolekulární Friedel-Craftsova acylace na substituovaný benzo[*c*]fluoren (PD-3). Příbuznost chemické struktury benzo[*c*]fluorenu (PD-4) s antineoplastikem a antivirotikem tiloronem.



Kromě různých možných mechanismů zásahu do metabolismu rakovinné buňky, které byly popsány ve výše zmíněné literatuře [27 - 30], byla zvažována rovněž možnost interkalačního efektu benfluronu a jeho derivátů. Některá antibiotika ze skupiny antracyklinů (daunorubicin, doxorubicin), aktinomycinů (daktomycin), chromomycinů (mitramycin) a bithiazolů (bleomycin) [47] mají schopnost vytvářet stálé komplexy s DNA interkalací planární části molekuly do dvojšroubovice DNA. Pozměňují stereochemickou konfiguraci DNA a stericky brání replikaci DNA blokadou polymerasového DNA-DNA komplexu.

Benfluron má, podobně jako výše zmíněná antibiotika, rozsáhlý planární benzo[*c*]fluorenový aromatický skelet, který by mohl být schopen interkalace.

Obr. 5: Chemická struktura benfluronu (R = -H) a dimefluronu (R = -OCH₃)



Benfluron však rovněž podléhá biotransformační redukci karbonylu v poloze 7 benzo[*c*]fluorenového skeletu. Změna sp² hybridizace uhlíku v poloze 7 na sp³ hybridizovaný uhlík vybočuje planární postavení benzenového a naftalenového jádra v benzo[*c*]fluorenovém seskupení redukovaného benfluronu a snižuje interkalační schopnosti takové molekuly. Redukce karbonylu benfluronu vede tedy ke ztrátě účinku, což bylo experimentálně potvrzeno [19].

Experimenty s lidskou jaterní mikrosomální a zejména cytosolovou frakcí a s lidskými hepatocyty byla zjištěna značná aktivita karbonylreduktas, která způsobuje, že tvorba neúčinného redukovaného benfluronu je preferenční biotransformační změnou

u člověka. Alternativní arenoxidace v benzo[*c*]fluorenovém seskupení, která vede k tvorbě 9-hydroxybenfluronu, je u člověka (na rozdíl od potkana) minoritní biotransformační cestou. Tím by se dal vysvětlit fakt, že klinické testování na lidech bohužel nepotvrdilo zajímavé farmakodynamické vlastnosti benfluronu zjištěné v *in vitro* experimentech a v preklinickém *in vivo* výzkumu. Navíc u benfluronu byly zjištěny některé další negativní farmakokinetické a distribuční vlastnosti. Proto byl další vývoj benfluronu zastaven.

Pozornost byla proto orientována na arylsubstituované deriváty benfluronu, které by (podobně jako 9-hydroxybenfluron) mohly vykazovat farmakodynamický efekt *in vivo* a mít výhodnější farmakokinetické vlastnosti [48].

Jedním z nově testovaných reprezentantů 2. generace benzo[*c*]fluorenových antineoplastik byl dimefluron, hydrochlorid 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylamino)ethoxy-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-onu (Obr. 5). Tato látka byla syntetizována Nobilisem na Ústavu experimentální biofarmacie AV ČR jako jedna z možných strukturálních modifikací benfluronu s předpokládaným odlišným způsobem distribuce, biotransformace a farmakokinetiky [48].

Dvě methoxy skupiny v poloze 3 a 9 benzo[*c*]fluorenového seskupení vytvářejí předpoklad k biotransformační *O*-desmethylaci, která by mohla být vhodnou alternativou k biotransformační redukci karbonylu, která, jak jsem se již zmínil, vede ke ztrátě pravděpodobného interkalačního efektu.

Dimefluron byl prozatím testován na králících a jeho potenciální chronické vlivy na srdeční funkci, biochemické, hematologické a ostatní fyziologické parametry byly porovnávány s vlivy jiného interkalačně působícího antineoplastika daunorubicinu [49 - 53]. Dále byly studovány některé aspekty metabolismu dimefluronu *in vitro* a *in vivo* [54, 55].

Předpokladem podrobnějších studií interakcí dimefluronu s organismem je vývoj a validace bioanalytické HPLC metody, kterou bude sledován osud tohoto potenciálního antineoplastika v organismu. To bylo úkolem této disertační práce.

3.2. Analytická část

Proces analýzy biologických vzorků můžeme rozdělit na dvě části - přípravu vzorku a vlastní instrumentální analýzu. Vzorky jsou často složité matrice, proto je třeba je většinou upravit, abychom zbytečně nezatěžovali instrumentální analytický systém a nezkracovali životnost jeho komponent. V analytické části se s výhodou používá chromatografických metod, které dovolují rozdělit směs analytů a jednotlivé analyty identifikovat a kvantifikovat v jednom kroku. Mezi chromatografickými metodami zastává čelní místo vysoceúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

3.2.1. Vysoceúčinná kapalinová chromatografie [56 - 59]

Objevitelem chromatografie byl ruský botanik M. S. Cvět, který publikoval první článek o této metodě již v roce 1903. Od něho také pochází název chromatografie, protože pracoval s barevnými látkami (z řeckého *chromos* – barevný). Už Cvět si však byl vědom, že je možné touto metodou separovat i látky nebarevné. Cvětem navržená metodika pracovala na základě adsorpčních mechanismů a byla využívána k separačním účelům. Jeho objevy však nebyly v době publikování doceněny. Až o několik desítek let později bylo navázáno na jeho práci. Velký rozvoj chromatografických metod byl zaznamenán po 2. světové válce. [60]

První dvě poválečná desetiletí byly rozvíjeny zejména chromatografické metody s planárním uspořádáním (papírová chromatografie [61], tenkovrstvá chromatografie [62]) a metody kolonové (plynová chromatografie, kapalinová chromatografie). Metody s různým uspořádáním využívali k separaci interakcí, jež nebyly často dostatečně objasněny. Za popis principu rozdělovací chromatografie dostali Martin a Synge v roce 1952 Nobelovu cenu [63].

V 70. a zvláště 80. letech 20. století došlo k bouřlivému vývoji ve vysoceúčinné kapalinové chromatografii. Tento vývoj byl zapříčiněn výrazným pokrokem v technických oborech, který zajistil výrobu vhodných komponent pro HPLC. V 90. letech 20. století se pak HPLC plně etablovala a stala se jednou z nejpoužívanějších instrumentálních analytických metod.

HPLC se tak stala moderní analytickou metodou, která se velmi rozšířila v analýze léčiv, což lze dokladovat na množství publikací, v nichž je této metody využito a řadě periodických odborných setkání na toto téma. Jako ostatní chromatografické metody je

založena na dělení částí vzorku mezi stacionární a mobilní fázi, přičemž mobilní fázi je kapalina, která prochází stacionární fází pod tlakem.

Vzorek se nejprve rozdělí na chromatografické koloně do koncentračních zón jednotlivých komponent, které pak postupně procházejí detekční celou. Metoda tak spojuje separační proces s analytickým hodnocením.

HPLC je vysoce selektivní, citlivá a přesná ve stanovení a umožňuje vyhodnotit všechny detekovatelné komponenty vzorku v jedné analýze.

Z celé řady instrumentálních analytických technik je HPLC vysoce univerzální. Oproti plynové chromatografii není limitována teplotní stálostí vzorku a oproti metodám elektroforetickým, kde je tok mobilní fáze závislý na stálosti elektrického pole, je vysoce robustní. Z pohledu univerzálnosti nalézá HPLC srovnání v technice MS-MS, kdy první MS slouží jako separátor různých molekulových iontů a další MS identifikuje a kvantifikuje vybrané molekulové ionty. Ve spojení HPLC-MS jsou znásobeny přednosti obou metod, tedy separační schopnosti HPLC se snoubí s detekční silou MS. (viz kapitola 3.2.1.6.3)

3.2.1.1. Princip HPLC

HPLC je analytická separační metoda založená na rozdílné distribuci látek mezi dvě fáze, z nichž mobilní fázi je kapalina, která prostupuje pevnou stacionární fází naplněnou v koloně. Velikost částic stacionární fáze a jejich kompaktní uložení v koloně nedovoluje volný průchod kapaliny a mobilní fáze tedy musí být v případě HPLC protlačována kolonou pod tlakem.

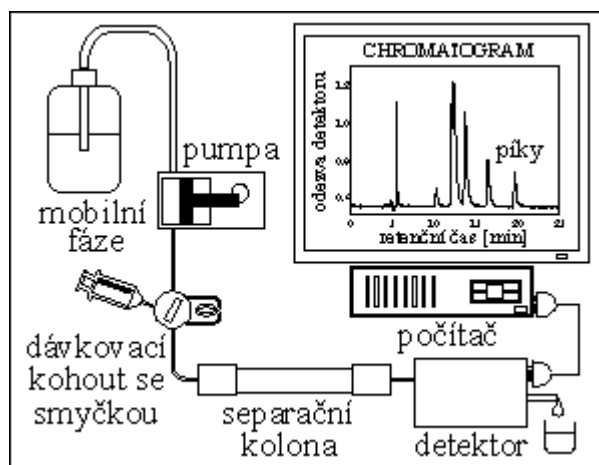
Interakce analytu s mobilní a stacionární fází v HPLC systému jsou založeny na mechanismech adsorpčních a rozdělovacích rovnováh, výměně iontů, vytěsňování nebo stereochemických interakcích [64]. Dělení na většině stacionárních fází je dnes popisováno jako adsorpčně-rozdělovací chromatografie. Většinou se tedy při separaci uplatňuje několik výše zmíněných dějů.

V koloně dochází k dynamickému ustalování rovnováhy. Látky, které mají vyšší afinitu k stacionární fázi jsou zpoždovány a opouštějí kolonu později, než látky s nižší afinitou k stacionární fázi.

Chromatograf je v principu složen z těchto částí (viz Obr. 6):

- zásobníky mobilní fáze
- čerpadlo (pumpa)
- prostor k dávkování vzorku
- separační kolona
- detektor (popř. detektory)
- vyhodnocovací (a řídicí) zařízení

Obr. 6: Základní schéma kapalinového chromatografu [58]



3.2.1.2. Čerpadla

Čerpadla zajišťují plynulý tok mobilní fáze systémem. Části čerpadel přicházející do styku s mobilní fází musí být chemicky odolné vůči komponentám mobilní fáze. Pro reverzní fáze, kde je mobilní fáze hydrofilní, se jedná o jednoduchý požadavek. U normálních fází nastávají problémy s plastovými částmi systému, které musí být odolné vůči organickým rozpouštědlům, nebo lépe nahrazeny prvky z nerezové oceli či jiné chemicky odolné slitiny.

Důležitý požadavek, který se již přímo dotýká analýzy, je zajištění stálosti tlaků. Čerpadla musí být konstruována tak, aby výkyvy tlaků (a tedy i průtoku) byly minimalizovány. Každý výrobce dodávající chromatografické systémy řeší tento problém různě, většinou využívají dvou pístových čerpadel se vzájemně komplementárním rytmem sání a komprese. Pokles tlaku v horní nebo dolní úvratí jednoho pístu je dorovnáván počítačově řízeným pohybem druhého pístu. Čerpadla můžeme rozdělit na jednoduchá, binární a kvaternární. Tento systém dělení lze užít tam, kde každá ze složek mobilní fáze má svůj vlastní čerpací systém (např. Agilent) a

znázorňuje kolik čerpacích jednotek obsahuje a z kolika nádob tedy může nasávat mobilní fázi. K mísení mobilní fáze pak dochází až za systémem čerpadel. Jiní výrobci mohou sání z více zdrojů vyřešit systémem ventilů před čerpací jednotkou, a potom k mísení dochází před čerpadlem, které je jediné (např. Waters, Thermo Electron).

3.2.1.3. Dávkovací zařízení

Od jednoduchého vstřikování do mobilní fáze, kdy kvůli vysokým tlakům musel být vždy před nástřikem průtok zastaven, a pak opět spuštěn, se přešlo k využití vícecestného ventilu (též označovaný jako Rheodyne, podle významného výrobce) se smyčkou o konstantním objemu.

V dnešní době se používají tzv. autosamplery, které dovolují programovat nástřiky jednotlivých vzorků za sebou tak, že analytik nemusí být přítomen při každém jednotlivém dávkování. Tato zařízení šetří čas a odstraňují nutnost přítomnosti operátora v noci a dnech pracovního volna. Většina autosamplerů využívá systém automaticky ovládaných vícecestných ventilů. Liší se v počtu pozic, do kterých lze vialky se vzorky uložit, v objemu vzorku, který lze do systému injikovat a možnosti jeho změny bez fyzického zásahu do systému. Moderní autosamplery umožňují ohřev (pro viskozní vzorky), chlazení (pro tepelně nestále vzorky) a případně programovatelné automatické manipulace se vzorky (automatická ředění, přepipetování, derivatizace, třepání apod.).

3.2.1.4. Stacionární fáze využívané ve vysoce účinné kapalinové chromatografii [65 - 67]

Stacionární fázi představuje chromatografická kolona naplněná sorbentem. Výběr kolony je hlavním determinujícím faktorem úspěšné chromatografické separace. V dnešní době jsou chromatografické kolony komerčně vyráběny a dodávány v deklarované kvalitě.

Kolony můžeme dělit podle řady různých hledisek. Podle materiálu obalu, délky, vnitřního průměru, velikosti a chemické podstaty částic, architektury kolony a podle povahy zakotvené fáze.

Délka kolony determinuje přímo úměrně i délku analýzy. Vnitřní průměr kolony ovlivňuje množství aplikovaného vzorku a rychlost průtoku mobilní fáze (viz Obr. 7). Nižší průtoky mobilní fáze vedou k úspornějším analýzám, ale zatím nebyla uspokojivě

vyřešena opakovatelnost takovýchto systémů, protože například změna relativní směrodatné odchylky je šestinásobně větší při snížení průměru na polovinu.

Obr. 7: Vliv vnitřního průměru na množství vzorku a jedno z navržených nomenklaturních rozdělení (převzato z [68])

Table I: Nomenclature for HPLC columns in cylindrical formats		
Description	Dimension (velocity 1–10 mm/s)	Approx. typical flow-rate
Open tubular liquid chromatography	< 25 μm i.d.	< 25 nL/min
Nanobore column HPLC	25 μm \leq i.d. \leq 100 μm	25–4000 nL/min
Capillary column HPLC	100 μm < i.d. < 1 mm	0.4–200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Microbore column HPLC	1 mm \leq i.d. \leq 2.1 mm	50–1000 $\mu\text{L}/\text{min}$
Narrow (small)-bore column HPLC	2.1 mm < i.d. < 4 mm	0.3–3.0 mL/min
Normal-bore column HPLC	4 mm \leq i.d. \leq 5 mm	1.0–10.0 mL/min
Semipreparative column HPLC	5 mm < i.d. \leq 10 mm	5.0–40 mL/min
Preparative column HPLC	i.d. > 10 mm	> 20 mL/min

Podle **architektury** můžeme kolony rozdělit na dva druhy – částicové a monolitické. Dříve se využívaly jen kolony částicové, kdy je sorbent v trubici uložen ve formě částic o definovaném středním průměru. U částicových kolon dochází k omezení horní hranice průtokových rychlostí zvýšením zpětného tlaku systému [69, 70]. Novým typem architektury je kolona monolitická. Jedná se v podstatě o inverzi částicových kolon. Tam, kde je u částicové kolony volný prostor, je u monolitické sorbent. Tam, kde byl u částicové kolony sorbent, je u monolitické prázdný prostor. Jedná se o polymerní sorbent válcovitého tvaru a houbovitého charakteru, který je vysrážen tak, aby tvořil dutiny s velkým povrchem. Buď dochází k vysrážení přímo ve válci kolony (kapilární kolony s malým vnitřním průměrem), nebo je stacionární fáze *ex post* zalita do plastového chemicky inertního obalu, který přilne k povrchu válce sorbentu a zamezí obtékání mezi stěnou trubice kolony a sorbentem. Při srážení přímo v kapiláře lze využít UV záření jako iniciátoru procesu polymerace. Postupným zakrýváním a odkrýváním částí kapiláry docílíme kolony se segmenty různých polymerů. Takto můžeme vytvářet kolony šité na míru (tailor made) určitému analytu nebo směsi analytů. [69]

Ačkoli monolitické kolony jsou novým přístupem k stavbě chromatografické kolony, částicové kolony zdaleka neztratily svůj význam. Dnes se v analytické chromatografii používají kolony plněné sorbentem o **velikosti částic** výhradně pod 5 μm . Vyuvíjejí se

sorbenty o menších rozměrech (okolo 1 μm), které umožňují lepší separaci, ale nebezpečně zvyšují zpětný tlak. Technicky se dnes řeší hlavně sestavení systému s minimálním mrtvým objemem a spojení komponent odolávající vysokým tlakům. Jedním z příkladů takového systému je Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) [71, 72].

Dalším hlediskem, podle kterého můžeme stacionární fáze dělit, je **chemická podstata matrice**. Stacionární fáze mohou být tvořeny z různých materiálů. Nejčastěji se používají silikagel, oxid hlinitý, aktivní uhlí, oxid zirkoničitý a polymethakrylát (či jiné polymerní sloučeniny). Nejpoužívanějším sorbentem je silikagel, jehož vývoj se za uplynulých dvacet let nezastavil. Od počátku se používaly silikagely mleté. Homogenost stacionární fáze byla zajištěna síťováním. Dnešní moderní silikagely se vyrábějí srážením z roztoku. Tento způsob umožňuje získat částice s užším rozptylem velikosti, s lépe definovaným tvarem a v neposlední řadě i částice obsahující vnesené strukturní prvky jakou jsou například ethylenové můstky. Ethylenové můstky zajišťují vyšší stabilitu částic proti vysokému tlaku a jsou využívány zejména u kolon pro výše zmíněnou UPLC [72]. Dále je možné ovlivňovat povrchové silanolové skupiny částic či obsah těžkých kovů, které, pokud jsou přítomny, mohou tvořit s analyty cheláty a komplikovat analýzu například výrazným chvostováním píků.

Z ostatních jmenovaných sorbentů se teší velkému zájmu zejména nové sorbenty z oxidu zirkoničitého. Jedná se o sorbenty odolné ve velkém rozmezí pH. Klasické silikagelové sorbenty jsou odolné v rozmezí hodnot pH 2 - 8. Pod hodnotou 2 se štěpí esterová vazba chemicky vázané fáze na sorbent, zatímco nad pH 8 dochází k rozpouštění silikagelových zrn. Sorbenty na bázi oxidu zirkoničitého jsou odolné v rozmezí pH 1 - 14. Stejně tak odolávají i vysokým teplotám a to až do 200 °C. Tyto sorbenty tak přibližují svými vlastnostmi HPLC k plynové chromatografii, kde se často využívá tepelné gradientové eluce. Zda se kolony se sorbentem z oxidu zirkoničitého etablojí mezi běžně užívanými kolony, je otázkou pro další desetiletí. Přinášejí však nové možnosti do HPLC analýz.

Sorbenty na bázi polymerů jsou ideálně hydrofobní bez další povrchové úpravy. Jsou vhodné pro přípravu kapilárních monolitových kolon. Polymery vznikají až *in situ* v koloně působením iniciátoru, kterým může být nejvhodněji UV záření. Tím lze vytvořit kolony s pásy sorbentů různých vlastností, jak již bylo popsáno výše.

Částice sorbentu mohou zůstat v původním stavu, ale častěji se přistupuje k jejich pokrytí **chemicky vázanou fází**. Pak můžeme o částicích prohlásit, že jsou vlastně jen

nosičem, pro chemicky ukotvenou fázi. Silikagel samotný má vysoce hydrofilní povahu, proto se s ním používají lipofilní mobilní fáze (hexan, toluen, benzen). Prvními chemicky vázanými fázemi byly řetězce lineárních uhlovodíků o délce 18 atomů uhlíku (C18). Takto získána stacionární fáze má opačné vlastnosti než původní silikagel. Je silně hydrofobní a vede k používání hydrofilních mobilních fází (voda, methanol, acetonitril). Tento způsob analýzy rozšířil spektrum analyzovatelných látek směrem k hydrofilním sloučeninám, které jsou běžnou součástí živých organismů, a jež se ireverzibilně zadržovaly na silikagelu. Kromě výše uvedených výhod přináší i výhody ekologické a ekonomické: používané chemikálie jsou lépe biodegradovatelné, méně toxické, jak pro analytika tak v dopadu na životní prostředí, a jejich výroba v deklarované kvalitě je mnohem levnější. Po zkušenostech s C18 vázanou fází byly zkoušeny další řetězce o různé délce jako C8, C12, C4, C2, ale i C1. Komerčně nejdostupnější a nejrozšířenější jsou vázané řetězce C18 a C8. Vývoj vedl k zavádění dalších struktur na povrch částic sorbentu. Jednalo se zejména o kyano skupinu (CN), amino skupinu (NH₂), ale i další struktury, které rozšířily spektrum separovatelných sloučenin. V jedné z našich publikací je používána struktura pentafluorophenylpropyl, která má podle výrobce vyšší selektivitu než C18, zlepšuje tvar píků, látky se na ní zadržují déle. Podle výrobce se vlastnosti kolony mění v závislosti na složení mobilní fáze – se zvyšujícím se množstvím acetonitrilu dochází ke konverzi z módu reverzních fází do módu normálních fází. [65]

S chemicky vázanou stacionární fází souvisejí někdy určité separační problémy. Ze sterických důvodů nemůže být na každý silanolový zbytek navázán řetězec stacionární fáze. Některé silanolové zbytky tedy zůstávají volné a mohou interagovat s analytem a vést k rušení separace. Tento problém se týká zejména analýz bazických látek, které pak tzv. chvostují. Byla vyvinuta řada řešení, která vedou k zabránění těchto interakcí (například endcapping silanolů nebo jejich dynamická blokáda nonylaminem [73] nebo triethylaminem přidaným do mobilní fáze). Silanolové zbytky mohou být zakryty kratšími řetězci (C1, C3 – viz již zmíněný endcapping), které nejsou tak stericky mohutné. Samotná fáze se může upravit tak, že na bazi řetězce je vložena mohutnější struktura, která zabrání pronikání molekul analytu až k povrchu částice (např. dimethylethyl). Pokrytí částice vrstvou polymeru s reaktivními místy pro vložení řetězců stacionární fáze je další z možností zakrytí volných silanolových skupin. Tento způsob se běžně používá u sorbentů na bázi oxidu zirkoničitého, jenž se pro změnu

chová jako Lewisova kyselina, což stejně jako silanolové skupiny vede k narušení separace.

Kromě normálních a reverzních fází se objevil nový fenomén fází **HILIC** (Hydrophilic interaction liquid chromatography – kapalinová chromatografie s hydrofilními interakcemi). Při použití gradientu mobilní fáze na reverzních fázích se s časem analýzy zvyšuje obsah více polární části mobilní fáze. Stacionární fáze přitom obsahuje, buď klasické hydrofobní řetězce nebo řetězce nesoucí ve své struktuře stálý náboj. Tento druh analýz se používá pro vzorky s vysoce hydrofilními komponenty, které se málo zdržují na reverzních fázích. Velice vhodný je například k separaci směsí peptidů nebo již zmíněné separaci léčiv a jejich metabolitů 2. fáze biotransformace [75].

Dříve byla nejčastější stacionární fází využívanou v analýze léčiv částicová silikagelová kolona s vázaným C18 řetězcem. S rozvojem technologií a rozšířením portfolia dostupných fází dochází k diferenciaci jejich užití a zejména v bioanalytice se často používá nových stacionárních fází. Další vývoj zřejmě povede k miniaturizaci a k vývoji kolon k jednomu užití tzv. tailor made (šitých na míru).

Samostatnou kapitolou jsou **chirální stacionární fáze**. Jejich využití, vyplývá již z názvu, spočívá v separaci a stanovení enantiomerů. Conterganová (thalidomidová) aféra v 60. letech minulého století upozornila na nezbytnost prověřovat biologické účinky jednotlivých enantiomerů a s tím souvisela i potřeba nalézt a využívat analytické metody umožňující kontrolu zastoupení jednotlivých enantiomerů v lékových substancích. 90. léta 20. století otevřela otázku enantiospecificity biologicky aktivních látek, ať už se jedná o účinnost nebo specifitu při biotransformaci. Trend vede k nacházení účinných enantiomerů mezi substancemi a jejich využívání v terapii. Příkladem jsou enantiospecifická antihistaminika levocetirizin (Xyzal[®]) a desloratadin (Aerius[®]) uvedená na trh. Zvýšení požadavků na analýzu chirálních látek vedlo k vývoji chirálních stacionárních fází. Na silikagelové sorbenty se začaly vázat chirální látky (vinkristin, vinblastin) nebo polymery (upravené dextriny, celulóza), které obsahují chirální centra nebo dutiny určitého tvaru. Teorie se zmiňuje o trojbodových prostorových interakcích, ale relevantní důkaz, který by vedl k logickému výběru vhodné chirální fáze nebyl podán. Většina chirálních fází je testována pro některou skupinu analytů. Jak jsme však dokázali na základě vlastních experimentů, i drobná změna struktury analytu vede k diametrálně odlišné separaci (viz 6.1.2).

3.2.1.5. Charakteristika a požadavky kladené na mobilní fáze

Vzhledem k tomu, že mobilní fáze protéká různými částmi chromatografického systému, musí splňovat celou řadu požadavků, aby byla kompatibilní s příslušnými částmi chromatografu. Protože se jedná o analýzu za vysokého tlaku, musí být kapalina mobilní fáze odplyněna. Pokud by nebyla zbavena plynných komponent, mohlo by dojít za kolonou po snížení tlaku k tvorbě plynových bublin, což by narušilo linearitu toku mobilní fáze systémem a způsobilo rušivé ohyby paprsků v optickém detektoru. K odplynění dochází v degasseru na základě fyzikálních principů. Degasser je zapojen mezi nádoby na mobilní fázi a čerpadlo. Jedná se o trubici (trubice pro více zásobníků), která je propustná pro plyny, ale nikoli pro kapaliny. Tato trubice prochází evakuovaným prostorem, kde dojde na základě rozdílu tlaků k přechodu plynu z kapaliny přes stěnu trubice. Tak dochází k odplynění mobilní fáze těsně před HPLC systémem. Dřívější způsoby odplynění pomocí vývěvy, ultrazvuku nebo probublávání heliem měly celou řadu nevýhod. Odplynění vývěvou a ultrazvukem bylo zapojeno off-line, přičemž vývěvou nebylo možné odplyňovat mobilní fázi obsahující současně vodnou a organickou složku, protože docházelo k odsávání molekul těžavější organické složky, a tím k narušení poměru komponent mobilní fáze. Probublávání heliem, které se nerozpouští v kapalinách a strhává tak plynné částice s sebou z kapaliny, je finančně nákladné.

Z pohledu čistoty musí být složky mobilní fáze vysoce čisté chemikálie, které se běžně označují jako *čisté pro HPLC (purity for HPLC, HPLC grade)*. Nečistoty mohou narušit separaci buď tím, že budou reagovat s analytem (např. vytvářet cheláty nebo dokonce vést ke srážení analytu).

Mobilní fáze musí být kompatibilní se vzorkem. Musíme vybírat mobilní fáze, ve kterých se vzorek plně rozpouští. Nejlepším řešením je vzorek injikovat rozpuštěný v mobilní fázi. Pokud je vzorek injikován v jiném rozpouštědle, může (ale nemusí) dojít k narušení separace (např. k takzvanému frontování píků).

Složení mobilní fáze a jeho omezení ve vztahu ke stacionární fázi bylo diskutováno výše (viz 3.2.1.4). Při módu normálních fází se používají nepolární rozpouštědla na polární stacionární fázi. V módu reverzních fází se používají vodné tlumivé roztoky a polární rozpouštědla (methanol, acetonitril) protékající nepolární stacionární fází. Někdy je výhodné, když se do mobilní fáze přimísí aditivum pro zlepšení tvaru píku (nejčastěji 2-propanol, etanol, nonylamin). pH tlumivých roztoků na silikagelových

kolonách je omezeno horní i dolní hranici (viz 3.2.1.4). Někdy lze místo tlumivých roztoků použít k úpravě pH slabou kyselinu (mravenčí, octovou).

Pokud je celou dobu analýzy poměr složek mobilní fáze stejný, mluvíme o izokratické eluci. V případě, že se poměr složek mobilní fáze v čase mění, jedná se o gradientovou eluci. Přistupuje se k ní pro zrychlení analýzy. Někdy můžeme použít teplotní gradient (sorbent z oxidu zirkoničitého) nebo gradient rychlosti průtoku (monolitické kolony). Při gradientu změnou poměru složek mobilní fáze je třeba zvýšeně dbát na čistotu komponent – používají se chemikálie *pro gradientovou eluci (gradient grade)*.

Po opuštění kolony prochází mobilní fáze detektorem. Obecně lze říci, že nesmí poskytovat signál v detektoru, při použití UV-VIS detektoru tedy musí být opticky transparentní. Jednotlivé aspekty budou diskutovány níže u jednotlivých druhů detektorů.

Posledním aspektem je zacházení s mobilní fází po opuštění systému. Z ekologického i ekonomického hlediska je lepší, pokud je to možné, pracovat v módu reverzních fází a využívat ve vodě rozpustné složky mobilní fáze.

Dalšími vlastnostmi, které mohou mobilní fázi charakterizovat, jsou průtok a teplota. Opět jsou oba faktory závislé na zvolené stacionární fázi. Se vzrůstajícím průtokem vzrůstá i tlak v systému, který je determinován na horní hranici tlakovou odolností kolony, i celého systému spojuj kapilár případně detekčních cel. Teplota ovlivňuje separační schopnosti a viskozitu mobilní fáze, a tím zpětně i tlak. Závislost separační účinnosti chromatografické kolony na rychlosti průtoku mobilní fáze je popsána van Deemterovou rovnicí.

3.2.1.6. Detekce ve vysoceúčinné kapalinové chromatografii

Výběr detektoru při HPLC analýze ovlivňuje šíři detekovatelných látek i limity detekce. Šíře detekovatelných látek je závislá na druhu detektoru a principu, pomocí kterého jsou látky detekovány. Limity detekce jsou ovlivněny typem detektoru i jeho technickým provedením.

Jedním z prvních detektorů byl **refraktometrický detektor**, který měří změny lomu světla v detekční cele. Tento detektor byl a je univerzální z pohledu šíře detekovatelných látek. Každá látka obsažená v roztoku ovlivňuje lom světla, které roztokem prochází. Refraktometrický detektor má ovšem vysoké hodnoty detekčního limitu a je vysoce citlivý vůči změnám teploty mobilní fáze. Další nevýhodou tohoto druhu detektoru je, že reaguje i na změny ve složení mobilní fáze a nelze tedy využít

gradientovou eluci. V posledních letech došlo k renesanci detekčních technik založených na ohybu a rozptylu světla vývojem tzv. **Evaporating Light Scattering Detector** (ELSD). Ten měří míru ohybu světla na shlucích molekul analytu v proudu plynu. Mobilní fáze je nejprve zmlžena, odpařena a vzorek je veden jako „paprsek“ plynu do detekční cely. Tento způsob detekce dovoluje detekovat široké spektrum látek. Protože dochází k odstranění mobilní fáze, můžeme využívat i gradientové eluce, avšak mobilní fáze musí být těkavá stejně jako u hmotnostní detekce (viz 3.2.1.6.3). Nevýhodou tohoto způsobu detekce je jeho poměrně vysoká cena. Hmotnostní detektor nám v porovnání s ELSD poskytne mnohem více informací. [75]

Dalším typem detektorů je skupina **elektrochemických detektorů**. Ty jsou založeny na snímání redoxních změn analytů v protékající mobilní fázi. Zkoumaná látka by měla mít redoxní vlastnosti (měla by obsahovat elektrofor). Při záznamu elektrického proudu a napětí je vyžadováno, aby se analyzovaná látka redukovala nebo oxidovala. Dochází tedy k destrukci molekul analytu. Při tomto druhu detekce dále musí složení mobilní fáze obsahovat velké množství vodné složky. Stejně jako u refraktometrického detektoru je nežádoucí gradientová eluce. Je také vyžadována vysoká čistota složek mobilní fáze.

V dalších kapitolách budou popsány pouze detektory, které souvisí s předkládanou prací.

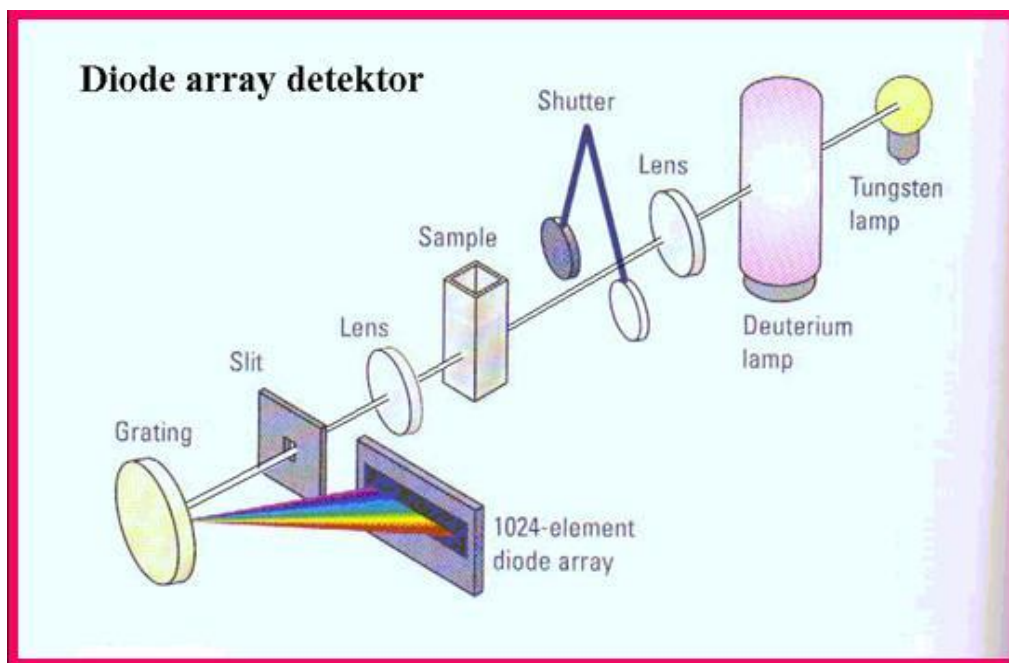
3.2.1.6.1. UV-VIS detektory

UV detektor je po refraktometrickém druhý nejuniverzálnější. Je založen na měření absorbance mobilní fáze v detekční cele. Látky, které lze takto detekovat musí absorbovat elektromagnetické záření v UV nebo VIS oblasti (musí obsahovat chromofor).

Podle Lambertova-Beerova zákona je závislost absorbance a koncentrace lineární jen pro monochromatické záření a vzhledem k logaritmické závislosti mezi absorbancí a intenzitou záření jen v určitém rozmezí hodnot absorbance. Rozmezí, kdy je vztah $A = f(c)$ lineární, je závislé na kvalitě a konstrukci každého jednotlivého spektrofotometru [76]. U starších typů UV spektrometrů Specord se udávala linearita do $A = 1,4$. Pro novější přístroje se tato hodnota neudává, nahrazuje se rozsahem měřených hodnot (až $A = 6$) a rozsahem správnosti (většinou do $A = 1$) [77].

V případech, že vzorek má vyšší absorpenci než spadá do rozsahu linearity, je vhodné ho naředit. Dalším omezením je možnost absorpce složek mobilní fáze, které mohou stejně jako analyzovaná látka obsahovat chromofor a omezí tak šíři spektra vlnových délek, které je možné využít pro detekci - tzv. cut-off efekt. UV-cut-off pro rozpouštědla používaná v HPLC-UV by měl být pod 200 nm.

Obr. 8: Photo-diode array detektor



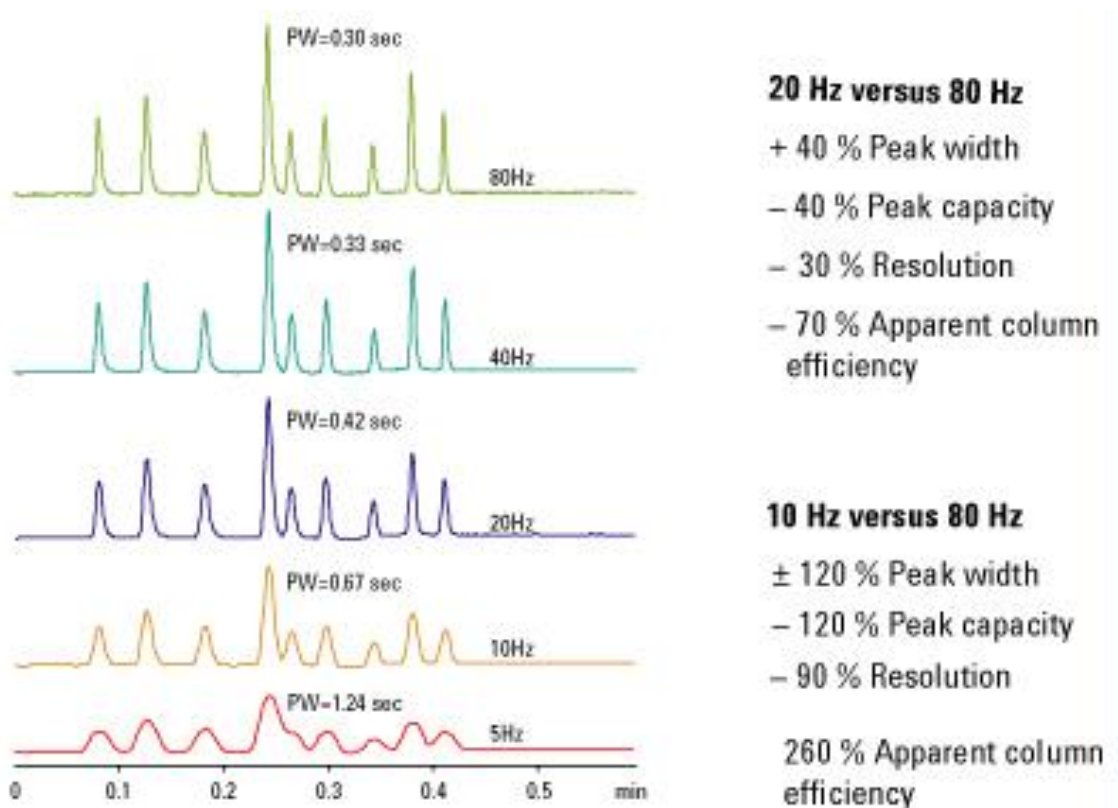
Legenda: Tungsten lamp a Deuterium lamp - zdroje polychromatického záření, Lens – čočka, Shutter – clona, Sample – vzorek, Slit - štěrbin, Grating - difrakční mřížka, 1024-element diode array - diodové pole.

UV detektory byly původně vyráběny jen pro jednu fixní vlnovou délku. Prvním pokrokem byla možnost měřit při více vlnových délkách, jejichž výběr koreloval z absorpčními maximy stanovovaných látek. Další etapou ve vývoji UV detektorů bylo zavedení **high-speed scanning** detektorů (rychle skenujících detektorů), které umožňovali proměření části nebo celého spektra, ovšem za určitou jasně stanovenou dobu. Rychlejší skenování omezuje přesnost odečtu vlnových délek. Pomalejší skenování může vést ke zhoršení vykreslení píků nebo k odečtu defektních spekter.

Nejmodernějším typem UV detektoru je **detektor s diodovým polem** (photodiode-array detektor, PDA), který umožňuje změřit celé spektrum v každém časovém okamžiku analýzy. K rozdělení polychromatického paprsku dochází až po průchodu květou se

vzorkem (viz Obr. 8). I v tomto případě dochází ke ztrátám informace v důsledku nedokonalé elektroniky, která omezuje rychlost sběru dat z diodového pole. U velmi rychlých analýz je proto důležité, aby rychlost sběru dat byla co možná nejrychlejší (viz Obr. 9). Pokud analyt nemá dostatečně absorbující chromofor v molekule, můžeme ho do molekuly vnést derivatizací vhodné reaktivní funkční skupiny analytu (-OH, -SH, -NH-, >C=O, -COOH...).

Obr. 9: Vliv rychlosti odečtu dat na tvar píků [78]



Legenda: Na uvedených chromatogramech je zaznamenán vliv snižující se rychlosti odečtu dat (od 80 Hz k 5 Hz) na tvar píku při 0,6 minutové analýze. V pravé části obrázku jsou vyjádřeny procentuální změny hodnot šířky píku (peak width), kapacity píku (peak capacity), rozlišení (resolution) a zdánlivé efektivity kolony (apparent column efficiency) pro vybrané případy 20 Hz a 10 Hz skenovací rychlosti vztaženo k hodnotám naměřeným při skenovací rychlosti 80 Hz.

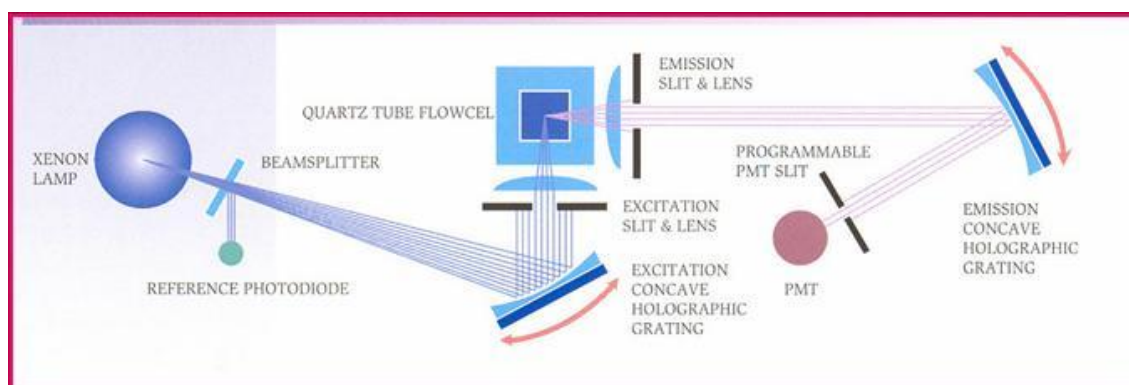
3.2.1.6.2. Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektor využívá schopnosti některých látek po předchozím vystavení elektromagnetickému záření emitovat kvalitativně jiné záření o nižší energii. Zatímco mnohé látky absorbují (což můžeme usoudit z jejich struktury), jen některé z nich

fluoreskují. Odhaduje se, že zhruba jen 10 % farmakologicky účinných substancí vykazuje vlastní fluorescenci. Predikovat schopnost fluorescence ze struktury nelze, i když se o to řada autorů pokoušela [79]. Základní podmínkou fluorescence je, aby molekula elektromagnetické záření absorbovala. Následně pak emituje záření s nižší energií.

Fluorescenční detektor je tedy omezen na látky, které mají vlastní schopnost fluoreskovat, nebo které lze derivatizací převést na fluoreskující analyty. Schéma fluorescenčního detektoru je znázorněno na Obr. 10. Setkáváme se zde s pojmy excitační a emisní spektrum. Excitační spektrum je měřeno při vybrané vlnové délce výstupního (emisního) monochromátoru a změnách vlnové délky na vstupním (excitačním) monochromátoru. Při měření emisního spektra je vstupní (excitační) monochromátor nastaven na vybranou vlnovou délku, zatímco výstupní (emisní) monochromátor skenuje zvolený interval elektromagnetického spektra. Ve většině případů se excitační spektrum shoduje s absorpčním spektrem, které měříme na UV spektrometru. Emisní spektra jsou oproti absorpčním spektrům jednodušší a často obsahují jedno maximum odpovídající vlnové délce o nižší energii než je energie excitační vlnové délky. Pro analýzy vybíráme nastavení excitační a emisní vlnové délky podle maxim v odpovídajících spektrech. [80]

Obr. 10: Schéma fluorimetrického detektoru [82]



Legenda: Xenon lamp – zdroj záření (xenonová lampa), Beamsplitter – rozdělovač paprsků, Reference photodiode – referenční dioda, Excitation concave holographic grating – vstupní monochromátor izolující záření o excitační vlnové délce, Quartz tube flowcell – detekční cela (v případě HPLC průtoková), Excitation (Emission) slit & lens – excitační (emisní) clona s čočkou, Emission concave holographic grating – výstupní monochromátor izolující záření o určité vlnové délce z emitovaného záření, Programmable PMT slit – programovatelná clona před měřicí diodou, PMT – měřicí dioda

Výhodou fluorescenčního detektoru je jeho schopnost zjednodušit chromatografický záznam. Při bioanalytických studiích se setkáváme, jak už bylo řečeno výše, s velice složitými vzorky, které nutně musí obsahovat části biomatrice. Celá řada komponent obsažených v biomatrici absorbuje v UV. Jedná se o hormony, aminokyseliny a jiné látky, které ve své molekule obsahují planární (sp^2 hybridizované) seskupení (a tedy i chromofor). Málomterá z těchto látek má však schopnost fluoreskovat. Pokud tedy zkoumané analyty fluoreskují je fluorescenční detektor ideální volbou. Při derivatizaci, která vede k fluoreskujícím produktům, dochází k dvojité selektivitě; nejdříve při specifické derivatizační reakci, která je závislá na přítomnosti reakčního místa v molekule a následně pak i výběrem selektivních vlnových délek z excitačního a emisního fluorescenčního spektra.

Významnou modifikací fluorescenční detekce je laserem indukovaná fluorescenční detekce (LIF detekce), která zvyšuje citlivost fluorescenční odezvy o dva až tři řády [81].

3.2.1.6.3. Využití hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC

Základním technickým předpokladem HPLC-MS analýz je používání organických pufrů (místo fosfátů se smí používat ammonium acetát/octová kyselina nebo ammonium formiát/mravenčí kyselina), které jsou spolu s ostatními složkami mobilní fáze odpařitelné a nezanášejí iontový zdroj vykrystalovanými solemi.

Hmotnostní detektor je založen na změnách rychlosti a trajektorii letu nabitých částic v elektromagnetickém poli, které jsou závislé na poměru hmotnosti částice k jejímu náboji (m/z).

Hmotnostní detektor je složen ze tří základních částí:

- iontového zdroje
- analyzátoru
- detektoru

Desorpce a ionizace

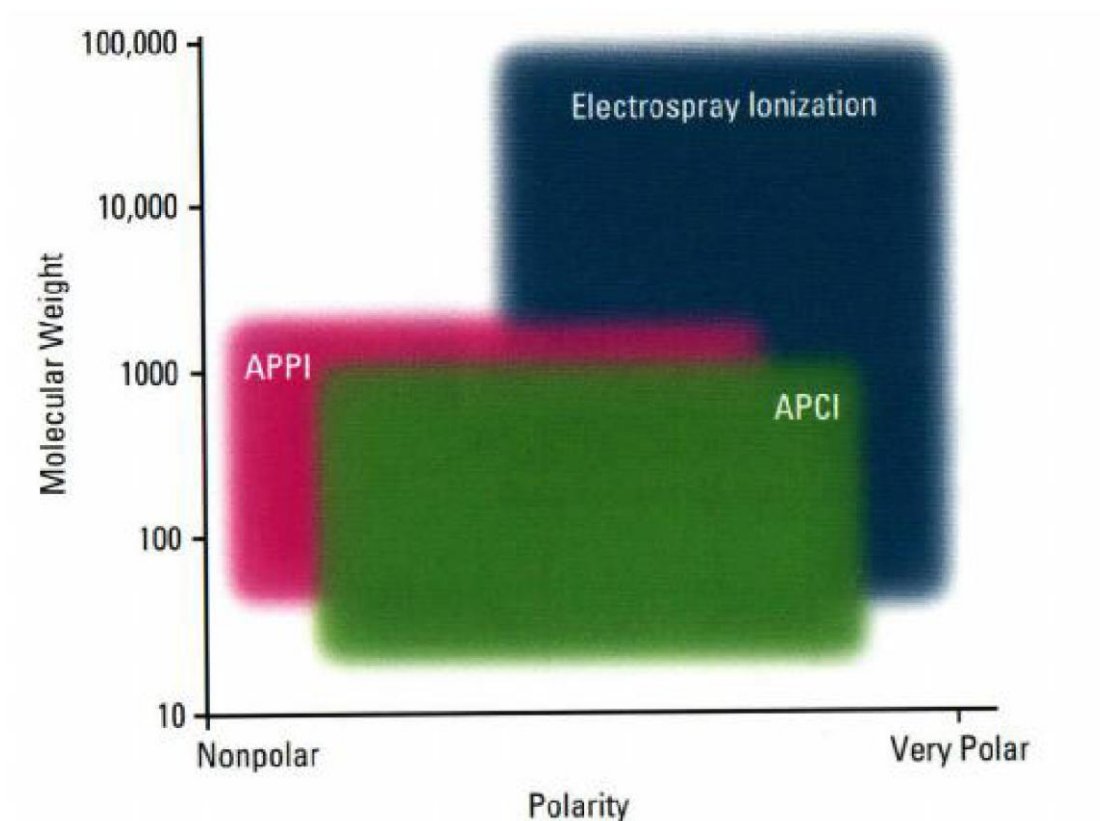
Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul na nabitě částice. První ionizační technikou byla elektronová ionizace. Při ní dochází průchodem urychleného elektronu okolím částice k ovlivnění valenčních elektronů a vzniku iontu M^+ . Tato technika je nejvíce prozkoumána, ale není vhodná ke spojení s HPLC. Iontový zdroj ve spojení s HPLC musí zajistit ionizaci i odstranění mobilní fáze (desorpci), která je oproti analytu v mnohonásobném přebytku.

Ve spojení s HPLC se dnes prakticky používají čtyři ionizační techniky:

- Ionizace elektrosprejem - Electrospray Ionization (ESI)
- Chemická ionizace za atmosférického tlaku - Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)
- Ionizace zářením za atmosférického tlaku - Atmospheric Pressure Photo Ionization (APPI)
- Desorpce laserem za přítomnosti matrice - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)

První tři uvedené ionizační techniky se používají s HPLC v zapojení on-line a vzájemně se doplňují v rozsahu využití pro různé skupiny látek (viz Obr. 11). Technika MALDI se užívá prakticky výhradně ve spojení s analyzátozem TOF (Time Of Flight) ke studiu vysokomolekulárních látek (MALDI-TOF).

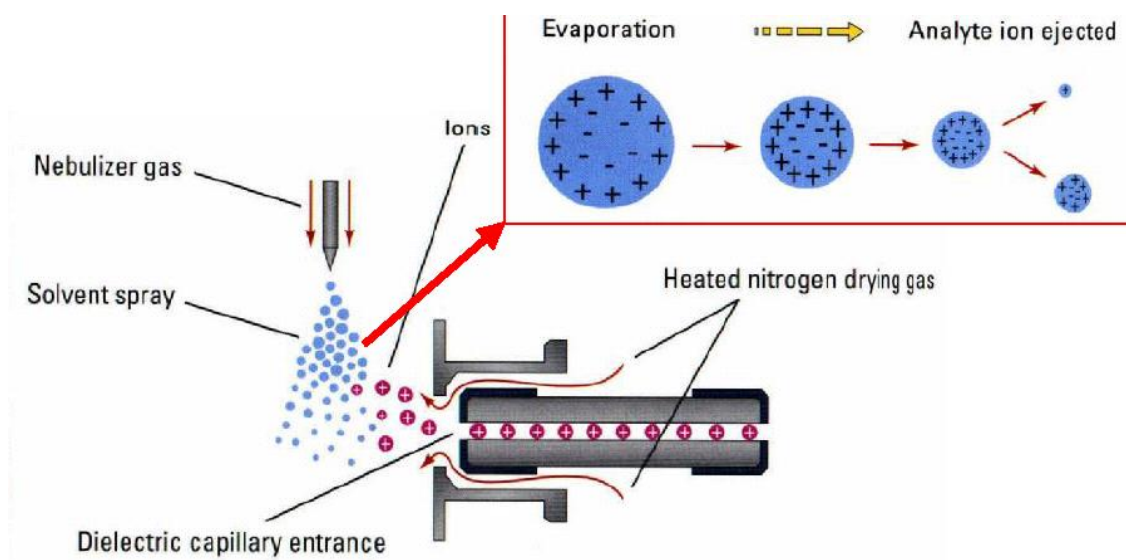
Obr. 11: Možnost využití ionizačních technik ESI, APCI a APPI pro různé skupiny analytu [83]



Legenda: Na ose x je vyznačena polarita analytu – zleva od nepolárních látek k polárním. Na ose y je vynesena v logaritmickém měřítku molekulová hmotnost.

Při **ESI** je eluent přiveden kovovou kapilárou s vloženým napětím (3 – 5 kV) do iontového zdroje a za pomoci přiváděného dusíku zmlžen za vzniku aerosolu. Kapičky aerosolu nesou velké množství náboje. V prostoru iontového zdroje dochází následně k odpařování komponent mobilní fáze (resp. efluentu opouštějícího kolonu) sušícím plynem (zpravidla dusík), tím pádem ke zmenšování kapének a tedy i zvýšení hustoty náboje na povrchu zmenšujících se kapének. Po dosažení určité kritické hustoty náboje dojde k tzv. Coulombické explozi a k uvolnění kvazimolekulárního iontu obecného tvaru $[M+H_n]^{n+}$ (viz Obr. 12). ESI může být zdrojem několikanásobně nabitých částic, čehož se hojně využívá při analýze vysokomolekulárních látek jako jsou peptidy či nukleové kyseliny. Z těchto vysokomolekulárních látek vložením velkého množství nábojů získáme částice s nízkou hodnotou m/z a můžeme je analyzovat i pomocí nejjednodušších typů analyzátorů (viz níže). Tento typ měkké (soft) desorpční a ionizační techniky umožňuje bez destrukce vyjmout z mobilní fáze a ionizovat takové typy molekul, jakými jsou konjugáty xenobiotik. Pro (bio)analytickou praxi byla technika ESI tak převratným objevem, že jejímu autorovi, Johnu B. Fennovi byla udělena v roce 2002 Nobelova cena. [84]

Obr. 12: Schéma elektrospreje [83]



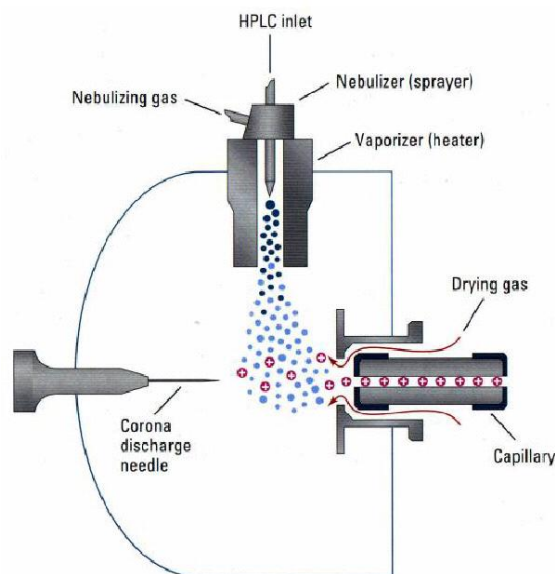
Legenda: Nebulizer gas – zmlžující plyn, Solvent spray – sprejovaný solvent, Dielectric capillary entrance – kapilární vstup, Heated nitrogen drying gas – sušící proud teplého dusíku, Ions – ionty, Evaporation – odpařování, Analyte ion ejected – tvorba iontu analytu

U **APCI** je eluent vnášen společně s mlžícím plynem do prostoru iontového zdroje, ve kterém je kovová jehla na níž vneseným napětím (3 – 4 kV) dochází ke koronárnímu výboji. Působením koronárního výboje dochází k ionizaci molekul mobilní fáze a následně k intermolekulárnímu přenosu náboje na molekuly analytu (viz Obr. 13). Vzniklé ionty bývají podobně jako v ESI ve tvaru $[M+H_n]^{n+}$, kde n dosahuje však maximálně hodnoty 2. Mnohdy dochází k tvorbě aduktů s alkalickými kovy přítomnými v mobilní fázi ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$). Přítomnost aduktů alkalických kovů usnadňuje interpretaci spekter a určení molekulového iontu, protože pouze molekulový iont tvoří adukty se sodnými a draselnými ionty a je ve spektru doprovázen ionty s nižší intenzitou s charakteristickými hmotnostními rozestupy.

APPI je analogií APCI. V technickém provedení dochází k nahrazení koronárního výboje zdrojem UV záření s energií fotonů 10 a 10,6 eV. Výběrem této hodnoty je dosaženo selektivity ionizace jen na analyt, protože většina běžných složek mobilní fáze se touto energií není schopna ionizovat. Využití APCI a APPI se v mnohém překrývá, ale zároveň i doplňuje.

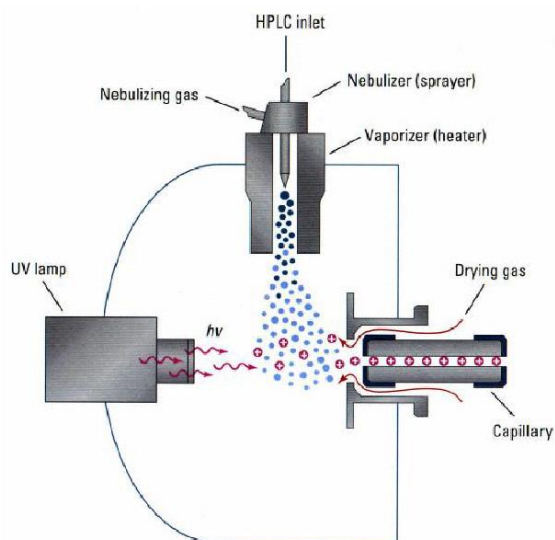
MALDI technika ionizace je ze své podstaty vhodná pouze pro případné off-line spojení s HPLC, protože musí dojít k vytvoření směsi analytu a matrice (zpravidla deriváty benzoové a skořicové kyseliny v silném přebytku 1:10⁴). Tato technika je jednou z nejúspěšnějších metod pro ionizaci molekul s vyšší molekulovou hmotností. Používá se k určování molekulových hmotností biomolekul, monitorování procesů v biologickém materiálu a zjišťování sekvencí peptidů a oligonukleotidů (proteomika a genomika). Metoda umožňuje vypařit a ionizovat netěkavé biologické vzorky přímo z pevné fáze lokalizované na destičce ozařované pulsním laserem. energii laserového impulsu zachytí právě zmíněná matrice a ta ji v šetrné formě předá makromolekulám. Ty se pak uvolňují převážně ve formě molekulových iontů $[M+H]^+$ v prostoru nad destičkou (ve formě iontového oblaku). Ionty jsou extrahovány extrakčními mřížkami s vysokým napětím do analyzátoru, kterým bývá v případě MALDI téměř vždy analyzátor doby průletu (Time Of Flight, TOF). Pomocí MALDI je možné generovat molekulové píky u molekul s relativní molekulovou hmotností dosahující až 10⁶. Výhodou je možnost několikanásobného využití nanesené stopy, protože laserem je ozářena jen její malá část. Objev techniky MALDI-TOF Franzem Hillenkampem kolem roku 1989 byl opět revolučním počinem v oblasti bioanalýzy makromolekul. Nobelova cena byla trochu nespravedlivě udělena pouze Koichi Tanakovi v roce 2002. [84]

Obr. 13: Schéma konstrukce APCI [83]



Legenda: HPLC inlet – vstup z HPLC, Nebulizing gas – zmlžující plyn, Nebulizer (sprayer) - zmlžovač, Vaporizer (heater) – odpařovač, Corona discharge needle – jehla s koronárním výbojem, Drying gas – sušící plyn, Capillary - kapilára

Obr. 14: Schéma konstrukce APPI [83]



Legenda: HPLC inlet – vstup z HPLC, Nebulizing gas – zmlžující plyn, Nebulizer (sprayer) - zmlžovač, Vaporizer (heater) – odpařovač, UV lamp – zdroj UV záření určité $h\nu$, Drying gas – sušící plyn, Capillary - kapilára

Separace iontů a analyzátořy

Po ionizaci analytu dochází k separaci vzniklých iontů na základě m/z . Sektorové analyzátořy, které byly používány při vzniku hmotnostní spektrometrie se zpravidla nehodí pro spojení s HPLC. V dalším textu se budu věnovat jen analyzátořům, které se používají ve spojení s HPLC.

- kvadrupól (Q), trojitý kvadrupól (QqQ)
- iontová past (ion trap, IT)
- analyzátoř doby letu (Time-of-Flight, TOF), reflexní TOF
- iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)

Ty se dají rozdělit do dvou skupin. Na ty jež dělí ionty v prostoru (Q, QqQ) a ty jež dělí ionty v čase (IT, TOF). Samostatnou kapitolou je iontová cyklotronová rezonance.

Kvadrupól se skládá ze čtyř kovových tyčí 30 - 50 cm dlouhých kruhového nebo hyperbolického průřezu. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na druhé dvě je vloženo stejně velké záporné stejnosměrné napětí. Na všechny čtyři tyče je zároveň superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Do středu osy kvadrupólu jsou přivedeny ionty a začínají oscilovat. V závislosti na vložném poměru U/V jsou oscilace stabilní pouze pro částici s určitou hodnotou m/z , která projde kvadrupólem až k detektoru. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou (skenováním) poměru stejnosměrného napětí a amplitudy U/V jsou postupně propuštěny na detektor všechny ionty (jedná se vlastně o hmotnostní filtr). Pro běžnou analýzu je možné nastavit jedinou hodnotu superponovaného střídavého napětí a zachytit jen záznam jedné hodnoty m/z (stejně jako u UV detektoru je možné vybrat jedinou vlnovou délku). Tento přístup je vhodný zvláště u stopových analýz, kdy známe m/z hledané látky. Nedochozí tak ke ztrátám iontů hledaného analytu při skenování „prázdných“ částí spektra (režim Selektivní záznam iontů - SIM – Selected Ion Monitoring).

Trojitý kvadrupól je soustavou za sebou jdoucích jednoduchých kvadrupólů. 1. a 3. slouží jako analyzátořy. Prostřední kvadrupól je určen k srážkám separovaného iontu s kolizním plynem (helium) a jeho dalšímu štěpení na fragmenty.

Iontová past se někdy popisuje jako trojrozměrný kvadrupól. Skládá se z jedné kruhové elektrody a dvou koncových elektrod, na něž je podobně jako u jednoduchého

kvadrupólu vkládáno napětí. Ionty jsou vneseny do pasti, kde se díky vkládanému napětí zakoncentrují v jejím středu. Změny napětí na koncových elektrodách mohou způsobit destabilizaci drah iontů v pasti a tím jejich následné vypuzení na detektor. Takto můžeme v iontové pasti izolovat jednotlivý iont a následným vnesením kolizního plynu (helium) způsobit jeho další štěpení. Tak můžeme pokračovat teoreticky až na desátou úroveň (značí se MS^{10}). Praktické možnosti iontové pasti však většinou dovolují maximálně MS^5 až MS^6 . Toto omezení je dáno životností iontů a jejich limitním množstvím, které se každým štěpením snižuje.

Novým analyzátozem na principu iontové pasti je **lineární iontová past**. Jedná se o jednoduchý kvadrupól, jehož tyče jsou rozděleny do tří sekcí. Krajní segmenty zastávají funkci koncových elektrod, jak je známe u iontové pasti. Vypuzování iontů se děje, buď ve směru původního letu, pak však (stejně jako u sférické IT) polovinu iontů ztratíme vypuzením na opačnou stranu, než na které se nachází detektor, nebo v radiálním směru, kdy na každé straně se nachází jeden detektor k zaznamenání vypuzených iontů. Lineární iontová past se zařazuje místo třetího kvadrupólu u trojitého kvadrupólu. Výhodami lineární iontové pasti jsou její vysoká kapacita, vysoká účinnost záchytu, stabilizace a detekce iontů, dostatečné rozlišení při vysoké skenovací rychlosti. [85]

Analyzátor doby letu využívá vlastnosti iontů, které se při stejné kinetické energii pohybují rozdílnou rychlostí, která je závislá na jejich m/z . Zjednodušeně malé ionty letí rychleji. Jedná se o pulzní detektor. Nejprve jsou ionty krátkým pulzem urychleny, a následně se přesně měří čas, za který dolétnou na detektor. Pro sjednocení kinetických energií a zpřesnění měření se dnes používají TOF analyzátozy s iontovým zrcadlem (reflektronem) – r-TOF. Protože se jedná o pulzní analyzátoz, je časté jeho použití s pulzním iontovým zdrojem MALDI. TOF je také, kromě iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR), jediným analyzátozem, který nemá shora omezen interval hodnot m/z . I proto je vhodný k analýze vysokomolekulárních látek. Pokud se tedy ostatní zmíněné analyzátozy používají k analýzám vysokomolekulárních látek, jedná se výhradně o spojení s ESI, který je zdrojem vícenásobně nabitých iontů a hodnota m/z je díky tomu snížena. Pro analýzu s TOF analyzátozem je principiálně možné použít jakýkoli iontový zdroj. Nejčastějším spojením je však spojení s MALDI. Obě pulzní metody se ideálně doplňují a není třeba zapojovat pulzní interface

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací je nejmodernější z MS analyzátorů. Její princip spočívá ve vložení iontů do silného magnetického pole. Ty se v tomto poli začnou pohybovat po cykloidální trajektorii s cyklotronovou frekvencí, jež je nepřímo úměrná poměru m/z .

Každá hodnota m/z má charakteristickou cyklotronovou frekvenci a Fourierovou transformací se následně záznam těchto frekvencí přepočte do škály m/z – tím získáme hmotnostní spektrum. Jedná se o finančně nákladný analyzátor s vysokými nároky na kvalitu vakua. Také zajištění zdroje silného magnetického pole není technicky ani finančně jednoduché. Proto jeho rozšíření v současné době není velké (v České republice se jedná pouze o jediný přístroj umístěný v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v péči docenta Havlíčka).

Detekce iontů

K detekci iontů v hmotnostní spektrometrii se používají:

- Faradayova klec
- Elektronový násobič
- Fotonásobič

S vývojem nových ionizačních technik (ESI, APCI) mohlo dojít ke spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Toto spojení klade vysoké požadavky, jak na podmínky analýzy tak i na schopnosti analytika, který musí porozumět kapalinové chromatografii i být schopen číst hmotnostní spektra.

MS lze využít i bez spojení s HPLC jako samostatnou analyticko-separační metodu. Při využití MSⁿ metod může být první krok využit jako separační, kdy izolujeme ionty m/z odpovídající hledanému, abychom je dále analyzovali pomocí MS. Nevýhodou je znečištění hmotnostního spektrometru složkami matrice, které se v prvním kroku ionizují společně s analytem, vůči němuž jsou v několikanásobném nadbytku.

3.2.1.7. Způsoby stanovení analytu pomocí HPLC

Vysoceúčinná kapalinová chromatografie je analytická metoda, která dovoluje identifikaci i stanovení. Pro většinu detektorů (prakticky pouze s výjimkou ELSD) je vztah mezi koncentrací a odezvou přímo úměrný. Pro HPLC z toho plyne, že

koncentrace je u většiny detektorů přímo závislá na ploše nebo výšce píku. Zda používat plochu nebo výšku je většinou na rozhodnutí analytika. Výběr plochy je vhodný u píků širokých s tendencí k chvostování. Výška je vhodná u píků štíhlých a symetrických. Vnesená chyba je tak menší. Dále se výšky může využít u stopových analýz, kdy jsou získané píky příliš mále. Zde je vnesená chyba ve výšce menší než v ploše. [59]

Protože se při výpočtu koncentrace vychází z plochy, resp. výšky, je třeba si stanovit hodnotu šumu pozadí. Dají se rozeznat tři typy šumu – short-term noise, long-term noise a baseline drift (termíny se do češtiny již většinou nepřekládají). Short-term noise lze definovat jako šum detektoru, elektronický šum integračního systému nebo pulzace systému. Většinou se nedá ovlivnit. Příčinou long-term noise jsou vnější zdroje a problémy systému, které lze odstranit nebo minimalizovat. Jedná se o špatné míchání mobilní fáze, změny teploty, bleeding (krvácení) stacionární fáze nebo interference látky eluující se z předchozí analýzy. Baseline drift je speciálním typem long-term noise. Může se jednat např. o růst základní linie v závislosti na gradientu mobilní fáze. Příkladem může být použití gradientu kyseliny octové a nízké vlnové délky UV detekce.

Pro měření je důležité stanovit mez, kdy můžeme odečítat přesné a správné výsledky. Tato mez je často stanovena (např. v lékopisné literatuře) hodnotou poměru signálu k šumu (viz Rovnice 2). Pro stanovení je požadována hodnota S/N alespoň 10. Pro identifikaci píku stačí S/N s hodnotou 3 [64]. V této práci jsou meze detekce stanoveny jako body kalibrační křivky s dostatečnou mírou správnosti (hodnoty $\pm 20\%$ od správné hodnoty) a přesnosti (max 15 %).

Rovnice 2: Poměr signálu k šumu

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

Legenda: S/N je poměr signálu k šumu, H je výška píku, h je zjednodušeně šířka šumu základní linie v místě měření signálu.

Samotné stanovení můžeme provádět čtyřmi způsoby. Prvním z nich je metoda **normalizovaného píku (normalized peak)**. Jde o vztažení velikosti píku k celkové ploše všech píků v chromatogramu (nebo vztažení k největšímu píku). Hodí se pro limitní analýzy nečistot, kde se porovnává velikost píků k hlavnímu píku

chromatografu (jako třeba zkoušky na Příbuzné látky Český lékopis 2005). Absolutní hodnota koncentrace nás v tomto případě nezajímá. Také se zanedbává různá odezva jednotlivých analytu.

K přesnějšímu stanovení lze použít druhý způsob, metodu **vnějšího standardu (external standard method)**. V tomto případě musíme mít standard stanovovaného analytu deklarované specifikace. Vytvoříme sadu vzorků o rostoucí koncentraci standardu. Vytvoříme z nich kalibrační křivku nebo vypočteme responsní faktor (viz Rovnice 3).

Rovnice 3: Responsní faktor pro vnější standard

$$RF = \frac{\textit{plocha}}{\textit{koncentrace}}$$

Legenda: RF - responsní faktor (jedná se o směrnici, neboli o tangens úhlu kalibrační křivky k ose x)

Po dosazení plochy z následné analýzy vzorku a úpravě rovnice vypočteme koncentraci. Z předchozího je patrné, že se tato metoda hodí tam, kde zpracováním nedochází k ztrátám vzorku.

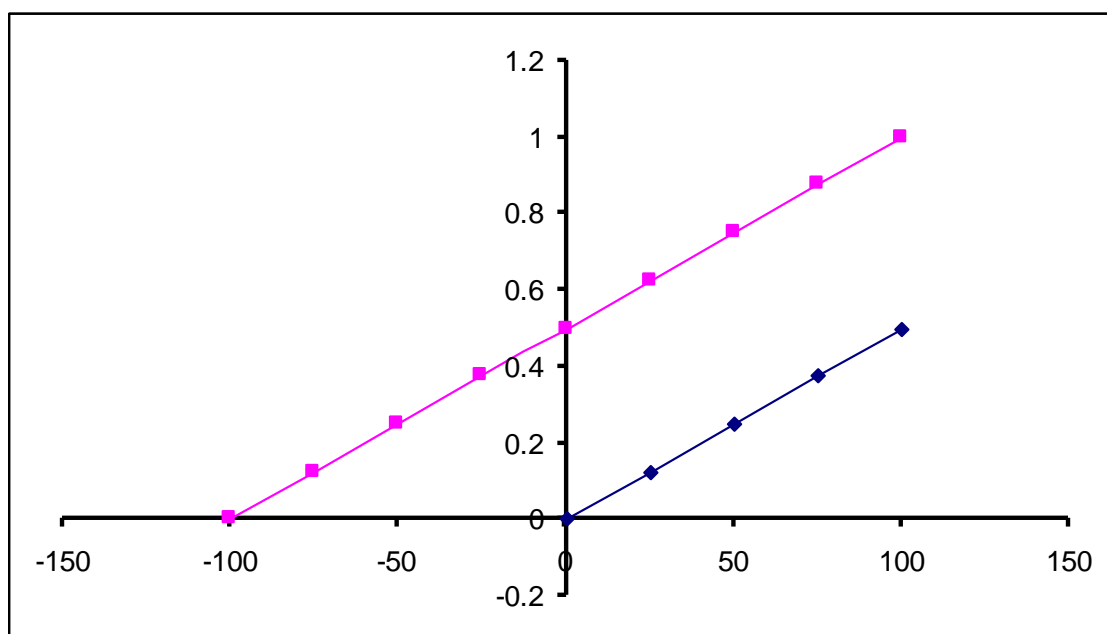
V bioanalytických stanoveních, kde dochází k rozsáhlému zpracování vzorku před analýzou, je vhodnější používat metodu **vnitřního standardu (internal standard method)**. K homogenizovanému vzorku se před zpracováním přidá definované množství vnitřního standardu (Internal Standard, IS). Následně se provedou veškeré úpravy vzorku a vlastní analýza. Vnitřní standard by měl být vybrán tak, aby napodoboval chování analytu. Jeho extrahovatelnost z biomatrice i odezva v detektoru by měly být podobné s extrahovatelností a odezvou analytu. Měl by se dobře separovat od ostatních píků analýzy a retence v chromatografické koloně se tedy musí lišit od ostatních analytů (léčiva a jeho metabolitů), jeho pík nesmí kolidovat s píky ostatních analytů nebo balastů. Při úpravě a analýze vzorku by neměl reagovat se vzorkem ani mobilní fází. Neodmyslitelnou vlastností je i komerční dostupnost vnitřního standardu v deklarované vysoké čistotě. Jelikož se vnitřní standard často používá pro složité matrice, měla by se zvážit možnost jeho přirozené přítomnosti ve vzorku například ve formě metabolitu. Jako vhodné se jeví vybírat vnitřní standardy jako vyšší (či nižší) homology analytu. Vnesení methylenové skupiny způsobí na obvykle používaných reverzních fázích delší retenci, než má analyt a jeho metabolity (ty jsou většinou hydrofilnější) [86]. Biotransformační reakce nevedou k produktům

tohoto typu [8, 86, 87]. Zajímavou možností výběru vnitřního standardu přineslo masivnější využití detekce pomocí hmotnostního spektrometru. Jako vnitřních standardů se využívá deuterovaných analytů, které mají stejné retenční vlastnosti, ale liší se v hodnotě m/z na hmotnostním spektru. Značení musí být několikanásobné, aby došlo k výraznému oddělení hodnot m/z .

Výhodou vnitřního standardu je, že koriguje ztráty vzniklé během přípravy vzorku.

Poslední možností stanovení v HPLC je metoda **standardního přidavku** (standard addition metod). Jako standard je zde použit analyt, respektive jeho chemický standard. Vytvoříme kalibrační křivku s maticí bez vzorku a následně i se vzorkem. Kalibrační přímka bude v druhém případě rovnoběžná s prvním jen bude posunuta o určitou hodnotu na ose y . Pokud chceme zjistit koncentraci analytu ve vzorku stačí vyřešit, v kterém místě protne přímka osu x (buď výpočtem nebo graficky). Tuto hodnotu je samozřejmě třeba odečíst v absolutní hodnotě. Metoda standardního přidavku je často používána při stopových analýzách (viz Obr. 15).

Obr. 15: Stanovení metodou standardního přidavku



Legenda: Modrá křivka znázorňuje kalibrační křivku bez analytu. Fialová křivka znázorňuje kalibrační křivku vzorku obsahujícího analyt. Jedná se jen o ilustrační obrázek. Naměřené hodnoty by byly jen od hodnoty 0 do kladných hodnot x .

3.2.2. Příprava biologického vzorku k analýze

Před analýzou biologického vzorku pomocí vysoceúčinné kapalinové chromatografie je třeba vzorek upravit v závislosti na jeho povaze. Nejčastěji se jako zkoumaný biologický materiál používají deriváty krve – plasma a sérum. Dalším nejvíce odebíraným materiálem je moč. Ale samozřejmě je možné použít jakýkoli biologický materiál – trus, žluč, tkáň, vlasy, sliny a hleny. Většina těchto materiálů obsahuje bílkoviny a tuky a celou řadu dalších endogenních látek, které je třeba odstranit, aby nerušili stanovení. Izolace zkoumaných struktur z biologické matrice lze docílit několika způsoby - extrakcí do kapaliny nebo na pevnou fázi nebo deproteinací pomocí chemických činidel. Každá z těchto metod má své výhody a nevýhody, které budou dále diskutovány.

3.2.2.1. Extrakce z kapaliny do kapaliny

Liquid-liquid extrakce (extrakce z kapaliny do kapaliny, LLE) je jedna z dělicích metod. Její prvotní uspořádání bylo jednoduché. Dvě nemísitelné kapaliny mezi něž se podle svých fyzikálně-chemických vlastností dělí analyt na základě rozpustnosti v organické a vodné fázi. Tento jev lze popsat rozdělovacím koeficientem, který je jednou ze základních charakteristik látek. (Rovnice 4)

Rovnice 4: Rozdělovací koeficient

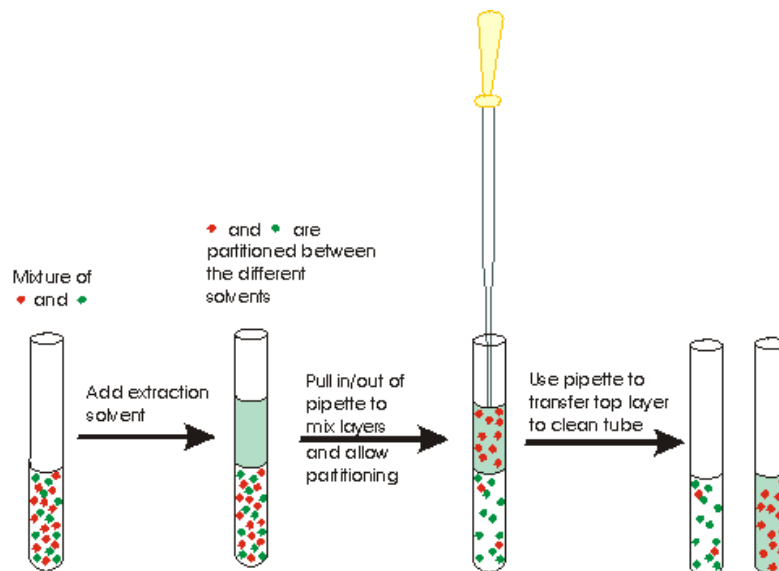
$$P = \frac{C_{org}}{C_w}$$

Legenda: C_{org} je koncentrace analytu v organické fázi a C_w je koncentrace analytu ve vodné fázi

Pro analytické účely bylo upraveno technické provedení metody od využití dělicí nálevky k provedení ve zkumavce, ale princip zůstal zachován. Je vhodné vybrat rozpouštědlo, do kterého se eluuje minimální množství dalších látek, ale maximální množství námi analyzovaných. Pro zvýšení extrakce se upravuje pH vodné fáze k převedení analytu z iontového stavu do stavu neutrální molekuly. Pro kyselé analyty se pH snižuje aspoň o dvě jednotky níže než je pKa analytu, pro zásadité se stejným způsobem zvyšuje, což vyplývá s Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice (viz Rovnice 1 a Obr. 16). Někdy se k pročištění vzorku využívá zpětné reextrakce

do vodné fáze, přičemž ovšem dochází k vnesení vyšší chyby. Vždy je nutné zvážit výhody (čistší záznam) a nevýhody (vnesená chyba).

Obr. 16: Schéma liquid-liquid extrakce



Legenda: Červené tečky – analyt, zelené tečky – složky matrice, 1. krok – směs analytu a matrice, 2. krok – přidavek organického rozpouštědla, 3. krok – po zatřepání se oddělí vrchní vrstva organického rozpouštědla a 4. krok – oddělený analyt v organickém rozpouštědle, matrice zůstala ve vodné fázi

Výhodou LLE je její jednoduchost a nenáročnost na vybavení laboratoře. Při nejjednodušším uspořádání nevznáší výraznou chybu pokud nedojde k vytvoření tzv. mezifáze (tu je možno odstranit centrifugací). Po provedení extrakce získáváme vzorek v nepolárním rozpouštědle, které lze snadno odpařit. Vodná fáze se dá jednoduše oddělit zmrazením, pokud použijeme nepolární rozpouštědlo lehčí než voda, lze organické rozpouštědlo dekantovat od zmrzlé vodné fáze do jiné zkumavky.

Nevýhodami LLE je složitější automatizace. Ale i tato nevýhoda byla již odstraněna zavedením LLE kolonek. Ty jsou naplněny porézní hmotou (dnes rozsivková hornina, křemelina, ale vývoj jistě najde i jiné druhy náplní), která do sebe zachytí kapalinu vzorku. Následným promýváním nepolárním rozpouštědlem dojde ke kontinuální extrakci na styčných plochách, přičemž vodná matrice je pevně zachycena v pórech díky povrchovému napětí [88]. Druhou výraznou nevýhodou je používání nepolárních často toxických rozpouštědel, které stejně jako u normálních fází na HPLC přináší ekologické i ekonomické problémy (viz 3.2.1.5).

3.2.2.2. Extrakce na pevných fázích

Solid phase extraction (SPE) – extrakce na pevné fázi pracuje na podobném principu jako kapalinová chromatografie. Kolonka nebo disk jsou naplněny sorbentem s vázanou fází o velikosti částic 5 – 10 krát větších než podobné sorbenty určené pro kapalinovou chromatografii. Na kolonku pro SPE se (po její aktivaci zpravidla methanolem) nanese vzorek. Po jeho průchodu by měl analyt zůstat zachycen na sorbentu kolonky, zatímco balastní látky by měly kolonku opustit. Vyplavení balastních látek podpoříme následným promytím vodnou fází. Pak nahradíme zkumavku s balasty novou čistou zkumavkou a následným promytím SPE kolonky organickým rozpouštědlem (methanol, acetonitril) dojde k uvolnění analytu z vazby na sorbent a k jeho vyplavení z kolonky. Odpaření rozpouštědla a následnou rekonstitucí v mobilní fázi získáme vhodný vzorek pro HPLC. Průtok kapalin kolonkou je zajištěn tlakem, a to buď přetlakem nebo podtlakem. Na kvalitu analýzy má vliv i rychlost průtoku kolonkou.

Výhodou SPE je její jednoduchá automatizace. Jednou z možností, kterou může analytik s úspěchem využít je uskladnění vzorku v SPE kolonce například pro transport, nebo k pozdější analýze.

3.2.2.3. Mikroextrakce na pevné fázi

Obdobou SPE extrakce je mikroextrakce na pevné fázi (Solid Phase MicroExtraction, SPME). Z názvu by se zdálo, že se jedná o jednoduchou miniaturizaci SPE, ale není tomu tak. SPME využívá schopnosti sorbentu navázat na sebe analyt ze svého okolí. Konstrukčně se jedná o vlákno obalené sorbentem, které je možné skrýt do jehly. Toto vlákno se vysunutím z jehly vystaví působení kapaliny nebo plynu po určitou dobu. V tomto kroku dojde k vytvoření rovnováhy mezi koncentracemi analytu na sorbentu a v jeho okolí. To je výrazná změna oproti SPE, kde je teoreticky možné zachytit veškeré množství analytu. Po extrakční fázi je možné jehlu vložit do vstupního prostoru plynového chromatografu a jednoduchým vysunutím vlákna dojde k termální desorpce zachycených látek a k započetí analýzy. Jde o jednoduché a elegantní zjednodušení jinak složité cesty vzorku od extrakce k samotné analýze. Pouhým dvojnásobným vysunutím extrakčního vlákna dosáhneme extrakce a následné desorpce rovnou do analytického systému. Tato metoda však přináší nové problémy i výzvy. Mezi problémy můžeme řadit rozdílnost sorpce látek na vlákno SPME. Mnohé látky (i strukturně podobné) se sorbují na vlákno v různém poměru k vnější koncentraci, což přináší problémy

s následnou kvantifikací. Stejně tak velkým problémem dlouho bylo spojení s jinými analytickými metodami, např. s HPLC. Jak je zřejmé u HPLC nemůže docházet k termální desorpci. Byl vyvinut interface, který dovoluje rychlou desorpci mobilní fázi, buď v proudu vedoucím rovnou na kolonu, nebo v čase, kdy je ve smyčce vlákno omýváno a až po časovém zpoždění nastříknut eluent na kolonu. [89]

Důležité je absolutní zjednodušení analýzy. Pokud lze na vlákno extrahovat ze vzduchu nebo z kapaliny, je možné na něj extrahovat rovnou z biologického materiálu? Nebo je možné na vlákno extrahovat z živého pokusného objektu? Z bioanalytického hlediska se jedná o zajímavou otázku proto, že může docházet ke změnám analyzovaného vzorku po smrti pokusného objektu nebo ve vzorku po jeho vyjmutí z pokusného objektu. I tento problém byl nakonec vyřešen a byly provedeny první pokusy nejdříve na rostlinných a posléze i živočišných tělech. Není bez zajímavosti, že při pokusech na rostlinných objektech byli zaznamenány rozdíly mezi analýzami vzorků na živých rostlinách a na částech rostlin předem oddělených. [90 - 92]

3.2.2.4. Deproteinace [93] a [94]

Změnou nativního stavu konformace bílkovin – denaturací – dojde k narušení sekundární, terciární případně kvarterní struktury bílkovin, tím k odhalení lipofilních částí molekuly a jejimu vysrážení z vodného roztoku (vytvoření „náhodného klubka“). Po odstředění roztoku získáme čirý, bílkovin prostý supernatant, v němž stanovujeme analyty.

Denuraci lze obecně provádět fyzikálními i chemickými postupy. Fyzikální denaturace lze provádět působením teploty po určitou dobu (90 °C, 5 – 15 minut). Denaturační činidla, která se používají, lze rozdělit do 3 skupin, podle principu denaturace. Silné kyseliny a zásady (trichloroctová kyselina, HClO₄, H₂WO₄, NaOH) a soli těžkých kovů (ZnSO₄) ruší iontové vazby v molekule bílkoviny. Nepolární vazby jsou rušeny organickými rozpouštědly rozpustnými ve vodě (methanol, acetonitril, ethanol, aceton) nebo tenzidy (dodecylsulfát sodný). Tvorbou nových vodíkových můstků mění konformaci bílkovin močovina a guanidin.

Při výběru denaturačního činidla je třeba brát v úvahu možnost reakce se stanovovanou látkou nebo takzvaného „cut-off“ efektu u činidel absorbujících v UV oblasti spektra (viz kapitola 3.2.1.6.1). Nejvýraznější problém, který je společný pro všechna denaturační činidla, je naředění vzorku, proto se tento postup nedoporučuje pro stopové analýzy.

Při denaturaci dochází k uvolnění léčiva z vazby na bílkoviny. Zatímco u jiných postupu přípravy vzorku pracujeme jen s léčivem (stanovovanou látkou), které je volně rozpuštěné v roztoku, u denaturace stanovujeme celkový obsah včetně části vázané na bílkoviny. S tímto faktem je třeba počítat při interpretaci výsledků a porovnání naměřených dat s rozdílnými postupy přípravy vzorku. Výhoda tohoto postupu přípravy vzorku se může projevit u stanovení léčiv vázaných na krevní bílkoviny ve vysoké míře. Uvolněním části vázané na bílkoviny je možné zvýšit koncentraci 50 až 100 krát.

Při rychlé denaturaci, nebo špatném postupu, může dojít k tvorbě precipitátu, na který se nespecificky sorbují analyty (léčivo a jeho metabolity). Při rychlé denaturaci je možné uzavření části molekul léčiva do kavity v precipitátu.

Přes zmíněné problémy je deproteinace s následnou (ultra)centrifugací rychlá a jednoduchá metoda odstranění makromolekul z biologického vzorku, kterou je možné používat i v kombinaci s jinými metodami úpravy vzorku.

3.2.2.5. Přímý nástřik

U biologického materiálu, který obsahuje minimum nebo vůbec žádné proteiny, je výhodné použít metodu přímého nástřiku. Většinou se tato metoda používá pro analýzu moči, protože ta za fyziologických podmínek neobsahuje žádné proteiny. Výhodou je, že nedochází ke ztrátám při přípravě vzorků jako u jiných metod, dále je metoda přímého nástřiku vhodná pro identifikaci a stanovení metabolitů 2. fáze biotransformace (glukuronidů, a jiných polárních konjugátů, které se neextrahují nebo obtížně extrahují). Nevýhodou je, že moč obsahuje velké množství solí a dalších látek, které komplikují analýzu.

3.2.3. Validace bioanalytické metody

Konečnou fází vývoje bioanalytické metody je její validace. Jedná se o prověření metody, nalezení jejích slabých míst a stanovení podmínek, za kterých lze metodu používat, aby byly zajištěny přesné a správné výsledky stanovení. Již během vývoje je vhodné testovat a zaznamenávat limity, které by mohly narušit průběh validace.

Pokud chceme mluvit o validaci, musíme se nejprve zamyslet, co to je a k čemu má sloužit. Odpovědi na takové otázky otvírají cestu k pochopení validace jako procesu. Validace by měla zajistit opakovatelnost procesu, stanovit podmínky, které musí být splněny, abychom mohli akceptovat výsledky.

Odovědné regulační autority (jako SÚKL, FDA, ICH) stanovily podmínky pro validace různých typů analýz. Důležitými parametry jsou přesnost, správnost, linearita, rozsah, specifická, robustnost a stabilita. Ne vždy musí být testovány všechny parametry. Podle účelu analýzy autority stanovují parametry, které musí být testovány (viz Obr. 17).

Obr. 17: Parametry požadované pro jednotlivé typy analýz podle FDA [95]

TYPE OF ANALYTICAL PROCEDURE; CHARACTERISTICS	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES		ASSAY; dissolution (measurement only); content/potency
		Quantitation	Limit	
Accuracy	-	+	-	+
Precision				
Repeatability	-	+	-	+
Intermediate Precision	-	+ ¹	-	+ ¹
Specificity ²	+	+	+	+
Detection Limit	-	- ³	+	-
Quantitation Limit	-	+	-	-
Linearity	-	+	-	+
Range	-	+	-	+

NOTE: - signifies that this characteristic is not normally evaluated; + signifies that this characteristic is normally evaluated.

¹ In cases where reproducibility (see Glossary) has been performed, intermediate precision is not needed.

² Lack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s).

³ May be needed in some cases.

Legenda: V prvním sloupci jsou uvedeny analytické procedury, 2. sloupec se týká identifikačních metod, 3. sloupec metod na testování nečistot, limitních i kvantifikačních, 4. sloupec metod kvantifikačních

Přesnost (Precision) se jednoduše vyjádří jako hodnota relativní směrodatné odchylky většinou šesti po sobě jdoucích analýz vzorků, které byly zpracovány validovanou metodou. Takovýto jednoduchý pohled na přesnost nazýváme opakovatelnost (*repeatability*). Vyšším pojmem souvisejícím s přesností je *intermediate precision*. Jde o vyjádření změny, respektive stálosti, výsledků získaných několikrát po sobě ve stejné laboratoři, ale s různými přístroji, provedené různými analytiky, v různých dnech. Nejvyšším pojmem souvisejícím s přesností je *reproducibility*. Jedná se o stanovení

přesnosti při převodu mezi laboratořemi. Repeatability je nejnižším požadavkem. Intermediate precision je nutné stanovit vlastně vždy, protože nelze zajistit stálost komponent. Při jejím stanovení můžeme najít různá omezení například i v kvalitě rozpouštědel různých výrobců. Je vhodné testovat pouze možnosti, které mohou nastat, proto se reproducibility určuje jen u metod, které předpokládají měření na více místech, jako v případě mezinárodních multicentrických studií.

Správnost (Accuracy) vyjadřuje vztah získaných hodnot k správné hodnotě. Pokud se nejedná o vzorek ve složité matrici, je možné ho porovnat se standardem. V bioanalytických studiích se téměř vždy vyskytují složité matrice, proto se správnost vyjadřuje jako *analyte recovery*. Množství získané po provedení celé analýzy včetně přípravy. V případě, že analyzujeme látky, k nimž nelze získat čistou matici (bez analytu), používáme metodu standardního přídatku.

Požadavek **linearity** zdánlivě jednoduše stanovuje, že závislost odezvy detektoru na koncentraci musí být lineární v celém rozsahu validované metody. Nejsnazším testem linearity je stanovení regresního koeficientu. Na každé úrovni je přitom nutné měřit alespoň tři vzorky.

Rozsah (Range) metody je interval mezi nejmenší a největší koncentrací, pro které je možné metodou měřit správně, přesně a s lineární odezvou. Rozsah, kterého je nutno dosáhnout, je závislý na účelu validované metody. S rozsahem úzce souvisí stanovení limitů detekce a kvantifikace. Rozsah je v podstatě vymezen spodním (LLOQ) a horním (ULOQ) limitem kvantifikace. Mezi těmito dvěma limity kvantifikace je pro biologické vzorky vyžadována přesnost do 15 % (s výjimkou blízkého okolí LLOQ, poslední bod, kde je povolena přesnost 20 %). Analogicky správnost vyjádřená jako relative standard bias smí v rozsahu dosáhnout hodnoty maximálně $\pm 15\%$ (s výjimkou blízkého okolí LLOQ, kde je povolena správnost $\pm 20\%$). Spolu s limity kvantifikace (LLOQ, ULOQ) je vyžadováno také stanovení limitu detekce (LOD).

Specificita HPLC analýzy se dokladuje většinou porovnáním chromatogramu prázdné blankové biomatrice a chromatogramu blankové biomatrice, ke které byly přidány standardy analytů (stanovovaná látka, její metabolity a vnitřní standard). Takto je dokladováno, že v okolí retenčních časů, kde se eluují jednotlivé analyty nejsou v čisté („blankové nespíkeované“) biomatrici přítomny žádné interferující balastní píky.

Robustnost bioanalytické metody je dokladována stabilitou (odolností) metody vůči malým změnám fyzikálně-chemických veličin (teplota, pH...). Pokud je metoda

robustní, neměla by malá změna některé veličiny výrazně ovlivnit kvalitu analytických výsledků.

Stabilitní studie prováděné během validace mají prokázat, jak se mění koncentrace analytu přítomného v roztoku nebo biomatrici v závislosti na čase (Long-Term Stability, Stock Solution Stability, Post-Preparative Stability). Prokazuje se rovněž stabilita analytů v biomatrici při jejím opakovaném rozmrazení a zmrazení z $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zpět (Freeze and Thaw Stability).

Test způsobilosti (System Suitability Test, SST) je nedílnou součástí každé validace. Jedná se o soubor podmínek, které musí být splněny, abychom mohli provést analýzu. Test způsobilosti stanoví podmínky, při kterých je možné prohlásit, že systém pracuje za stejných podmínek jako v čase validace. Jde o ověření způsobilosti systému, které je prováděno s roztoky standardních látek. Běžně uváděnými parametry jsou symetrie píku, rozlišení (počet teoretických pater pro analýzy s jedním píkem), poměr signálu k šumu a opakovatelnost. Ne vždy musí být uvedeny všechny. Výběr parametrů závisí na účelu, ke kterému má metoda sloužit, a na uvážení vývojového analytika, který zná limity metody. Například pro limitní zkoušky nečistot je nutné uvést poměr signálu k šumu, který však není nezbytný u stanovení obsahu čisté substance. SST se provádí před zahájením každé větší série analýz s použitím modelového namíchaného vzorku k ověření kvality separace a citlivosti detekce.

4. Experimentální část a výsledky

4.1. Přístroje a chemikálie

4.1.1. Chemikálie

4.1.1.1. Standardy a prekurzory připravené pro účely disertace

Dimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on hydrochlorid ($C_{23}H_{24}ClNO_4$, $M = 413,89 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

9-*O*-Desmethyldimefluron, 9-hydroxy-3-methoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on hydrochlorid ($C_{22}H_{22}ClNO_4$, $M = 399,87 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

3-*O*-Desmethyldimefluron, 3-hydroxy-9-methoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on hydrochlorid ($C_{22}H_{22}ClNO_4$, $M = 399,87 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

3,9-*O*-Didesmethyldimefluron, 3,9-dihydroxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on, baze ($C_{21}H_{19}NO_4$, $M = 349,38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

***N*-Desmethyldimefluron**, 3,9-dimethoxy-5-(2-methylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on hydrochlorid ($C_{22}H_{22}ClNO_4$, $M = 399,87 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Dimefluron *N*-oxid ($C_{23}H_{23}NO_5$, $M = 393,43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

***C*₇-Reduced dimefluron**, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-ol ($C_{23}H_{25}NO_4$, $M = 379,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Homodimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminopropoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on, baze ($C_{24}H_{25}NO_4$, $M = 391,46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

3,9-Dimethoxy-5-hydroxy-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on ($C_{19}H_{14}O_4$, $M = 306,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) byly syntetizovány v laboratořích Farmaceutické fakulty a Ústavu experimentální farmacie AV ČR.

4.1.1.2. Komerčně získané chemikálie

3-Dimethylaminopropyl chlorid hydrochlorid ($M = 158,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich)

Acetonitril a methanol (oba HPLC grade, Merck, Darmstadt, Německo)

Amoniak (Lachema Brno, Česká republika)

Diethyl azodikarboxylát (Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema Brno, Česká republika)

Dimethylsulfoxid-D6 (Armar AG, Německo)

Ethylacetát (Lachema Brno, Česká republika)

Hydrid sodno-boritý (práškový, 98+%, Janssen-Chimica, Belgie)

Hydroxid amonný (26 % vodný roztok NH₃, Lachema Brno, Česká republika)

Hydroxid sodný (Lachema Brno, Česká republika)

Chlorid sodný nespecifikované kvality pro přípravu chlorovodíku

Chloroform (purum, Lachema, Brno)

Chromatografické desky (200x200x0,5 mm silikagelová vrstva na skleněné desce) pro preparativní tenkovrstvou chromatografii byly připraveny nanesením suspenze **Silica gel 60 HF₂₅₄ for thin-layer chromatography** (Merck, Darmstadt, Německo) ve směsi methanol-triethylamin (1:1, v/v).

Koncentrovaná kyselina sírová (Lachema, Brno, Česká republika)

Kyselina bromovodíková (48 % vodný roztok)

Kyselina chlorovodíková (35 % vodný roztok HCl, Lachema Brno, Česká republika)

Kyselina mravenčí (87 % p.a., Lachema Brno, Česká republika)

Kyselina octová (99 %, analytical grade, HiChem s r.o., Praha, Česká republika)

Kyselina octová (99,8 %, p.a., Lachema Brno, Česká republika)

Kyselina o-fosforečná (85 % p.a., Lachema Brno, Česká republika)

Nonylamin (purum; >97%, Fluka Chemika)

Octan amonný (Fractopur[®], Merck, Darmstadt, Německo)

Peroxid vodíku (30 % vodný roztok, Lachema Brno, Česká republika)

Sulfatasa (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)

Triethylamin (Merck, Darmstadt, Německo)

Triethylamin (purum; >98%, Fluka Chemika)

UHQ voda (připravená pomocí Elgastat UHQ PS *apparatus*, Elga Ltd., Bucks, Anglie)
v práci jen voda

β -Glukuronidasa (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)

4.1.1.3. Zásobní roztoky

Zásobní roztoky standardů metabolitů byly připraveny o koncentraci 10⁻³ mol·l⁻¹. V případě, že se jednalo o standardy bazí (v případě redukovaného dimefluronu, 3,9-*O*-desmethyldimefluronu a homodimefluronu), bylo do roztoku přidáno ekvivalentní množství kyseliny chlorovodíkové.

Pro vývoje analytických metod a jejich validace byli připraveny roztoky jednotlivých metabolitů o koncentraci o řád nižší včetně roztoku směsi dimefluronu a jeho šesti

metabolitů, respektive roztoku směsi dimefluronu, jeho šesti metabolitů a vnitřního standardu, v kterých byla každá komponenta obsažena v koncentraci $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.1.1.4. Použité tlumivé roztoky (pufry)

Nonylaminový pufr byl připraven smícháním 1,83 ml nonylaminu s 990 ml vody, hodnota pH byla upravena na hodnotu 7,4 pomocí roztoku kyseliny *o*-fosforečné ($2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Roztok byl doplněn vodou do 1000 ml.

Triethylammonium acetátový pufr byl připraven jako $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok triethylaminu ve vodě, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7,4 pomocí kyseliny octové ($2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Fosfátový pufr ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ o pH 3) byl připraven rozpuštěním 6,81 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 990 ml vody. Roztok byl následovně upraven na hodnotu pH 3 roztokem kyseliny *o*-fosforečné ($2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a doplněn na 1000 ml vodou.

Ammonium acetátový pufr ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ o pH 3) byl připraven stejným způsobem, rozpuštěním 0,385 g octanu amonného v 1000 ml vody. Hodnota pH byla upravena kyselinou mravenčí.

4.1.2. Přístrojové vybavení

Fluorimetr – **LS 50-B Luminescence Spectrometer** (PerkinElmer, Boston, MA, USA)

Nanašeč TLC desek - **Camag Automatic TLC Plate Coater** (MuttENZ, Švýcarsko)

Centrifuga - **Mikro 22, Hettich Centrifugen** (Tuttlingen, Německo)

Centrifuga - **K80, refrigerated centrifuge** (VEB MLW Medizintechnik, Leipzig, Německo)

NMR spektrometr - **Varian Mercury-Vx BB 300 NMR spectrometer** (Varian, Palo Alto, CA, USA)

Vakuová odparka - **Laborota 4000** (Heidolph Instruments, Scwabach, Německo)

4.1.2.1. Chromatografické systémy

System Thermo Separation

Thermo Electron (dříve Thermo Finnigan) chromatograf (San Jose, CA, USA), SCM1000 solvent degasser, P4000 kvarternární gradientové čerpadlo, AS3000 autosampler se 100- μl smyčkou, UV6000 LP photodiode array detektor s Light Pipe

technologií (totální reflexe paprsku v 5 cm optické dráze kyvety), SN4000 systémový modul.

Připojený na osobní počítač (Intel-Pentium 4CPU 1,6 GHz, RAM 256 MB, HDD 40 GB) vybavený analytickým softwarem ChromQuest 4 (Thermo Electron, Inc., San Jose, CA., USA) pracující pod operačním systémem Windows 2000 (Microsoft Corporation).

Systém Agilent

Agilent 1100 Series Chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) složený z Vacuum Degasser, Binary Pump, Autosampler, Thermostated Column Compartment, Variable Wavelength Detector a ovládaný počítačem (x86 Family 6 Model 8 Stepping 3, RAM 128 MB) s chromatografickým softwarem ChemStation for LC (Rev. A.08.03 [847]) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) pracujícím pod operačním systémem Windows NT (Microsoft Corporation).

HPLC-MS

Systém využitý pro HPLC-MS analýzy se skládal z Esquire 3000 ion trap analyzer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) a kapalinového chromatografu složeného z kvaternární pumpy model 616, photodiode array detektoru model 996, autosampleru model 717+, termostatovaného kolonového prostoru. Celý systém byl řízen softwarem Millennium chromatography manager (Waters, Milford, MA, USA).

4.1.2.2. Chromatografické kolony

předkolona **LiChroCART® 4-4** se stejnou stacionární fází (Merck, Darmstadt, Německo)

LiChroCART® 125-4 mm kolona plněná **LiChrospher®100 RP-C18, 5µm**,

LiChroCART® 125-4 mm kolona plněná **LiChrospher® RP select-B 250-4 mm, 5µm**, (Merck, Darmstadt, Německo)

Discovery 250-4 mm HS-F5, 5 µm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA)

4.2. Příprava standardů

K HPLC stanovení dimefluronu a jeho metabolitů v biologické matrici bylo nutné připravit chemické standardy očekávaných metabolitů a vhodného vnitřního standardu. Purifikované standardy jsou nezbytné jednak pro vývoj chromatografické metody, která má zajistit jejich dostatečnou vzájemnou separaci i separaci od balastních látek, jednak pro validační studie, ve kterých použitím různých koncentrací jednotlivých standardů vyšetřujeme praktický rozsah použitelnosti kalibračních křivek, výtěžnost extrakční metody a další validační parametry potřebné pro charakterizaci metody současného HPLC stanovení parentní látky i jednotlivých jejích metabolitů v odebrané biologické matrici.

Chemické referenční látky (CRL) lékopisných léčiv získáváme zpravidla zakoupením substance (Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg nebo SÚKL), u vyvíjených léčiv od příslušných firem, které se jejich vývojem zabývají.

V našem případě šlo o potenciální léčivo vyvíjené na akademickém pracovišti, standardy jednotlivých metabolitů a vnitřního standardu dimefluronu jsme tedy museli připravit, purifikovat a čistotu a strukturu potvrdit vlastními silami a využitím HPLC, NMR a MS.

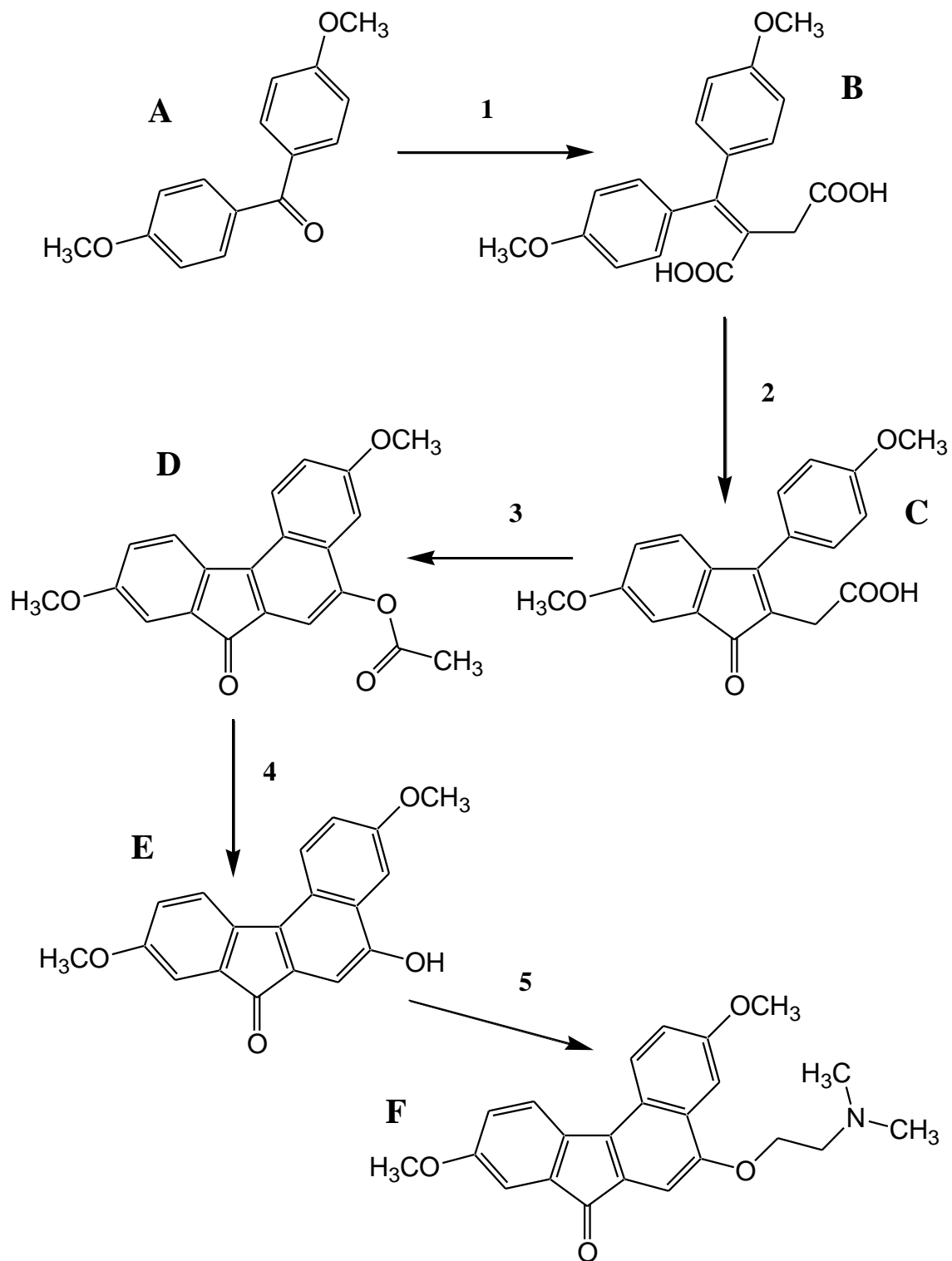
Jak bylo naznačeno v kapitole 3.1.3.1, výběr syntetizovaných struktur vycházel z odhadu způsobu biotransformace dimefluronu během 1. fáze biotransformace. Dalo se předpokládat, že hlavní biotransformační pochody povedou k přeměně dimefluronu na oxidační produkty (*O*-desmethylované metabolity, *N*-desmethylované metabolity, *N*-oxid) a redukované metabolity (zejména *C*₇-redukováný metabolit dimefluronu). Jako vnitřní standard (vzhledem k převaze 7-oxo-derivátů mezi metabolity) byl zvolen vyšší homolog dimefluronu.

4.2.1. Dimefluron

Dimefluron (3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on hydrochlorid) byl parentní látkou podávanou v našich biotransformačních studiích laboratorním zvířatům za účelem poznání jejího osudu (absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece) v organismu. Byl syntetizován na Ústavu experimentální biofarmacie AV ČR v Hradci Králové (Nobilis, 1998). Protože modifikací jeho struktury případně struktury jeho fenolického prekursoru byly připraveny všechny níže

uvedené standardy, považují za nutné uvést alespoň v přehledu jeho totální syntézu, i když nebyla předmětem zájmu mé dizertační práce.

Obr. 18: Totální syntéza dimefluronu



Syntéza dimefluronu vychází z 4,4'-dimethoxybenzofenonu (**A**). Stobbeho kondenzací (**1**) s jantaranem ethylnatým a *tert*-butoxidem draselným v bezvodém tetrahydrofuranu získáme lakton kyseliny **B** a po hydrolýze pak kyselinu bis 4,4-(*p*-methoxyfenyl)-itakonovou (**B**). Intramolekulární Friedel-Craftsovou acylací ve vychlazené kyselině sírové (**2**) dojde k uzavření pětičlenného kruhu za tvorby kyseliny 6-methoxy-3-(4-methoxyfenyl)-2-indenyloctové (**C**), která pak varem v prostředí acetanhydridu (**3**) poskytne 5-acetoxy-3,9-dimethoxy-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on (**D**). Jeho alkalickou hydrolýzou (**4**) získáme 5-hydroxy-3,9-dimethoxy-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on (**E**). Williamsonovou syntézou (**5**) dokončíme z tohoto prekursoru syntézu dimefluronu (**F**), jehož base se převede na hydrochlorid, formu rozpustnou ve vodě. Fenol (**E**) a dimefluron (**F**) se používaly k přípravě dalších níže zmíněných standardů.

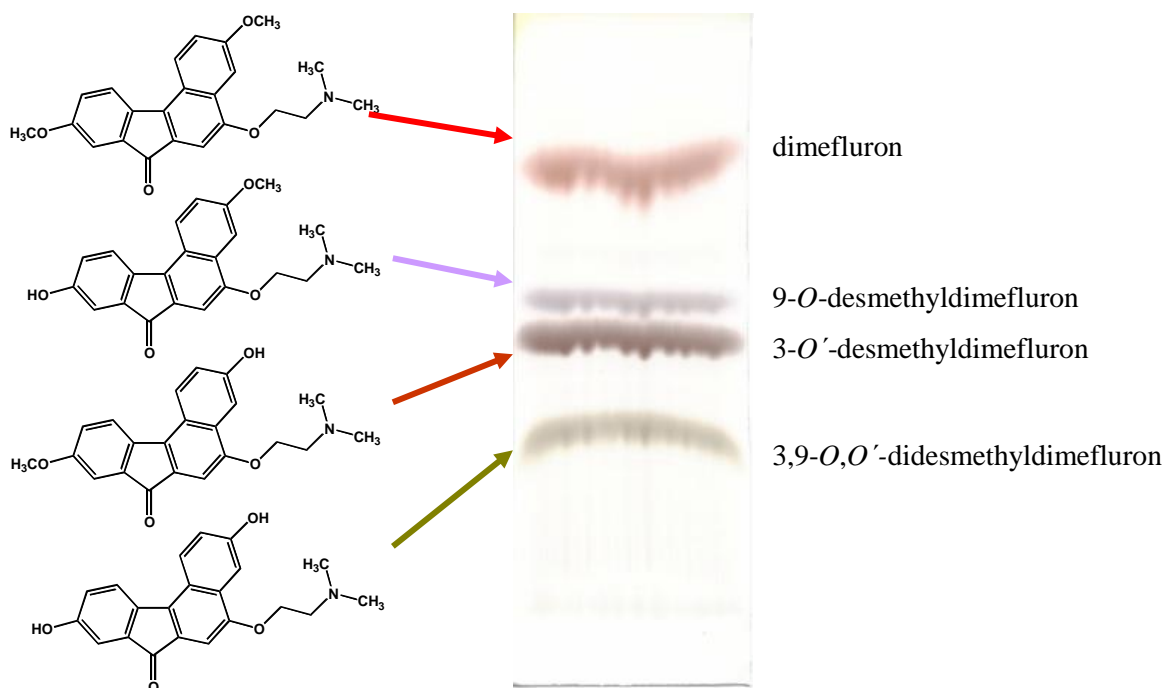
4.2.2. *O*-Desmethylace dimefluronu

O-Desmethylace dimefluronu byla prováděna varem dimefluronu s 48 % vodným bromovodíkem v prostředí kyseliny octové (podrobnosti viz 6.1.1). Za těchto podmínek vznikla reakční směs obsahující dimefluron, 9-*O*-desmethyldimefluron, 3-*O'*-desmethyldimefluron a 3,9-*O,O'*-didesmethyldimefluron (viz Obr. 19). Tato směs byla separována preparativní tenkovrstvou chromatografií (skleněné desky 200 x 200 mm s 0,5 mm vrstvou Kieselgelu 60H nanesenou na sklo v suspenzi Kieselgelu ve směsi methanol-triethylamin) přístrojem Camag. Po nanesení pruhu zahuštěné reakční směsi na start byla každá deska vyvíjena v soustavě chloroform-methanol-triethylamin (70:10:5 až 80:5:5, v/v/v).

Jak je patrné z TLC chromatogramu, reakční směs se velmi dobře rozdělila na červenou koncentrační zónu dimefluronu, fialovou zónu 9-*O*-desmethyldimefluronu, červenohnědou zónu 3-*O'*-desmethyldimefluronu a zelenošedou koncentrační zónu 3,9-*O,O'*-didesmethyldimefluronu. Pruhy silikagelu obsahující jednotlivé barevné rozdělené látky byly separátně seškrabány do kádinek, vyextrahovány methanolem s použitím sintrového filtru 4. Filtrát byl odpařen do sucha. Izolované *O*-desmethylované deriváty dimefluronu byly podrobeny HPLC (kontrola čistoty) a NMR a MS analýze (potvrzení identity). Pak byly rozpuštěny v etheru a probubláním suchým chlorovodíkem převedeny a krystalické, dobře važitelné soli, které byly používány při vývoji a validaci HPLC metody stanovení dimefluronu a jeho metabolitů. Výsledky NMR a MS analýz jsou uvedeny publikaci v kapitole 6.1.1.

O-Desmethylace dimefluronu pomocí 1 M roztoku BBr_3 v dichloromethanu za nízké teploty ($-50\text{ }^\circ\text{C}$) byla hůře regulovatelná, poskytovala nejvíce 3,9-*O,O'*-didesmethyldimefluronu jako finálního produktu *O*-desmethylace.

Obr. 19: Preparativní TLC chromatogram reakční směsi z *O*-desmethylace dimefluronu



4.2.3. *N*-Desmethylace dimefluronu

K selektivní *N*-desmethylaci dimefluronu byl použit diethyl azodikarboxylát, reakce proběhla podle reakčního schématu na Obr. 20.

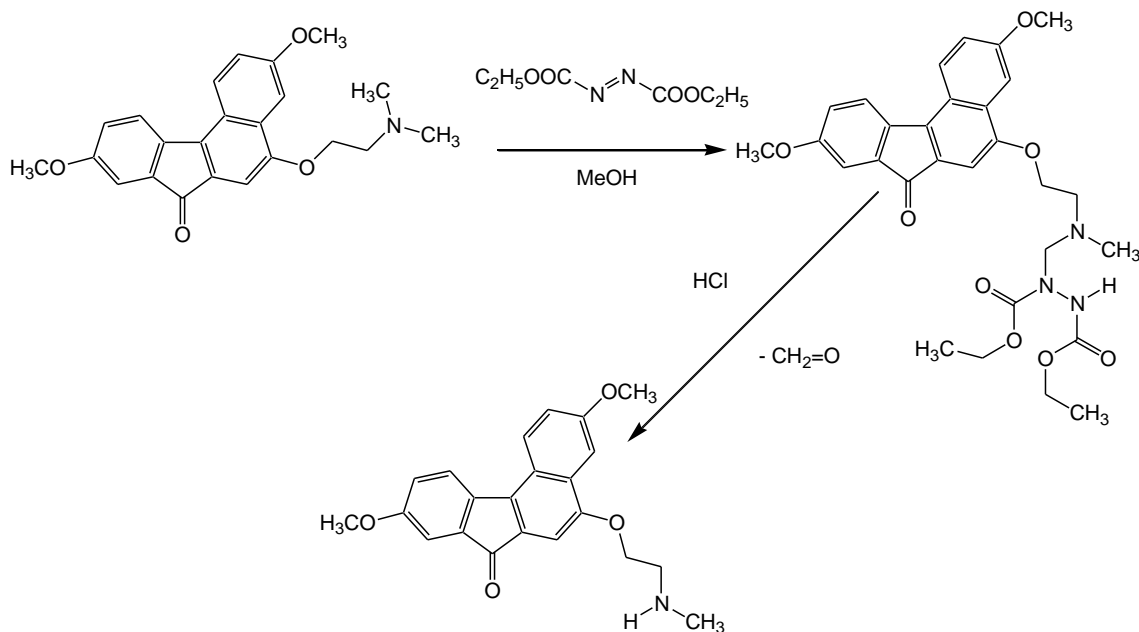
Dimefluron byl rozpustěn v methanolu, byl přidán diethyl azodikarboxylát (přesné podmínky viz 6.1.1). Po hodinovém míchání byla směs krátce povařena pod zpětným chladičem, směs byla okyselena přidáním 10 ml 1 M kyseliny chlorovodíkové a povařena 30 minut pod zpětným chladičem. Methanol byl ze směsi oddestilován, reakční směs byla po zvýšení pH na 10 vyextrahována do octanu ethylatého.

Jak je patrné ze schématu, jde o oxidační reakci na metylu. Dimefluron vytvoří s diethyl azodikarboxylátem komplex, přičemž azoseskupení se redukuje na hydrazoseskupení a metyl, přes který je dimefluron spojen s činidlem, se oxiduje a po hydrolýze komplexu chlorovodíkovou kyselinou odstupuje ve formě formaldehydu.

N-Desmethylovaný dimefluron se opět purifikuje preparativní TLC (viz kapitola 4.2.2), čistota byla testována pomocí HPLC, identita pomocí NMR a MS (viz výsledky

v publikaci 6.1.1). Pro snadnější manipulaci a navažování byla база převedena na sůl (hydrochlorid, viz 4.2.1).

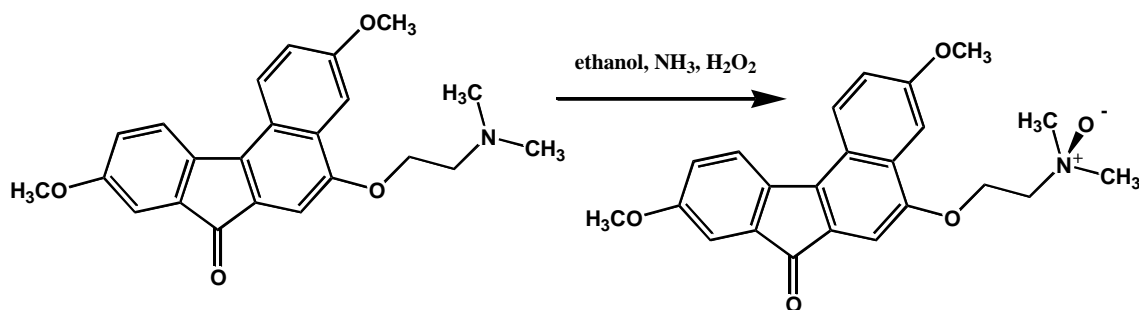
Obr. 20: *N*-desmethylace dimefluronu ethyl azodikarboxylátem



4.2.4. *N*-Oxidace dimefluronu

Pro *N*-oxidaci dimefluronu se osvědčila oxidace peroxidem vodíku v bazickém prostředí při 40 °C. Reakce proběhla jednoznačně, surový *N*-oxid dimefluronu byl vyjmut do chloroformu, vysušen nad síranem sodným a purifikován preparativní TLC (chloroform – methanol – triethylamin, 70:30:5, v/v/v).

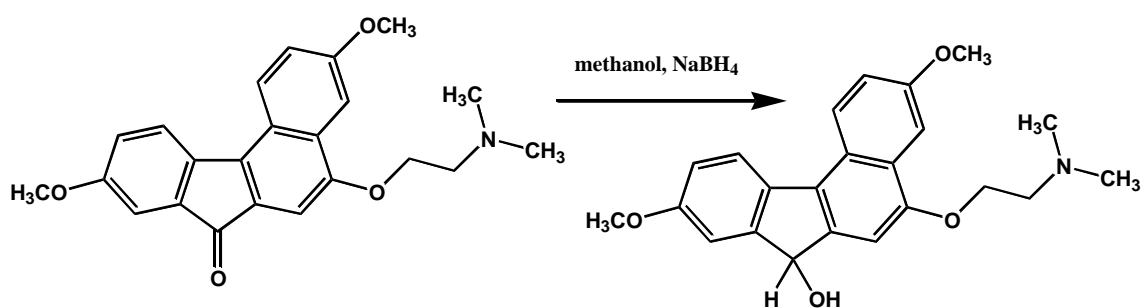
Obr. 21: Příprava dimefluron *N*-oxidu



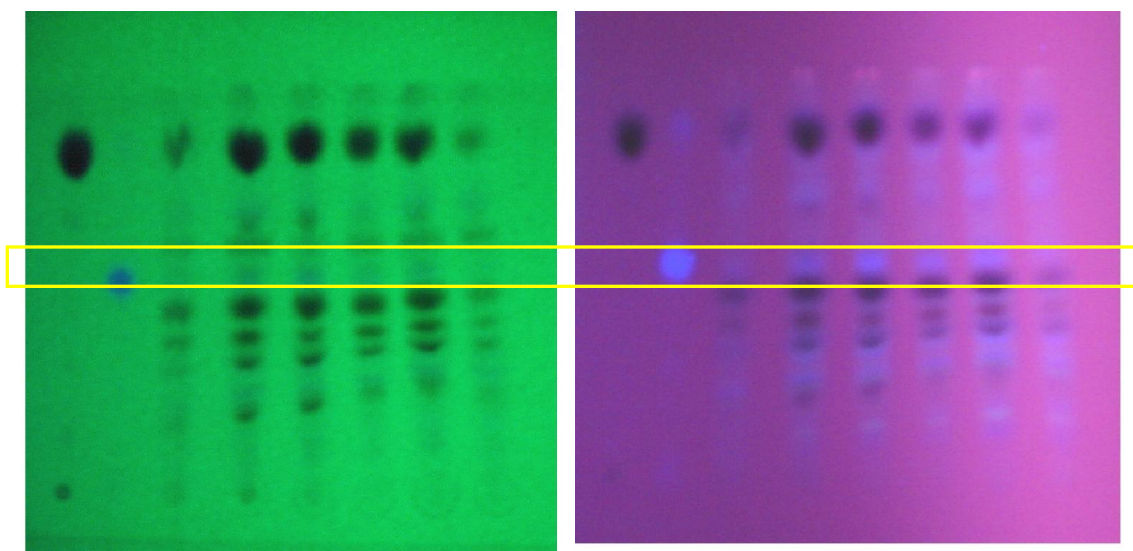
4.2.5. C₇-Redukce karbonylu dimefluronu

Redukovaný dimefluron (3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]-fluoren-7-ol) byl připraven mícháním base dimefluronu v methanolickeém roztoku borohydridu sodného za pokojové teploty po dobu 1 hodiny a následným krátkým povařením. Methanol byl oddestilován, surový produkt byl po alkalizaci vyjmut do ethylacetátu, vysušen nad síranem sodným, zfiltrován a odpařen do sucha. Při použití trojnásobného molárního množství borohydridu reakce proběhla kvantitativně a jednoznačně, nebyla tedy nutná purifikace TLC.

Obr. 22: Příprava redukovaného dimefluronu



Obr. 23: TLC extraktů metabolitů při osvětlení UV zářením o vlnové délce 254 nm (vlevo) a 366 nm (vpravo)



Legenda: Na obou chromatogramech je zleva doprava nanesen standard dimefluronu, standard redukovaného dimefluronu, a následně extrakty z trusu odpovídající vzorkům odebraným 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodin po podání.

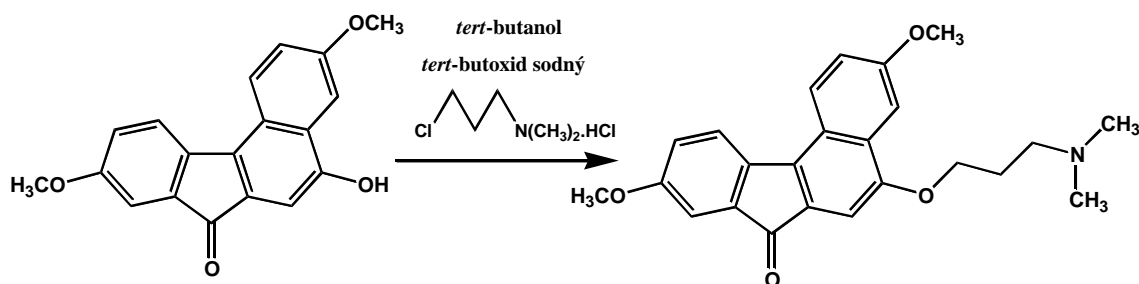
Obr. 23 demonstruje některé spektrální vlastnosti redukovaného dimefluronu a jeho chromatografické chování v TLC. V levé části obrázku je TLC chromatogram ozářený vlnovou délkou 254 nm. Chromatografická deska měla fluoreskující světle zelené pozadí. V pravé části obrázku vidíme tentýž TLC chromatogram ozářený vlnovou délkou 366 nm.

V první stopě obou chromatogramů je zřejmá zhášející skvrna standardu dimefluronu, v druhé stopě pak modře fluoreskující skvrna standardu redukovaného dimefluronu. Třetí až osmá stopa v obou chromatogramech jsou separace extraktů stolice potkana shromážděné vždy za 24 hodin po 1. - 6. dni po perorálním podání dimefluronu. Z těchto analýz je patrná přítomnost poměrně malého množství metabolitu redukovaného dimefluronu ve stolici (viz žlutý rámeček). Více jsou zastoupeny *O*-desmetylované metabolity a *N*-oxid (viz zhášející skvrny pod žlutým rámečkem).

4.2.6. Homodimefluron (vnitřní standard pro HPLC stanovení)

Sodík byl rozpuštěn za bezvodých podmínek v nadbytku *tert*-butanolu, pak byl přidán fenolický prekursor dimefluronu (3,9-dimethoxy-5-hydroxy-7*H*-benzo[*c*]-fluoren-7-on). Reakční směs zmodrala. V několika porcích byla přidána suspence 3-dimethylaminopropyl chlorid hydrochloridu a reakční směs byla zahřívána a míchána za nepřístupu vzdušné vlhkosti cca 1,5 hodiny. Průběh reakce byl sledován opticky, modrá barva reakční směsi (způsobená sodným fenolátem 3,9-dimethoxy-5-hydroxy-7*H*-benzo[*c*]-fluoren-7-onu) postupně přecházela do tmavě červené (barva finálního požadovaného produktu). *Tert*-Butanol byl po skončení reakce oddestilován, po alkalizaci 5 % vodným hydroxidem sodným byl surový produkt vyextrahovaný do ethylacetátu, vysušen nad síranem sodným. Následovala purifikace produktu (3,9-dimethoxy-5-(3-dimethylaminopropyl)-7*H*-benzo[*c*]-fluoren-7-on).

Obr. 24: Williamsonova syntéza vyššího homologu dimefluronu



4.2.7. Převedení na hydrochlorid

Převedení na hydrochlorid bylo prováděno zavedením proudu suchého chlorovodíku do roztoku příslušné látky v tetrahydrofuranu. Vzniklé chloridy se z roztoku vysrážely a byly z něj získány filtrací.

Proud chlorovodíku byl získán jednoduchou reakcí vytěsněním ze soli (NaCl) pomocí koncentrované kyseliny sírové.

Redukovaný dimefluron, 3,9-*O,O'*-didesmethyldimefluron a homodimefluron nebyly převedeny na hydrochlorid.

4.2.8. NMR

NMR analýzy syntetických standardů metabolitů dimefluronu byly měřeny při 300 MHz pro ^1H spektra a 75 MHz pro ^{13}C spektra. Chemický posun δ byl udáván v ppm a couplingová konstanta v Hz.

Analyzovaný vzorek (15 – 20 mg) byl rozpuštěn v deuterovaném dimethylsulfoxidu (0,7 ml) a roztok byl pipetou přenesen do NMR kyvety (203 mm délka, 5 mm průměr).

Výsledky NMR analýz jsou popsány v publikaci v kapitole 6.1.1.

4.2.9. MS

Hmotnostní spektra připravených standardů byla měřena v rozsahu m/z 15 - 1000 v pozitivním i negativním iontovém módu za ionizace elektrosprejem. Spektra byla měřena metodou přímé aplikace do elektrospreje. Průtok sušícího plynu byl $4 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ a tlak 10 psi (68 948 Pa). Jeho teplota byla 300 °C. Vzorek byl rozpuštěn ve směsi acetonitrilu a vody (1:1, v/v).

Výsledky MS analýz jsou podrobně popsány v publikaci uvedené v kapitole 6.1.1.

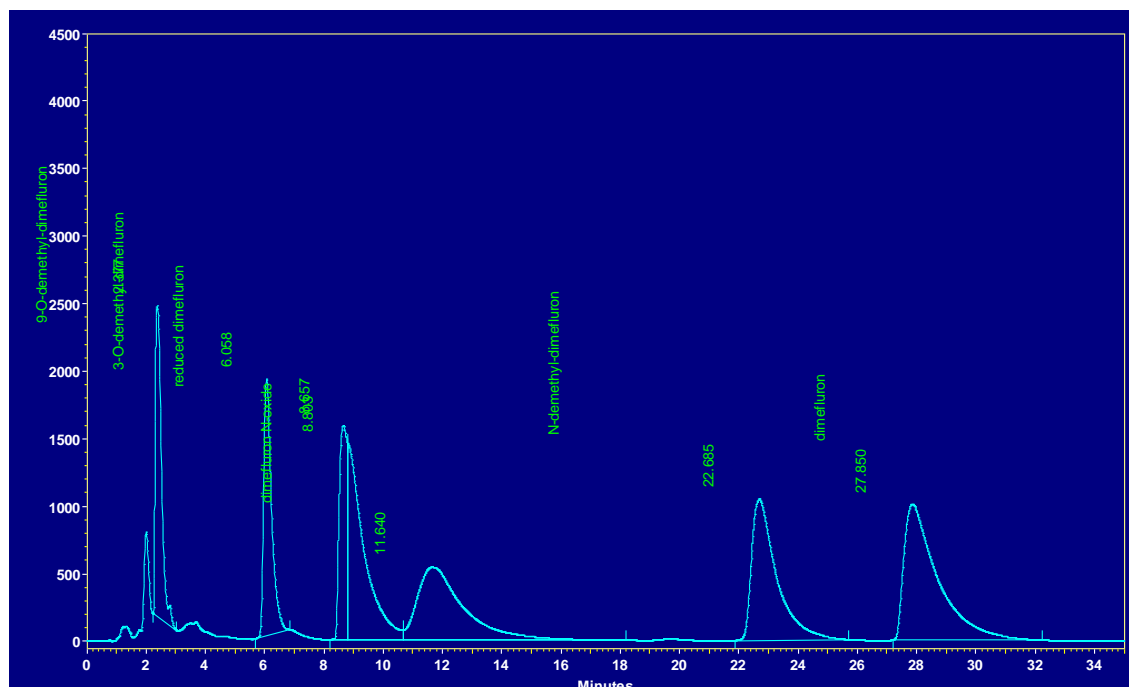
4.3. Analytická část

Hlavní část analytické práce této disertace byla věnována vyvoji a validaci bioanalytické metody stanovení dimefluronu a jeho metabolitů. Práce na této metodě je popsána v publikaci v kapitole 6.1.1., proto dále uvedu jen shrnutí vývoje metody a budu se soustředit na části vývoje, které byly v práci zmíněny okrajově.

4.3.1. Vývoj bioanalytické metody

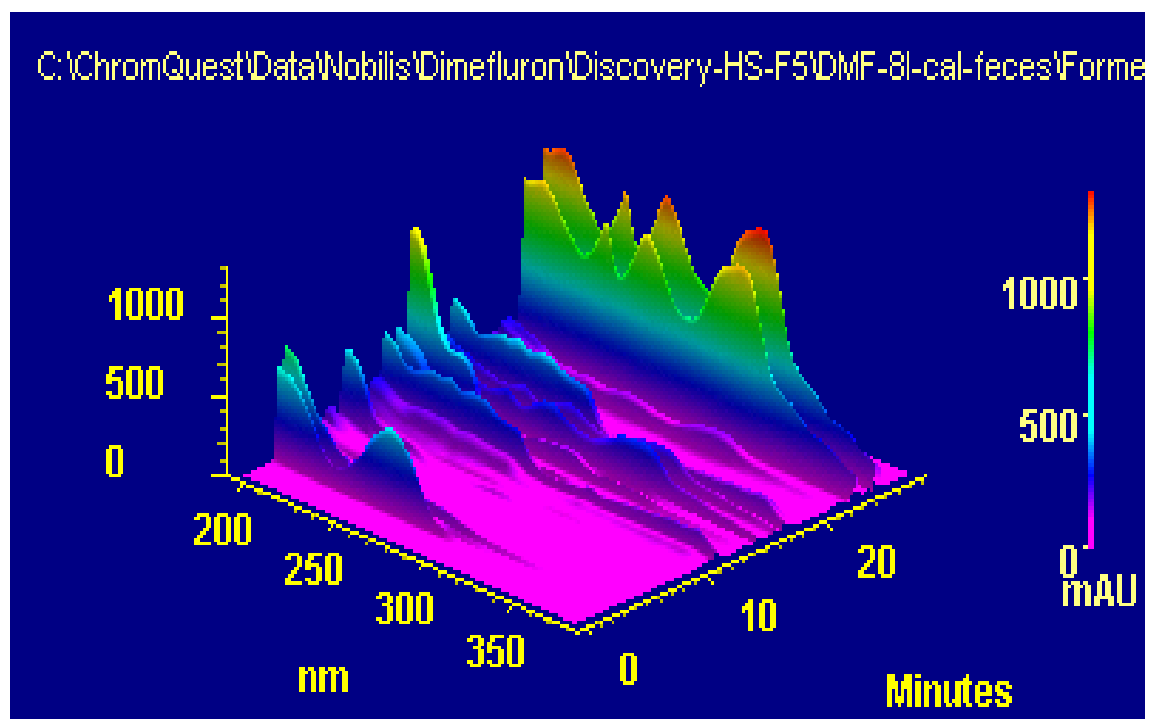
Vývoj bioanalytické metody započal za chromatografických podmínek, které byly užity při stanovení benfluronu, jenž je předchůdcem dimefluronu. Pro nevyhovující výsledky byly během vývoje měněny chromatografické podmínky. Během těchto změn byly testovány i další chromatografické kolony. Chromatogramy směsi dimefluronu a jeho metabolitů na testovaných kolonách, které nejsou součástí publikace jsou ukázány na následujících obrázcích (Obr. 25 a Obr. 26). Složení mobilní fáze se gradientově měnilo. Schéma gradientové eluce popsané v kapitole 6.1.1. je znázorněno na Obr. 27.

Obr. 25: HPLC záznam chromatogramu dimefluronu a jeho šesti metabolitů na koloně LiChrospher 100 RP-18 užívané pro benfluron



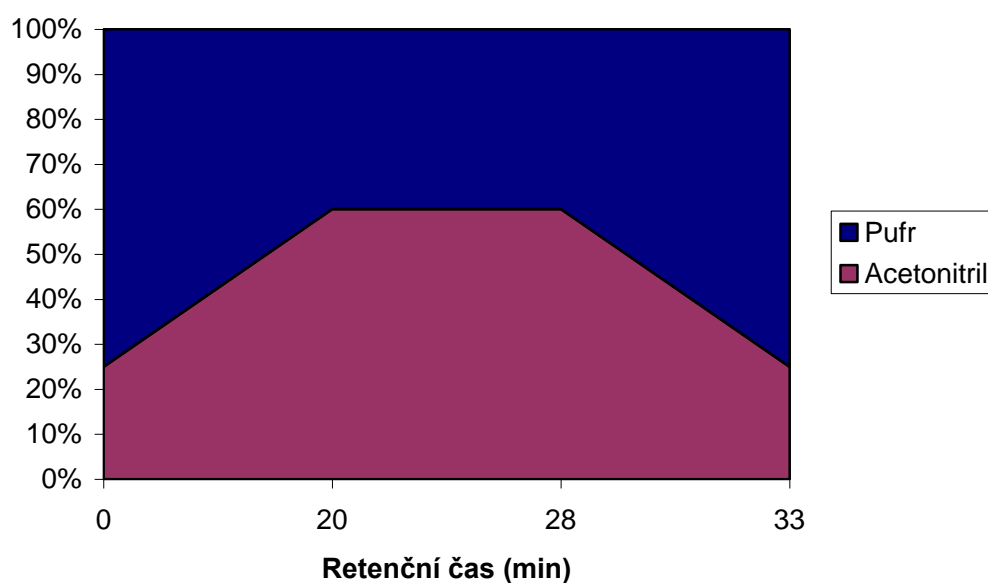
Legenda: Užitá kolona LiChrospher 100 RP-18 5 mm, 125 mm x 4 mm, Merck, Darmstadt; mobilní fáze nonylaminový pufr o pH 7,4 : acetonitril (1:2; v/v); objem smyčky 100 μ l; průtok 1 ml/min; UV detekce (317nm)

Obr. 26: 3D chromatogram reálného vzorku trusu potkana získaný na koloně Discovery HS F5



Legenda: Kolona Discovery HS F5 250 x 4 mm, 5 μm (Supelco); mobilní fáze acetonitril a fosfátový pufr (0,05 M KH_2PO_4 , pH = 3), v lineárně gradientovém módu viz Obr. 27; průtok 1 ml·min⁻¹; detekce UV 317 nm a 367 nm a ve skenu 195 – 400 nm

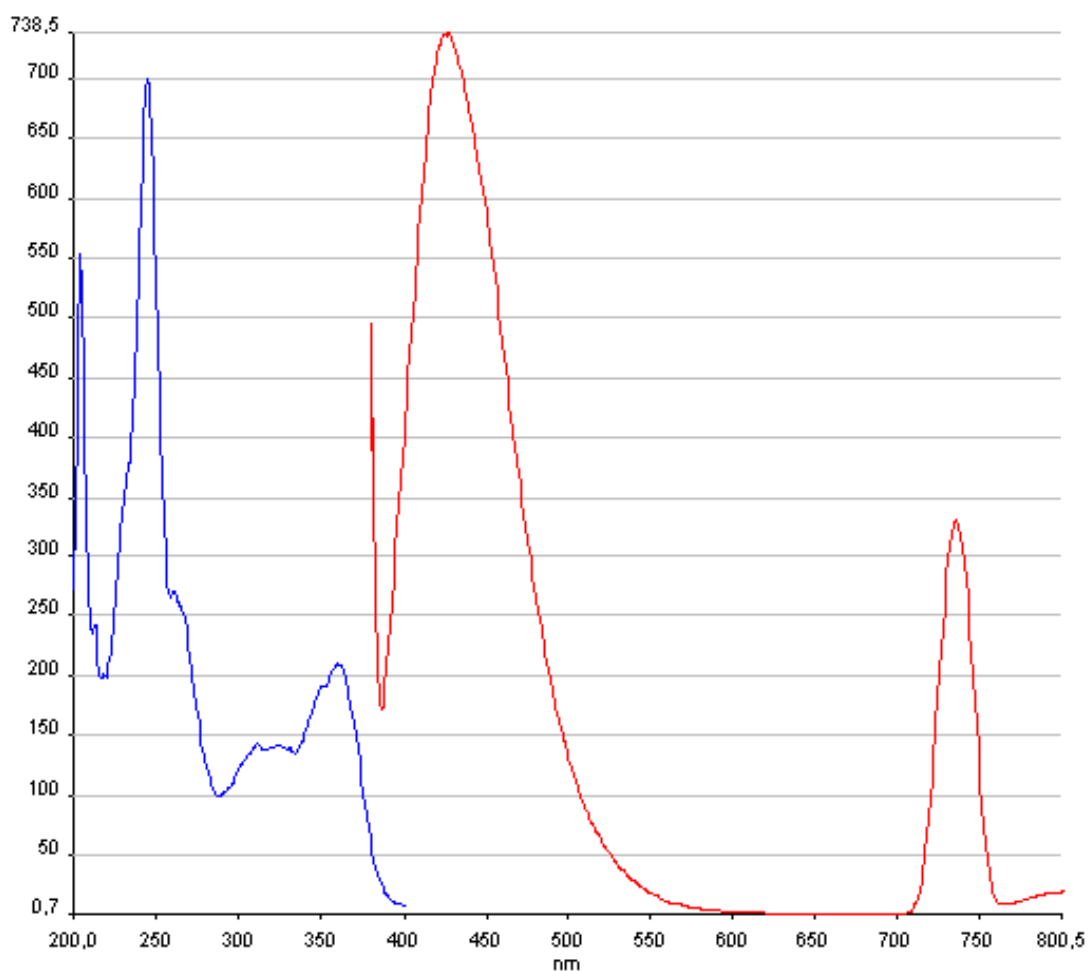
Obr. 27: Gradient mobilní fáze



Pro detekci byl vybrán UV detektor s diodovým polem. Dimefluron poskytuje UV-VIS spektrum s řadou výrazných maxim. Jeho C₇ redukované deriváty mají spektrum chudší. Obě spektra jsou zobrazena v kapitole 6.1.1. (Fig. 2). Výhody UV detektoru s diodovým polem jsou jasně patrné na obrázku Obr. 26, kde jsou zřetelně rozpoznatelné píky látek s 7H-benzo[c]fluoren-7-on i 7H-benzo[c]fluoren-7-ol skeletem.

Byla testována možnost využití fluorescenčního detektoru. Spektra C₇ redukovaného dimefluronu jsou zobrazena viz Obr. 28. Dimefluron a jeho metabolity s oxo skupinou v poloze 7 neposkytují fluorescenční spektra.

Obr. 28: Fluorescenční spektrum C₇ redukovaného dimefluronu



Legenda: Modrá – excitační spektrum, hlavní maxima 245, 360,67 nm; červená - emisní spektrum, hlavní maxima 427,40 a 736 nm

Následná validace vyvinuté metody byla prováděna podle norem americké Agentury pro potraviny a léky (FDA). Při validaci byla hodnocena přesnost, správnost, rozsah a linearita.

Vyvinutá metoda byla mírně modifikována pro využití se zapojeným MS detektorem. Zejména byl snížen průtok a s ním byl upraven gradient. Fosfátový pufr byl nahrazen s MS detekci kompatibilním pufrem s octanu amonného.

4.3.2. Příprava vzorků k analýze

4.3.2.1. Extrakce z trusu

Trus potkanů byl třikrát extrahován 20 ml ethylacetátu. Filtrát byl vysušen nad bezvodým síranem sodným a opět zfiltrován. Vody zbavený filtrát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Odparek byl rekonstituován v methanolu a převeden do zábrusové zkumavky, ve které byl odfoukán dusíkem a uskladněn v mrazáku lednice až do doby zpracování a analýzy.

4.3.2.2. Vodný extrakt z trusu

Při odběru samicím potkana byly dvě pětiny denní produkce trusu extrahovány 10 ml vody UHQ. Trus byl rozdroben a rozmíchán magnetickou míchačkou. Vzniklá suspenze byla přeplněna do centrifugačních zkumavek a odstředěna 15 min při 3600 g. Vzniklý supernatant byl převeden po 1 ml do mikrozkušavek a centrifugován 10 min při 10 000 g. Supernatant byl přepipetován po 950 µl do nových mikrozkušavek a nechal se zamrazit v mrazáku lednice. Takto připravený vzorek byl přichystán k dalšímu zpracování.

4.3.2.3. Moč

Denní produkce moče byla odebrána z metabolické klece do odměrné zkumavky, bylo zaznamenáno její množství v mililitrech. Následně byla doplněna vodou UHQ do celého mililitru a rozplněna do mikrozkušavek po 1 ml. Vzorky byly zamrazeny.

4.3.2.4. Inkubace

Části vzorků moče a vzorků získaných vodnou extrakcí byly před analýzou podrobeny působení enzymů. K 250 µl rozmražené moči, respektive vodného extraktu trusu, bylo přidáno 100 µl acetátového pufru o pH 5 a 8 µl buď stejného pufru (vzorek A), nebo

β -glukuronidasy (vzorek B), nebo sulfatasy (vzorek C). 18 hodin byly vzorky inkubovány při 36 °C. Inkubace byla ukončena přidáním 30 μ l amoniaku. Dále bylo ke vzorku přidáno 50 μ l zásobního roztoku vnitřního standardu (10^{-3} M). Po přidání 3 ml ethylacetátu byl roztok 50 sekund třepán na ruční třepačce. Pak byl odstředěn (2 600 g, 12 min) a zamražen (-34 °C, 1,5 hod). Ethylacetátová vrstva, která zůstala nezmražená nad ledem vodné vrstvy, byla slita a odfoukána do sucha proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn ve 2 ml počáteční mobilní fáze (25:75, acetonitril:fofátový pufr o pH 3), centrifugován (10 000 g, 10 min) a přenesen do vialky k nástřiku.

4.4. Biotransformační studie

Dimefluron byl podán potkanům typu Wistar. Všichni jedinci pocházeli ze šlechtitelské stanice v Konárovicích u Kolína. Potkanům byl dimefluron podáván *per os* žaludeční sondou v dávce odpovídající 250 mg na kg živé váhy ve formě nasyceného vodného roztoku.

Pro první pokusy popsané v publikaci 6.1.1. byli vybráni samci.

Hmotnosti potkanů a hmotnosti podaného množství dimefluronu jsou vypsány v následujícím odstavci.

- Samec 1: 290 g (72,6 mg dimefluronu)
- Samec 2: 290 g (72,5 mg dimefluronu)
- Samec 3: 270 g (67,6 g dimefluronu)

Po aplikaci byl každých 24 hodin odebírán trus. Samci potkana byli drženi v klecích vystlaných dřevěnými hoblinami. Experimentální zvířata měla volný přístup k potravě a vodě.

Při dalším pokusu byl dimefluron aplikován samicím, aby mohli být zmonitorovány případné intersexuální rozdíly v metabolismu.

Hmotnosti samic potkanů a hmotnosti podaného množství dimefluronu jsou vypsány v následujícím odstavci.

- Samice 1: 265 g (66,5 mg dimefluronu)
- Samice 2: 285 g (71,2 mg dimefluronu)
- Samice 3: 275 g (68,7 mg dimefluronu)

Při této studii byli odebírány trus a moč každých 24 hodin po podání. Pro získání moči byly samice po dobu experimentu drženy v metabolických klecích za volného přístupu k vodě i stravě.

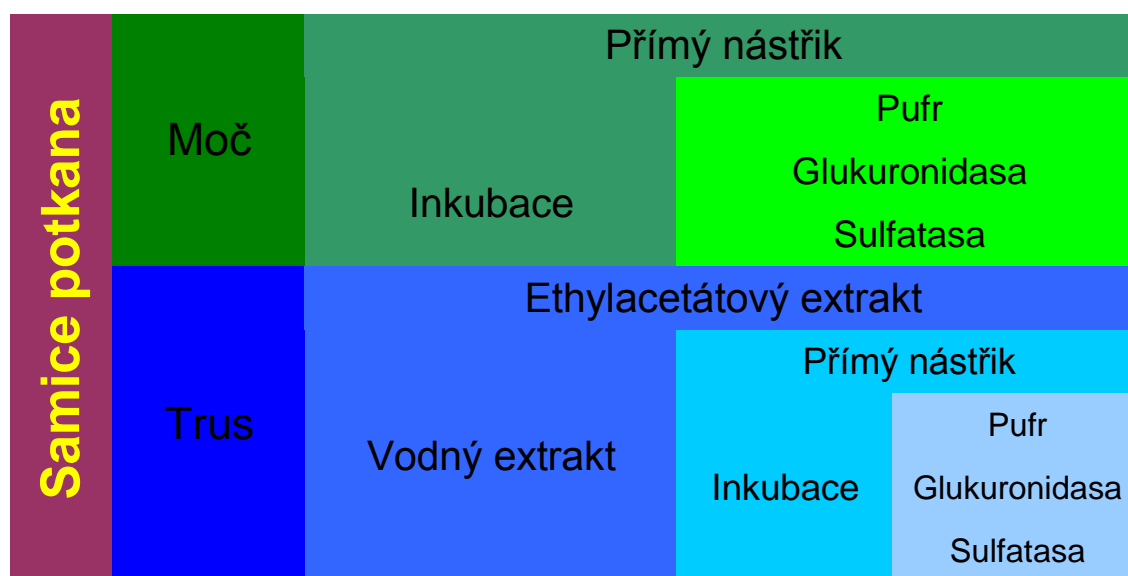
Získané vzorky trusu a moče byly připraveny k analýze, jak je popsáno v kapitole 4.3.2.

Data z analýz prvních vzorků získaných z potkaních samců byla popsána v kapitole 6.1.1. Pomocí MS bylo ve vzorcích identifikováno několik dalších metabolitů 1. fáze. Tabulka s identifikovanými známými i novými metabolity je také součástí publikace v kapitole 6.1.1. Table 1.

4.4.1. Biotransformace u samic

Po podání dimefluronu potkaním samicím byl sbírán trus i moč. Vzorky moče i trusu byly rozděleny podle Obr. 29. Moč byla analyzována přímým nástřikem. Vybrané vzorky moče s odběrů z nejvyšším obsahem metabolitů byly podrobeny inkubačním reakcím s enzymy podle postupu 4.3.2.4. Trus byl extrahován stejně jako trus samců ethylacetátem. Část trusu byla extrahována vodou. Extrakt byl stejně jako vzorek moče rozdělen na část k přímému nástřiku a část, která byla inkubována s enzymy.

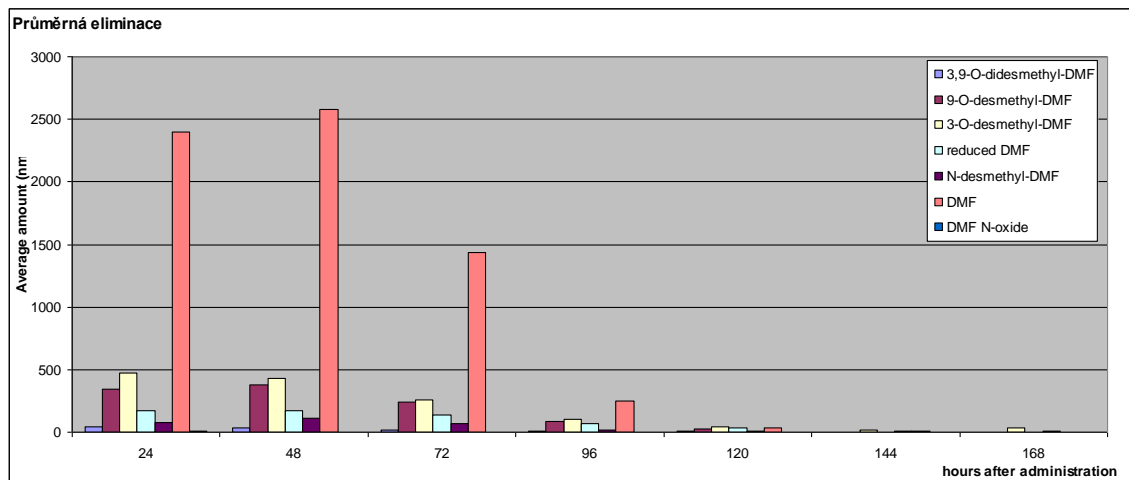
Obr. 29: Rozdělení vzorků získaných od samic potkana



Legenda: Dělení vzorků bylo prováděno podle obrázku, pokud bude čten zleva doprava.

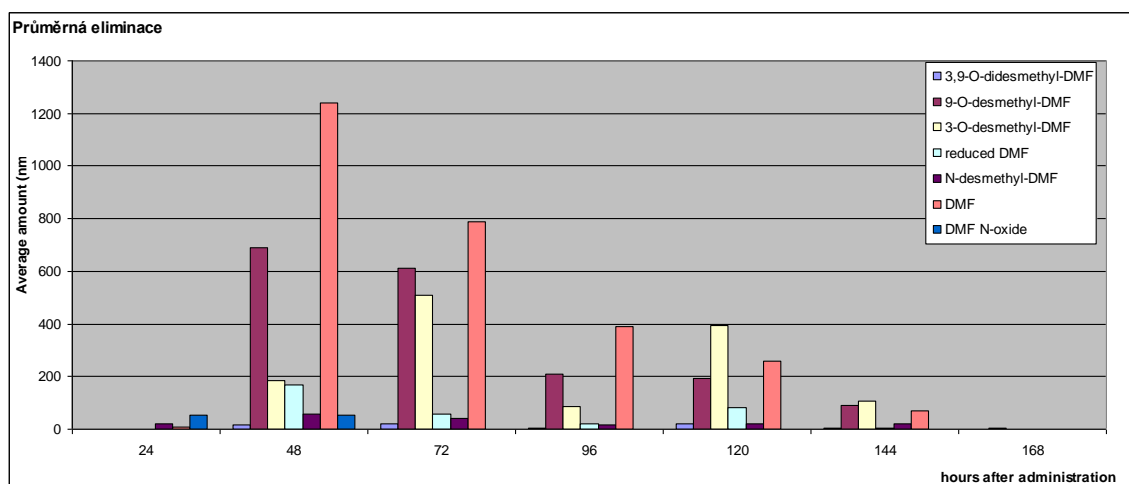
Ethylacetátový extrakt trusu odpovídal složením i analýzou vzorkům získaným od samců potkana. Stejně jako u vzorků získaných od samců je maximum metabolitů eliminováno v druhém až třetím dnu. Proto byly pro analýzu přímých nástřiků moče a inkubaci s enzymy vybrány vzorky v těchto odběrech.

Obr. 30: Eliminace dimefluronu a jeho hlavních metabolitů v čase u samic potkana



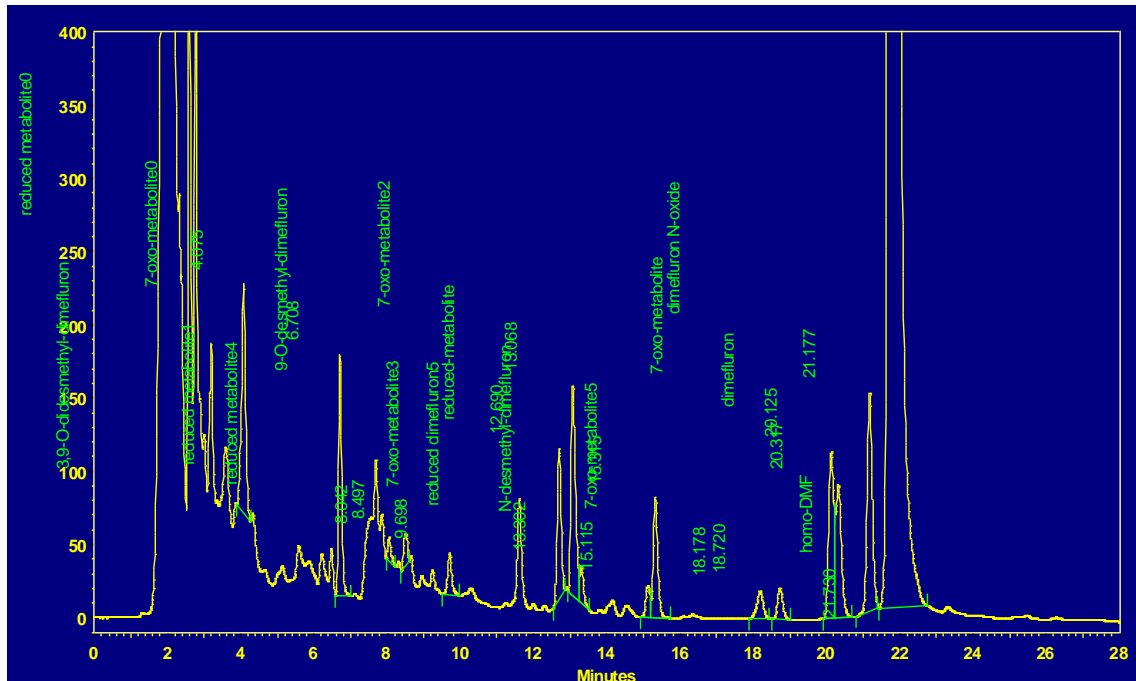
Legenda: Na ose x jsou vyneseny hodiny odběrů vzorku po podání. Na ose y jsou vynesena látková množství.

Obr. 31: Eliminace dimefluronu a jeho hlavních metabolitů v čase u samic potkana



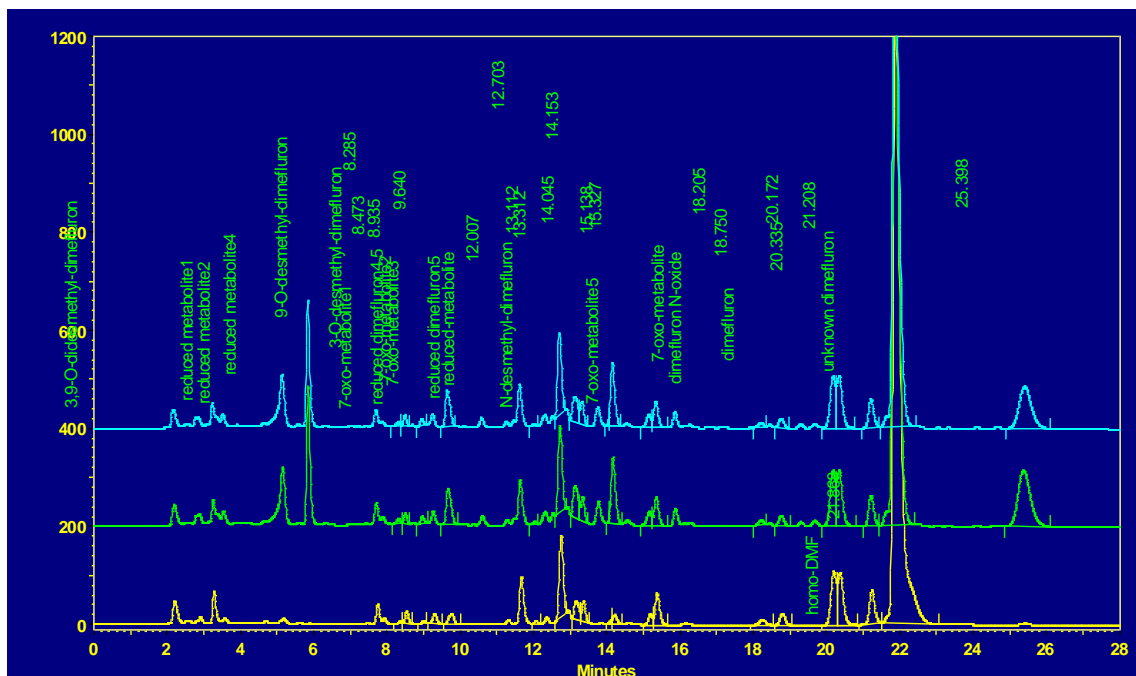
Legenda: Na ose x jsou vyneseny hodiny odběrů vzorku po podání. Na ose y jsou vynesena látková množství.

Obr. 32: Chromatogram přímého nastříku moče



Legenda: Označené píky v čase 4,075 a 6,708 minutě jsou identifikovány podle UV spekter jako metabolity dimefluronu, podle retenčního času předpokládáné metabolity 2. fáze

Obr. 33: Chromatogramy vzorků moče podrobené enzymové inkubaci



Legenda: Pro názornost jsou vzorky inkubované s pufrem, glukuronidasou i sulfatasou vloženy do jednoho obrázku. Odsopdu nahoru vzorek inkubovaný s pufrem, glukuronidasou a sulfatasou.

5. Diskuse a závěr

Většina výsledků je diskutována v příložených publikacích, proto v této kapitole shrnu jen krátce.

Nejprve byly navrženy předpokládané cesty biotransformace dimefluronu na základě předchozích zkušeností s biotransformací benfluronu.

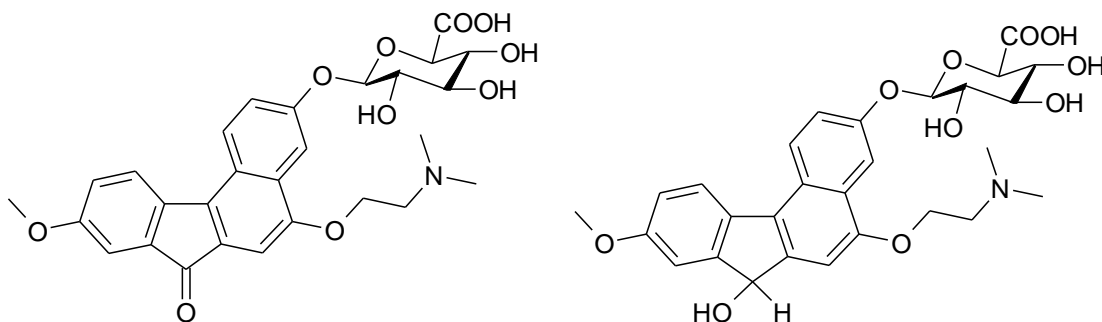
S využitím poměrně jednoduchých chemických modifikací struktury dimefluronu a jeho prekurzoru 3,9-dimethoxy-5-hydroxy-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-onu popsaných detailně v kapitole 4.2 bylo připraveno 6 standardů potenciálních metabolitů (produktů *N*-desmethylace, *O*-desmethylace, *N*-oxidace a karbonylredukce) a vnitřní standard (vyšší homolog dimefluronu). Všechny tyto standardy byly charakterizovány NMR a MS spektry a čistota kontrolována HPLC a TLC analýzami.

S použitím těchto standardů byla vyvinuta a zvalidována nová gradientová bioanalytická metoda stanovení dimefluronu a jeho metabolitů pomocí HPLC využívající pentafluorophenylpropyl kolonu, photodiode-array, fluorescenční a hmotnostně spektrometrický detektor. Experimenty prokázaly analytickou sílu hyphenačního spojení chromatografie s photodiode-array (PDA) a hmotnostně spektrometrickým (MS) detektorem, kdy pouze kombinace retenčních charakteristik a spektrálních údajů (UV, MS) umožnila jednoznačně prokázat strukturu určitého metabolitu. Například 3-*O*-desmethyldimefluron a 9-*O*-desmethyldimefluron mají identická UV a MS spektra, rozlišit se dají pouze chromatograficky (různé retenční charakteristiky v HPLC a TLC, odlišná absorpce ve viditelné oblasti na TLC, viz Obr. 19). V UV spektrální analýze se daly rozlišit pouze dva typy chromoforů [3,9-dimethoxy-5-(2-alkoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-on a 3,9-dimethoxy-5-(2-alkoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-ol, viz UV spektra v 6.1.1] v porovnání se čtyřmi typy chromoforů, které byly identifikovány u benfluronu a jeho metabolitů [96]. Pro identifikaci dalších (nesyntetizovaných) metabolitů dimefluronu tedy byla hyphenační kombinace HPLC-PDA-MS velmi důležitá.

Celkem se podařilo identifikovat ve stolici a moči potkanů deset metabolitů 1. fáze biotransformace a zatím dva metabolity 2. fáze biotransformace dimefluronu. Na identifikaci dalších metabolitů 2. fáze biotransformace se pracuje. Byly rovněž nalezeny podmínky pro chirální separaci racemického redukovaného dimefluronu a prokázala se enantiospecificita v redukci dimefluronu (viz 6.1.2).

hlavní biotransformační reakcí je glukuronidasace, předpokládám, že nalezené metabolity jsou glukuronidy (glukuronová kyselina ve druhém vzorci v Obr. 35 může být alternativně vázána přes sekundární alkoholovou skupinu). K této domněnce mne vede také fakt, že sulfatasa není dostatečně specifický enzym a štěpí i některé glukuronidy.

Obr. 35: Struktura nalezených metabolitů 2. fáze biontransformace



Závěrem bych chtěl konstatovat, že syntetizované standardy metabolitů dimefluronu a vyvinutá a zvalidovaná metoda LLE-HPLC-PDA-MS budou použity k dalším farmakokinetickým a biotransformačním studiím potenciálního antineoplastika dimefluronu. Bude nyní nezbytné potvrdit předpoklad, že na úrovni mikrosomální frakce lidských jater nebo na úrovni lidských hepatocytů probíhají preferenčně *O*-desmethylace dimefluronu a nikoli redukce karbonylu známé z lidské biotransformace benfluronu. Teprve pak by se mohl dimefluron stát zajímavou strukturou, která biotransformací neztrácí své potenciální interkalační vlastnosti zmíněné v kapitole 3.1.4. Postupy navržené k syntéze dimefluronových metabolitů budou využity k syntéze většího množství těchto metabolitů, aby mohl být testován farmakodynamický a toxikologický profil těchto látek (včetně parentního dimefluronu).

6. Přehled publikační činnosti

6.1. Seznam publikací přijatých do tisku ve vědeckých časopisech

6.1.1. Disposition study of a new potential antineoplastic agent dimefluron in rats using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection

P. Císař, M. Nobilis, Z. Vybíralová, M. Holčapek, L. Kolářová, M. Pour, J. Kuneš, J. Klimeš

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 37, Issue 5, 2 April 2005, Pages 1059-1071

První a nejrozsáhlejší předkládaná publikace se zabývá dimefluronem a jeho osudem v živém organismu. Práce začíná syntézou standardů majoritních metabolitů, které byly připraveny a jejich struktura byla potvrzena pomocí NMR i MS technik.

Na tuto syntetickou část navazuje vývoj HPLC stanovení. Během hledání vhodných podmínek bylo vyzkoušeno několik druhů chromatografických kolon. Vývoj podmínek započal na podmínkách, které byly používány pro stanovení benfluronu a jeho metabolitů. Jak bylo popsáno v přechozích kapitolách, benfluron je předchůdce dimefluronu, který obsahuje dvě methoxy skupiny v polohách 3 a 9 na planárním benzo[c]fluorenovém cyklu. Jako nejvhodnější se jevílo použití kolony s vázanými pentafluorophenylpropyl skupinami.

Vyvinutá a zvalidovaná metoda byla užita k studiu biotransformace dimefluronu po podání potkanům. Dimefluron byl podáván ve vodném roztoku *perorálně* žaludeční sondou a následně byl sbírán trus potkanů po dobu sedmi dní od podání.

V HPLC analýzách extraktů trusu byly identifikovány porovnáním retenčních časů a UV spekter předpokládané metabolity, které byly předem připraveny a použity při vývoji validaci. S využitím UV diode-array detektoru mohly být v záznamu identifikovány i píky i dalších metabolitů dimefluronu. K vyřešení jejich konečné struktury bylo využito spojení HPLC-MS. Takto bylo identifikováno deset metabolitů.



Disposition study of a new potential antineoplastic agent dimefluron in rats using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection

P. Císař^a, M. Nobilis^{a,b,*}, Z. Vybíralová^b, M. Holčápek^c,
L. Kolářová^c, M. Pour^d, J. Kuneš^d, J. Klimeš^a

^a Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b Institute of Experimental Biopharmaceutics, Joint Research Center of PRO.MED.CS Praha a.s. and Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovského 1207, CZ-500 03 Hradec Králové, Czech Republic

^c Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, nám. Čs. legií 565, CZ-532 10 Pardubice, Czech Republic

^d Department of Organic and Inorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Received 19 May 2004; received in revised form 22 September 2004; accepted 22 September 2004
Available online 5 November 2004

Abstract

The disposition of a new potential antineoplastic drug dimefluron after an oral administration to rats was investigated. Dimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride, was administered in a single oral dose (250 mg kg⁻¹ of body weight) in the form of an aqueous solution via a gastric probe. Dimefluron metabolites were being searched for in rat faeces. Synthetic standards of the expected phase I metabolites (the products of *O*- and *N*-desmethylation, *N*-oxidation and carbonyl reduction of dimefluron) were prepared and used together with dimefluron and internal standard in the development of two HPLC bioanalytical methods based on different separation principles. The first separation of dimefluron and the phase I metabolites was tested on a 250 mm × 4 mm chromatographic column with LiChrospher 60 RP-selectB 5 μm (Merck) using an isocratic mobile phase containing 0.01 M nonylamine buffer (pH 7.4) and acetonitrile in the 1:2 ratio (v/v). The second separation was performed on a 250 mm × 4 mm chromatographic column Discovery HS F5, 5 μm (Supelco) using a linear gradient mode with the mobile phase containing acetonitrile and phosphate buffer (0.05 M KH₂PO₄, pH 3). The flow rate was 1 ml min⁻¹ in both cases. UV detection was performed in the dual wavelength mode, with 317 nm having been used for dimefluron and all 7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one metabolites, 367 nm for 7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-ol metabolites. A higher homologue of dimefluron served as an internal standard. The identity of the dimefluron metabolites in biological samples was confirmed using HPLC–MS experiments.

The elimination study showed that the concentration maximum for dimefluron and its metabolites in rat faeces was reached 48 h after the administration of the parent drug. *O*-Desmethylated derivatives of dimefluron prevailed among the phase I metabolites.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Potential antineoplastic dimefluron; Metabolites in faeces; HPLC with UV and MS detection

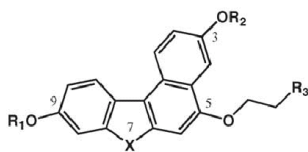
1. Introduction

A potential antineoplastic agent dimefluron [3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride, see Fig. 1, compound 1] was synthesized

in the laboratories of Institute of Experimental Biopharmaceutics in Hradec Králové as one of the proposed structural modifications of benfluron [1].

The starting structure from the group of basic benzo[*c*]fluorene derivatives, benfluron (5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride [2–4]), exhibited an interesting spectrum of pharmacodynamic properties in experiments carried out *in vitro* and *in vivo* [5–8].

* Corresponding author. Tel.: +420 49 5514771; fax: +420 49 5512719.
E-mail address: nobilis@uebfi.cas.cz (M. Nobilis).



Compound	X	R ₁	R ₂	R ₃
1	C=O	-CH ₃	-CH ₃	-N(CH ₃) ₂
2	C=O	-H	-CH ₃	-N(CH ₃) ₂
3	C=O	-CH ₃	-H	-N(CH ₃) ₂
4	C=O	-H	-H	-N(CH ₃) ₂
5	C=O	-CH ₃	-CH ₃	-NH(CH ₃)
6	C=O	-CH ₃	-CH ₃	-N(CH ₃) ₂ O
7	CH-OH	-CH ₃	-CH ₃	-N(CH ₃) ₂
8	C=O	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₂ N(CH ₃) ₂

Fig. 1. Chemical structures of benzo[c]fluorene derivatives under study: dimefluron (DMF) (compound 1); 9-*O*-desmethyl-DMF (compound 2); 3-*O*-desmethyl-DMF (compound 3); 3,9-*O*-didesmethyl-DMF (compound 4); *N*-desmethyl-DMF (compound 5); DMF *N*-oxide (compound 6); C₇-reduced-DMF (compound 7); higher homologue of DMF (compound 8).

The disposition of benfluron in experimental animals was studied by TLC [9–12], HPLC [13–15], MS [16] and NMR [17] methods using a comparison of the metabolites with their synthesized standards [18,19]. During xenobiochemical studies, the biotransformation products of arylhydroxylation, *N*-desmethylation, *N*-oxidation, carbonyl reduction and also of conjugation with glucuronic acid were identified [14,15,20–23] and the enzymes involved in their biotransformation were characterized [24]. The elimination study of benfluron in rats showed that the principal phase I metabolite in faeces was 9-hydroxy-benfluron and that this metabolite was eliminated in the form of a conjugate with glucuronic acid [14,15,23].

Unfortunately, the preclinical tests of benfluron revealed certain negative pharmacokinetic, distribution and xenobiochemical properties, for which its further research and development was terminated. Attention was paid to some structural analogues of benfluron, including its 3,9-dimethoxy derivative, dimefluron.

Dimefluron was tested on rabbits and its potential chronic effects on the cardiac function, biochemical, haematological and other physiological parameters were compared with another intercalating antineoplastic agent, daunorubicin [25–28]. Only some aspects of dimefluron metabolism in vitro and in vivo have been studied so far [29,30].

The goal of this study was to develop chromatographic methods for the disposition studies of dimefluron, since insufficient amount of information about the pharmacokinetics and metabolism of dimefluron in experimental animals has been published to date. For this purpose, chemical reference standards of six expected metabolites of dimefluron and a higher homologue of dimefluron (internal standard) were synthesized and various bioanalytical HPLC methods based

on ultraviolet diode-array and mass spectrometry detection were developed. The most promising of these methods was validated and used for the identification and determination of dimefluron metabolites in biomatrices (extracts from rat faeces).

2. Experimental

2.1. Chemicals, preparations and materials

Dimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[c]fluorene hydrochloride (C₂₃H₂₄ClNO₄, MW = 413.89 g mol⁻¹, Fig. 1, compound 1); 9-*O*-desmethyl-dimefluron, 9-hydroxy-3-methoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[c]fluorene hydrochloride (C₂₂H₂₂ClNO₄, MW = 399.87 g mol⁻¹, Fig. 1, compound 2); 3-*O*-desmethyl-dimefluron, 3-hydroxy-9-methoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[c]fluorene hydrochloride (C₂₂H₂₂ClNO₄, MW = 399.87 g mol⁻¹, Fig. 1, compound 3); 3,9-*O*-didesmethyl-dimefluron, 3,9-dihydroxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[c]fluorene, base (C₂₁H₁₉NO₄, MW = 349.38 g mol⁻¹, Fig. 1, compound 4); *N*-desmethyl-dimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-methylaminoethoxy)-7*H*-benzo[c]fluorene hydrochloride (C₂₂H₂₂ClNO₄, MW = 399.87 g mol⁻¹, Fig. 1, compound 5); dimefluron *N*-oxide (C₂₃H₂₃NO₅, MW = 393.43 g mol⁻¹, Fig. 1, compound 6); C₇-reduced dimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[c]fluorene-7-ol (C₂₃H₂₅NO₄, MW = 379.45 g mol⁻¹, Fig. 1, compound 7) and a higher homologue of dimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminopropoxy)-7*H*-benzo[c]fluorene base (C₂₄H₂₅NO₄, MW = 391.46 g mol⁻¹, Fig. 1, compound 8) were synthesized in our laboratories and used as the standards in the elimination study. Hydrobromic acid (48% in water) and acetic acid (99.8%, p.a., both Lachema Brno, Czech Republic) were used for the *O*-desmethylation of dimefluron. Sodium borohydride (powder, >98%, Janssen-Chimica, Belgium) was employed in the carbonyl reduction of dimefluron. Diethyl azodicarboxylate (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) was used for *N*-desmethylation of dimefluron. Hydrogen peroxide (30% water solution, Lachema Brno, Czech Republic) was used for *N*-oxidation of dimefluron. 3,9-Dimethoxy-5-hydroxy-7*H*-benzo[c]fluorene-7-one (C₁₉H₁₄O₄, MW = 306.31 g mol⁻¹, synthesized in our laboratory) and 3-(dimethylaminopropyl) chloride hydrochloride (MW = 158.07 g mol⁻¹, Sigma-Aldrich) were used for the preparation of the internal standard. Acetonitrile, methanol (both HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany), acetic acid (99%, analytical grade, HiChem s r.o., Prague, Czech Republic), ammonium acetate (Fractapur[®], Merck, Darmstadt, Germany), ammonium hydroxide (26% aqueous solution of NH₃, all Lachema Brno, Czech Republic), ethyl acetate, formic acid (87% p.a.), hydrochloric acid (35% water solution of HCl, analytical grade), orthophosphoric acid (85% p.a.), potassium dihydrogenphosphate, sodium

hydroxide (all analytical grade, Lachema Brno, Czech Republic), nonylamine (purum; >97%), triethylamine (purum; >98%, both Fluka Chemika), ultra-high-quality (UHQ) water (prepared using Elgastat UHQ PS apparatus, Elga Ltd., Bucks, England) were used for the liquid–liquid extraction of biomatrices and chromatography of dimefluron derivatives. Dimethyl sulfoxide- d_6 (Armar AG, Germany) was used in NMR experiments.

Nonylamine buffer was made by mixing 1.83 ml of nonylamine with 990 ml of UHQ water, adjusting to pH 7.4 with a solution of orthophosphoric acid (2 mol l^{-1}) and making up to 1000 ml with water.

Triethylammonium acetate (ammonium acetate) buffer was prepared from a 10 mmol l^{-1} solution of triethylamine (ammonium hydroxide) in UHQ water, pH was adjusted to 7.4 by 2 mol l^{-1} acetic acid.

Phosphate buffer (50 mmol l^{-1} , pH 3) was made by mixing 6.81 g of KH_2PO_4 with 990 ml of UHQ water, adjusting to pH 3 with a solution of orthophosphoric acid (2 mol l^{-1}) and making up to 1000 ml with water.

Ammonium acetate buffer (5 mmol l^{-1} , pH 3) was prepared in an analogous way from 0.385 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ per liter, pH was adjusted to the required value by the addition of formic acid (consumption ca 1.8 ml per liter).

Chromatographic plates ($200 \text{ mm} \times 200 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$ silica gel layers on glass plates) for the preparative thin-layer chromatographic separations of the synthesized standards of dimefluron metabolites were made on a Camag Automatic TLC Plate Coater (Muttenez, Switzerland) using a suspension of Silica gel 60HF₂₅₄ for thin-layer chromatography (Merck, Germany) in a methanol–triethylamine mixture (1:1, v/v) poured on glass plates.

Preparative thin-layer chromatography (TLC) with a mobile phase of chloroform–methanol–triethylamine (70:10:5, v/v/v) was used for the separation of the reaction mixtures. The reaction mixture was dissolved in a minimum volume of the mobile phase, the solution was then transferred onto the start of a chromatographic plate and developed. The colour bands of silica gel, containing individual compounds were scraped off from the chromatogram. Each silica gel portion containing an individual compound was suspended in methanol and silica gel from the suspension was filtered off on a sintered glass filter with porosity under $40 \mu\text{m}$. The filtrate (methanolic solution of an isolated compound) was evaporated to dryness. The purity of each individual compound was evaluated by HPLC with ultraviolet photodiode-array detection (HPLC–DAD), HPLC–MS and NMR experiments.

2.2. NMR analyses

A Varian Mercury-Vx BB 300 NMR spectrometer was used for the NMR analyses of the synthetic standards of dimefluron metabolites. The NMR spectra were recorded at 300 MHz for ^1H , and 75 MHz for ^{13}C . Chemical shifts are given as δ values in ppm, the coupling constants are given in

Hz. Analytical sample (15–20 mg) was dissolved in deuterated dimethyl sulfoxide (0.7 ml) and the solution was transferred via pipette into an NMR tube (203 mm length, 5 mm diameter).

2.3. HPLC–MS analyses

High-performance liquid chromatography–mass spectrometry (HPLC–MS) analyses were performed on an Esquire 3000 ion trap analyzer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and a liquid chromatograph consisting of a model 616 pump with a quaternary gradient system, a model 996 photodiode array detector, a model 717+ autosampler, a thermostated column compartment and a Millennium chromatography manager (all from Waters, Milford, MA, USA). Mass spectra were recorded in the range m/z 15–1000 using the positive-ion and negative-ion electrospray ionization (ESI). The pressure and flow rate of the nebulising gas were 70 psi and 12 l min^{-1} , respectively. The temperature of the drying gas was 365°C . The mass spectrometer was tuned to give an optimum response for m/z 350. The extracts from the rat faeces or synthetic compounds were separated using a linear gradient elution: 0 min–40% A and 60% B, 20 min–80% A and 20% B, 60 min–80% A and 20% B, where A is acetonitrile and B is ammonium acetate buffer ($\text{C} = 5 \text{ mmol l}^{-1}$, pH 3). The samples were dissolved in the mobile phase and $100 \mu\text{l}$ of the solution was injected into HPLC–MS system.

The positive-ion and negative-ion electrospray ionization mass spectra of all compounds were also measured using the direct infusion technique under the following conditions: the flow rate and pressure of the nebulising gas 4 l min^{-1} and 10 psi, respectively, temperature of the drying gas 300°C . For direct infusion ESI experiments, the samples were dissolved in acetonitrile–water (1:1, v/v).

2.4. Syntheses of the standards of expected phase I dimefluron metabolites

2.4.1. *O*-Desmethylation of dimefluron (preparation of compounds 2–4 in Fig. 1 and in Section 2.1)

Dimefluron (1.3 g, 3.36 mmol) was dissolved in a mixture of hydrobromic acid (5 ml) and acetic acid (100 ml) and the solution heated under reflux for 1.5 h. The acids were then evaporated and the reaction mixture was separated by preparative thin-layer chromatography (see Section 2.1). The retention factors and colours of individual separated compounds were as follows: 3,9-*O*-didesmethyl-DMF ($R_f = 0.35$, gray green); 3-*O*-desmethyl-DMF ($R_f = 0.53$, red brown); 9-*O*-desmethyl-DMF ($R_f = 0.61$, violet); dimefluron (DMF; $R_f = 0.89$, red); the isolated bases of compounds 2 and 3 were converted to hydrochlorides and recrystallized.

2.4.1.1. 9-*O*-Desmethyldimefluron, hydrochloride of compound 2 ($\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4$, $MW = 399.87 \text{ g mol}^{-1}$). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.10 (s, 1H, OH), 10.01 (bs,

1H, N.HCl), 8.41 (d, 1H, $J=9.34$ Hz, H1), 7.86 (d, 1H, $J=8.24$ Hz, H11), 7.65 (d, 1H, $J=2.75$ Hz, H4), 7.33 (dd, 1H, $J=9.34$ Hz, $J=2.75$ Hz, H2), 7.07 (s, 1H, H6), 6.97 (d, 1H, $J=2.47$ Hz, H8), 6.86 (dd, 1H, $J=8.24$ Hz, $J=2.47$ Hz, H10), 4.579 (t, 2H, $J=4.67$ Hz, OCH₂), 3.96 (s, 3H, OCH₃), 3.66 (t, 2H, NCH₂), 2.89 (s, 6H, NCH₃)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 193.7, 159.3, 158.1, 152.5, 137.3, 136.3, 134.6, 130.8, 128.9, 127.2, 124.1, 123.6, 120.5, 119.7, 111.9, 103.1, 100.2, 63.2, 55.9, 55.4, 42.9.

Positive-ion ESI mass spectra of 9-*O*-desmethyl-dimefluron base, C₂₂H₂₁NO₄, MW=363; MS: m/z 402, [M+K]⁺, 5%; m/z 386, [M+Na]⁺, 2%; m/z 364, [M+H]⁺, 100%. MS² of 364: m/z 319, [M+H-CH₃NHCH₃]⁺, 100%. Negative-ion ESI mass spectra: MS: m/z 362, [M-H]⁻, 100%; m/z 290, [M-H-(CH₃)₂NCH₂CH₂]⁻, 36%. MS² of 362: m/z 317, [M-H-CH₃NHCH₃]⁻, 2%; m/z 290, [M-H-(CH₃)₂NCH₂CH₂]⁻, 100%; m/z 275, [C₁₇H₇O₄]⁻, 15%.

2.4.1.2. 3-*O*-Desmethyl-dimefluron, hydrochloride of compound 3 (C₂₂H₂₂ClNO₄, MW = 399.87 g mol⁻¹). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.48 (bs, 1H, OH), 8.39 (d, 1H, $J=9.07$ Hz, H1), 7.94 (d, 1H, $J=8.25$ Hz, H11), 7.58 (d, 1H, $J=2.20$ Hz, H4), 7.31 (dd, 1H, $J=9.06$ Hz, $J=1.97$ Hz, H2), 7.07 (d, 1H, $J=2.20$ Hz, H8), 7.02 (s, 1H, H6), 6.99 (dd, 1H, $J=8.24$ Hz, $J=2.20$ Hz, H10), 4.63–4.54 (m, 2H, OCH₂), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.70–3.60 (m, 2H, NCH₂), 2.92 (s, 6H, NCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 193.3, 159.7, 158.1, 152.4, 137.2, 136.5, 136.2, 131.3, 128.3, 127.4, 123.8, 122.9, 120.9, 118.1, 110.5, 105.9, 99.6, 63.1, 55.9, 55.6, 43.1.

Positive-ion ESI mass spectra of 3-*O*-desmethyl-dimefluron base, C₂₂H₂₁NO₄, MW=363; MS: m/z 402, [M+K]⁺, 6%; m/z 386, [M+Na]⁺, 3%; m/z 364, [M+H]⁺, 100%. MS² of 364: m/z 319, [M+H-CH₃NHCH₃]⁺, 100%. Negative-ion ESI mass spectra: MS: m/z 362, [M-H]⁻, 100%. MS² of 362: m/z 317, [M-H-CH₃NHCH₃]⁻, 3%; m/z 290, [M-H-(CH₃)₂NCH₂CH₂]⁻, 100%; m/z 275, [C₁₇H₇O₄]⁻, 10%.

2.4.1.3. 3,9-*O*-Didesmethyl-dimefluron, base of compound 4 (C₂₁H₁₉NO₄, MW = 349.38 g mol⁻¹). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.35 (d, 1H, $J=9.21$ Hz, H1), 7.83 (d, 1H, $J=8.10$ Hz, H11), 7.50 (d, 1H, $J=2.75$ Hz, H4), 7.23 (dd, 1H, $J=9.21$ Hz, $J=2.75$ Hz, H2), 6.96 (s, 1H, H6), 6.92 (d, 1H, $J=2.47$ Hz, H8), 6.83 (dd, 1H, $J=8.10$ Hz, $J=2.47$ Hz, H10), 4.29 (t, 2H, $J=5.21$ Hz, OCH₂), 2.89 (t, 2H, $J=5.22$ Hz, NCH₂), 2.37 (s, 6H, NCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 193.8, 157.9, 157.9, 152.9, 137.1, 136.6, 134.9, 131.5, 128.3, 127.4, 123.9, 122.9, 120.7, 119.4, 111.7, 105.6, 99.3, 66.2, 57.6, 45.4.

Positive-ion ESI mass spectra of 3,9-*O*-desmethyl-dimefluron base, C₂₁H₁₉NO₄, MW=349; MS: m/z 350, [M+H]⁺, 100%. MS² of 350: m/z 305, [M+H-CH₃NHCH₃]⁺, 100%. Negative-ion ESI mass spectra: MS: m/z 697, [2M-H]⁻, 4%; m/z 348, [M-H]⁻,

100%. MS² of 348: m/z 303, [M-H-CH₃NHCH₃]⁻, 3%; m/z 276, [M-H-(CH₃)₂NCH₂CH₂]⁻, 100%.

2.4.2. *N*-Desmethylation of dimefluron (preparation of compounds 5 in Fig. 1 and Section 2.1)

Dimefluron base (1.5 g, 4.7 mmol) was dissolved in methanol (40 ml), diethyl azodicarboxylate (1.5 g, 8.6 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. The temperature was then shortly elevated to the boiling point of methanol. The reaction mixture was acidified by 100 ml of 1 M HCl, heated and maintained at reflux for half of an hour. Methanol was evaporated and pH of the reaction mixture was adjusted to value of 10 with 1 M NaOH. The reaction mixture was extracted into ethyl acetate, the organic layer filtered, dried over anhydrous Na₂SO₄, and the solvent removed under reduced pressure. *N*-Desmethyldimefluron was isolated from the reaction mixture using preparative TLC (see Section 2.1) and then converted into the corresponding hydrochloride.

2.4.2.1. *N*-desmethyldimefluron, hydrochloride of compound 5 (C₂₂H₂₂ClNO₄, MW = 399.87 g mol⁻¹). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.25 (bs, 2H, NH.HCl), 8.49 (d, 1H, $J=9.34$ Hz, H1), 7.99 (d, 1H, $J=8.51$ Hz, H11), 7.77 (d, 1H, $J=1.95$ Hz, H4), 7.42–7.32 (m, 1H, H2), 7.15–7.06 (m, 2H, H6, H8), 7.06–6.98 (m, 1H, H10), 4.57–4.45 (m, 2H, OCH₂), 3.99 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.55–3.42 (m, 2H, NCH₂), 2.68 (bs, 3H, NCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 193.3, 159.8, 159.4, 153.0, 136.8, 136.3, 136.2, 130.9, 129.2, 127.2, 123.9, 123.8, 120.6, 118.4, 110.6, 103.7, 100.0, 64.3, 56.0, 55.9, 47.4, 33.0.

Positive-ion ESI mass spectra of *N*-desmethyldimefluron base, C₂₂H₂₁NO₄, MW=363; MS: m/z 727, [2M+H]⁺, 2%; m/z 364, [M+H]⁺, 100%; m/z 333, [M+H-CH₃NH₂]⁺, 5%. MS² of 364: m/z 333, [M+H-CH₃NH₂]⁺, 100%; m/z 321, [M+H-CH₃N=CH₂]⁺, 5%; m/z 307, [M+H-CH₃N=CHCH₃]⁺, 17%.

2.4.3. Reduction of the carbonyl function into a secondary alcoholic group (preparation of compound 7 in Fig. 1)

The base of dimefluron (1 g, 2.65 mmol) was dissolved in methanol (40 ml), sodium borohydride (0.3 g, 7.94 mmol) was added to the solution and the reaction mixture was stirred under ambient temperature for 1 h and then heated at reflux for half of an hour. The solvent was removed under reduced pressure, the residue diluted by 5% aqueous NaOH (20 ml), and the product extracted into ethyl acetate. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄. After solvent removal, the base of 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[*c*]fluoren-7-ol was obtained.

2.4.3.1. *C*₇-reduced dimefluron, base of compound 7 (C₂₃H₂₅NO₄, MW = 379.45 g mol⁻¹). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.51 (d, 1H, $J=9.34$, H1), 8.04 (d, 1H,

$J=8.51$ Hz, H11), 7.59 (d, 1H, $J=2.75$ Hz, H4), 7.30 (dd, 1H, $J=9.34$ Hz, $J=2.75$ Hz, H2), 7.22 (s, 3H, H6), 7.20 (d, 1H, $J=2.61$ Hz, H8), 6.94 (dd, 1H, $J=8.51$ Hz, $J=2.61$ Hz, H10), 5.87 (bs, 1H, OH), 5.39 (s, 1H, CH), 4.34–4.23 (m, 1H, OCH₂), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 2.82 (t, 2H, $J=5.27$ Hz, NCH₂), 2.30 (s, 6H, NCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.1, 156.7, 152.8, 149.9, 143.6, 133.3, 126.9, 126.6, 125.7, 124.2, 122.1, 119.1, 113.5, 111.2, 103.6, 102.0, 74.1, 67.1, 57.9, 55.5, 55.2, 45.9.

Positive-ion ESI mass spectra of C₇-reduced dimefluron, C₂₃H₂₅NO₄, MW = 379; MS: m/z 380, [M+H]⁺, 100%; m/z 362, [M+H-H₂O]⁺, 4%. MS² of 380: m/z 362, [M+H-H₂O]⁺, 100%; m/z 319, [M+H-H₂O-CH₃N-CH₂]⁺, 47%; m/z 305, [M+H-H₂O-CH₃N=CHCH₃]⁺, 55%; m/z 289, [M+H-H₂O-CH₃N=CH₂-CH₂O]⁺, 29%. Negative-ion ESI mass spectra: MS: m/z 378, [M-H]⁻, 100%. MS² of 378: m/z 363, [M-H-CH₃]⁻, 30%; m/z 350, [M-H-CO]⁻, 93%; m/z 335, [M-H-CH₃N=CH₂]⁻, 5%; m/z 318, [M-H-CO-CH₃OH]⁻, 10%; m/z 306, [M-H-(CH₃)₂NCH₂CH₂]⁻, 100%; m/z 291, [M-H-(CH₃)₂NCH=CHOH]⁻, 15%; m/z 277, [M-H-CO-(CH₃)₂NCH₂CH₃]⁻, 21%; m/z 260, [M-H-CO-(CH₃)₂NCH₂CH₂O]⁻, 5%; m/z 247, [M-H-CO-(CH₃)₂NCH₂CH₃-CH₂O]⁻, 16%.

2.4.4. N-Oxidation of dimefluron (preparation of compounds 6 in Fig. 1 and Section 2.1)

Dimefluron hydrochloride (0.2 g, 0.48 mmol) was dissolved in ethanol (20 ml) and 7 ml of concentrated ammonium hydroxide and 7 ml of hydrogen peroxide were added to the solution. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 3 h. Ethanol was then distilled off and the product was extracted into chloroform and the solution dried over anhydrous Na₂SO₄. After solvent removal, the crude N-oxide of 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[*c*]fluoren-7-one was purified by preparative TLC (chloroform-methanol-concentrated ammonium hydroxide, 70:30:5, v/v/v).

2.4.4.1. Dimefluron N-oxide, compound 6 (C₂₃H₂₃NO₅, MW = 393.43 g mol⁻¹). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.43 (d, 1H, $J=9.21$ Hz, H1), 7.96 (d, 1H, $J=8.24$ Hz, H11), 7.51 (d, 1H, $J=2.61$ Hz, H4), 7.33 (dd, 1H, $J=9.21$ Hz, $J=2.61$ Hz, H2), 7.11 (s, 1H, H6), 7.10 (d, 1H, $J=2.61$ Hz, H8), 7.01 (dd, 1H, $J=8.25$ Hz, $J=2.61$ Hz, H10), 4.83–7.70 (m, 2H, NCH₂), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.75–3.63 (m, 2H, CH₂), 3.15 (s, 6H, NCH₃).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ 193.3, 159.7, 159.3, 153.0, 136.4, 136.3, 130.9, 129.4, 127.3, 123.8, 123.8, 120.7, 118.4, 110.6, 102.3, 99.9, 72.8, 68.6, 63.3, 60.1, 55.9, 55.5.

Positive-ion ESI mass spectra of dimefluron N-oxide, C₂₃H₂₃NO₅, MW = 393; MS: m/z 809, [2M+Na]⁺, 36%; m/z 787, [2M+H]⁺, 43%; m/z 432, [M+K]⁺, 15%; m/z 416, [M+Na]⁺, 100%; m/z 394, [M+H]⁺, 42%. MS² of 394: m/z 377, [M+H-OH]⁺, 2%; m/z 333, [M+H-(CH₃)₂NOH]⁺, 5%; m/z 305,

[M+H-(CH₃)₂NOCH₂CH₃]⁺, 100%. Negative-ion ESI mass spectra: MS: m/z 820, [2M+Cl]⁻, 57%; m/z 428, [M+Cl]⁻, 100%.

2.4.5. Higher homologue of dimefluron (preparation of compound 8 in Fig. 1 and Section 2.1)

Sodium (0.5 g, 21.74 mmol) was dissolved in 50 ml of 2-methyl-2-propanol (*tert*-butyl alcohol) and 3,9-dimethoxy-5-hydroxy-7H-benzo[*c*]fluoren-7-one (1 g, 3.26 mmol) in *tert*-butyl alcohol was added to the solution with stirring. When the reaction mixture turned blue, a suspension of 3-dimethylaminopropylchloride hydrochloride (1.5 g, 9.5 mmol) in a small amount of *tert*-butyl alcohol was added in several portions. The reaction mixture was stirred and heated at reflux under unaqueous conditions for half of an hour. When the colour turned red, the reaction was complete. *tert*-Butyl alcohol was distilled off, the reaction mixture diluted by 5% aqueous NaOH, the product extracted into ethyl acetate and the extract dried over anhydrous Na₂SO₄. After solvent removal, the crude base of 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminopropoxy)-7H-benzo[*c*]fluoren-7-one was purified by preparative TLC (see Section 2.1).

2.4.5.1. Homo-dimefluron, base of compound 8 (C₂₄H₂₅NO₄, MW = 391.46 g mol⁻¹). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.34 (d, 1H, $J=9.21$ Hz, H1), 7.87 (d, 1H, $J=8.24$ Hz, H11), 7.45 (d, 1H, $J=2.74$ Hz, H4), 7.28 (dd, 1H, $J=9.21$ Hz, $J=2.74$ Hz, H2), 7.04 (d, 1H, $J=2.48$ Hz, H8), 6.96 (dd, 1H, $J=8.24$ Hz, $J=2.47$ Hz, H10), 6.93 (s, 1H, H6), 4.19 (t, 2H, $J=6.32$ Hz, OCH₂), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 2.48 (t overlapped, 2H, $J=6.33$ Hz, NCH₂), 2.20 (s, 6H, NCH₃), 2.05–1.92 (m, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 193.4, 159.6, 159.2, 153.6, 136.4, 136.3, 136.0, 130.9, 129.4, 127.2, 123.7, 123.7, 120.5, 118.2, 110.5, 102.2, 99.6, 66.7, 56.0, 55.4, 45.3, 35.5, 26.8.

Positive-ion ESI mass spectra: MS: m/z 392, [M+H]⁺, 100%; m/z 347, [M+H-CH₃NHCH₃]⁺, 3%. MS² of 392: m/z 347, [M+H-CH₃NHCH₃]⁺, 100%; m/z 319, [M+H-(CH₃)₂NCH₂CH₃]⁺, 25%.

In addition, the NMR, APCI-MS and ESI-MS spectra of dimefluron were measured for the sake of comparison:

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.92 (6H, s, CH₃N), 3.67 (2H, bt, $J=4.5$ Hz, CH₂N), 3.81 (3H, s, CH₃O), 3.94 (3H, s, CH₃O), 4.56 (2H, bt, $J=4.5$ Hz, CH₂O), 6.97 (1H, dm overlapped, $J=8.2$ Hz, Ar), 6.95–7.10 (2H, m, Ar), 7.30 (1H, dm, $J=9.2$ Hz, Ar), 7.55–7.65 (1H, m, Ar), 7.88 (1H, dm, $J=8.2$ Hz, Ar), 8.35 (1H, dm, $J=9.2$ Hz, Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 193.5, 159.9, 159.5, 152.8, 137.0, 136.4, 136.3, 130.9, 129.3, 127.3, 124.0, 123.8, 120.7, 118.4, 110.7, 103.2, 100.3, 63.2, 55.99, 55.95, 55.5, 43.0.

Positive-ion ESI mass spectra of dimefluron base, C₂₃H₂₃NO₄, MW = 377; MS: m/z 400, [M+Na]⁺, 4%; m/z 378, [M+H]⁺, 100%; m/z 333, [M+H-CH₃NHCH₃]⁺, 3%. MS² of 378: m/z 333, [M+H-CH₃NHCH₃]⁺, 100%.

2.5. Rats and biological material

Dimefluron was administered in a single oral dose of 250 mg kg^{-1} of body weight to three male rats (*Rattus norvegicus* var. *alba*, Wistar type, weighing 270–290 g, from the Konárovice breeding station) in the form of a saturated aqueous solution via a gastric probe. These experiments were approved by the institutional ethics committee. The rats were placed individually into cages in which they had free access to water and food pellets before and during the experiment. Faeces of individual rats were collected each 24 h (in the intervals 0–24, 24–48, 48–72, 72–96, 96–120, 120–144, 144–168 h after the administration). The collected faeces were processed immediately.

2.6. Extraction of faeces and sample preparation

Each portion of faeces was triturated and extracted repeatedly (three times) with small volumes of ethyl acetate containing 5% of triethylamine (10–25 ml of mixture according to the amount of faeces eliminated during 24 h). For the homogenization of faeces, a vigorous stirring of faeces with the above-mentioned extraction mixture was used (magnetic stirrer, 40°C for a few minutes). The extraction medium containing benzo[*c*]fluorene derivatives was filtered off from the dispersed biomatrix and the filtrate dried over anhydrous Na_2SO_4 . The ethyl acetate extract was then evaporated in a glass tube (stream of nitrogen, max. 40°C) to dryness. The dry extract in the glass tube was dissolved in 2 ml of methanol. Fifty microliters of this methanolic mixture were spiked by $50 \mu\text{l}$ of 10^{-3} M aqueous solution of homodimefluron (I.S.), diluted with $1900 \mu\text{l}$ of the mobile phase, vigorously mixed and centrifuged ($10\,000 \times g$ for 10 min). One hundred microliters of the supernatant were injected onto the chromatographic column.

2.7. HPLC with ultraviolet photodiode-array detection

Routine chromatographic analyses were performed using a Thermo Electron (formerly Thermo Finnigan) chromatograph (San Jose, CA, USA). The chromatographic system was composed of an SCM1000 solvent degasser, P4000 quaternary gradient pump, AS3000 autosampler with a $100\text{-}\mu\text{l}$ sample loop, UV6000 LP photodiode array detector with Light Pipe Technology, FL3000 fluorescence detector, SN4000 system controller and a data station (Intel-Pentium 4 CPU 1.6 GHz, RAM 256 MB, HDD 40 GB) with the ChromQuest 4 analytical software (Thermo Electron Inc., San Jose, CA, USA) working under the Windows 2000 operating system (Microsoft Corporation).

The efficiency of two chromatographic systems was evaluated in the separation of dimefluron, its phase I metabolites and internal standard in the extracts from the faeces.

System A consisted of a LiChroCART[®] 250-4 mm chromatographic column with LiChrospher 60 RP-selectB, $5 \mu\text{m}$ (Merck) and a mobile phase containing 0.01 M nonylamine

buffer (pH 7.4) and acetonitrile in the 1:2 ratio (v/v), and the column was rinsed in the isocratic mode.

System B consisted of a Discovery 250-4 mm chromatographic column containing a HS-F5, $5 \mu\text{m}$ stationary phase (Supelco) and a mobile phase containing 0.05 M KH_2PO_4 buffer pH 3 and acetonitrile. The chromatographic analysis started with the mobile phase composition acetonitrile–0.05 M KH_2PO_4 buffer pH 3 (25:75, v/v). A linear gradient, increasing the proportion of acetonitrile in the mobile phase gradually to 60% over 20 min was applied, and an isocratic mobile phase composition of acetonitrile–0.05 M KH_2PO_4 buffer pH 3 (60:40, v/v) was used in the time interval of 20–28 min in the analysis. After equilibration (time interval of 28–33 min) preceding the initial chromatographic conditions, the next sample could be analysed.

The flow rate was 1 ml min^{-1} in both chromatographic systems. UV detection was performed in the dual wavelength mode, with 317 nm having been used for dimefluron and all 7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one metabolites, 367 nm for all 7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-ol metabolites (see Fig. 2). In recording the UV spectra, a photodiode-array mode (in the range of 195–380 nm with a 1 nm distance) was used. The identity of the dimefluron metabolites in biological samples was confirmed using HPLC–MS experiments (see Section 2.3).

2.8. Calibration

Standard 10^{-3} M stock solutions (41.4 mg of dimefluron, 40.0 mg of 9-*O*-desmethyl-DMF, 40.0 mg of 3-*O*-desmethyl-DMF, 34.9 mg of 3,9-*O*-didesmethyl-DMF (base), 40.0 mg of *N*-desmethyl-DMF, 39.3 mg of DMF *N*-oxide, 37.9 mg of C₇-reduced-DMF (base) and 39.1 mg of homoDMF (base), each in 100 ml of the respective UHQ-water solution were prepared. The compounds used in the form of bases were dissolved in UHQ-water containing an equimolar amount of hydrochloric acid. Lower concentrations (10^{-4} M , 10^{-5} M) of each compound were obtained by the dilution with UHQ water. A calibration series of dimefluron + its metabolites/homodimefluron (IS) mixtures with the concentrations of 0.05, 0.25, 0.5, 2.5, 10, 17.5, 25 and 35 nmol/ml of each analyte, and with the same homodimefluron concentration (25 nmol/ml) was made. Six individual samples were prepared at each calibration level. The same concentrations were used to make a calibration curve with a drug-free faeces extract spiked with dimefluron, its metabolites and homodimefluron (using appropriate concentrations in order to keep the volumes at a minimum). This calibration series was measured using the UV detector under the conditions mentioned in Section 2.7. The extraction procedures were the same as described in Section 2.6.

2.9. Testing and statistical evaluation of the analytical procedure

As mentioned in Section 2.8, eight-level calibration series with six analyses at each concentration level was measured.

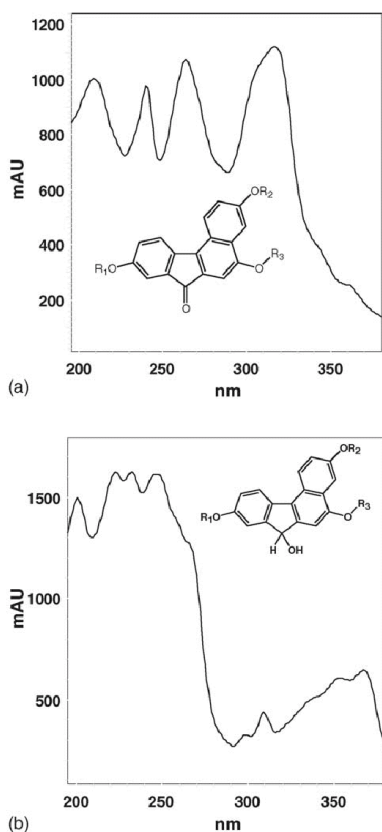


Fig. 2. (a) UV spectra of 3,9-dimethoxy-7H-benzo[c]fluoren-7-one chromophore (dimefluron and all 7-one metabolites, maxima: 209, 240, 264 and 317 nm). (b) UV spectra of 3,9-dimethoxy-7H-benzo[c]fluoren-7-ol chromophore (C₇-reduced dimefluron and all 7-ol metabolites, 201, 223, 232, 247, 299, 309, 354, 367 nm).

On-line statistical processing of the calibration analyses by the least-squares method was performed automatically using the ChromQuest software. The linearity of the calibration curve from the aqueous solutions of dimefluron, its metabolites and homodimefluron (IS) and from the drug-free faeces extracts spiked with the above-mentioned analytes was tested and evaluated [$y = kx + q$, where x is the concentration ratio of dimefluron (or one of its metabolites, respectively) to homodimefluron (IS) and y is the corresponding peak–area ratio of dimefluron (one of its metabolites)/homodimefluron (I.S.)] and the correlation coefficient (r) was expressed. The accuracy was determined as a relative error (%) found on the standard curve. The precision of the method, expressed as the relative standard deviation (percentage of coefficients of variation; R.S.D. = 100 S.D./mean), was also assessed. Both statistical parameters were calculated for each concentration level. The range of the applicability of the HPLC method was

enclosed within the lower limit of quantification (LLOQ) and the upper limit of quantification (ULOQ). The lower limit of quantification (LLOQ) was determined as the lowest concentration on the standard calibration curve which was measured with a precision of 20% and accuracy of 80 or 120%. Upper limit of quantification (ULOQ) was equal to the highest concentration in the eight-level faeces extract calibration. The recovery of dimefluron and its six metabolites was also calculated [31,32].

3. Results and discussion

3.1. Syntheses of the standards and their NMR spectra

For the development of new HPLC methods and for the preparation of calibration samples, the standards of the expected dimefluron metabolites and a suitable internal standard were required. Consequently, simple synthetic and degradation methods starting from dimefluron and its precursor (3,9-dimethoxy-5-hydroxy-7H-benzo[c]fluoren-7-one) were employed. Given the functional groups present in dimefluron and our previous experience with the biotransformation of benfluron, the following pathways in phase I dimefluron metabolism were expected: *O*-desmethylation, *N*-desmethylation, *N*-oxidation and carbonyl reduction. The products of these metabolic reactions could be identified in various biomatrices after the administration of dimefluron, hence their standards had to be synthesized.

O-Desmethylation, *N*-desmethylation, *N*-oxidation and carbonyl reduction were performed by the above chemical modifications of dimefluron (see Sections 2.4.1–2.4.4). Under the conditions described in Section 2.4.1, three *O*-desmethylated products (compounds 2–4 in Fig. 1) arose from the parent compound 1 and were separated by preparative TLC (see Section 2.1). The other reaction led to relatively pure final products, but for analytical purposes, all these compounds (5–7 in Fig. 1) were purified by preparative TLC as well. Some of the basic products were converted into their salts (hydrochlorides) for a better crystallization.

Before the development of the chromatographic conditions for the HPLC bioanalyses of dimefluron and its phase I metabolites, a suitable internal standard had to be identified. In some of our previous papers [33–35], good experience with the structural homologues of the drugs under study was made. Consequently, a higher homologue of dimefluron (homodimefluron, compound 8 in Fig. 1), possessing an additional methylene group in the side chain of molecule was prepared by the Williamson synthesis from the dimefluron precursor (3,9-dimethoxy-5-hydroxy-7H-benzo[c]fluoren-7-one) and 3-dimethylaminopropyl chloride.

The structure and purity of individual compounds 2–8 (see Fig. 1) was confirmed by NMR, HPLC–DAD and HPLC–MS experiments.

3.2. Mass spectra of the dimefluron derivatives

The individual compounds in real samples were unambiguously identified using the following HPLC–MS approach. First, the first-order and MSⁿ spectra of all standards were measured and interpreted both in the positive-ion and negative-ion electrospray ionization mode (see Section 2.3). A mixture of all standards was then analysed by HPLC–MS and HPLC–MS–MS to verify that the mass spectra are identical to those obtained in the direct infusion experiments. The following step was the analysis of real samples of three rat faeces. No significant differences were found among individual samples, and the results are therefore discussed together. All synthetic standards (see Section 2.4) were clearly identified in the rat faeces extracts, but the concentration of compound 4 (3,9-*O*-didesmethyl-DMF) was very low.

The comparison of observed ions with the structures showed the characteristic fragmentation behaviour for individual functional groups, which enabled us the identification of other metabolites, the standards of which were not synthesized, based on the following rules. The molecular weights (MW) were determined according to $[M+H]^+$ ions in the positive-ion and $[M-H]^-$ ions in the negative-ion ESI mass spectra, which was further confirmed by the less abundant $[M+Na]^+$ and $[M+K]^+$ ions in some cases. The compounds without a hydroxy group (compounds 1, 5, 8 and 13 in Table 1) did not provide any signal in the negative-ion mode except for the *N*-oxide (compound 6), where the adduct ions $[M+Cl]^-$ and $[2M+Cl]^-$ were found, but with very low sensitivity. The presence of the dimethylamino group was indicated by the neutral loss of CH_3NHCH_3 ($\Delta m/z$ 45) or $CH_3N=CH_2$ ($\Delta m/z$ 43), while the presence of the methylamino group corresponded to the loss of CH_3NH_2 ($\Delta m/z$ 31) together with a minor loss of $CH_2N=CH_2CH_3$ ($\Delta m/z$ 57). The

presence of *N*-oxide was characterized by the neutral losses of $CH_3N(OH)CH_3$ ($\Delta m/z$ 61) and $(CH_3)_2NOCH_2CH_3$ ($\Delta m/z$ 89), by a slightly increased relative abundance of molecular adducts with alkali metal ions and dimeric ions $[2M+H]^+$ as well as by an increased fragmentation in the first-order mass spectra. When the 7-carbonyl group was reduced to the secondary hydroxy group, the loss of water ($\Delta m/z$ 18) was the base peak in the MS/MS spectrum unlike other compounds containing 7-carbonyl function. The other typical neutral losses were observed after the primary loss of water. Compounds with the primary hydroxy group in positions 3- or 9- could be easily distinguished from the 7-hydroxy derivatives, because the loss of water in the first case occurred after the loss of alkylamines and was not a predominate peak in the spectrum.

All information valuable for the characterization of phase I metabolites is summarised in Table 1 together with the identification of new metabolites (compounds 9–15), the standards of which were not prepared. The MWs, fragmentation behaviour and retention order of compounds 9–15 are in agreement with the proposed structures depicted in Table 1. In addition to phase I metabolites, there is certain evidence of phase II metabolites with lower retention times as well, but their concentrations in our extracts were too low and the chromatographic resolution must also be improved for their positive identification.

3.3. Sample preparation procedure

As mentioned in our previous study [14], the principal route of elimination of phase I benfluron metabolites was the gastrointestinal tract of rats. With a view to the similarity of benfluron and dimefluron, it was expected that prevailing amounts of the phase I dimefluron metabolites would

Table 1
List of compounds identified in the extracts of rat faeces by HPLC–MS and HPLC–MS–MS

Compound no. ^a	<i>t</i> _R (min) ^b	MW	Hydroxyl group (position) ^c	Alkylamino group (substituent R ₃ in Fig. 1)
1	50.5	377	–	(CH ₃) ₂ N–
2	28.3	363	Yes (9)	(CH ₃) ₂ N–
3	32.5	363	Yes (3)	(CH ₃) ₂ N–
4	16.3	349	Yes (3, 9)	(CH ₃) ₂ N–
5	45.2	363	–	CH ₃ NH–
6	47.0	393	–	(CH ₃) ₂ NO–
7	35.4	379	Yes (7)	(CH ₃) ₂ N–
8	55.8	391	–	(CH ₃) ₂ NCH ₂ –
9	33.8	397	Yes (3 or 9)	(CH ₃) ₂ N–
10	29.4	349	Yes (3)	CH ₃ NH–
11	24.6	349	Yes (9)	CH ₃ NH–
12	28.3	393	Yes (unknown)	(CH ₃) ₂ N–
13	24.6	379	–	CH ₃ NH–
14	20.1	365	Yes (3, 7)	(CH ₃) ₂ N–
15	18.7	365	Yes (7, 9)	(CH ₃) ₂ N–

^a 9: 3-*O*-desmethyl-chlordimefluron or 9-*O*-desmethyl-chlordimefluron; 10: 3-*O*-desmethyl-*N*-desmethyldimefluron; 11: 9-*O*-desmethyl-*N*-desmethyldimefluron; 12: hydroxydimefluron; 13: *N*-desmethyl-*C*₇-reduced -7-methoxydimefluron; 14: 3-*O*-desmethyl-*C*₇-reduced dimefluron; 15: 9-*O*-desmethyl-*C*₇-reduced dimefluron. See Fig. 1 for structures of 1–8 and Fig. 6 for structures of 10–11 and 13–15.

^b Retention times in HPLC–MS system (see Section 2.3).

^c Compounds without hydroxy groups do not provide signal in the negative-ion ESI mode.

be found in the faeces as well. For this reason the primary search for phase I dimefluron metabolites was oriented towards this solid, relatively worse extractable biomatrix. Ethyl acetate with triethylamine was found to be a good extraction medium for phase I dimefluron metabolites of various polarity. A small amount of triethylamine (proton scavenger) in this medium served to convert the possibly present salts of dimefluron metabolites in the excrements into their better extractable bases.

Ethyl acetate and triethylamine were evaporated from the extracts and the dry extract was dissolved in methanol, which is compatible with the mobile phase used in the HPLC determination. The methanolic solution was spiked with the internal standard. In accord with our assumptions, the faeces contained a large number and amounts of colour phase I dimefluron metabolites and had to be repeatedly diluted before the HPLC analysis.

3.4. Chromatography

The development of chromatographic conditions, which would be suitable for the separation of dimefluron and its phase I metabolites, started by testing chromatographic system used in the separation of benfluron derivatives [13–15]. Benfluron and its metabolites were separated on various reversed phase columns C_{18} , using a mobile phase containing nonylamine buffer (pH 7.4), acetonitrile and 2-propanol (2:2:1, v/v/v). These conditions were sufficient for the resolution of all benfluron derivatives during 30 min. The employment of these chromatographic conditions for dimefluron and its metabolites failed due to an unsatisfactory resolution of isomeric 3-*O*-desmethyl-DMF and 9-*O*-desmethyl-DMF. In addition, most of the peaks in the chromatogram were asymmetric which was result of the interaction of the basic analytes with the residual silanols on the surface of non-encapped

octadecylsilyl silica gel. Hence, new chromatographic conditions for dimefluron derivatives were being searched for.

In the *chromatographic system A* (see Section 2.7), a chromatographic column LiChrospher RP-selectB (Merck) with the chemically bound octylsilyl (C_8) on the silica gel surface was tested. The starting silica material was optimized to suppress the undesirable interactions with the basic analytes. The mobile phase used for the separation of benfluron derivatives was simplified by the elimination of 2-propanol, and its composition was optimized to achieve a satisfactory resolution of all dimefluron derivatives under study (see compounds in Fig. 1). Fig. 3 shows a chromatogram of dimefluron derivatives in the mobile phase containing 0.01 M nonylamine buffer (pH 7.4) and acetonitrile in the 1:2 ratio (v/v). The chromatographic analysis of compounds 1–7 lasted 45 min with the resolution of individual compounds being satisfactory, but the peaks were asymmetric to a high degree. The most fundamental limitation of this chromatographic system was a very long retention time (more than 120 min) of the internal standard (homodimefluron, compound 8 in Fig. 1) under the above-mentioned conditions and such a chromatographic system was unsuitable for serial analyses.

In the *chromatographic system B* (see Section 2.7), a chromatographic column containing an HS-F5, 5 μ m stationary phase (pentafluorophenylpropyldimethylsilyl silica gel) was used. The composition of an acidic mobile phase based on a mixture of acetonitrile and a phosphate buffer of pH 3 was being changed using a linear gradient during the first 20 min of the chromatography and then maintained in the isocratic mode until the completion of the analysis. As apparent from Fig. 4a, the whole analysis lasted 28 min, all eight dimefluron derivatives including the internal standard (compounds 1–8 in Fig. 1) were well separated and, importantly, the shape of all peaks exhibited a much higher degree of symmetry than those in the chromatographic system A. Hence, the

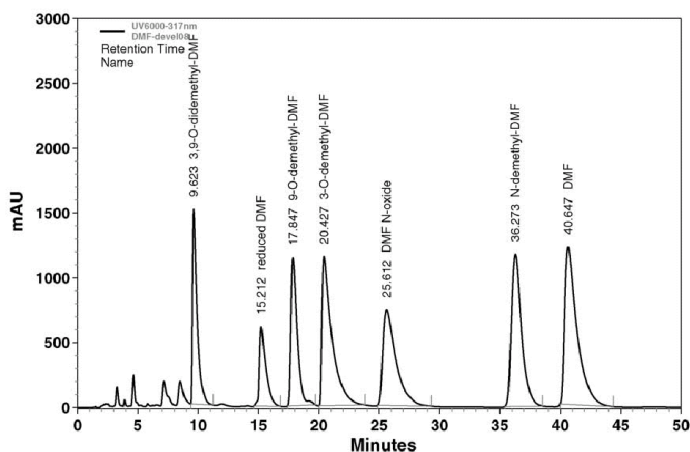


Fig. 3. Chromatographic separation of dimefluron and its metabolites on a RP-selectB (octylsilyl silica gel) column using an isocratic mobile phase containing nonylamine buffer (pH 7.4)–acetonitrile in the 1:2 ratio (v/v).

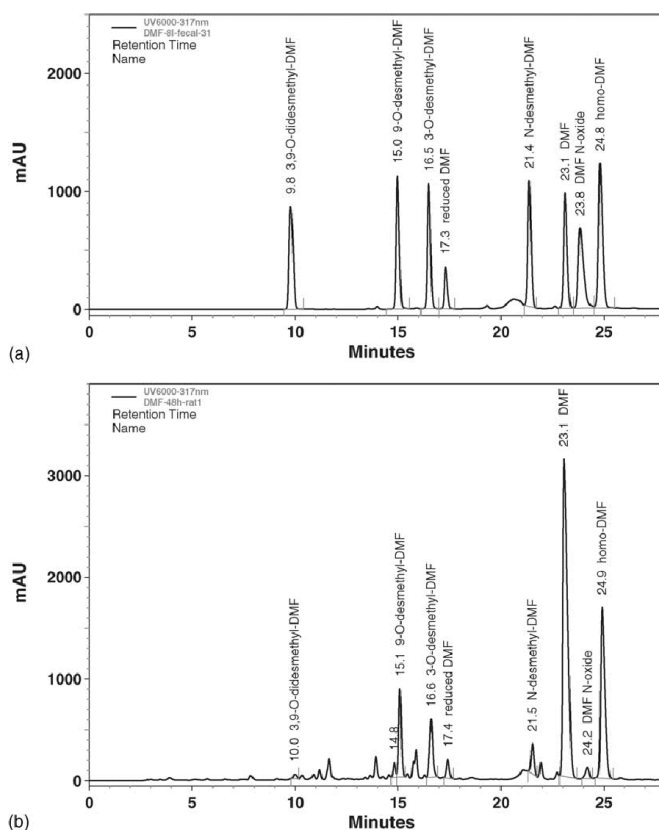


Fig. 4. (a) Chromatographic separation of dimefluron and its metabolites on a Discovery HS-F5 (pentafluorophenylpropyldimethylsilyl silica gel) column using a gradient mobile phase containing phosphate buffer (pH 3)–acetonitrile (see Section 2.7, system B). Extract from drug-free rat faeces spiked with the individual metabolites, dimefluron and homodimefluron (I.S.). (b) Chromatographic separation under the same conditions (see Section 2.7, system B). Extract from the rat faeces collected in the interval 24–48 h after the oral administration of dimefluron; the sample was spiked with homodimefluron (I.S.).

chromatographic system B was validated and chosen for routine analyses.

Photodiode-array UV–vis detection (DAD) under the conditions described in Section 2.7 was employed not only for the determination of dimefluron and those metabolites, the synthetic standards of which were available, but also in the search for and preliminary identification of all other benzo[*c*]fluorene derivatives discovered in the extracts. Spectral analysis of the acquired 3D-chromatograms (spectrochromatograms) enabled us to identify two types of benzo[*c*]fluorene compounds (*7H*-benzo[*c*]fluoren-7-one and *7H*-benzo[*c*]fluoren-7-ol) according to their characteristic UV-spectra displayed in Fig. 2. In this way, some new minor metabolites, having the *7H*-benzo[*c*]fluoren-7-one and *7H*-benzo[*c*]fluoren-7-ol chromophore were discovered in the spectrochromatograms. Their final structure was elucidated by HPLC–DAD–MS experiments.

The possibility of the fluorescence detection employment was also tested. It was observed that only *7H*-

benzo[*c*]fluoren-7-ol derivatives exhibited fluorescence at the excitation maxima of 245 and 361 nm and the emission maxima were found at the wavelengths of 427 and 736 nm.

The developed bioanalytical method for the determination of dimefluron derivatives involving a liquid–solid extraction of faeces and based on the ultraviolet photodiode-array detection was validated. The validation parameters are summarised in Table 2. The calibration curves were found to be linear in the range of 0.05–35 nmol/ml. The value of LLOQ varied in dependence on a particular compound (0.05–2.5 nmol/ml). The recovery for different metabolites ranged between 75 and 89%.

3.5. Elimination of dimefluron and its metabolites via gastrointestinal tract of rats

The developed and validated bioanalytical method was used for the study of dimefluron disposition in rats. The aim of this study was to elucidate the structures of individual phase

Table 2
Validation results of the bioanalytical LSE–HPLC–DAD method for dimefluron and its metabolites

Compound (no. in Fig. 1 and Table 1)	Regression equation	<i>r</i>	Precision (%)	Accuracy (%)	LLOQ (nmol/ml)	ULOQ (nmol/ml)
3,9- <i>O</i> -Didesmethyl-DMF	$y = 0.9517x + 0.0155$	0.9988	1.15–7.18	97.94–106.41	0.5	35
9- <i>O</i> -Desmethyl-DMF	$y = 0.9502x + 0.0122$	0.9997	1.68–5.80	99.49–114.31	0.5	35
3- <i>O</i> -Desmethyl-DMF	$y = 0.9211x + 0.0103$	0.9998	0.79–3.53	99.24–101.98	2.5	35
Reduced DMF	$y = 0.2954x + 0.003$	0.9999	0.55–4.62	99.57–108.81	2.5	35
<i>N</i> -Desmethyl-DMF	$y = 0.9128x + 0.019$	0.9978	3.94–14.53	98.44–110.79	0.5	35
DMF	$y = 0.9729x + 0.0133$	0.9996	1.02–5.27	98.33–114.17	0.5	35
DMF <i>N</i> -oxide	$y = 0.9833x + 0.0528$	0.9997	0.49–4.62	89.79–114.43	0.05	35

I dimefluron metabolites and to evaluate their elimination from the organism from the viewpoint of time dependence and total balance dependence (administered molar amount of dimefluron versus the sum of eliminated molar amounts of dimefluron and its metabolites).

9-*O*-Desmethyl-dimefluron and 3-*O*-desmethyl-dimefluron were identified as the principal phase I metabolites (see Fig. 4b). In an analogous elimination study of benfluron [14], 9-hydroxybenfluron was found to be the principal phase I metabolite of benfluron in faeces. With a view to the fact that the biotransformation precursors of phenolic metabolites (9-hydroxybenfluron in this case) are nucleophilic arenoxides

(epoxides), which may be very toxic for the organism given their possible influence on nucleic acids and proteins, the dimefluron phase I metabolism leading to *O*-desmethylation products seems less hazardous for the organism than the aryl-hydroxylation of benfluron.

The other expected or newly found phase I dimefluron metabolites (products of *N*-desmethylation, *N*-oxidation and carbonyl reduction) were eliminated in minor amounts, as shown in Fig. 5 and Table 1.

The elimination of dimefluron and its phase I metabolites culminated in the time interval of 24–48 h following the administration of the parent compound (see Fig. 5) and the

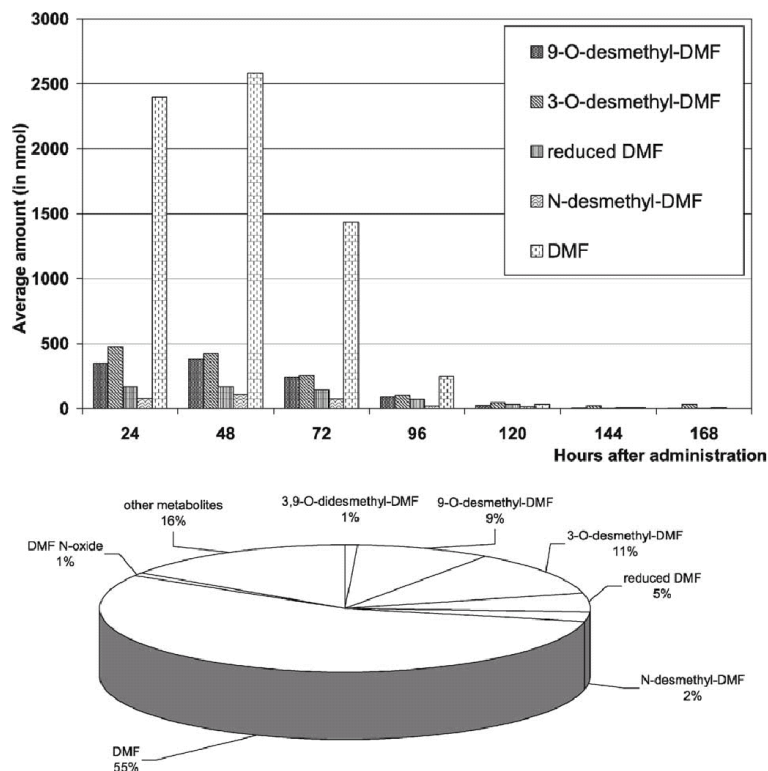


Fig. 5. (a) Average molar amount of dimefluron and its four principal phase I metabolites in the extracts from rat faeces. (b) Percentage of the total elimination of dimefluron and its phase I metabolites in the extracts from rat faeces.

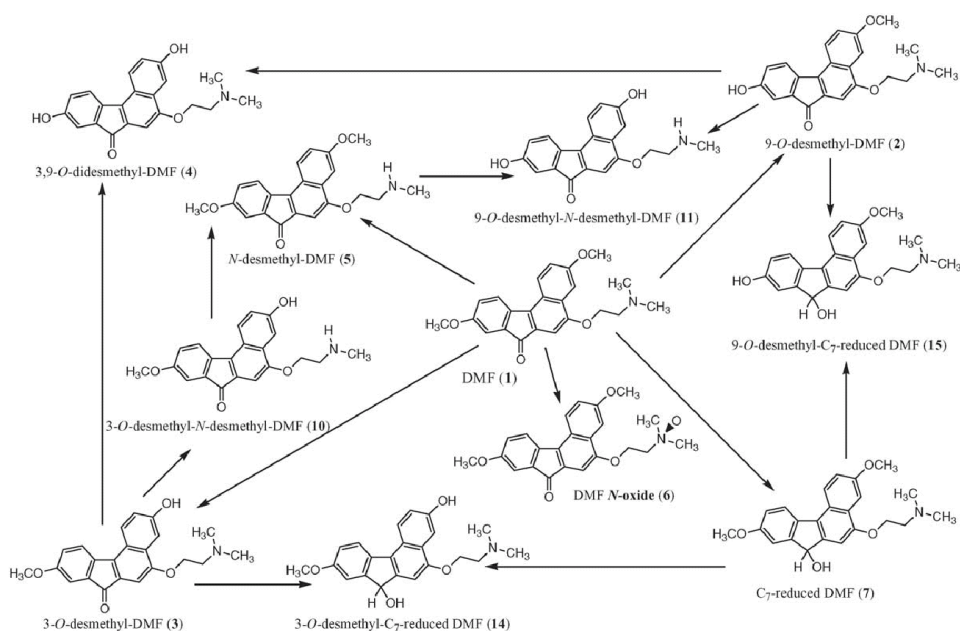


Fig. 6. Presumptive survey of the phase I dimefluron biotransformation (the numbering of individual compounds is the same as in Fig. 1 and Table 1).

major amount of unconjugated benzo[*c*]fluorene derivatives (89.4%, average from three rats) left the organism over the first three days. Presumptive survey of the phase I dimefluron biotransformation based on the results of HPLC–DAD–MS analyses is given in Fig. 6. In addition to the metabolites, whose synthetic standards were available (see compound 1–8 in Table 1), some new benzo[*c*]fluorene structures were discovered in the extracts from rat faeces: the products of a consecutive *O*- and *N*-desmethylation (compounds 10 and 11 in Table 1) and products of *O*-desmethylation and *C*₇-carbonyl reduction (compounds 14 and 15 in Table 1). Also small amounts of hydroxydimefluron (compound 12, position of hydroxyl unknown) were identified. The finding of compounds 9 (3-*O*-desmethyl-chlordimefluron or 9-*O*-desmethyl-chlordimefluron) and 13 (*N*-desmethyl-*C*₇-reduced-7-methoxydimefluron) is according to the actual xenobiochemical knowledge hardly explicable.

The balance study showed that only 7.3% of dimefluron and its phase I metabolites (of the administered molar amount of dimefluron = 100%) left the rat organism via the gastrointestinal tract during the next 7 days after the administration. This percentage corresponds to a similar total amount of benfluron and its phase I metabolites found in our former experiments [14]. The remaining amount could have been eliminated via another route (by uropoietic system) or in the form of phase II metabolites (conjugates), which were not investigated in this study because they are not extractable into ethyl acetate.

4. Conclusions

Two chromatographic systems differing in the stationary phases used, in the pH value of the mobile phase and in the mode of elution (isocratic versus gradient) were tested in the development of a new bioanalytical method involving the liquid–solid extraction of animal faeces and subsequent high-performance liquid chromatographic determination of dimefluron and its phase I metabolites based on the ultraviolet and mass spectrometric detections. Better results were achieved using a pentafluorophenylpropylsilyl silica gel column rinsed with the mobile phase of acetonitrile–phosphate buffer pH 3 in a gradient mode. After the validation of the bioanalytical method, this chromatographic system was applied to the disposition study of dimefluron in rats. The elimination of dimefluron and its phase I metabolites in the faeces was studied after an intragastric administration of dimefluron to three male rats. Maximum concentrations of dimefluron derivatives in the excrements were achieved in the time interval of 24–48 h after the administration. 9-*O*-Desmethyldimefluron and 3-*O*-desmethyldimefluron were the major metabolites found in the rat faeces, while the metabolic products of *N*-desmethylation, *N*-oxidation and carbonyl reduction were found in lower concentrations. According to the balance study, only 7.3% of the administered molar amount of dimefluron were eliminated in the form of an unchanged parent compound and its phase I metabolites by the gastrointestinal tract, the fate of the remaining amount of

benzo[*c*]fluorene derivatives will be elucidated in our further studies.

Acknowledgements

The authors wish to thank their technicians, Mrs. Květa Sládková, Mrs. Hana Machová and Mr. Stanislav Novotný for their skillful technical assistance. This work was partially supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (M.H. and L.K. acknowledge the support by the grant project No. 253100002, the others acknowledge support by grant project No. 111600001).

References

- [1] E. Kvasničková, M. Nobilis, M. Mělka, Project 303/93/2021 of Grant Agency of the Czech Republic, 1993–1995.
- [2] J. Křepelka, I. Vančurová, J. Holubek, M. Mělka, K. Řežábek, Collect. Czech. Chem. Commun. 47 (1982) 1856–1866.
- [3] I. Vančurová, J. Holubek, M. Mělka, K. Řežábek, J. Křepelka, Česk. Farm. 31 (1982) 308–310.
- [4] M. Mělka, J. Křepelka, Drugs Future 12 (1987) 745–748.
- [5] M. Miko, J. Křepelka, M. Mělka, Biochem. Pharmacol. 42 (1991) 214–216.
- [6] M. Miko, J. Křepelka, M. Mělka, Anticancer Drugs 2 (1991) 289–295.
- [7] M. Miko, J. Křepelka, M. Nobilis, Anticancer Drugs 3 (1992) 63–68.
- [8] S. Jantová, K. Horáková, Cell Biochem. Funct. 11 (1993) 131–135.
- [9] Z. Roubal, L. Poláková, J. Grimová, B. Kakáč, M. Peterková, V. Rejholec, P. Sedlmayer, I. Janků, Česk. Farm. 34 (1985) 311–313.
- [10] V. Francová, S. Šmolík, M. Schlehrová, K. Ráz, A. Selecká, Z. Franc, M. Frůhaufová-Aušková, K. Řežábek, I. Vančurová, J. Křepelka, Neoplasma 32 (1985) 529–536.
- [11] E. Kvasničková, M. Nobilis, I.M. Hais, J. Chromatogr. 295 (1984) 201–209.
- [12] E. Kvasničková, M. Nobilis, A. Šroler, E. Báčová, I.M. Hais, J. Chromatogr. 387 (1987) 559–561.
- [13] M. Nobilis, I.M. Hais, J. Chromatogr. 434 (1988) 363–375.
- [14] M. Nobilis, E. Kvasničková, A. Šroler, I.M. Hais, Drug Metabol. Drug Interact. 9 (1991) 225–240.
- [15] M. Nobilis, P. Anzenbacher, J. Pastera, Z. Svoboda, K. Hrubý, J. Květina, K. Ubik, F. Trejtnar, J. Chromatogr. B 681 (1996) 143–151.
- [16] I. Koruna, M. Ryska, L. Poláková, O. Matoušová, I. Vančurová, Z. Roubal, J. Křepelka, Česk. Farm. 35 (1986) 451–455.
- [17] A. Lyčka, J. Jirman, M. Nobilis, E. Kvasničková, I.M. Hais, Magn. Reson. Chem. 25 (1987) 1054–1057.
- [18] M. Nobilis, I. Vančurová, I.M. Hais, E. Kvasničková, J. Křepelka, Česk. Farm. 35 (1986) 68–73.
- [19] M. Nobilis, I. Vančurová, J. Křepelka, M. Mělka, A. Lyčka, J. Jirman, E. Kvasničková, I.M. Hais, M. Miko, Czechoslov. Patent No. 267519, Federal Bureau for Invention (PV02914-88), Prague, 1990 (in Czech).
- [20] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, F. Trejtnar, E. Kvasničková, Exp. Toxicol. Pathol. 48 (1996) 366–370.
- [21] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, V. Wsól, E. Kvasničková, Drug Metabol. Drug Interact. 14 (1998) 221–233.
- [22] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, V. Wsól, E. Kvasničková, Drug Metabol. Drug Interact. 14 (1998) 235–250.
- [23] Z. Svoboda, M. Nobilis, J. Květina, K. Lemr, Acta Med. (Hradec Králové) 42 (1999) 73–78.
- [24] K. Hrubý, E. Anzenbacherová, P. Anzenbacher, M. Nobilis, Collect. Czech. Chem. Commun. 65 (2000) 1374–1386.
- [25] V. Geršl, M. Mělka, J. Vortel, E. Kvasničková, M. Nobilis, Y. Mazurová, R. Hrdina, Acta Med. (Hradec Králové) 41 (1998) 47–48.
- [26] R. Hrdina, V. Geršl, M. Nobilis, M. Mělka, J. Vortel, J. Vávrová, M. Pecka, M. Holečková, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 358 (Suppl. 2) (1998) R530, P452.
- [27] J. Macháčková, V. Geršl, R. Hrdina, M. Nobilis, V. Palička, Acta Med. (Hradec Králové) 42 (1999) 89–92.
- [28] J. Macháčková, M. Adamcová, Y. Mazurová, R. Hrdina, M. Nobilis, Physiol. Res. 50 (2001) 491–499.
- [29] M. Nobilis, L. Skálová, B. Szotáková, J. Kujíček, M. Pour, J. Kuneš, M. Mělka, E. Kvasničková, V. Geršl, Drug Metab. Rev. 33 (2001) 116.
- [30] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, E. Kondrová, M. Šavlík, V. Wsól, L. Pichard-Garcia, E. Maser, Biochem. Pharmacol. 64 (2002) 297–305.
- [31] V.P. Shah, K.K. Midha, S.V. Dighe, et al., Int. J. Pharm. 82 (1992) 1–7.
- [32] CDER and CVM Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001 (<http://www.fda.gov/cder/guidance/>).
- [33] M. Nobilis, J. Květina, P. Anzenbacher, T. Vontor, Z. Zadák, V. Bláha, J. Vlček, M. Brátová, D. Solichová, D. Svoboda, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 23 (1998) 287–294.
- [34] M. Nobilis, M. Pour, J. Kuneš, J. Kopecký, J. Květina, Z. Svoboda, K. Sládková, J. Vortel, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2001) 937–946.
- [35] M. Nobilis, J. Kopecký, J. Květina, Z. Svoboda, M. Pour, J. Kuneš, M. Holčapek, L. Kolářová, J. Pharm. Biomed. Anal. 32 (2003) 641–656.



Corrigendum

Corrigendum to “Disposition study of a new potential antineoplastic agent dimefluron in rats using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection”
[J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 1059–1071]

P. Císař^a, M. Nobilis^{a,b,*}, Z. Vybíralová^b,
M. Holčapek^c, L. Kolářová^c, M. Pour^d, J. Kuneš^d, J. Klimeš^a

^a Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b Institute of Experimental Biopharmaceutics, Joint Research Center of PRO.MED.CS Praha a.s. and Academy of Sciences of the Czech Republic, Heyrovského 1207, CZ-500 03 Hradec Králové, Czech Republic

^c Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, nám. Čs. legií 565, CZ-532 10 Pardubice, Czech Republic

^d Department of Organic and Inorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Available online 26 August 2005

The Author regrets an error which appeared in Fig. 6 of the above-mentioned article. A methoxy group (–OCH₃) instead of the hydroxy group (–OH) should have appeared in position 3 of 9-*O*-desmethyl-*N*-desmethyl-DMF (II) in Fig. 6. Please see a corrected version of the figure below.

DOI of original article: [10.1016/j.jpba.2004.09.031](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.09.031).

* Corresponding author. Tel.: +420 49 5514 771; fax: +420 49 5512 719.
E-mail address: nobilis@uebf.cas.cz (M. Nobilis).

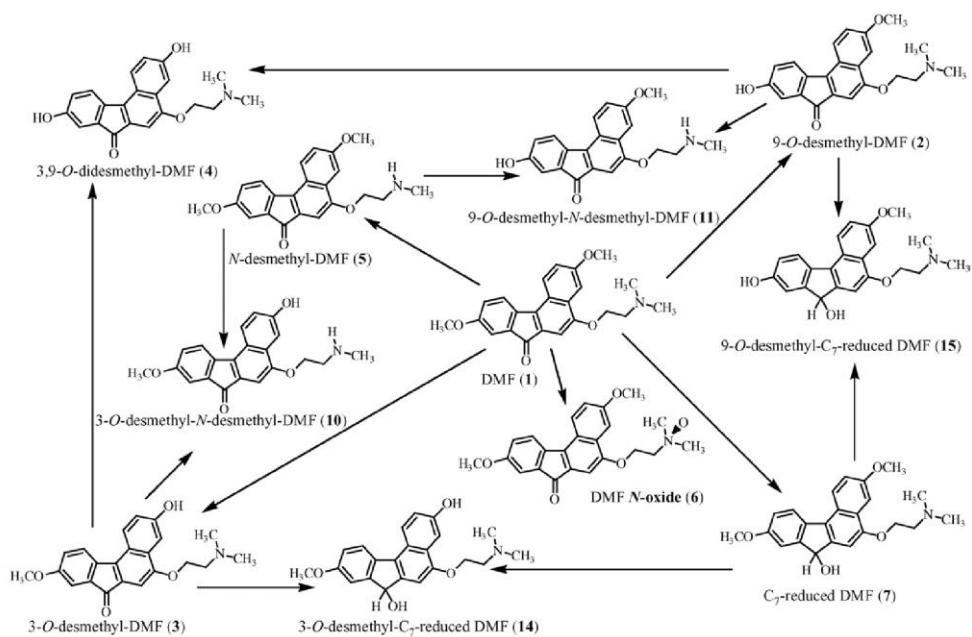


Fig. 6. Presumptive survey of the phase I dimefluron biotransformation (the numbering of individual compounds is the same as in Fig. 1 and Table 1).

6.1.2. Use of chiral liquid chromatography for the evaluation of stereospecificity in the carbonyl reduction of potential benzo[c]fluorene antineoplastics benfluron and dimefluron in various species

R. Kučera, M. Nobilis, L. Skálová, B. Szotáková, P. Císař, Th. Jira, J. Klimeš, V. Wsól
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 37, Issue 5, 29 April 2005, Pages 1049-1057

Benfluron i dimefluron se biotransformují mimo jiné redukcí v poloze 7 na sekundární alkohol. Tato redukce vede k tvorbě dvou enantiomerů. Poměr vzniklých enantiomerů je závislý na testovaném species.

Pro analýzu poměru vzniklých enantiomerů byla vyvinuta metoda chirální HPLC. Bylo testováno několik chirálních kolon. Následně byly optimalizovány podmínky umožňující separaci enantiomerů metabolitu benfluronu a dimefluronu na vybrané koloně. Optimalizované podmínky pro chirální separaci enantiomerů redukovaného benfluronu a redukovaného dimefluronu byly použity pro studium biotransformace základních látek. Biotransformace benfluronu a dimefluronu byly studovány v jaterních mikrosomálních frakcích vybraných species – potkan, králík, prase, morče, koza a člověk. Byly pozorovány mezidruhové rozdíly i rozdíly v rámci jednoho druhu v biotransformaci obou látek. Tyto difference je možno vysvětlit na základě vlivu sterických efektů, které se uplatňují při vazbě substrátu na apoenzym, nebo přichází v úvahu možnost, že je karbonylová skupina obou látek redukována u různých species různými redukujícími enzymy (karbonylreduktasy, aldoketo-reduktasy, 11- β -hydroxysteroiddehydrogenasa typ 1 apod.).

Ačkoli jsou si struktury benfluronu a dimefluronu velice podobné, byla během práce pozorována různá míra separace enantiomerů redukovaného benfluronu oproti enantiomerům redukovaného dimefluronu za stejných separačních podmínek.



Use of chiral liquid chromatography for the evaluation of stereospecificity in the carbonyl reduction of potential benzo[*c*]fluorene antineoplastics benfluron and dimefluron in various species

R. Kučera^{a,*}, M. Nobilis^{a,b}, L. Skálová^c, B. Szotáková^c, P. Císař^a, Th. Jira^d, J. Klimeš^a, V. Wsól^c

^a Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Heyrovského 1203, CZ-50005 Hradec Králové, Czech Republic

^b Institute of Experimental Biopharmaceutics, Joint Research Center of Academy of Sciences and PRO.MED.CS Praha a.s., Heyrovského 1207, CZ-50005 Hradec Králové, Czech Republic

^c Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemical Sciences, Heyrovského 1203, CZ-50005 Hradec Králové, Czech Republic

^d Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald, Institute of Pharmacy, Department of Pharmaceutical/Medical Chemistry, E.-L.-Jahn-Strasse 17, D-17487 Greifswald, Germany

Received 20 May 2004; received in revised form 4 October 2004; accepted 4 October 2004
Available online 28 November 2004

Abstract

Benfluron (B) [5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[*c*]fluorene-7-one hydrochloride] is a potential antineoplastic agent. In the organism, B undergoes a rapid phase I biotransformation through oxidative and reductive metabolic pathways. The carbonyl reduction of B leads to reduced benfluron, red-B, this is one of the principal pathways for the deactivation of this compound.

The structure of B was modified to suppress its rapid deactivation via the carbonyl reduction on C₇. Dimefluron, D (3,9-dimethoxy-benfluron) is one of the derivatives of B, in which an alternative metabolic pathway (*O*-desmethylation) prevails over the carbonyl reduction.

The goal of this study was to develop HPLC methods enabling chiral separations of the red-B and -D enantiomers. The separation of red-B enantiomers was successful done on a Chiralcel OD-R column (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) using a mobile phase acetonitrile–1 M NaClO₄ (40:60, v/v). Another mobile phase, methanol–1 M NaClO₄ (75:25, v/v), had to be employed for the sufficient resolution of red-D enantiomers. Flow rate was 0.5 ml min⁻¹ in both cases. Red-B was detected at 340 nm, red-D at 370 nm.

The above chiral HPLC methods were used for the study of the biotransformation of B and D in the microsomal fractions of liver homogenates prepared from various species (rat, rabbit, pig, guinea pig, goat and human). The enantiospecificity of the respective carbonyl reductases was evaluated and discussed for both prochiral compounds, B and D.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Chiral HPLC; Potential antineoplastics; Benfluron and dimefluron; Carbonyl reduction metabolites

1. Introduction

Drug metabolism studies belong to the fundamental items to be resolved in the research and development of new drugs. The metabolism of drugs is usually extensively studied with

regards to their oxidation. Less attention has been paid to their reductive metabolism, although it is well known that a variety of pharmacologically important substances undergo reductive reactions in their biotransformation [1]. Carbonyl reaction is a significant step in the phase I biotransformation of a great variety of aromatics, alicyclic and aliphatic carbonyl compounds, including pharmacologically active substances [2,3]. Carbonyl reduction has always been shown to

* Corresponding author. Tel.: +420 495 067 446; fax: +420 495 512 423.
E-mail address: kucerar@faf.cuni.cz (R. Kučera).

be of significance in various inactivation processes of drug containing a carbonyl group, such as warfarin, haloperidol, daunorubicin and doxorubicin [4,5].

Benfluron (B) [5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-one hydrochloride], first prepared in the Research Institute for Pharmacy and Biochemistry in Prague, is a typical representant of the first generation of potential antineoplastic agents exhibiting the activity against a broad spectrum of experimental tumors *in vitro* and *in vivo* [6]. The metabolism of B has been studied extensively *in vivo* as well as *in vitro* [7–21]. B undergoes a rapid phase I biotransformation through oxidative and reductive metabolic pathways [8,12,16]. The carbonyl reduction of B leads to C₇-reduced benfluron, 5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-ol (red-B), this is one of the principal pathways for the deactivation of this compound [8,12,16,20,21].

In recent years, the chemical structure of B has been modified with the aim to suppress its disadvantageous pharmacokinetic properties (low accessibility from the gastrointestinal tract and strong binding to tissue proteins) and to prevent from deactivating through carbonyl reduction.

Dimefluron (D) [3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-one hydrochloride], is one of the developed derivatives of B, in which an alternative metabolic pathway (*O*-desmethylation) prevails over the carbonyl reduction, although the C₇-reduced metabolite, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-ol (red-D), was also detected [20–24]. Higher antineoplastic efficiency of D (in comparison with B) could be expected *in vivo* [25–27] and the respective studies have been done or are currently in progress.

As mentioned above, both B as well as D undergoes in organism the metabolic changes leading to reduced derivatives. The substituents on the carbon atom bearing the carbonyl group are different, thus this carbon is a prochiral centre. The reduction of such a carbonyl group produces then two enantiomers of red-B (red-D, respectively). The carbonyl reductases tend to be stereospecific [4].

The goal of this study was to develop an HPLC method enabling chiral separations of the red-B and -D enantiomers. The enantiospecificity of the respective carbonyl reductases was evaluated and discussed for both prochiral compounds, B and D in various species.

2. Experimental

2.1. Chemicals, solutions and material

Benfluron [5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-one hydrochloride], C₂₁H₂₀ClNO₂, MW = 353.84 g mol⁻¹, racemic 5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-ol hydrochloride C₂₁H₂₂ClNO₂, MW = 355.86 g mol⁻¹, dimefluron [3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-one hydrochloride]; C₂₃H₂₄ClNO₄, MW = 413.89 g mol⁻¹, racemic 3,9-dimeth-

oxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-ol hydrochloride, C₂₃H₂₆ClNO₄, MW = 415.91 g mol⁻¹ (see Fig. 1) were synthesized in the laboratories of Institute of Experimental Biopharmaceutics and characterized using NMR experiments. Acetonitrile (ACN), chloroform, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), hexane (Hex), 2-propanol, triethylamine (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany), diethyl ether (analytical grade, Merck, Germany), hydrochloric acid 35%, sodium perchlorate (analytical grade, Lachema, Czech Republic), sodium borohydride (powder, 98+%, Janssen-Chimica, Belgium), ultra-high-quality (UHQ) water (prepared using Elgastat UHQ PS apparatus, Elga Ltd., Bucks, England) were used for the liquid–liquid extraction of biomatrices and chiral chromatography. Kieselgel 60H (Merck, Darmstadt, Germany) was used for preparative TLC.

2.2. Preparation of synthetic rac. 5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-ol and rac 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-ol

Base of benfluron (0.84 g, 2.65 mmol) or dimefluron (1 g, 2.65 mmol) was dissolved in methanol (40 ml). Sodium borohydride (0.3 g, 7.94 mmol) was added and the reaction mixture was stirred under ambient temperature for 1 h and then refluxed for half of an hour. Methanol was removed under reduced pressure, the residue was diluted by 5% aqueous NaOH (20 ml), and C₇-reduced dimefluron was extracted into ethyl acetate. The organic layer containing the product was dried over anhydrous Na₂SO₄. After ethyl acetate removal, the crude base of rac. 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-ol (base of rac. 5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluorene-7-ol, respectively) was obtained.

Preparative thin-layer chromatography was used for isolation of red-B and -D from reaction mixtures. Chromatographic layers of Kieselgel 60H (0.3 mm thick on 20 × 20 glass plates) were prepared from a suspension in triethylamine–methanol 1:1 (v/v) using a Camag Automatic TLC Plate Coater (Muttenez, Switzerland) and left to dry for about 20 min. The reaction mixture was dissolved in a minimum volume of the mobile phase and the solution was transferred onto the start of a chromatographic plate and developed in a chloroform–methanol–triethylamine mixture (80:10:5, v/v). After chromatography, the individual fluorescence bands appertaining to red-B or -D were scraped off from the silica gel. Each individual purified product was eluted from silica gel with methanol using a sintered-glass filter (No. 4, porosity 40 μm) and filtrate was evaporated to dryness. The identity of the compounds was confirmed by NMR analysis.

A Varian Mercury-Vx BB 300 NMR spectrometer was used for the NMR analyses of the synthetic standards of red-B and -D metabolites. The NMR spectra were recorded at 300 MHz for ¹H, and 75 MHz for ¹³C. Chemical shifts are given as δ values in ppm, the coupling constants are given in

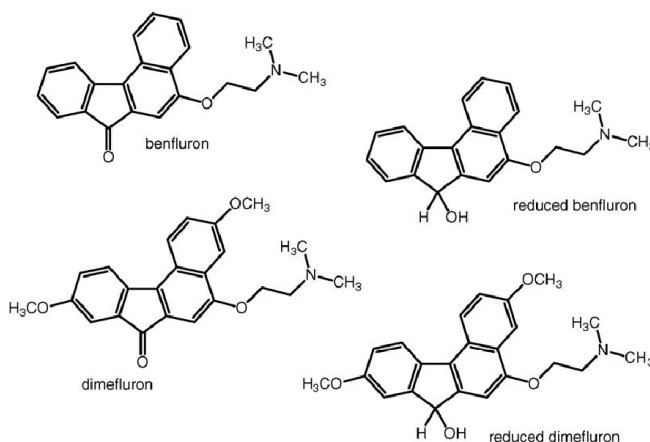


Fig. 1. Structures of the compounds under study.

Hz. Analytical sample (15–20 mg) was dissolved in deuterated dimethylsulfoxide (0.7 ml) and the solution was transferred *via* pipette into an NMR tube (203 mm length, 5 mm diameter).

2.2.1. NMR analysis of red-B

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.65 (1H, d, $J=8.51$ Hz, H1), 8.28 (1H, dd, $J=8.51$ Hz, $J=1.10$ Hz, H4), 8.20 (1H, d, $J=7.69$ Hz, H11), 7.73–7.65 (1H, m, H2), 7.62 (1H, d, $J=7.69$ Hz, H8), 7.60–7.53 (1H, m, H3), 7.46–7.38 (1H, m, H10), 7.31–7.22 (2H, m, H6, H9), 5.90 (1H, d, $J=7.42$ Hz, OH), 5.47 (1H, d, $J=7.41$ Hz, H7), 4.39–4.25 (2H, m, OCH_2), 2.83 (2H, t, $J=5.49$ Hz, NCH_2), 2.30 (3H, s, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 154.6, 147.6, 147.3, 140.6, 129.5, 128.7, 127.8, 126.1, 125.6, 125.6, 125.2, 124.7, 124.0123.1, 121.7, 102.8, 74.3, 66.9, 57.9, 45.9.

2.2.2. NMR analysis of red-D

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.51 (d, 1H, $J=9.34$ Hz, H1), 8.04 (d, 1H, $J=8.51$ Hz, H11), 7.59 (d, 1H, $J=2.75$ Hz, H4), 7.30 (dd, 1H, $J=9.34$ Hz, $J=2.75$ Hz, H2), 7.22 (s, 3H, H6), 7.20 (d, 1H, $J=2.61$ Hz, H8), 6.94 (dd, 1H, $J=8.51$ Hz, $J=2.61$ Hz, H10), 5.87 (bs, 1H, OH), 5.39 (s, 1H, CH), 4.34–4.23 (m, 1H, OCH_2), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 2.82 (t, 2H, $J=5.27$ Hz, NCH_2), 2.30 (s, 6H, NCH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 158.1, 156.7, 152.8, 149.9, 143.6, 133.3, 126.9, 126.6, 125.7, 124.2, 122.1, 119.1, 113.5, 111.2, 103.6, 102.0, 74.1, 67.1, 57.9, 55.5, 55.2, 45.9.

2.3. Biological material

Young adult intact males, sexually matured, 3–5 animals from each species, were used for experiments. All animals used were healthy and have not been subjected to any pharmacological treatments. Wistar rats (*Rattus norvegicus*

var. alba, 10–14 weeks old) and guinea pigs (*Cavia aperea var. porcellus*, weight 450–500 g) were fed a standard diet and sacrificed by decapitation under ether anaesthesia. Rabbits (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*, Chinchilla race) were fed a standard diet and sacrificed by cervical spine dislocation at the age of 4 month. Farm animals, boars (*Sus scrofa f. domestica*, Landrace breed) and bucks (*Capra aegagrus f. hircus*, Czech white goat breed), were bred under the usual farm conditions in Czech Republic. They were slaughtered at the age of 7–9 months. All species were subjected to an overnight starvation with free access to tap water. The liver (without any macroscopic alterations) was removed immediately after death of animal. The whole liver or *lobus sinister* or *dexter lateralis* were cut into small pieces, and stored frozen in liquid nitrogen. The human liver samples from three male donors (49, 56 and 64 years old) were obtained from the Cadaver Donor Programme of Transplant Centre of Faculty of Medicine, Charles University, Hradec Králové. Cut part of liver (*lobus hepatis sinister*) in ice-cooled Eurocollins solution was transported from the hospital to the laboratory and after that it was stored in the freezer (-80°C) till preparation of subcellular fractions.

2.4. Preparation of subcellular fractions

Frozen liver samples were thawed at room temperature (up to 15 min) and homogenised at the w/v ratio of 1:6 in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, using a Potter-Elvehjem homogeniser and sonication with Sonupuls (Bandeline, Germany). The microsomal fractions were isolated by fractional ultracentrifugation of the liver homogenate with the same buffer. A re-washing step (followed by a second ultracentrifugation) was included at the end of the microsome preparation procedure. Microsomes were finally resuspended in the same buffer containing 20% glycerol (v/v) and were stored at -80°C . Protein concentrations were assayed using the

bicinchoninic acid method [28]. Concentrations of protein ranged between 6 and 8 mg ml⁻¹.

2.5. Incubation of hepatic microsomal fraction with benfluron and dimefluron

Suitable conditions for biotransformation assays (substrate and coenzyme concentrations, time of incubation) were chosen according to previous experiments [23]. The microsomal or cytosolic suspensions (0.1 ml in 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.4) were incubated with 0.6 μmol of coenzymes (mixture NADPH and NADH) and with 0.5 μmol of substrates (benfluron or dimefluron, respectively). The total volume of reaction mixtures was 0.3 ml. First type of blank samples did not contain substrates, while in second types of blanks the buffer was added instead of microsomes. The incubations were carried out at 37 °C for 30 min under aeration and were terminated by addition of 0.1 ml of 26% aqueous ammonia solution.

2.6. Sample preparation of the incubates

When the in vitro enzymatic reaction (see Section 2.5) was accomplished by addition of aqueous ammonia solution, ethyl acetate (0.7 ml) was added into the incubation mixture and the content of the tube was vortexed-mixed for 1 min. After centrifugation (2000 × g, 12 min), the tubes were stored in a deep freezer (–75 °C for 30 min) until the lower aqueous layer froze to ice. The upper ethyl acetate layer containing the analytes was decanted into another clean 3-ml tube. The extraction of aqueous layer was repeated once more with the same volume of ethyl acetate as described above. Both ethyl acetate extracts were poured together and the solvent was evaporated (water bath 45 °C, stream of nitrogen). The dry extract in the glass tube was reconstituted in 600 μl of the mobile phase and transferred into the vial of autosampler. An amount of 100 μl of the sample was injected into the chromatographic column.

2.7. Chiral chromatography of benzo[*c*]fluorene derivatives in the incubation mixtures

Routine chromatographic analyses were performed using a Thermo Electron (formerly Thermo Finnigan) chromatograph (San Jose, CA, USA). The chromatographic system was composed of an SCM1000 solvent degasser, P4000 quaternary gradient pump, AS3000 autosampler with a 100 μl sample loop, UV6000 LP photodiode array detector with Light Pipe Technology, SN4000 system controller and a data station with the ChromQuest 4 analytical software (Thermo Electron, Inc., San Jose, CA, USA) working under the Windows 2000 operating system (Microsoft Corporation). During the development of an HPLC method, a polarimetric detector Chiralyser (IBZ Meßtechnik, Hannover, Germany) was used for identification of (+)- and (–)-enantiomer of reduced metabolites of benfluron and dimefluron.

A polysaccharide, cellulose-based reversed phase chiral column 250 mm × 4.6 mm packed with Chiralcel® OD-R, 10 μm (Daicel Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan), pre-column LiChroCART® 4-4 (Merck, Darmstadt, Germany) with a C-18 achiral reversed phase.

A mixture of 1 M aqueous NaClO₄ and acetonitrile (60:40, v/v) was applied to the separation and determination of benfluron and its phase I metabolites, including C₇-reduced benfluron (red-B) enantiomers. Benfluron and its metabolites were separated over 50 min.

Likewise, a mixture of 1 M aqueous NaClO₄ and methanol (25:75, v/v) was applied to the separation and determination of dimefluron and its phase I metabolites, inclusive of C₇-reduced dimefluron (red-D) enantiomers. Dimefluron and its metabolites were separated over 90 min.

Flow rate was 0.5 ml min⁻¹ in both cases. Red-B was detected at 340 nm, red-D at 370 nm.

2.8. Calibration

Standard 10⁻³ M stock solutions [31.9 mg of red-B (base) and 37.9 mg of red-D (base)] and each in 100 ml of the respective UHQ-water solution containing equimolar amount of hydrochloric acid were prepared. Lower concentrations of each compound were obtained by dilution with UHQ water. A calibration series of C₇-reduced benfluron (C₇-reduced dimefluron, respectively) with the concentrations 2.5, 10.0, 17.5, 25.0, and 35.0 nmol ml⁻¹ of each analyte was made. All points of calibration curve were made in six replicates. This calibration series was measured using the UV detector under the condition mentioned in Section 2.7 and evaluated using an external standard method.

2.9. Testing and statistical evaluation of the analytical procedure

On-line statistical processing of the calibration analyses by the least-squares method was performed automatically using the ChromQuest 4, software. The linearity of the calibration curve from the aqueous solutions of rac. C₇-reduced benfluron (rac. C₇-reduced dimefluron, respectively) was tested and evaluated for each of the enantiomers [$y = kx + q$, where x is the half concentration of rac. C₇-reduced benfluron (rac. C₇-reduced dimefluron) and y the corresponding peak-area of each enantiomer of C₇-reduced benfluron (C₇-reduced dimefluron). The correlation coefficient (r) was also expressed. The accuracy was determined as a relative error (%) found on the standard curve. The precision of the method, expressed as the relative standard deviation (percentage of coefficients of variation; R.S.D. = 100 S.D./mean), was also assessed. Both statistical parameters were calculated for each concentration level. The range of the applicability of the HPLC method was enclosed within the lower limit of quantification (LLOQ) and the upper limit of quantification (ULOQ). The lower limit of quantification (LLOQ) was determined as the lowest concentration on the standard calibration curve, which was measured

with a precision of 20% and accuracy of 80 or 120%. Upper limit of quantification (ULOQ) was equal to the highest concentration in the 5-level calibration. The recoveries of individual enantiomers of red-B and -D were also calculated [29,30].

3. Results and discussion

3.1. Chiral chromatography of benzo[c]fluorene derivatives

The carbonyl reduction of a prochiral 7*H*-benzo[c]fluorene-7-one derivative (B or D) leads to the formation of two enantiomers. Their enantiomeric ratio is dependent on the conditions of the respective reaction. Reduction of B or D using sodium borohydride in methanol (see Section 2.2) gave a racemic mixture of both enantiomers (enantiomeric ratio 1:1), because the access of hydride anion to the electrophilic

carbon of carbonyl group is possible from both sides of 7*H*-benzo[c]fluorene-7-one molecule with the same probability.

On the other hand, in an enzymatically catalyzed reduction, when a planar 7*H*-benzo[c]fluorene-7-one molecule is fixed on the surface (or in some cavity) of apoenzyme and the prochiral carbonyl is accessible preferentially from one side of the planar molecule, the enantiomeric ratio could be shifted in favour of one of the enantiomers. These differences could be observed using chiral separation methods.

For these purposes, suitable chiral chromatographic columns (chiral selectors) had to be searched for and new bio-analytical chiral HPLC methods were developed, validated and used for the evaluation of interspecies differences in the stereospecificity of reductive metabolism of B and D.

Eleven various chiral columns were tested in the development of the optimal conditions for enantiomeric separations of red-B and -D. Solutions of racemic red-B ($c = 0.2 \text{ mg ml}^{-1}$) and racemic red-D ($c = 0.4 \text{ mg ml}^{-1}$) in 2-propanol were injected into the chiral column and the resolution factor was

Table 1
Results of the enantioselective separation of red-B

Column	Parameters	Particle size (μm)	Mobile phase (v/v)	Flow rate (ml min^{-1}), temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Commentary
Chiralcel OD-R	250 mm \times 4.6 mm	10	ACN–1 M NaClO ₄ (60:40)	0.5, 40	Partly separated
			ACN–1 M NaClO ₄ (40:60)	0.5, 40	Baseline separated, analysis time about 20 min
			ACN–1 M NaClO ₄ (40:60)	0.5, 25	Baseline separated; optimal condition
			ACN–0.5 M NaClO ₄ (40:60)	0.5, 40	Decrease of resolution
			ACN–0.25 M NaClO ₄ (40:60)	0.5, 40	Decrease of resolution
			ACN–0.5 M NaClO ₄ (39:61)	0.5, 40	Baseline separated, analysis time about 20 min
Chiralcel OD-H	250 mm \times 4.6 mm	10	Hex–2-propanol (90:10)	1.0, 40	Baseline separated, analysis time about 30 min
			Hex–2-propanol (75:25)	1.0, 40	No separation, analysis time about 23 min
			Hex–EtOH (80:20)	1.0, 30	No separation, analysis time about 8.5 min
Chiralcel OB-H	250 mm \times 4.6 mm	10	Hex–2-propanol (65:35)	0.7, 40	No separation, analysis time about 13 min
Caltrex Chiral R IV	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (40:60)	0.9, 40	No separation, analysis time about 22 min
Caltrex Chiral R VIII	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (30:70)	0.7, 40	No separation
Caltrex Chiral R X	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–2-propanol (75:25)	1.0, 30	No separation
Chiral AGP	100 mm \times 4.0 mm	5	12 mM Na ₂ HPO ₄ –2-propanol (95:5) pH = 7.03	0.8, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –MeOH (88:12) pH = 7.03	0.6, 25	Partly separated
Chiral HSA	150 mm \times 4.0 mm	5	12 mM Na ₂ HPO ₄ –MeOH (88:12) pH = 7.03	0.6, 25	No separation
(R,R) Whelk-0-1	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–2-propanol (60:40)	1.0, 40	No separation
Kromasil KR 100-5CHI – DMB	250 mm \times 4.6 mm	5	Hex–2-propanol (60:40)	1.0, 40	No separation, analysis time about 3.8 min
	250 mm \times 4.6 mm	5	Hex–EtOH (95:5)	1.0, 40	No separation, analysis time about 3.8 min
Chiraspher	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (50:50)	0.6, 30	No separation
			Hex–EtOH (75:25)	0.6, 30	No separation

Table 2
Results of the enantioselective separation of red-D

Column	Parameters	Particle size (μm)	Mobile phase (v/v)	Flow rate (ml min^{-1}), temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Commentary
Chiralcel OD-R	250 mm \times 4.6 mm	10	ACN–1 M NaClO ₄ (40:60)	0.5, 40	No separation
			Gradient elution*	0.5, 40	Without effect
			EtOH–1 M NaClO ₄ (29:71)	0.5, 25	Partly separation, low resolution
			(MeOH–EtOH (7:3))–1 M NaClO ₄ (75:25)	0.5, 40	Partly separation, low resolution
			(MeOH–EtOH (8.5:1.5))–1 M NaClO ₄ (75:25)	0.5, 40	Partly separation, low resolution
			(MeOH–EtOH (9:1))–1 M NaClO ₄ (75:25)	0.5, 40	Partly separation, low resolution
			MeOH–1 M NaClO ₄ (75:25)	0.5, 40	Sufficient separation
			MeOH–1 M NaClO ₄ (75:25)	0.5, 25	Sufficient separation, optimal condition
Chiralcel OD-H	250 mm \times 4.6 mm	10	Hex–2-propanol (70:30)	1.0, 40	No separation
			Hex–2-propanol (75:25)	1.0, 40	No separation
			Hex–EtOH (80:20)	0.8, 30	No separation
Chiralcel OB-H	250 mm \times 4.6 mm	10	Hex–2-propanol (60:40)	0.5, 40	No separation
			Hex–2-propanol (75:25)	0.5, 40	No separation
Caltrex Chiral R IV	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (40:60)	0.9, 40	No separation
Caltrex Chiral R VIII	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (30:70)	0.7, 40	No separation
Caltrex Chiral R X	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–2-propanol (75:25)	1.0, 30	No separation
			Hex–2-propanol (10:90)	1.0, 30	No separation
Chiral AGP	100 mm \times 4.0 mm	5	10 mM CH ₃ COOH, pH = 4.51	0.8, 25	No separation
			10 mM CH ₃ COOH–2-propanol (95:5) pH = 4.51	0.8, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –2-propanol (95:5) pH = 6.58	0.8, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –ACN (82:18) pH = 7.03	0.6, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –ACN (95:6) pH = 6.58	0.6, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –MeOH (82:18) pH = 6.58	0.6, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –MeOH (82:18) pH = 7.03	0.6, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –MeOH (82:18) pH = 7.03	0.6, 25	No separation
Chiral HAS	150 mm \times 4.0 mm	5	12 mM Na ₂ HPO ₄ –MeOH (82:18) pH = 7.03	0.6, 25	No separation
			12 mM Na ₂ HPO ₄ –MeOH (82:18) pH = 7.03	0.6, 25	No separation
(R,R) Whelk-0-1	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–2-propanol (95:5)	1.0, 40	No separation
			Hex–2-propanol (60:40)	1.0, 40	No separation
Kromasil KR 100-5CHI – DMB	250 mm \times 4.6 mm	5	Gradient elution**	1.0, 40	Without effect
			Hex–2-propanol (40:60)	1.0, 40	No separation
			Hex–2-propanol (60:40)	1.0, 40	No separation
			Hex–2-propanol (90:10)	1.0, 40	No separation
Chiraspher	250 mm \times 4.0 mm	5	Hex–EtOH (95:5)	0.7, 40	No separation
			Hex–EtOH (50:50)	0.6, 30	No separation
			Hex–EtOH (75:25)	0.6, 30	No separation

* 0–20 min ACN–1 M NaClO₄ (30:70, v/v); 20–40 min ACN–1 M NaClO₄ (10:90, v/v); 40–50 min ACN–1 M NaClO₄ (10:90, v/v); 50–70 min ACN:1 M NaClO₄ = 30:70; 70–90 min ACN–1 M NaClO₄ (50:50, v/v); 90–120 min ACN–1 M NaClO₄ (50:50, v/v).

** 0 min Hex–2-propanol (100:0, v/v); 30 min Hex–2-propanol (0:100, v/v).

evaluated as a principal criterion for the selection of suitable conditions of enantioselective separation of red-B and -D. The results are shown in Table 1 for red-B and in Table 2 for red-D, respectively.

The best separation of enantiomers in racemic red-B were achieved on a Chiralcel OD-R column, with cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) as chiral selector using a mobile phase acetonitrile–1 M aqueous NaClO₄ (40:60, v/v). Flow rate was 0.5 ml ml⁻¹ and the separation was performed at ambient temperature (see Fig. 2). Increase of the temper-

ature led to the acceleration of analysis but the resolution of enantiomers was worse. An analogous effect was observed after the decrease of sodium perchlorate concentration in the mobile phase. From the whole spectrum of chiral selectors (see Tables 1 and 2), also the AGP-column seemed to give promising results, but the peak symmetry and resolution was not sufficient on this column. The separation properties of the other columns tested were not appropriate for our purpose.

Reduced dimefluron differs from the structure of reduced benfluron by the presence of two methoxy groups on C₃ and

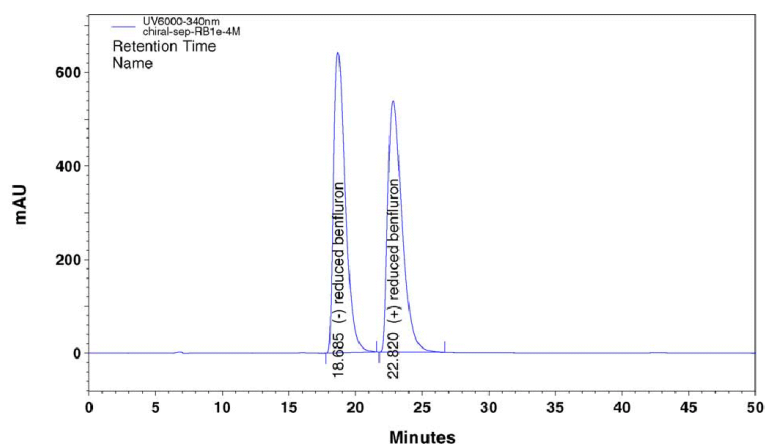


Fig. 2. Chiral separation of red-B under optimal conditions (see Table 1).

C₉ carbons. These methoxy groups seems to be promising for the pharmacokinetic and xenobiochemical properties [22,23] but the chiral separation of red-D is negatively influenced by this substitution. When the same conditions as for red-B had been applied on chiral separation of red-D, the separation of red-D enantiomers failed. The organic component of mobile phase was by sequel replaced with ethanol and then with methanol. In first case, the enantiomers were only in part resolved. Better results were achieved with methanol as an organic modifier. The mobile phase was then optimised to the final composition methanol–1 M aqueous NaClO₄ (75:25, v/v); flow rate was 0.5 ml min⁻¹ at ambient temperature (see Fig. 3).

The peak identity and purity was tested using UV6000 diode-array detector, the same very characteristic UV spectra were obtained for both enantiomers of each com-

ound (red-B or -D). Optical rotation was characterized using a Chiralyser polarimetric detector. (–)-Enantiomer of both compounds left the column as first (*t*_R = 18.685 min for red-B, *t*_R = 20.405 min for red-D) followed by (+)-enantiomer (*t*_R = 22.820 min for red-B, *t*_R = 22.702 min for red-D).

Although only the percentual enantiomeric ratio of red-B (red-D, respectively) after the incubation of the microsomal fractions of various species was evaluated, the validation of an external standard method for both enantiomers of red-B (red-D, respectively) was performed. The calibration curve was found to be linear [$y = 1.43 \times 10^5 x - 8.4 \times 10^4$ for (–)-enantiomer of red-B; $y = 1.43 \times 10^5 x - 8.9 \times 10^4$ for (+)-enantiomer of red-B; $y = 9.89 \times 10^5 x - 7.2 \times 10^4$ for (–)-enantiomer of red-D; $y = 1.09 \times 10^5 x - 5.7 \times 10^4$ for (+)-enantiomer of red-D] in the range of 5.0–17.5 nmol ml⁻¹ with

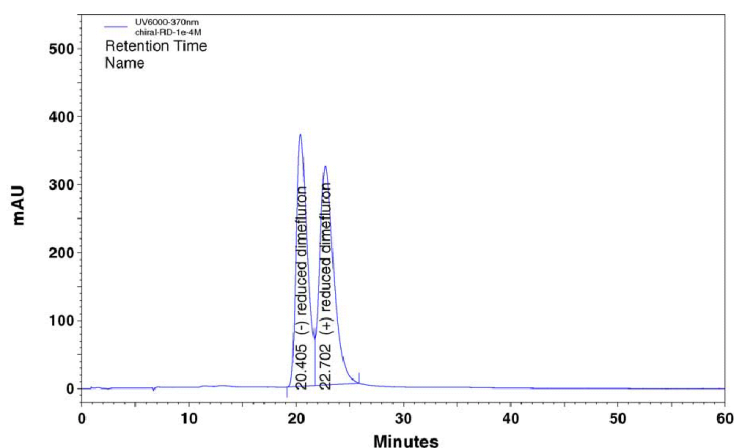


Fig. 3. Chiral separation of red-D under optimal conditions (see Table 2).

$r=0.999$ for both red-B and -D. The accuracy and precision for red-B and -D ranged in the intervals 81.9–103.7% and 0.04–4.0%. LLOQ for red-B (red-D) was 2.5 nmol ml⁻¹. ULOQ was in both cases 17.5 nmol ml⁻¹. Recovery ranged in the interval (72.9–74.5%).

3.2. Enantiomeric ratios of red-B and -D in the incubation mixtures of various species

The extracts from the incubation mixtures were analysed under the optimal conditions for each enantiomer. Differences among species in the metabolism of both compounds (B and D) were observed. The carbonyl reduction of B led predominantly to (+)-red-B in all species except rat. The amount of (–)-red-B was inconsiderable in comparison with (+)-enantiomer, whereas in the metabolisms of rats prevailed (–)-red-B. In some cases, the enantiomeric excess was not

Table 3
Comparison of the enantiomeric excess of red-B

Species	(–)-Red-B	(+)-Red-B	e.e. (–)-red-B vs. (+)-red-B
Red-B			
Rat	Prevalent	Minor	90.2% vs. 9.8%
Guinea pig	Minor	Prevalent	–
Rabbit	Not detected	Prevalent	0% vs. 100%
Goat	Minor	Prevalent	–
Pig	Minor	Prevalent	–
Human	Not detected	Prevalent	0% vs. 100%

specified exactly, because some small amounts of interfering peaks were co-eluted with red-B (see Table 3).

Different results have been found out for red-D. Rat metabolized B mainly to (–)-red-B as D was metabolized to (+)-red-D. More interesting was the comparison of metabolites by rabbits, B was converted completely to the (+)-red-B

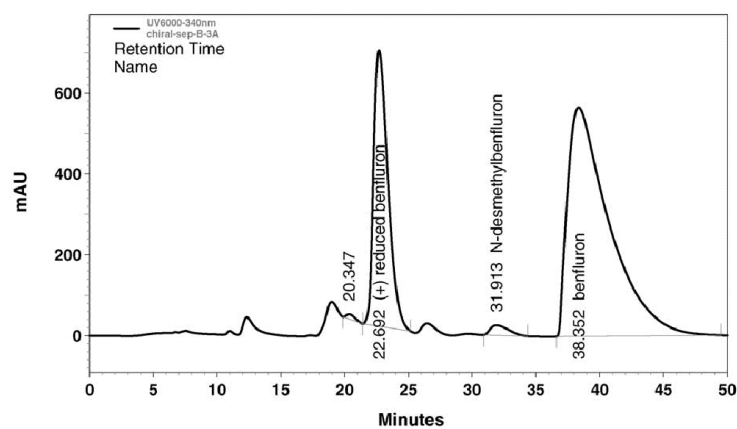


Fig. 4. Chromatogram of benfluron after incubation in rabbit's microsomes.

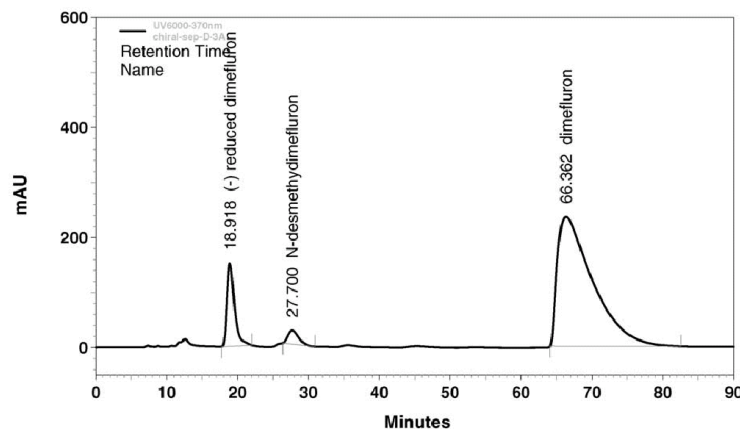


Fig. 5. Chromatogram of dimefluron after incubation in rabbit's microsomes.

Table 4
Comparison of the enantiomeric excess of red-D

Species	(–)-Red-D	(+)-Red-D	e.e. (–)-red-D vs. (+)-red-D
Red-D			
Rat	Minor	Prevalent	19.3% vs. 80.7%
Guinea pig	Minor	Prevalent	23.6% vs. 76.4%
Rabbit	Prevalent	Not detected	100% vs. 0%
Goat	Minor	Prevalent	28.2% vs. 71.8%
Pig	Comparable	Comparable	47.0% vs. 53%
Human	Prevalent	Minor	64.6% vs. 35.4%

(see Fig. 4), but D was converted completely to the (–)-red-D (see Fig. 5). Pig's reductase seems to be not stereospecific in conversion of D to the red-D metabolite, the enantiomeric excess was nearly 1:1, but B undergoes the conversion largely to the (+)-red-B. Results summary is shown in Tables 3 and 4.

4. Conclusions

Optimized chromatographic conditions for chiral separation of red-B and -D were searched out. The best separation was achieved on column Chiralcel OD-R, with cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate as chiral selector). The red-B enantiomers were separated successfully using a mobile phase acetonitrile–1 M aqueous NaClO₄ (40:60, v/v). Another mobile phase, methanol–1 M aqueous NaClO₄ (75:25, v/v), had to be employed for the sufficient resolution of red-D enantiomers. Flow rate was 0.5 ml min⁻¹ at ambient temperature in both cases. Red-B was detected at 340 nm, red-D at 370 nm.

The developed analytical procedures were successfully applied to in vitro study of the biotransformation of B and D in the microsomal fractions of liver homogenates prepared from six species (rat, rabbit, pig, guinea pig, goat and human).

Variances in the reductive metabolism were found out in the biotransformation of both parent compounds, i.e. B and D. Interesting results gave the comparison of all species under study. The carbonyl reduction was stereospecific in all cases and led predominately to one enantiomeric form. Only carbonyl-reductase of pig seems not to be stereospecific, if D was used as substrate. The amounts of both enantiomers are comparable in this case.

Acknowledgements

This work was implemented with the support of the Research Project MSM 111600001 and MSM 111600002, Czech Republic and Ministry for Education, Science and Culture of Mecklenburg-Vorpommern, Germany. Authors are grateful to Drs. Pour and Kuneš (Faculty of Pharmacy) for NMR-analyses of red-B and red-D standards and to the Transplant Centre (Hradec Králové) for providing human liver samples.

References

- [1] B. Testa, J. Caldwell, *Biochemistry of Redox Reactions*, Academic Press, London, 1995.
- [2] R. Felsted, N.R. Bachur, *Drug Metab. Rev.* 11 (1980) 1–60.
- [3] B. Wermuth, *Prog. Clin. Biol. Res.* 174 (1985) 209–230.
- [4] J.J.R. Hermans, H.H.W. Thijssen, *Adv. Exp. Med. Biol.* 328 (1993) 351–360.
- [5] E. Masser, *Biochem. Pharmacol.* 49 (1995) 421–440.
- [6] M. Miko, J. Křepelka, M. Mělka, *Biochem. Pharmacol.* 42 (1991) 214–216.
- [7] E. Kvasničková, M. Nobilis, I.M. Hais, *J. Chromatogr.* 295 (1984) 201–209.
- [8] E. Kvasničková, M. Nobilis, A. Šroler, E. Báčová, I.M. Hais, *J. Chromatogr.* 387 (1987) 559–561.
- [9] I.M. Hais, M. Nobilis, E. Kvasničková, *J. Chromatogr.* 500 (1990) 643–653.
- [10] E. Kvasničková, I.M. Hais, M. Nobilis, in: P. Hlavica (Ed.), *Progress in Pharmacology and Clinical Pharmacology*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, NY, 1991, pp. 137–146.
- [11] M. Miko, J. Křepelka, M. Nobilis, in: D. Adam (Ed.), *Recent Advances in Chemotherapy*, Futuramed Publishers, Munich, 1992, pp. 2620–2621.
- [12] M. Nobilis, E. Kvasničková, A. Šroler, I.M. Hais, *Drug Metab. Drug Interact.* 9 (1991) 225–240.
- [13] E. Kvasničková, M. Nobilis, A. Šroler, V. Wsól, I.M. Hais, in: D. Crommelin, P. Couvreur, D. Duchéne (Eds.), *In vitro and Ex vivo Test Systems to Rationalize Drug Design and Delivery*, Editions de Santé, Paris, 1994, pp. 331–335.
- [14] M. Nobilis, P. Anzenbacher, J. Pastera, Z. Svoboda, K. Hrubý, J. Květina, K. Ubik, F. Trejtnar, *J. Chromatogr. B* 681 (1996) 143–151.
- [15] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, F. Trejtnar, E. Kvasničková, *Exp. Toxicol. Pathol.* 48 (Suppl. II) (1996) 366–370.
- [16] K. Hrubý, E. Anzenbacherová, P. Anzenbacher, M. Nobilis, *Gen. Physiol. Biophys.* 16 (1997) 321–327.
- [17] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, V. Wsól, E. Kvasničková, *Drug Metabol. Drug Interact.* 14 (1998) 221–234.
- [18] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, V. Wsól, E. Kvasničková, *Drug Metabol. Drug Interact.* 14 (1998) 235–250.
- [19] Z. Svoboda, M. Nobilis, J. Květina, K. Lemr, *Acta Med. (Hradec Králové)* 42 (1999) 73–78.
- [20] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, V. Wsól, V. Kubíček, V. Baliharová, E. Kvasničková, *Chem. -Biol. Interact.* 126 (2000) 185–200.
- [21] K. Hrubý, E. Anzenbacherová, P. Anzenbacher, M. Nobilis, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65 (2000) 1374–1386.
- [22] M. Nobilis, L. Skálová, B. Szotáková, J. Kujíček, M. Pour, J. Kuneš, M. Mělka, E. Kvasničková, V. Geršl, *Drug Metab. Rev.* 33 (Suppl. 1) (2001) 116.
- [23] L. Skálová, M. Nobilis, B. Szotáková, E. Kondrová, M. Šavlík, V. Wsól, L.P. Garcia, E. Maser, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 297–305.
- [24] P. Císař, M. Nobilis, J. Klimeš, in: *Abstract Book of the 32nd conference Synthesis and Analysis of Drugs* (ISBN 80-900306-5-3), p. 19.
- [25] S. Janotová, K. Horáková, *Cell Biochem. Funct.* 11 (1993) 131–135.
- [26] M. Miko, J. Křepelka, M. Mělka, *Anti-cancer Drugs* 2 (1991) 289–295.
- [27] M. Miko, J. Křepelka, M. Nobilis, *Anti-cancer Drugs* 3 (1992) 63–68.
- [28] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, D.C. Klenk, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [29] V.P. Shah, K.K. Midha, S.V. Dighe, *Int. J. Pharm.* 82 (1992) 1–7.
- [30] CDER and CVM Guidance for Industry. *Bioanalytical Method Validation*, May 2001 (<http://www.fda.gov/cder/guidance/>).

6.1.3. Comparison of different stationary phases for bioanalytical studies of biologically active compounds

Anna Zerzaňová, Přemek Císař, Jiří Klimeš

Journal of Separation Science, Volume 29, Issue 14, September 2006, Pages 2126 - 2135

Chromatografické chování čtyř směsí látek bylo testováno na kolonách různých vlastností. Kokain, dimefluron, nabumeton a tramadol ve směsích se svými hlavními metabolity byli vybrány jako testované látky. Výše zmíněné modelové směsi látek byly separovány na kolonách s vázanými řetězci čtyř druhů – C18, C8, palmitamidopropyl a pentafluorophenylpropyl. Nejlepší podmínky pro separaci jednotlivých látek ve směsi s jejich metabolity byly vybrány na základě porovnání hodnot rozlišení, retenčních časů a symetrie píků.

Čtyři vybrané směsi byly vybrány, aby reprezentovali několik typů látek s jejich metabolity. Všechny mají ve své struktuře větší či menší aromatickou planární část. Nabumeton je neutrální sloučenina přeměňovaná na kyselé metabolity. Tramadol, kokain a dimefluron jsou látky bazického charakteru, přičemž kokain je biotransformován na amfoterní benzoyllegonin. Tramadol i dimefluron obsahují ve své struktuře methoxyskupinu vázanou na aromatické jádro. Při biotransformaci se tato skupina mění na fenolickou. Srovnání tramadolu s jedním benzenovým jádrem a dimefluronu s rozsáhlým benzo[c]fluorenovým skeletem se zdálo být zajímavé.

Ze získaných dat vyplývá, že pro směs dimefluronu a jeho metabolitů je nejvhodnější stacionární fáze s pentafluorophenylpropyl vázaným řetězcem, na které jsou hodnoty symetrie nezávislé na změně struktury vedoucí k vyšší polaritě.

Pro směs nabumetonu a jeho metabolitů byl zaznamenán nejužší rozptyl hodnot symetrie u kolony s palmitamidopropyl vázaným řetězcem. Bohužel z pohledu ostatních parametrů bylo nutno tuto kolonu zavrhnout, protože se nepodařilo rozdělit jednotlivé metabolity. Struktura s naftalenovou planární strukturou by vedla k domněnce, že bude dobré použít kolonu s pentafluorophenylpropyl planární stacionární fází. Hodnoty symetrie píků jsou ovšem na této koloně distribuovány v širokém rozmezí. Předpokládáme, že v tomto případě je symetrie ovlivněna odkrytím fenolické skupiny (*O*-desmethylace) na aromatickém jádře. Z tohoto důvodu bylo zajímavé studovat hodnoty symetrie na koloně s pentafluorophenylpropyl vázanou fází pro směs

tramadolu a jeho metabolitů, kde také u některých metabolitů dochází k odkrytí fenolické skupiny na aromatickém jádře. A předpoklad se nám potvrdil, *O*-desmethylovaný metabolit se na rozdíl od ostatních metabolitů významně rozmývá vpředu.

Směs kokainu a jeho metabolitu byla přidána k potvrzení této domněnky a v podstatě ji potvrdila.

Hlavním přínosem naší práce bylo, že vlastnosti kolon byly studovány na směsích příbuzných látek (léčivo – metabolity), což nebývá pravidlem při prezentaci vlastností kolon.

Anna Zerzaňová
Přemek Císař
Jiří Klimeš

Charles University, Faculty of
Pharmacy, Department of
Pharmaceutical Chemistry and
Drug Control, Hradec Králové,
Czech Republic

Original Paper

Comparison of different stationary phases for bioanalytical studies of biologically active compounds

In this study, the chromatographic behaviour of four mixtures of compounds was tested on columns possessing various surface properties. Cocaine, dimefluron, nabumetone, and tramadol were chosen as the test compounds. Cocaine is a tropane alkaloid, which is relatively often abused as a drug. This is why many papers have already been written about its determination in human biological samples. Dimefluron, a derivative of benzo[*c*]fluorene, is a new perspective drug being investigated for its potential antineoplastic effects. Nabumetone is a non-steroidal anti-inflammatory prodrug used for treatment of inflammatory and degenerative rheumatic diseases. Tramadol, derived from an opioid structure is used as an anodyne for treatment of severe pain. As a medicament it is usually determined either in biological samples or in pharmaceuticals. The above-mentioned model drugs were separated using chromatographic columns with C18, C8, palmitamidopropyl, and pentafluorophenylpropyl chains. The best conditions for separation of the individual compounds and their metabolites were chosen on the basis of resolution, retention times, and peak symmetry.

Keywords: Cocaine / Comparison of columns / Dimefluron / Nabumetone / Tramadol

Received: November 30, 2005; revised: May 30, 2006; accepted: June 7, 2006

DOI 10.1002/jssc.200500469

1 Introduction

Numerous HPLC columns with different bonded stationary phases are nowadays available, and producers continue to expand the range of columns they offer. New trends lead to size minimization and to decreased flow resistance. However, HPLC of classical dimensions is still used for routine analyses in laboratories.

Interactions between molecules of predominantly neutral character and the classical types of bonded stationary phases (C18 and C8) can be described mainly in analogy to a lipophilicity distribution between *n*-octanol and water. The other interactions are asserted above all in the case of ionogenic compounds or in the case of different types of stationary phases in dependence on bonded chains. New column architectures permit reduction of analysis time by increasing the flow rate. Various analytical HPLC columns were tested in this study: two particle-packed and two monolithic columns. The monolithic columns

included bonded C18 or C8 chains. These are made from highly porous monolithic rods of high-purity polymeric silica gel with a revolutionary bimodal pore structure ([http://pronet-internet.merck.de/Attachment/18571.Pronet.pdf?file, 28/02/2006](http://pronet-internet.merck.de/Attachment/18571.Pronet.pdf?file,28/02/2006); [http://www.phenomenex.com/phen/products/onyx/t_bimodal_pore.htm, 28/02/2006](http://www.phenomenex.com/phen/products/onyx/t_bimodal_pore.htm,28/02/2006)).

The particle-packed columns included new stationary phases – pentafluorophenylpropyl (HS F5) and palmitamidopropyl (RP-Amide) chains. According to the manufacturer, HS F5 (Fig. 1) gives excellent retention and resolution of polar compounds, as well as better selectivity, peak shape, and efficiency. Generally, bases are retained longer on HS F5 than on a C18 phase.

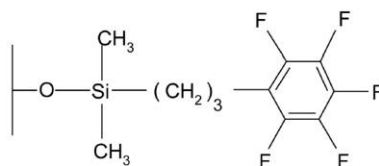


Figure 1. Structure of the bonded chain of Discovery HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm (Supelco) column ([http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/HS_F5.html, 28/02/2006](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/HS_F5.html,28/02/2006)).

Correspondence: Anna Zerzaňová, Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic.

E-mail: anna.zerzanova@faf.cuni.cz

Fax: +420-495-512423

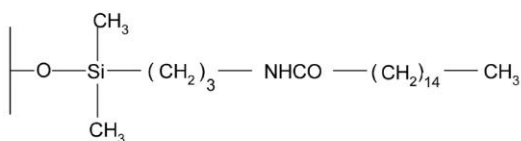


Figure 2. Structure of the bonded chain of Ascetis™ RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm Supelco column (http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/Discovery_RP_Amide_C16_HPLC_Columns.htm, 28/02/2006).

Ascetis RP-Amide (Fig. 2) is a polar embedded RP phase that provides unique selectivity and increased resolution for HPLC analyses of polar compounds.

Cocaine, dimefluron, nabumetone, and tramadol were chosen as test compounds. The two drugs (nabumetone and tramadol), the habit-forming substance (cocaine), and the potential drug (dimefluron) were studied after administration in a biological sample where they were determined together with their metabolites. These four mixtures of compounds were chosen for comparison of stationary phases.

Cocaine (Fig. 3), belonging to the group of tropane alkaloids, is a drug that is relatively often abused. It is metabolized in the human body to form benzoylecgonine as major metabolite, regardless of the mode of administration, and this compound is most commonly used for analytical determination of cocaine abuse. Immunochemical and TLC methods have been developed for proof of the presence of cocaine in biological systems. Many

instrumental techniques such as HPLC, GC, CE, etc. (usually coupled with an MS detector) are used for its determination and determination of its metabolites [1, 2]. UV detection is commonly used in HPLC. Fluorescence and mass spectroscopy can also be used to increase sensitivity [3]. In HPLC, which is the focus of our interest, various chromatographic columns have been used, mostly classical C18 and C8 columns. A column with bonded cyanopropyl is an example of a phase at an interface between RP and NP. Use of an internal standard is widespread. Lidocaine, bupivacaine, higher esters of benzoylecgonine, or deuterated cocaine or benzoylecgonine serve this purpose (MS) [1, 4].

Dimefluron (Fig. 4) is one of a set of basic derivatives of benzo[*c*]fluorene which are being investigated for their potential antineoplastic effect. It is altered primarily to *O*-desmethyl, *N*-desmethyl, *N*-oxide, and in position *C*₇ reduced metabolites. These six principal metabolites were chosen with dimefluron for this study. Homodimefluron (the higher homologue of dimefluron) was used as internal standard. Three types of columns with different mobile phases were tested in previous papers where dimefluron was studied. A column with bonded pentafluorophenylpropyl chain was selected for its best properties. UV (at 317 nm for dimefluron and metabolites and at 367 nm for reduced dimefluron) [4] and fluorescence detection [5] were used. The HPLC–MS method was developed for identification of the other minority phase I metabolites and phase II metabolites [4].

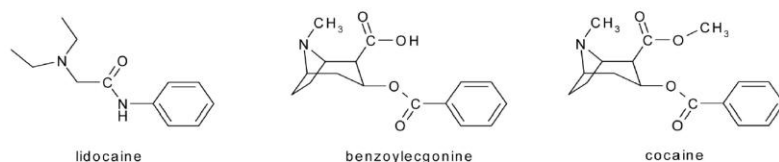


Figure 3. Structures of lidocaine (used as IS), benzoylecgonine, and cocaine.

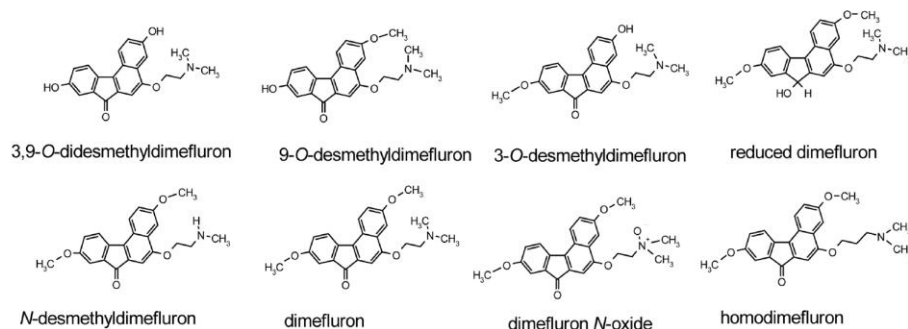


Figure 4. Structures of dimefluron, its studied metabolites, and homodimefluron (used as IS).

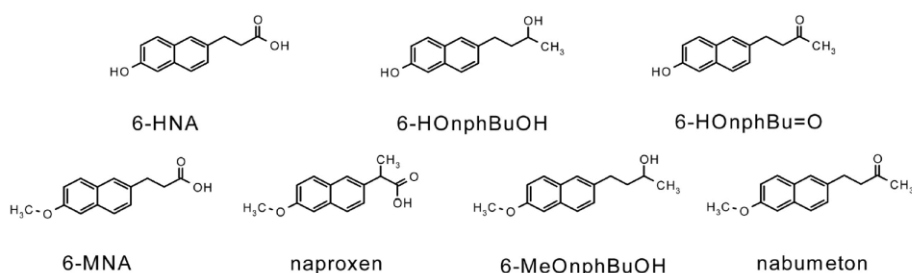


Figure 5. Structures of nabumetone, its studied metabolites, and naproxen (used as IS).

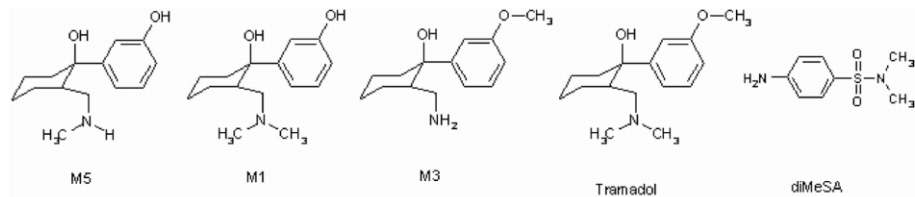


Figure 6. Structures of tramadol, its studied metabolites, and diMeSA (used as IS).

Nabumetone (Fig. 5) is a relatively new nonsteroidal anti-inflammatory prodrug, which undergoes extensive first pass metabolism to 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6-MNA). Only nabumetone and 6-MNA are usually determined [6–8]. The other effective and non-effective metabolites are generated in the body. The determination of nabumetone and its five metabolites has also been described [9]. The same working group solved the determination of phase II metabolites. The structures of these phase II metabolites were solved by HPLC with MS detection [10]. Naproxen is generally used as internal standard. UV, fluorescence, or mass spectrometric detection are described in previous papers. Columns with bonded C18 chain were usually employed [7–10]. A C8 bonded chain column has been used once [6]. Mobile phases varied. The use of acetonitrile and an aqueous component of low pH value was the only common feature.

Tramadol (Fig. 6) is a centrally-acting analgesic agent used in the treatment of more severe pain. In an organism it is preferentially metabolized by *O*- and *N*-desmethylation to *O*-desmethyl- (M1) and *N,N*-didesmethyltramadol (M3). Also other metabolites of tramadol, which occur in rat and in dog, were elucidated with the aid of MS [11]. Three major metabolites M1, M3, M5 were chosen for our study. All three major separation techniques GC, CE, and HPLC have been used for determination of tramadol and its metabolites [12]. Many detection techniques have been coupled with HPLC for this purpose: UV, fluorescence, electrochemical, and MS [12]. *N*-Acetylprocainamide [13], diMeSA [12], the *O*-ethoxy derivative of tramadol [14–17], metoprolol [18], fluconazol [19], $^2\text{H}_2$ and ^{15}N tramadol (MS) [20] were used as internal

standards. Methods using C18 columns with diverse mobile phases were developed for determination of tramadol and its metabolites [18, 21, 22]. An RP select B column was also used [12]. A method for determination of tramadol and its two monodesmethyl metabolites on a column with a monolithic architecture [23] was also developed. In the majority of cases simple mixtures of the studied compounds, internal standard, and at most one or two metabolites were separated. Often the determination was performed only as a separation of *O*-desmethyltramadol and tramadol with internal standard.

These four groups of compounds have been chosen because each of them represents a different type of analyte. One of them (nabumetone) is neutral with acid and neutral metabolites. The others are basic. All of them contain a planar structure in their molecule. These are important properties for studying their behaviour on the various types of HPLC columns.

The aim of this study was to compare the behaviour of different compounds on various chromatographic columns. The following analytical columns were tested: Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4.6 mm, monolith; Onyx Monolithic C8, 100 × 4.6 mm, monolith; Discovery HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm and Ascentis RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm.

2 Experimental

2.1 Chemicals and materials

Cocaine hydrochloride, (–)-methyl- β -benzoyloxy-2β(1*α*H,5*α*H)-tropanecarboxylate] hydrochloride (C₁₇H₂₁NO₄, M_r = 303) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,

USA); benzoylecgonine anhydrous, (–)[3β-benzoyloxy-2β(1α*H*,5α*H*)-tropanecarboxylic acid] (C₁₆H₁₉NO₄, M_r = 289) (Alltech, Applied Science, Pennsylvania, USA) and lidocaine, 2-diethylamino-2',6'-dimethylacetanilide (C₁₄H₂₂N₂O, M_r = 234), used as IS, (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) were used in our study.

Dimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride (C₂₃H₂₄ClNO₄, M_r = 414); 9-*O*-desmethyldimefluron, 9-hydroxy-3-methoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride (C₂₂H₂₂ClNO₄, M_r = 399.87); 3-*O*-desmethyldimefluron, 3-hydroxy-9-methoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride (C₂₂H₂₂ClNO₄, M_r = 400); 3,9-*O*-didesmethyldimefluron, 3,9-dihydroxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one, base (C₂₁H₁₉NO₄, M_r = 349); *N*-desmethyldimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-methylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride (C₂₂H₂₂ClNO₄, M_r = 400); dimefluron *N*-oxide (C₂₃H₂₃NO₅, M_r = 393); C₇-reduced dimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-ol (C₂₃H₂₅NO₄, M_r = 379) and homodimefluron (a higher homologue of dimefluron), 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminopropoxy)-7*H*-benzo[*c*]fluoren-7-one base (C₂₄H₂₅NO₄, M_r = 391) were synthesized in our laboratories. Their structures were confirmed by NMR and MS. Their syntheses have been described in a previous paper [4].

Nabumetone, 4-(6-methoxy-2-naphthyl)-butan-2-one (C₁₅H₁₆O₂, M_r = 228) was obtained from PRO.MED.CS Praha a.s., Czech Republic. Naproxen, (+)-6-methoxy-α-methyl-2-naphthaleneacetic acid (Sigma Aldrich, Prague, Czech Republic) was used as IS for HPLC determination. 6-Methoxy-2-naphthylacetic acid (C₁₃H₁₂O₃, M_r = 216, 6-MNA); 6-hydroxy-2-naphthylacetic acid (C₁₂H₁₀O₃, M_r = 202, 6-HNA); 4-(6-methoxy-2-naphthyl)-butan-2-ol (C₁₅H₁₈O₂, M_r = 230, 6-MeOnphBuOH); 4-(6-hydroxy-2-naphthyl)-butan-2-one (C₁₄H₁₄O₂, M_r = 214, 6-HONphBu=O); 4-(6-hydroxy-2-naphthyl)-butan-2-ol (C₁₄H₁₆O₂, M_r = 216.28, 6-HONphBu-OH) were synthesized in the laboratories of the Institute of Experimental Biopharmaceutics and used as the standards of nabumetone metabolites. Their structures have been confirmed by HPLC and MS [9, 10].

Tramadol, (*RS,RS*)-2-(dimethylaminomethyl)-1-(3-methoxyphenyl)cyclohexanol (C₁₆H₂₅NO₂, M_r = 267), was obtained from PRO.MED.CS Praha a.s. (Prague, Czech Republic). *O*-Desmethyltramadol, (*RS,RS*)-2-(dimethylaminomethyl)-1-(3-hydroxyphenyl)cyclohexanol (C₁₅H₂₃NO₂, M_r = 249, M1); *N,N*-didesmethyltramadol, (*RS,RS*)-2-(aminomethyl)-1-(3-methoxyphenyl)cyclohexanol (C₁₄H₂₁NO₂, M_r = 235, M3), and *O*-desmethyl-*N*-desmethyltramadol, (*RS,RS*)-2-(methylaminomethyl)-1-(3-hydroxyphenyl)cyclohexanol (C₁₄H₂₁NO₂, M_r = 235, M5) were synthesized at

The R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute (Spring House, Pennsylvania, USA) [11]; diMeSA, *N*¹,*N*¹-dimethylsulfanilamide (C₈H₁₂N₂O₂S, M_r = 204) was synthesized in the laboratory of The Institute of Experimental Biopharmaceutics [12].

Acetonitrile (HPLC gradient grade, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA), orthophosphoric acid (85% p.a.) and potassium dihydrogenphosphate (both analytical grade, Lachema Brno, Czech Republic), and ultra-high-quality (UHQ) water (prepared using an Elgastat UHQ PS apparatus, Elga, High Wycombe, England) were used.

Phosphate buffer pH 3 (50 mmol/L, pH = 3) was prepared by mixing 6.81 g of KH₂PO₄ with 990 mL of UHQ water, adjusting to pH = 3 with a solution of orthophosphoric acid (2 mol/L) and making up to 1000 mL with water.

Phosphate buffer pH 2.8 (50 mmol/L, pH = 2.8) was prepared by mixing 6.81 g of KH₂PO₄ with 990 mL of UHQ water, adjusting to pH = 2.8 with a solution of orthophosphoric acid (2 mol/L), and making up to 1000 mL with water.

Stock solutions of studied compounds were prepared at a concentration of 10⁻³ mol/L from the appropriate standard. Sample solution, mixtures of cocaine, benzoylecgonine, and lidocaine, of tramadol, its three metabolites, and internal standard, respectively, were prepared at a concentration of 10⁻⁴ mol/L. The same procedure was used for preparation of a mixture of seven nabumetone and a mixture of eight dimefluron standards.

2.2 Columns

Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4.6 mm, monolith (Merck KGaA, Darmstadt Germany); Onyx Monolithic C8, 100 × 4.6 mm, monolith (Phenomenex, Torrance, California, USA); Discovery HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) and Ascentis RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) were tested in this study.

2.3 Chromatographic system

An Agilent 1100 Series chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) consisting of vacuum degasser, binary pump, autosampler, thermostated column compartment, variable wavelength detector, and a data station (× 86 Family 6 Model 8 Stepping 3, RAM 128 MB) with the ChemStation for LC (Rev. A.08.03 (847)) analytical software (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) running under the Windows NT operating system (Microsoft Corporation) was employed for this research.

Mixture with cocaine was detected with the aid of a UV detector at a wavelength of 230 nm. The mobile phase consisted of phosphate buffer pH 3 and acetonitrile. Vari-

ous ratios were tested and then the mobile phase with 18% of acetonitrile was chosen as the best one for further analyses. The flow rate was 1 mL/min.

Dimefluron and its metabolites were detected with a UV detector at 317 nm. The flow rate was 1 mL/min for analyses on particle-packed columns. Experiments at higher flow rates (1, 2, 3, and 4 mL/min) were pursued on monolithic columns. The mobile phases used for separations of dimeflurons contained acetonitrile and phosphate buffer pH 3 (KH₂PO₄). A linear gradient mode was used. For particle-packed columns, the chromatographic analysis started with a mobile phase composed of acetonitrile–phosphate buffer pH 3 (25:75, v/v). The proportion of acetonitrile in the mobile phase was gradually increased up to 60% in 20 min, and an isocratic mobile phase composition of acetonitrile–phosphate buffer pH 3 (60:40, v/v) was used for analysis in the time interval from 20 to 28 min. After equilibration (time interval: 28–33 min) establishing the initial chromatographic conditions, the next sample could be analysed. The gradient time profile was reduced in analyses on monolithic columns.

The UV detection of nabumetone with its metabolites was performed at a wavelength of 325 nm. The mobile phases used for nabumetone separations contained acetonitrile and 1% aqueous solution of acetic acid in isocratic mode. The ratio of component varied from 25:75 to 55:45 (acetonitrile–acidified water, v/v). The flow rate was 1 mL/min.

Tramadols were detected at 275 nm and the composition of the mobile phase was: acetonitrile and phosphate buffer pH 2.8 in a ratio of 30:70. The flow rate was 1 mL/min.

3 Results and discussion

Four groups of compounds with different properties were chosen: cocaine as a basic compound with amphoteric metabolite benzoylecgonine (carboxylic acid and tertiary amine), dimefluron and its derivatives are basic, nabumetone as a neutral drug with acid and neutral metabolites, and tramadol as a representative of basic compounds with basic (amine) or amphoteric metabolites (phenol and amine).

The chromatographic behaviour of these groups of compounds on different stationary phases was observed. Four types of stationary phases were chosen (two classical and two new ones). Compounds with a planar structure should be separated better on a Discovery HS F5 column. The Ascentis RP-Amide is claimed to reduce tailing of basic compounds.

Four parameters were monitored for numerical expression of elution properties – retention time (R_t), theoretical plate number (N) or height equivalent of theoretical

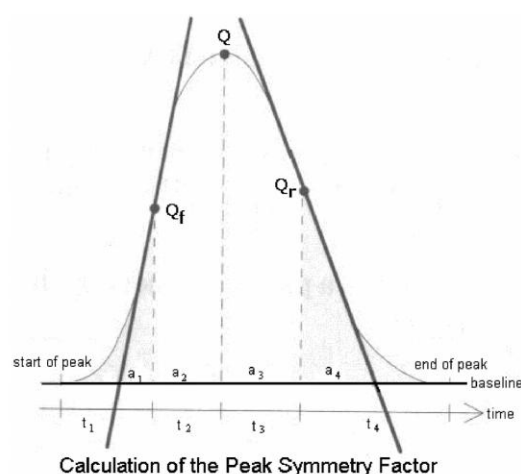


Figure 7. Calculation of peak symmetry factor. a = area of slice, t = time of slice, Q_f = height of front inflection point, Q_r = height of rear inflection point, Q = height at apex [24].

plate (H), peak resolution (R_s), and peak symmetry (S) were calculated by ChemStation software. The peak symmetry obtained according to ChemStation (Agilent 1100 Series Chromatograph) was calculated as a pseudomoment by the integrator using the following moment equations (Fig. 7) [24]:

$$m_1 = a_1(t_2 + a_1/1.5 Q_f) \quad (1)$$

$$m_2 = a_2^2/0.5 Q_f + 1.5 Q \quad (2)$$

$$m_3 = a_3^2/0.5 Q_r + 1.5 Q \quad (3)$$

$$m_4 = a_4(t_3 + a_4/1.5 Q_r) \quad (4)$$

$$S = \sqrt{m_1 + m_2/m_3 + m_4} \quad (5)$$

The height equivalent of theoretical plate was calculated according to Eq. (6):

$$H = l/N \quad (6)$$

where H is the height equivalent of theoretical plate (mm), l is the column length (mm), and N is the theoretical plate number (counted by ChemStation Agilent 1100 Series Chromatograph).

The values of the resolution for co-eluting peaks were calculated from values of peak width at half-height and the retention times acquired from two subsequent analyses of standard monocomponent solutions. The data obtained are presented in tabular form.

Experiments with cocaine started under the conditions developed for determination of cocaine and its metabolite (with IS) on an RP-Amide column. Besides the RP-

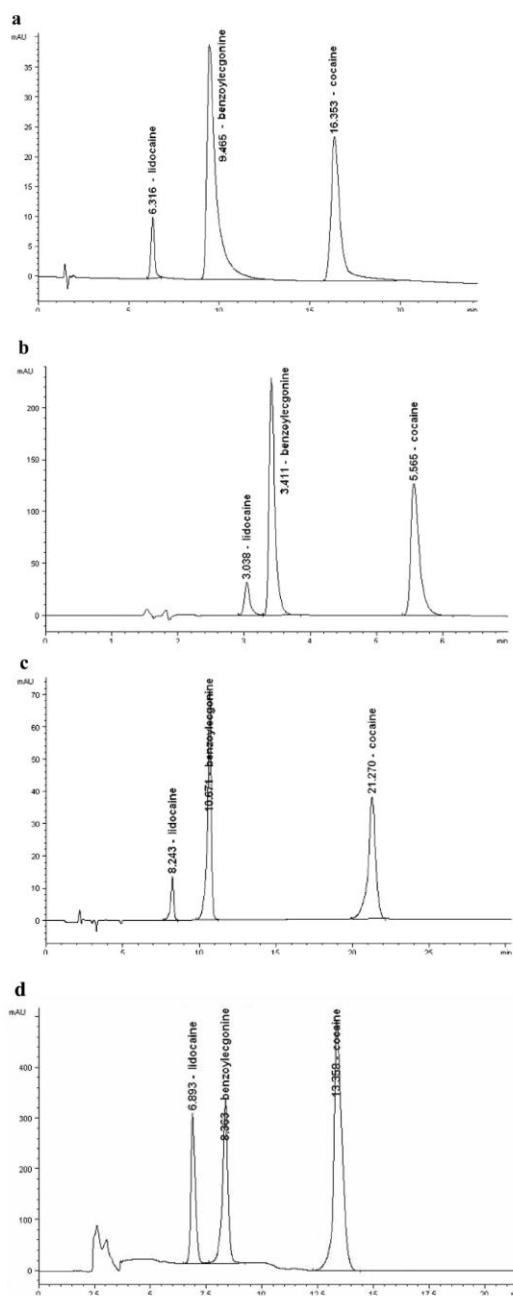


Figure 8. Chromatograms of the mixture of cocaine, its metabolite, and internal standard on various columns. UV detection 230 nm. Flow rate 1 mL/min. Mobile phase: 50 mmol/L phosphate buffer pH 3 and acetonitrile 82:18 (v/v). **8a:** Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4.6 mm, monolith. **8b:** Onyx Monolithic C8, 100 × 4.6 mm, monolith. **8c:** Discovery1 HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm. **8d:** Ascentis RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm.

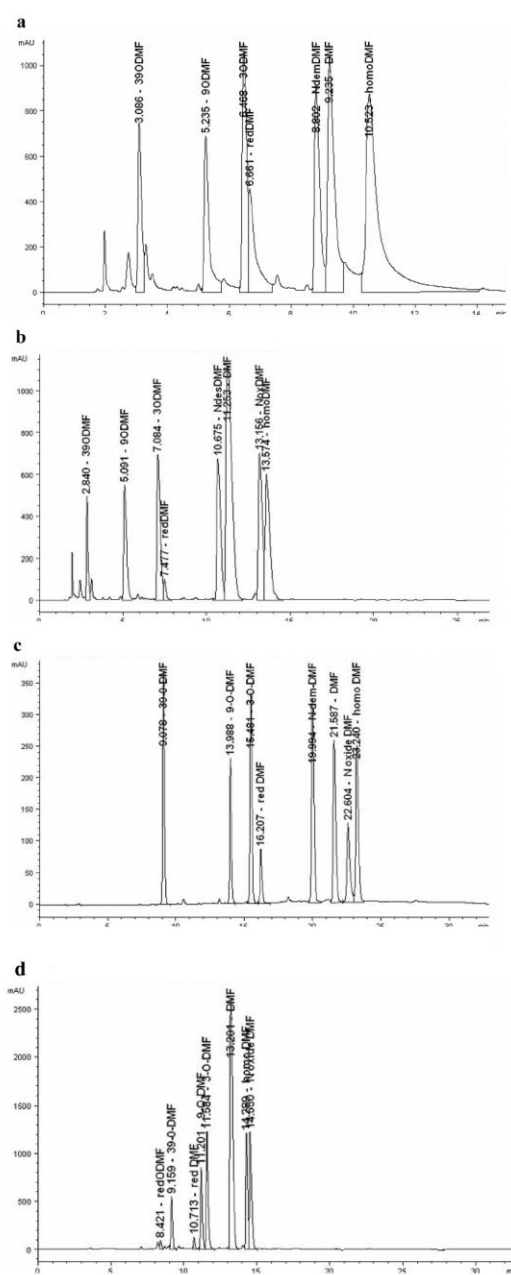


Figure 9. Chromatogram of the mixture of dimefluron, its metabolites and internal standard on various columns. UV detection 317 nm. Flow rate 1 mL/min. Mobile phase: **9a, 9b:** 50 mmol/L phosphate buffer pH 3 and acetonitrile 25:75 (v/v). **9c, 9d:** Gradient mode: 0–20 min: 75:25–40:60 (v/v), 21–28 min: 60:40 (v/v). **9a:** RP-18e, 100 × 4.6 mm, monolith. **9b:** Onyx Monolithic C8, 100 × 4.6 mm, monolith. **9c:** Discovery HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm. **9d:** Ascentis RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm.

Table 1. System suitability data for a mixture of cocaine, its metabolite and internal standard (average values from four analyses).

	Chromolith 18					Onyx C8					Discovery HS F5					Ascentis RP-Amide				
	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s
Lidocaine	6.316	6013	0.0166	–	0.878	3.038	8270	0.0121	–	0.690	8.242	12327	0.0203	–	1.382	6.893	6186	0.0404	–	0.622
Benzylecgonine	9.465	2601	0.0384	5.886	0.402	3.411	9197	0.0109	2.702	0.622	10.657	12355	0.0202	7.089	1.379	8.363	7140	0.0350	3.933	1.142
Cocaine	16.353	6685	0.0153	8.919	0.667	5.565	9990	0.0104	11.783	0.577	21.243	12677	0.0197	18.570	1.103	13.358	7461	0.0335	9.831	0.606

R_t = retention time, N = theoretical plate number, H = height equivalent of theoretical plate, R_s = peak resolution, S = peak symmetry.

Table 2. System suitability data for a mixture of dimefluron, its metabolites and internal standard (average values from four analyses).

	Chromolith 18					Onyx C8					Discovery HS F5					Ascentis RP-Amide				
	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s
3,9-O-Didesmethyl-dimefluron	2.891	2376	0.0421	–	0.397	2.876	4828	0.0207	–	0.512	9.462	35633	0.0073	–	0.663	9.189	35324	0.0071	–	0.958
9-O-Desmethyl-dimefluron	5.182	7258	0.0138	8.469	0.367	5.122	5305	0.0188	9.509	0.377	14.474	60927	0.0041	22.452	0.679	11.226	47588	0.0053	2.637	0.625
3-O-Desmethyl-dimefluron	6.413	7007	0.0143	3.658	0.433	7.084	5019	0.0199	5.626	0.353	15.968	64882	0.0039	6.133	0.612	11.591	35308	0.0071	1.591	0.520
Reduced dimefluron	6.593	9791	0.0102	0.529	0.241	7.443	11823	0.0085	1.051	0.425	16.718	66305	0.0038	2.930	0.638	10.707	57249	0.0044	7.413	0.626
N-Desmethyl-dimefluron	8.795	13300	0.0075	7.001	0.418	10.683	9741	0.0103	8.975	0.369	20.576	80789	0.0031	13.981	0.623	13.339	43549	0.0057	0.017	0.524
Dimefluron	9.216	10039	0.0102	1.199	0.367	11.326	6732	0.0149	1.283	0.331	22.195	78603	0.0032	5.316	0.586	13.269	30658	0.0082	5.969	0.424
Dimefluron N-oxide	10.637	9473	0.0106	0.275	0.252	13.191	12977	0.0077	3.568	0.353	23.21	49642	0.0051	2.757	0.578	14.577	52587	0.0048	1.006	0.548
Homodimefluron	10.549	10434	0.0096	2.841	0.372	13.599	11861	0.0084	0.823	0.344	23.894	77600	0.0032	1.788	0.628	14.312	47174	0.0053	3.671	0.488

R_t = retention time, N = theoretical plate number, H = height equivalent of theoretical plate, R_s = peak resolution, S = peak symmetry.

Amide column, which seemed to be the best column for separation of this mixture, the separation was also satisfactory on the C8 column (Fig. 8, Table 1).

The experiments with dimefluron described in previous papers started on columns with bonded C18 stationary phase or with RP select B, which is a mixed stationary phase (C18 and C8). These experiments were carried out in isocratic mode. The final mobile phase used in gradient mode on an HS F5 column was adopted from the above-mentioned paper. The same mobile phase was tried on all the stationary phases. The values of the retention times were lower on the monolithic columns and also even on RP-Amide but the other parameters led to the choice of HS F5. The values of peak resolution were always unsuitable for at least one pair of peaks except in the case of the chosen HS F5 phase (tailing on C18, unsatisfactory peak resolution on C8 and RP-Amide). The values of symmetry decreased in the order HS F5, RP-Amide, C8, C18 bonded phases. The narrowest distribution of values of symmetry of all the studied compounds and their best separations were achieved on the HS F5 column. The order of peaks varied with the columns. While this order was the same on HS F5 and C8, the rank

of reduced dimefluron changed on RP-Amide. (It would be interesting to investigate this fact for the other reduced dimeflurons.) (Fig. 9, Table 2)

The experiments with nabumetone and its metabolites started under conditions described in reference [9]. The mobile phase contained acetonitrile, UHQ water, and acetic acid (45:55:1) on a column with a C18 bonded chain. These conditions were adjusted. UHQ water and acetic acid were combined into one component of the mobile phase – 1% acetic acid in water (acidified water). This step simplified experimentation with the composition of the mobile phase. The mobile phase contained acidified water and acetonitrile in the ratio 55:45 (v/v) on HS F5 and RP-Amide. The mobile phase containing acidified water and acetonitrile in the ratio 65:35 (v/v) was used for analyses on both monolithic columns. Because the separation of nabumetone and its metabolites was satisfactory on monolithic columns, an increase of flow rate was tested. In the case of dimefluron, the separation was unsuitable using a lower flow rate, thus experiments with a higher flow rate were pointless. In the case of nabumetone, the analyses were accelerated proportionally to the increase of flow rate. The symme-

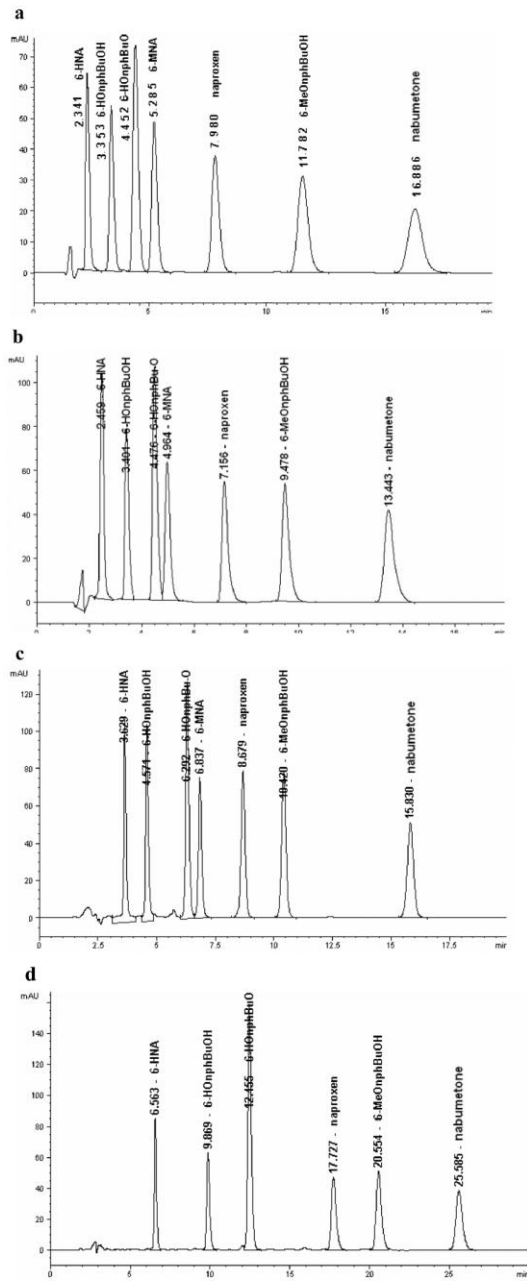


Figure 10. Chromatogram of the mixture of nabumetone, its metabolites and internal standard on various columns. UV detection 325 nm. Flow rate 1 mL/min. Mobile phase: 1% aqueous solution of acetic acid and acetonitrile in the ratio: **10a, 10b:** 65:35 (v/v). **10c, 10d:** 55:45 (v/v). **10a:** Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4.6 mm, monolith. **10b:** Onyx Monolithic C8, 100 × 4.6 mm, monolith. **10c:** Discovery HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm. **10d:** Ascentis RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm.

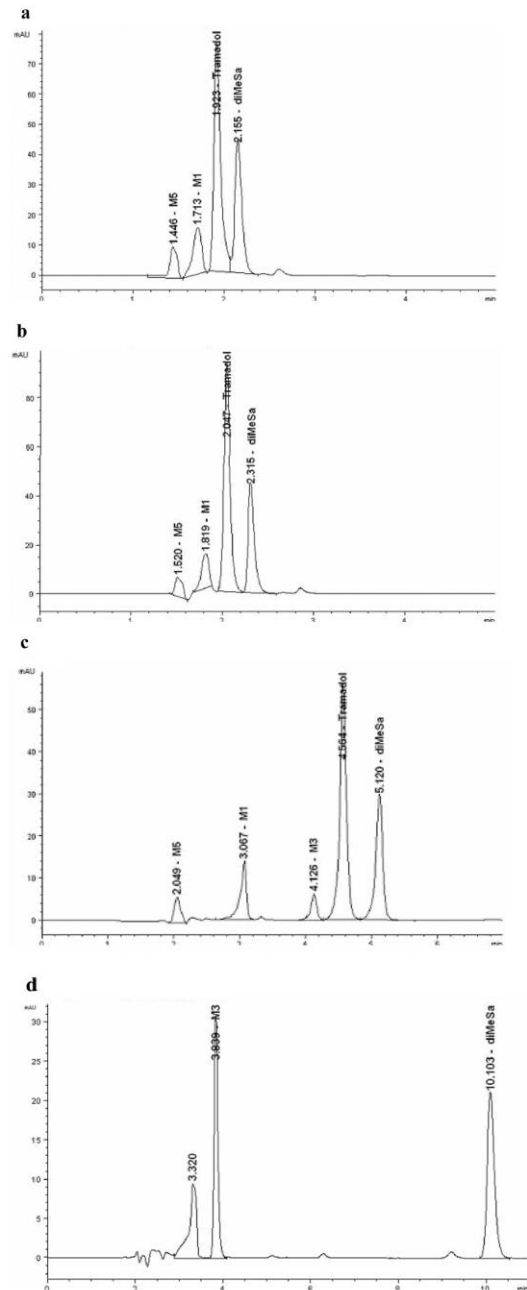


Figure 11. Chromatogram of the mixture of tramadol, its metabolites and internal standard on various columns. UV detection 275 nm. Flow rate 1 mL/min. Mobile phase: 50 mmol/L phosphate buffer pH 2.8 and acetonitrile 70:30. **11a:** Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4.6 mm, monolith. **11b:** Onyx Monolithic C8, 100 × 4.6 mm, monolith. **11c:** Discovery HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm. **11d:** Ascentis RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm.

Table 3. System suitability data for a mixture of nabumetone, its metabolites and internal standard (average values from 4 analyses).

	Chromolith 18					Onyx C8					Discovery HS F5					Ascentis RP-Amide				
	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s
6-HNA	2.338	1011	0.0989	–	0.712	2.504	4350	0.0230	–	0.664	3.593	7227	0.0346	–	0.795	6.613	13461	0.0186	–	0.769
6-HOnphBuOH	3.355	1399	0.0715	3.112	0.713	3.451	5801	0.0172	5.122	0.579	4.534	8056	0.0310	5.065	0.731	9.915	15784	0.0158	11.913	0.772
6-HOnphBu-O	4.450	1568	0.0638	2.713	0.805	4.529	6709	0.0149	4.812	0.635	6.203	9834	0.0254	7.365	0.834	12.515	17329	0.0144	7.347	0.781
6-MNA	5.287	2254	0.0444	1.869	0.811	5.012	6950	0.0144	1.901	0.632	6.732	11848	0.0211	2.125	0.845	12.532	19080	0.0131	0.069	0.769
Naproxen	7.982	3338	0.0300	5.391	0.771	7.200	7900	0.0127	7.165	0.584	8.544	13622	0.0184	6.724	0.935	18.521	18669	0.0134	11.628	0.777
6-MeOnphBuOH	11.784	4741	0.0211	6.144	0.773	9.528	8579	0.0117	5.979	0.629	10.307	14862	0.0168	5.580	0.928	21.931	19625	0.0127	4.981	0.794
Nabumetone	16.888	5072	0.0197	6.240	0.806	13.443	6810	0.0147	7.111	0.672	15.522	17145	0.0146	12.815	0.980	25.747	20262	0.0123	7.689	0.823

R_t = retention time, N = theoretical plate number, H = height equivalent of theoretical plate, R_s = peak resolution, S = peak symmetry.

Table 4. System suitability data for a mixture of tramadol, its metabolites and internal standard (average values from four analyses).

	Chromolith 18					Onyx C8					Discovery HS F5					Ascentis RP-Amide				
	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s	S	R _t (min)	N	H (mm)	R _s
M5	1.445	1446	0.0692	–	0.958	1.521	1386	0.0722	–	0.640	2.047	2351	0.1063	–	0.817	3.512	7501	0.0333	–	2.488
M1	1.718	1715	0.0583	1.683	1.323	1.820	2486	0.0402	1.897	1.084	3.064	7090	0.0353	6.456	2.002	3.515	6805	0.0367	0.501	2.534
M3	1.892	4621	0.0216	1.221	0.624	2.007	4835	0.0207	1.335	0.758	4.123	12588	0.0199	7.219	1.011	3.846	9429	0.0265	3.387	0.771
Tramadol	1.923	3639	0.0275	0.967	0.648	2.048	5267	0.0190	1.014	0.733	4.561	10852	0.0232	2.718	0.959	3.781	4289	0.0583	2.584	0.509
diMeSA	2.155	3854	0.0259	1.643	0.717	2.313	5906	0.0169	2.148	0.680	5.120	13132	0.0193	3.132	1.216	10.105	19244	0.0130	28.481	0.782

R_t = retention time, N = theoretical plate number, H = height equivalent of theoretical plate, R_s = peak resolution, S = peak symmetry.

try improved. The values of resolution remained identical although it was possible that the further increase in flow rate could lead to changes of these values. The order of the peaks was the same for all the tested stationary phases. The duration of analysis was longest on RP-Amide. At a flow rate of 1 mL/min, the highest values of symmetry were noted in the case of the HS F5 column; however, the distribution of values was very wide. The narrowest distribution around the average value of symmetry was observed in the case of RP-Amide. The wide distribution of values of symmetries on HS F5 could be caused by an influence of interactions on uncovered polar phenolic group. The values of resolution were higher than 2 for all tested columns except RP-Amide, on which 6-HOnphBu=O and 6-MNA were not separated. The C18 column was shown to be the best for analysis of nabumetone and its five metabolites. The peak resolutions were satisfactory. The values of symmetry were relatively high and the distribution of values was not wide. The analysis time was short (only 17 min for separation of seven compounds, and 14 min, respectively, for C8) and it could be decreased by an increase of flow rate (only 4.2 min and 3.5 min, respectively) (Fig. 10, Table 3).

Experiments dealing with tramadol and its metabolites were begun with a mobile phase taken from the paper

[8]. This mobile phase was originally developed for the RP select B column which possesses both C18 and C8 chains. From the point of view of peak symmetry, the best column for tramadol and its metabolites was HS F5, where M1 was the only fronting compound. This could be caused by an uncovered OH group on an aromatic nucleus. This free polar group might intrude upon the π -interactions between the aromatic rings of analyte and stationary phase, which are probably one of the main mechanisms of separation on these types of columns. Values of peak symmetry also lay in a narrow range for columns with classical phases C8 and C18. In this case, peak co-elution happened and low values of resolution were obtained. The RP-Amide column was entirely unsuitable under the current conditions. Values of symmetry were widely distributed and very strong fronting of substances with uncovered phenolic group occurred. Separation expressed as a resolution value was also totally unsatisfactory and peaks M1 and M5, M3 and tramadol co-eluted (Fig. 11, Table 4).

4 Concluding remarks

Columns for bioanalytical application were compared. Four real mixtures of compounds were used for testing of four columns. The best type of column was sought for each of them. The retention time, theoretical plate

number and height equivalent of theoretical plate, respectively; peak resolution and peak symmetry were used for the searching for the optimal stationary phase.

RP-Amide was chosen as the best column for analyses of cocaine with its major metabolite and internal standard. Compared to the other columns, the compounds were separated with satisfactory resolution on RP-Amide. The HS F5 column, having a stationary phase with planar structure, was chosen as the best column for analyses of dimefluron and its derivatives. It can be supposed that the better separation results from π -interactions between the aromatic rings. This hypothesis could be supported by the results obtained for nabumetone and its derivatives, which were eluted as symmetric peaks if they contained a phenolic group. The C18 bonded stationary phase was evaluated as the best column for separation of nabumetone and its derivatives. The best way to analyze tramadol with its metabolites and appropriate internal standard was on the HS F5 column with a stationary phase of planar structure. The experimental data led to this conclusion because peak symmetry was very good, with the slight exception of M1, and peaks were baseline separated with regular spacing. Peaks were more or less co-eluted on the other columns. The C18 and C8 bonded stationary phases were evaluated as unsatisfactory for the tested basic compounds; in other words, it was possible to attain better separation on modern types of columns where principles of separation other than those based only on lipophilicity prevail. The columns with the classical stationary phases (C8 and C18) are sufficient for the acid and neutral compounds. The HS F5 stationary phase is the best one for compounds with a large planar structure, especially for basic compounds, because it eliminates peak tailing, which is significant on classical stationary phases. The symmetry of peaks is influenced by polar group on this column. Certain restrictions of use were found for modern stationary phases. In some cases, HS F5 is useful but the relation between the number of carbons in aromatic rings and the number of polar groups should have been investigated.

The authors wish to thank W. N. Wu for providing standards of tramadol metabolites. This work was supported by the research project of the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic No. 002 162 0822 and by the grant project of GA UK 294/2005.

5 References

- [1] Dräger, B., *J. Chromatogr. A* 2002, 978, 1–35.
- [2] Anastos, N., Barnett, N. W., Lewis, S. W., *Talanta* 2005, 67, 269–279.
- [3] Sun, L., Hall, G., Lau, C. E., *J. Chromatogr. B* 2000, 745, 315–323.
- [4] Císař, P., Nobilis, M., Vybíralová, Z., Holčápek, M., et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37, 1059–1071.
- [5] Kučera, R., Nobilis, M., Skálová, L., Sztotáková, B., et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37, 1049–1058.
- [6] Jager, A. D., de, Hundt, H. K. L., Hundt, A. F., Swart, K. J., et al., *J. Chromatogr. B* 2000, 740, 247–251.
- [7] Kobylińska, K., Barlińska, M., Kobylińska, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32, 323–328.
- [8] Mikami, E., Goto, T., Ohno, T., Matsumoto, H., Nishida, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 23, 917–925.
- [9] Nobilis, M., Kopecný, J., Květina, J., Svoboda, Z., Pour, M., et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32, 641–656.
- [10] Nobilis, M., Holčápek, M., Kolářová, L., Kopecný, J., et al., *J. Chromatogr. A* 2004, 1031, 229–236.
- [11] Wu, W. N., McKown, L. A., Gauthier, A. D., Jones, W. J., Raffa, R. B., *Xenobiotica* 2001, 31, 423–441.
- [12] Nobilis, M., Kopecný, J., Květina, J., Chládek, J., et al., *J. Chromatogr. A* 2002, 949, 11–22.
- [13] Chao, C. K., Yu, L. L., Su, L. L., Liu, C. M., Yang, T. H., et al., *Arzneim. Forsch.* 2000, 50, 636.
- [14] Becker, R., Lintz, W., *J. Chromatogr.* 1986, 377, 213.
- [15] Elsing, B., Blaschke, G., *J. Chromatogr.* 1993, 612, 223.
- [16] Valle, M., Pavon, J. M., Calvo, R., Campanero, M. A., Troconiz, I. F., *J. Chromatogr. B* 1999, 724, 83.
- [17] Ceccato, A., Vanderbist, F., Pabst, J.-Y., Streeel, B., *J. Chromatogr. B* 2000, 748, 65.
- [18] Kmetec, V., Rožkar, R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32, 1061–1066.
- [19] Campanero, M. A., Calahorra, B., Garcia-Quetglass, E., Escolar, M., Honorato, J., *Chromatographia* 1998, 48, 555.
- [20] Lintz, W., Uragg, H., *J. Chromatogr.* 1985, 341, 65.
- [21] Gan, S. H., Ismail, R., Wan Axman, W. A., Wan, Z., *J. Chromatogr. B* 2002, 772, 123–129.
- [22] Overback, P., Blaschke, G., *J. Chromatogr.* 1999, 732, 185–192.
- [23] Rouini, M.-R., Ardakani, Y. H., Soltani, F., Aboul-Enein, H. Y., Foroumadi, A., *J. Chromatogr. B* 2006, 830, 207–211.
- [24] *Understanding Your ChemStation*, Agilent Technologies, Germany, 2001.

6.1.4. Determination of low contents of fenpiverine bromide by extraction spectrophotometry

Vladimír Kubíček, Daria Kučová, Přemysl Císař and Vlasta Burešová

Microchimica Acta, Volume 142, Number 4, January 2003, Pages 273-276

Předkládaná publikace se vymyká z řady předkládaných prací. Jejím tématem je stanovení léčiv pomocí UV spektrometrie. V předložené práci byla vyvinuta ion-párová extrakce k stanovení fenpiverinu v tabletě. Stanovovaná látka se v tabletě vyskytuje v minoritním množství oproti ostatním dvěma, a proto je důležité nalézt experimentální podmínky k eliminaci dalších částí tablety. Pro stanovení byla vzkříšena a převedena na moderní instrumentaci extrakčně fotometrické metoda UV stanovení vyvinutá prof. Gasparičem, která elegantně obchází krok oddělení fází, když pro extrakci i měření využívá sadu vybraných zkumavek se stejnými optickými vlastnostmi, a tím eliminuje chybu vnesenou při oddělování fází. [97]

Směs tří účinných látek v přípravku Algifen, na který byla vyvinutá metoda aplikována, se skládá z metamizolu (527 mg na tabletu), pitofenonu (5,25 mg na tabletu) a fenpiverinu (0,1 mg na tabletu). Žádná z látek neabsorbuje záření ve viditelné oblasti spektra. Iontový pár fenpiverinu s kyselinou pikrovou je barevný, neutrální a jako pár lipofilní. To umožňuje po extrakci měřit fenpiverin ve směsi s metamizolem a pitofenonem, i když je oproti ostatním přítomným látkám ve výrazně nižším množství.

Popisovaná metoda byla vyvinuta jako pH dependentní ion-párová extrakce do nepolárního rozpouštědla. Každá část této metody eliminuje možnost rušení stanovení ostatními látkami ve směsi. Pouze při určitém pH vytváří fenpiverin s kyselinou pikrovou neutrální iontový pár, který se extrahuje do nepolárního rozpouštědla a pouze tento iontový pár je schopen absorbovat při vlnové délce, která byla vybrána ve viditelné části spektra. Posledním sledovaným parametrem je čas, který je nezbytný k ustálení rovnováh.

*Original Paper***Determination of Low Contents of Fenpiverine Bromide by Extraction Spectrophotometry**

Vladimír Kubíček*, Daria Kučová, Přemysl Císař, and Vlasta Burešová

Charles University Prague, Faculty of Pharmacy Hradec Králové, Heyrovského 1203, CZ-500 05
Hradec Králové, Czech RepublicReceived December 11, 2002; accepted April 24, 2003; published online July 28, 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract. An ion-pair extraction spectrophotometry method was developed for the determination of fenpiverine bromide in tablets. To determine this substance it was necessary to find experimental conditions that would allow eliminating the influence of other components of the tablets. Attention was paid to the fact that a suitable pH of water phase was necessary to achieve high selectivity.

Key words: Fenpiverine bromide; extraction spectrophotometry; tablets; precision; accuracy.

Although fenpiverine bromide is a drug used in several remedies, its determination in real samples is not described in the literature. Aside from a recent article [1], the latest issues of the pharmacopoeias [2–5] do not contain any articles about this drug. Only in the Martindale Pharmacopoeia [6] did the authors find a comment dealing with fenpiverine bromide, but it did not describe an analytical procedure.

Due to its anticonvulsive action, fenpiverine bromide (Fig. 1) is used in mixture with pitofenone hydrochloride (Fig. 2) and metamizole sodium salt (Fig. 3). The remedy containing these three substances is commercially known as Baralgan® or Algifen®. In this paper a method for the determination of fenpiverine bromide in Algifen® is proposed. Algifen® is available in the form of tablets, drops, suppositories and injections. Determination of

fenpiverine bromide was developed for tablets. Each Algifen® tablet contains metamizole sodium salt (500 mg), pitofenone hydrochloride (5.25 mg) and fenpiverine bromide (0.1 mg). The tablet matrix is formed by lactose, starch, sodium hydrogencarbonate, talcum and calcium stearate. The content of fenpiverine bromide differs in several orders from the contents of the other substances. We used ion pair extraction spectrophotometry to determine fenpiverine bromide in the Algifen® tablets. The method is very precise and accurate even at very low concentrations. This paper describes a reliable procedure for determination and solves the problem of interference of ion pairs formed by fenpiverinium and pitofenonium cations with a counterion.

Experimental*Preparation of Samples*

Algifen® tablets were powdered, and about 1.5 grams of the powder was weighed. The weighed amount was placed on a paper filter in the glass funnel and slowly (5 min) leached by 20 mL distilled water. The filtrate was transferred into a 25 mL volumetric flask, and the volume was filled to 25 mL. The concentration of fenpiverine bromide in this solution was determined by ion-pair extraction spectrophotometry.

Method

The so-called test tube method originally developed by Gasparic [7] was used. With this method all steps of the ion-pair extraction

* Author for correspondence. E-mail: kubicek@faf.cuni.cz

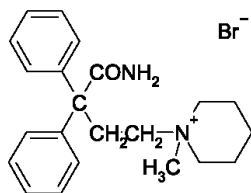


Fig. 1. Chemical structure of fempiverine bromide

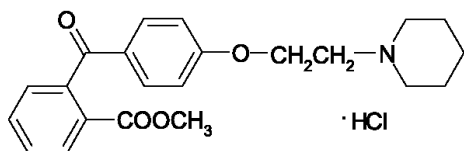


Fig. 2. Chemical structure of pitofenone hydrochloride

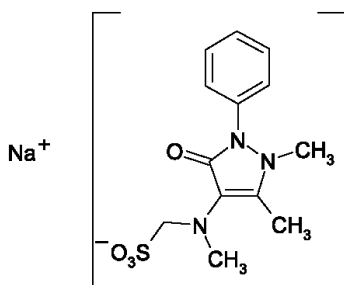


Fig. 3. Chemical structure of metamizole sodium salt

spectrophotometry procedure (i. e. ion pair formation, extraction and measurement of the extract absorbance) are performed in one test tube for every sample. Since extraction is carried out in one step, a high extraction constant of ion pair is required. Prior to the determination it is necessary to find (a) the time of extraction (time of shaking) during which the ion pair is quantitatively extracted, (b) a suitable pH for ion pair formation and (c) the absorbance maximum wavelength of the extracted ion pair. These three parameters have to be fixed during the analysis. The vessels used in the test tube method are either round cuvettes or a carefully selected set of test tubes. All test tubes (cuvettes) in the set must exhibit the same absorbance of testing solution (0.0015% solution of potassium permanganate is used). Using the selected set of test tubes, both the calibration curve and the absorbance of samples were measured.

Reagents

Picric acid p.a. (Fluka), boric acid (Lachema Brno), acetic acid (Lachema Brno), phosphoric acid (Lachema Brno), sodium hydroxide (Lachema Brno), metamizole sodium salt (Leciva Praha, certified purity 99.0%), pitofenone hydrochloride (Leciva Praha, certified purity 99.2%), fempiverine bromide (Leciva Praha, certified purity 99.7%), chloroform (Lachema Brno), Algifen® tablets (Leciva

Praha). Picric acid was recrystallized from ethanol, and chloroform was twice redistilled before every use. The other reagents were used as obtained.

Procedure

0.5 mL of picric acid solution ($0.005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 mL of sample or calibration solution, 0.25 mL of Britton-Robinson buffer ($\text{pH} = 10.38$) and 2 mL of chloroform were placed into a test tube with pipettes. The test tubes containing two liquid layers were sealed with parafilm, then shaken for 20 min with a laboratory shaker, and after this period placed in the rack for 10 minutes to allow both liquid phases to separate completely. Then the absorbance of the chloroform layer was directly measured against a blank using a Helios ϵ spectrophotometer (Umicam Cambridge). The blank was prepared in the same way as the mixtures in the other test tubes, but instead of 0.5 mL of sample 0.5 mL of distilled water were used inside. The calibration solutions were prepared by dissolving fempiverine bromide substance (weighed with analytical balances) in distilled water in volumetric flasks.

Model samples were prepared by mixing the powdered tablet matrix, metamizole sodium salt, pitofenone hydrochloride and fempiverine bromide. The components of the mixture were weighed by means of analytical balances to obtain the model samples of the same composition as the tablets.

Results and Discussion

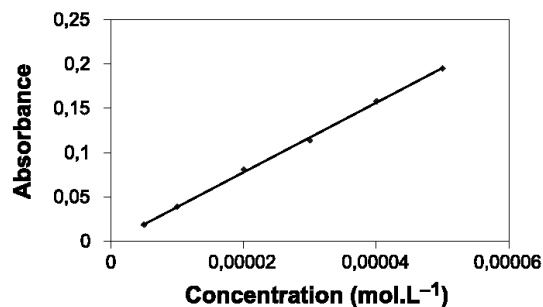
The pitofenonium cation forms the same type of ion pairs as the fempiverinium cation. Hence, the first step was to find conditions (especially pH) suitable for the determination which would allow selective formation of the ion pair of the fempiverinium cation. A solution of fempiverine bromide ($c = 0.0005 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $\lambda_{\text{max}} = 370 \text{ nm}$ was determined for fempiverine picrate ion pair extracted to chloroform, and the time of extraction was found to be 20 min. To find a suitable pH was more difficult since it was necessary to study both the solution of fempiverine bromide and the solutions of pitofenone hydrochloride and metamizole sodium salt. Although formation of ion pairs between the metamizolium anion and the picrate anion was not expected, the inactivity of metamizole was confirmed. The suitable pH, at which pitofenone hydrochloride does not form ion pairs but fempiverine bromide does, could be assumed to exist. While pitofenone hydrochloride is a weak electrolyte and its degree of dissociation is affected by the pH value, fempiverine bromide is a strong electrolyte dissociated completely, regardless of the pH value. Since the dissociation is a necessary condition for ion pair formation, the region of pH, where ion pairs are formed only by fempiverinium cation, has to be found.

Hence, the extraction spectrophotometry experiments were performed separately with each of the three substances at several pH values. Original

Table 1. Absorbance of ion pairs formed by substances studied and picric acid at different pH

pH	Substance	A
2	metamizole	0.015
	pitofenone	0.051
	fenpiverine	0.074
3	metamizole	0.013
	pitofenone	0.053
	fenpiverine	0.071
4	metamizole	0.001
	pitofenone	0.050
	fenpiverine	0.072
5	metamizole	0.000
	pitofenone	0.043
	fenpiverine	0.075
6	metamizole	0.000
	pitofenone	0.042
	fenpiverine	0.076
7	metamizole	0.000
	pitofenone	0.015
	fenpiverine	0.076
8	metamizole	0.000
	pitofenone	0.002
	fenpiverine	0.076
9	metamizole	0.000
	pitofenone	0.002
	fenpiverine	0.075
10	metamizole	0.000
	pitofenone	0.001
	fenpiverine	0.075
11	metamizole	0.000
	pitofenone	0.001
	fenpiverine	0.075
12	metamizole	0.000
	pitofenone	0.001
	fenpiverine	0.075

concentrations of the appropriate solutions corresponded to the concentrations in the extract of the tablets: $c_{\text{metamizole}} = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{pitofenone}} = 0.001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{fenpiverine}} = 1.9 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The results are given in Table 1. The absorbances stated in the table are average values calculated from five parallel measurements for each pH. Table 1 shows that the suitable pH value is over 10, which is where the absorbance of the metamizole extract is zero and the absorbance of the pitofenone picrate extract reaches a minimum, while the extract of fenpiverine picrate exhibits a high absorbance suitable to be measured. Further experiments were carried out at pH 10.38. Using the previously determined conditions, the extraction experiment was performed with tablet powder which did not contain either fenpiverine bromide or pitofenone hydrochloride or metamizole sodium salt. Zero

**Fig. 4.** Calibration curve used for the spectrophotometric determination of fenpiverine bromide. Regression line: $A = 3933.15069c - 0.00094$. Correlation coefficient: $r = 0.99887$

absorbance was found, confirming that the tablet matrix has no effect on the absorbance values of the fenpiverine picrate.

The calibration curve was measured in the concentration range of 0.5×10^{-5} to $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. This concentration range is sufficient to include the concentrations of fenpiverine bromide in the solutions obtained by leaching the tablet powder. The calibration curve is shown in Fig. 4.

The precision of the determination is represented by repeatability as shown in Table 2. The procedure was repeated ten times with the same sample, and the obtained results are very satisfactory. The values are close to each other, the standard deviation is small, and the confidence interval for the 95% level is very narrow. The content of fenpiverine bromide in the tablet (b) was calculated using the following equation:

$$b = \frac{c \cdot 0.025 \cdot M \cdot w}{m}, \quad (1)$$

Table 2. Results of repeatability for fenpiverine bromide determination in Algifen® tablets

No.	m (mg)	A	$c \cdot 10^5$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	b (mg/tbl.)
1	1.4723	0.071	1.83	0.098
2	1.4792	0.069	1.78	0.095
3	1.5154	0.072	1.86	0.096
4	1.4868	0.072	1.86	0.098
5	1.5217	0.070	1.81	0.093
6	1.5186	0.072	1.86	0.096
7	1.4875	0.073	1.88	0.099
8	1.4934	0.069	1.78	0.094
9	1.5063	0.072	1.86	0.097
10	1.4869	0.070	1.81	0.095

Average value of b : 0.096 mg/tbl. Standard deviation: $s = 0.002 \text{ mg/tbl}$. Confidence interval for 95% reliability: $I = 3.8 \times 10^{-5}$.

Table 3. Results of recovery for fenpiverine bromide determination in Algifen® tablets

No.	m (mg)	A	$c \cdot 10^5$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	x ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	x_1 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	R (%)
1	1.5031	0.071	1.83	0.127	0.129	98.4
2	1.5279	0.070	1.86	0.123	0.126	97.6
3	1.5082	0.071	1.83	0.127	0.130	97.7
4	1.5127	0.073	1.88	0.130	0.132	98.5
5	1.4863	0.069	1.78	0.125	0.128	97.7
6	1.5011	0.072	1.86	0.129	0.129	100.0
7	1.4940	0.071	1.83	0.128	0.130	98.5

where c is the concentration of the original solution after leaching the tablets (obtained from the calibration curve), M is the molecular mass of fenpiverine bromide ($M = 417.4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), w is the average mass of the tablet ($w = 0.7535 \text{ g}$ in this case), m is the weighed amount, and the factor 0.025 is the volume of the original solution in liters.

To confirm the accuracy of the determination, the recovery (R) was determined for seven model samples. The results of the recovery determination are given in Table 3. The content of fenpiverine bromide in the sample (x) was calculated from the equation (2):

$$x = \frac{c \cdot 0.025 \cdot M}{m} \quad (2)$$

In Table 3, x_1 denotes the true content of fenpiverine bromide in the sample. The average recovery ($R = 98.3\%$) shows excellent accuracy of the determination.

Three model samples were pressed to form tablets, and the fenpiverine bromide content was determined in these tablets by the described method (y). The results were compared with the results of the same model samples without tableting (z). The following couples of y and z (in $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) were

found: $y_1 = 0.127$, $z_1 = 0.127$; $y_2 = 0.130$, $z_2 = 0.131$; $y_3 = 0.128$, $z_3 = 0.128$. It is evident that the results are not influenced by tableting followed by powdering.

Conclusion

The results show that extraction spectrophotometry is able to determine low contents of important substances in complex mixtures. The absorbance measured by this method is sensitive to some parameters (time of extraction, pH), but this sensitivity can be utilized to find suitable conditions for the selective determination of components without a separation method. These advantages are demonstrated in the method for the determination of fenpiverine bromide by extraction spectrophotometry.

Acknowledgement. This investigation was supported by Research Project MSM 111600001.

References

- [1] Vargas G.; Havel J.; Babackova L.; Patocka J. *J. Capillary Electrophor.* **1998**, *5*, 153
- [2] European Pharmacopoeia (1997) 3rd edn., CEDEX Strasbourg
- [3] The United States Pharmacopoeia 24, Twinbrook Parkway, Rockville 2000, MD 20852
- [4] British Pharmacopoeia (1993) HMSO Publication Centre, London
- [5] Czech Pharmacopoeia (1997) Grada Publishing, Praha
- [6] Reynolds J. E. F. (ed) (1996) Martindale, The extra pharmacopoeia, 31st edn., Royal Pharmaceutical Society, London, p. 1706
- [7] Gasparic J.; Baruchova A.; Horka I. *Chem. Listy* **1986**, *80*, 1214

6.2. Práce publikované na konferencích

Ivan Buben, Přemysl Císař, Naděžda Novotná: Některé problémy stanovení zbytkových rozpouštědel dle ČL 97, Zborník XXXI. Konferencie „Syntéza a analýza liečiv“, Bratislava, 11. – 13. 9. 2002, str. 13

Přemek Císař, Milan Nobilis, Jiří Klimeš: HPLC stanovení dimefluronu a jeho metabolitů, Sborník XXXII. Konference „Syntéza a analýza léčiv“, Velké Karlovice, 16. – 19. 9. 2003, str. 19

Přemek Císař, Milan Nobilis, Jiří Klimeš: Stanovení dimefluronu – porovnání různých druhů kolon, Proceedings of 15th International Conference Chromatographic Methods and Human Health, Piešťany, Slovakia, 10. – 13. 11. 2003, str. 65

P. Císař, M. Nobilis, M. Holcapek, L. Kolářová, M. Pour, J. Kunes, J. Klimes: Disposition study of a new potential antineoplastic agent dimefluron in rats using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection, Abstrakt book and final programme PBA 2004 Symposium, Florencie, Italy, May 2-6, 2004, str. 93

R. Kucera, M. Nobilis, L. Skálová, B. Szotáková, P. Císař, Th. Jira, J. Klimes, V. Wsól: Use of chiral reversed-phase liquid chromatography for the evaluation of stereoselectivity in the carbonyl reduction of potential benzo[*c*]fluorene antineoplastics benfluron and dimefluron in various species, Abstrakt book and final programme PBA 2004 Symposium, Florencie, Italy, May 2-6, 2004, str. 94

Milan Nobilis, Přemek Císař, Radim Kučera, Jiří Klimeš, Michal Holčapek, Lenka Kolářová: High-performance liquid chromatographic determination of phase II dimefluron metabolites in rat urine and faeces using photodiode-array and mass spectrometric detection, ISC 04 - 25th International Symposium on Chromatography, 4. - 8. 10. 2004, Paris, Francie, str. 126

Přemek Císař, Milan Nobilis, Jiří Klimeš: HPLC stanovení produktů biotransformace dimefluronu *in vivo*, Abstrakt z Konference „Syntéza a analýza léčiv“, Nitra, Slovensko, 9. – 11. 10. 2004, otištěn ve Farm. Obzor LXXIII, 2004, strana 236

Přemek Císař, Milan Nobilis, Lenka Kolářová, Michal Holčapek, Jiří Klimeš, Sample preparation of urine before the HPLC-DAD-MS determination of phase I and phase II dimefluron metabolites, Stockholm, Abstrakt Book 29th International High Performance Liquid Phase Separations and related Techniques, June 26-30 2005, p. 465

Přemek Císař, Milan Nobilis, Jiří Klimeš, Comparison of Various HPLC columns used in bioanalytical studies, Rimini, Italy, Final Program & Abstrakt Book 11th Meeting on Recents Developments in Pharmaceutical Analysis, September, 25-28, 2005, p. 136

Přemek Císař, Milan Nobilis, Jiří Klimeš, Comparison od Different Stationary Phases for Potential Antineoplastic Analysis, Pardubice 11th International Symposium on Separation Science, Pardubice, Česká republika, 12.-14.09.2005, Book of Abstracts p. 275, ISBN 80-7194-771-7.

R. Kučera, P. Císař, V. Žižkovský, J. Sochor, J. Klimeš, Zirconia-Based HPLC column as an Alternative in Drug Control. 11th International Symposium on Separation Science, Pardubice, Česká republika, 12.-14.09.2005, Book of Abstracts p. 138, ISBN 80-7194-771-7.

Císař Přemek, Nobilis Milan, Klimeš Jiří, DIMEFLURON – STANOVENÍ POMOCÍ HPLC, Sborník 34. konference Syntéza a analýzy léčiv, Brno, Česká republika, 12. – 14. 9. 2005, strana 13

Kolářová L, Holčapek M, Nobilis M., Císař P.: Využití HPLC-MS, Metabolity léčiv, 3. ročník Školy HPLC-MS Sborník přednášek, Editoři Holčapek M., Kolářová L., Doubice, Česká republika, 2005

L. Kolařová, M. Holčapek, P. Císař, M. Nobilis: HPLC/MS/MS in the Analysis of Drug Metabolites, 24th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Ustron, Poland, 14.-18.5. 2006, Book of Abstrakt, p. 33

6.3. Řešené granty

6.3.1. Grantová agentura Univerzity Karlovy

Analýza potenciálního antineoplastika dimefluronu

Hlavní řešitel: Přemysl Císař

Sekce: B

Podsekce: Chemie

Číslo grantu: 294/2005/B-CH/FaF

Svěřené prostředky: 128 000 Kč

Naším cílem bylo vypracovat metodiku stanovení dimefluronu a jeho metabolitů tak, aby mohla být použita pro vzorky libovolné biomatrice (moč, žluč, stolice, krevní plazma, tkáň). Projekt byl zaměřen rovněž na hledání struktur dosud neodhalených metabolitů dimefluronu (minoritních produktů 1. fáze biotransformace a metabolitů 2. fáze biotransformace, tedy konjugátů). Dosažené výsledky poskytly metodické nástroje k dalšímu podrobnému studiu osudu dimefluronu v organismu, tedy ke studiu jeho distribuce, metabolismu a eliminace. Získaná farmakokinetická a xenobiochemická data mohou významně přispět k poznání, zda dimefluron může být novým terapeuticky zajímavým antineoplastikem.

6.3.2. Fond rozvoje vysokých škol

Využití různých druhů HPLC kolon v bioanalýze léčiv

Hlavní řešitel: Přemysl Císař

Tématický okruh: G6

Číslo grantu: 76/2005

Svěřené prostředky: 121 000 Kč

Projekt se zabýval porovnáním chromatografických kolon s různými zakotvenými fázemi pro směsi čtyř biologicky aktivních látek s jejich metabolity.

7. Summary

The aim of this study consisted in the development and validation of a bioanalytical method for the identification and determination of dimefluron and its metabolites in biomatrices. For purposes of this study, six expected potential dimefluron metabolites were prepared and identified by NMR and MS. Higher homologue of dimefluron (homodimefluron) was selected and synthesized as an internal standard.

The chromatographic columns with various types of the stationary phases were tested. The best results were achieved using a pentafluorophenylpropylsilyl silica gel column rinsed with the mobile phase of acetonitrile-phosphate buffer pH = 3 in a gradient mode. After the validation of the bioanalytical method, this chromatographic system was applied to the disposition study of dimefluron in rats. Samples of urine and faeces were collected after the oral administration of dimefluron to rats each 24 hours. The elimination of dimefluron and its phase I metabolites in the faeces was studied after an intragastric administration of dimefluron to three male rats. Maximum concentrations of dimefluron derivatives in the excrements were found in the time interval of 24 - 48 hours after the administration. 9-*O*-Desmethyldimefluron and 3-*O*-desmethyldimefluron were the principal metabolites found in the rat faeces, while the metabolic products of *N*-desmethylation, *N*-oxidation and carbonyl reduction were found in lower concentrations.

Some unknown peaks in chromatograms were identified as further minority metabolites of dimefluron. The survey of dimefluron biotransformation was suggested from the obtained results.

The metabolites of phase II biotransformation were searched in urine. The 3-*O*-desmethyldimefluron glucuronide and reduced 3-*O*-desmethyldimefluron glucuronide were identified as phase II metabolites in urine.

8. Použitá literatura

- [1] Vlček, A., Kameníková L., Pokroky ve farmacii 3, Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n.p., Praha (1982) 103-168
- [2] Gibson, G.G., Skett, P., Introduction to Drug Metabolism, Third Edition, Nelson Thornes Ltd, Cheltenham, U.K. (2001)
- [3] Kolektiv autorů, Pharmindex Breviř 2001/1, MediMedia Information, Praha, (2001)
- [4] Hynie, S., Obecná farmakologie, Díl 1, Karolinum, Praha (1993)
- [5] Lülmann, H., Mohr, K., Ziegler, A., Atlas farmakologie, vydání 1., Grada Publishing, Praha (1994)
- [6] Pasáková, I., Klimeš, J., Sochor, J., Hrabálek, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42** (2006) 136-142
- [7] Nobilis M., Vybíralová Z., Sládková K., Lísa M., Holčapek M., Květina J., *J. Chromatogr. A* **1119** (2007) 299-308
- [8] Parkinson, A., Biotransformation of xenobiotics, Chapter 6 from Casarett & Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons (edited by C.D. Klaassen) The McGraw-Hill, Inc. (2001)
- [9] Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E., *Cell. Mol. Life.Sci.* **58** (2001) 737-747
- [10] Nobilis, M., Kopecký, J., Květina, J., Svoboda, Z., Pour, M., Kuneš, J., Holčapek, M., Kolářová, L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32** (2003) 641-656
- [11] Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredita, V. V., Penning, T. M., *Chem Biol Interact.* **143-144** (2002) 621-631
- [12] Nordling, E., Jornvall, H., Persson, B., *Eur. J. Biochem.* **269** (2002) 4267-4276
- [13] Kallberg, Y., Oppermann, U., Jornvall, H., Persson, B., *Eur. J. Biochem.* **269** (2002) 4409-4417
- [14] Lan, S.J., Kripalani, K.J., Dean, A.V., Ryli, P., Difazio, L.T., Schreiber, E.C., *Drug Metab Dispos.* **4** (1976) 330-339

- [15] Nobilis M., Pour M., Kuneš J., Kopecký J., Květina J., Svoboda Z., Sládková K., Vortel J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24** (2001) 937-946
- [16] Maláková J., Nobilis M., Svoboda Z., Lísa M., Holčapek M., Květina J., Klimeš J., Palička V., *J. Chromatogr. B.* **853** (2007) 265-274
- [17] Wsól V., Skálová L., Skotáková B., *Current Drug Metabolism* **5** (2004) 517-533
- [18] SeQuant, „A Practical Guide to HILIC“, (2007) 26, <http://www.sequant.com>
- [19] Křepelka, J., Vančurová, I., Holubek, J., Roubík, J., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **46** (1981) 2207-2216
- [20] Křepelka, J., Roubík, J., Holubek, J., Vančurová, I., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **47** (1982) 1258-1266
- [21] Křepelka, J., Vančurová, I., Holubek, J., Mělka, M., Řežábek, K., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **47** (1982) 1856-1866
- [22] Vančurová, I., Šimonová, M., Beneš, J., Křepelka, J., *Česk. Farm.*, **31** (1982) 308-310
- [23] Hubík, J., Dušek, J., Řezáčová, A., Štarhová, A., *Obecná farmakognozie, Díl II., Sekundární látky*, Státní pedagogické nakladatelství, Praha (1978), 21-23
- [24] Melichar, B., a spol., *Chemická léčiva (3. přepracované vydání)*, Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, Praha (1987) 793
- [25] Melichar, B., a spol.: *Chemická léčiva (3. přepracované vydání)*. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, Praha (1987) 829
- [26] Mělka, M., Křepelka, J., *Drugs of the Future*, **12** (1987) 745-748
- [27] Miko, M., Křepelka, J., Mělka, M., *Biochem. Pharmacol.* **42**, Suppl. 214 (1991) 214-216
- [28] Miko, M., Křepelka, J., Mělka, M., *Anticancer Drugs* **2** (1991) 289-295
- [29] Miko, M., Křepelka, J., Nobilis, M., *Anticancer Drugs* **3** (1992) 63-68
- [30] Jantová, S., Horáková, K., *Cell Biochem. Funct.*, **11** (1993) 131-135
- [31] Roubal, Z., Poláková, L., Grimová, J., Kakáč, B., Peterková, M., Rejholec, V., Sedlmayer, P., Janků, I., *Česk. Farm.*, **34** (1985) 311-313

- [32] Francová, V., Šmolík, S., Schlehrová, M., Ráz, K., Selecká, A., Franc, Z., Frühaufová-Aušková, M., Řežábek, K., Vančurová, I., Křepelka, J., *Neoplasma*, **32** (1985) 529-536
- [33] Kvasničková, E., Nobilis, M., Hais, I.M., *J. Chromatogr.*, **295** (1984) 201-209
- [34] Kvasničková, E., Nobilis, M., Šroler, A., Báčová, E., Hais, I.M., *J. Chromatogr.*, **387** (1987) 559-561
- [35] Nobilis, M., Hais, I.M., *J. Chromatogr.*, **434** (1988) 363-375
- [36] Nobilis, M., Kvasničková, E., Šroler, A., Hais, I.M., *Drug Metabol. Drug Interact.*, **9** (1991) 225
- [37] Nobilis, M., Anzenbacher, P., Pastera, J., Svoboda, Z., Hrubý, K., Květina, J., Ubik, K., Trejtnar, F., *J. Chromatography B*, **681** (1996) 143-151
- [38] Koruna, I., Ryska, M., Poláková, L., Matoušová, O., Vančurová, I., Roubal, Z., Křepelka, J., *Česk. Farm.*, **35** (1986) 451-455
- [39] Lyčka, A., Jirman, J., Nobilis, M., Kvasničková, E., Hais, I.M., *Magn. Reson. Chem.*, **25** (1987) 1054-1057
- [40] Nobilis, M., Vančurová, I., Hais, I.M., Kvasničková, E., Křepelka, J., *Česk. Farm.*, **35** (1986) 68-73
- [41] Nobilis, M., Vančurová, I., Křepelka, J., Mělka, M., Lyčka, A., Jirman, J., Kvasničková, E., Hais, I.M., Miko, M., Czechoslov. Patent No. 267519, Federal Bureau for Invention (PV02914-88), Prague (in Czech) 1990
- [42] Skálová, L., Nobilis, M., Szotáková, B., Trejtnar, F., Kvasničková, E., *Exp. Toxicol. Pathol.*, **48** Suppl.II (1996) 366-370
- [43] Skálová, L., Nobilis, M., Szotáková, B., Wsól, V., Kvasničková, E., *Drug Metabol. Drug Interact.*, **14** (1998) 221-233
- [44] Skálová, L., Nobilis, M., Szotáková, B., Wsól, V., Kvasničková, E., *Drug Metabol. Drug Interact.*, **14** (1998) 235-250
- [45] Svoboda, Z., Nobilis, M., Květina, J., Lemr, K., *Acta Med. (Hradec Králové)*, **42** (1999) 73-78
- [46] Hrubý, K., Anzenbacherová, E., Anzenbacher, P., Nobilis, M., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **65** (2000) 1374-1386

- [47] Melichar, B., a spol., Chemická léčiva (3. přepracované vydání). Avicenum, zdravotnické nakladatelství, Praha (1987) 823-827
- [48] Kvasničková, E., Nobilis, M., Mělka, M., Project 303/93/2021 of Grant Agency of the Czech Republic (1993-1995), Možné zdokonalení chemické struktury kancerostatika na základě farmakokinetických a xenobiochemických nálezů
- [49] Geršl, V., Mělka, M., Vortel, J., Kvasničková, E., Nobilis, M., Mazurová, Y., Hrdina R. - IGA MZ č. 4212-3 (1996-1999), Nová cytostatika - problematika jejich kardiotoxicity a potenciální kardioprotektivní účinnosti
- [50] Geršl, V., Mělka, M., Vortel, J., Kvasničková, E., Nobilis, M., Mazurová, Y., Hrdina, R., *Acta Med. (Hradec Králové)* **41** (1998) 47-48
- [51] Hrdina, R., Geršl, V., Nobilis, M., Mělka, M., Vortel, J., Vávrová, J., Pecka, J., Holečková, M., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **358** Suppl.2 (1998) R530, P452
- [52] Macháčková, J., Geršl, V., Hrdina, R., Nobilis, M., Palička, V., *Acta Med. (Hradec Králové)* **42** (1999) 89-92
- [53] Macháčková, J., Adamcová, M., Mazurová, Y., Hrdina, R., Nobilis, M., *Physiol. Res.* **50** (2001) 491-499
- [54] Nobilis, M., Skálová, L., Szotáková, B., Kujíček, J., Pour, M., Kuneš, J., Mělka, M., Kvasničková, E., Geršl, V., *Drug Metab. Rev.* **33** Suppl.1 (2001) 116
- [55] Skálová, L., Nobilis, M., Szotáková, B., Kondrová, E., Šavlík, M., Wsól, V., Pichard-Garcia, L., *E. Maser, Biochem. Pharmacol.* **64** (2002) 297-305
- [56] Kazakevich, Y.V., LoBrutto, R., HPLC for Pharmaceutical Scientists, Wiley Interscience (2007)
- [57] Kolektiv autorů, High Performance Liquid Chromatography (HPLC): A Users Guide, Website of Students of University of Kentucky (25. února 2007) <http://kerouac.pharm.uky.edu/ASRG/HPLC/hplcmytry.html>
- [58] Coufal, P., Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie (25. února 2007) <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [59] Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glancu, J.L., Practical HPLC Method Development, Wiley Interscience (1997)

- [60] Smolková, E.: Historie života a díla M.S. Cvěta, Seminář 100 let chromatografie, ústní sdělení, Praha (2003)
- [61] Hais, I.M., Macek, K. (Editors): Papírová chromatografie, Nakladatelství ČSAV, Praha (1954)
- [62] Gasparič, J., Churáček, J., Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin, SNTL, Knižnice Moderní metody v chemické laboratoři, Svazek 36, Praha (1981)
- [63] The Official Web Site of the Nobel Foundation (15. června. 2006) <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1952/index.html>, Last modified October 5, 2005
- [64] Ministerstvo zdravotnictví, Český lékopis 2005, Grada Publishing, Praha (2005)
- [65] Sigma Aldrich (25. února 2007), http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Europe_Home/Czech_Republic.html
- [66] Merck (25. února 2007), <http://www.merck.cz/main.php?id=35>
- [67] Phenomenex (25. února 2007), <http://www.phenomenex.com/Phen/Products/Brand.asp>
- [68] Rozing, G., Trends in HPLC Column Formats — Microbore, Nanobore, and Smaller, *LCGC LC Column Technology Supplement*, (2004) 12-16
- [69] Švec, F., Monolithic columns: Where are we going with them?, Abstrakt Book of 29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Stockholm (2005)
- [70] Buszewski, B., New Solutions and Challenges at the Begining of the 21st Century. Quo Vadis Chromatographia?, Abstrakt Book of 15th International Conference Chromatographic Methods and Human Health, Piešťany (2003)
- [71] Nováková, L., Matysová, L., Solich, P., Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, *Talanta*, **68** (2006) 908-918

- [72] Waters (25. února 2005),
<http://www.waters.com/watersdivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-5LMPZR&WT.svl=1>
- [73] Nobilis M., Pastera J., Macek K., Svoboda D. and Květina J.: HPLC determination of ambroxol in human plasma. *J. Chromatogr. B* **581** (No.2) (1992) 251-255
- [74] Sequant (25. února 2007), <http://www.sequant.com/sn/products.php>
- [75] Sedere (25. února 2007), <http://www.sedere.com/WLD/whatis.html>
- [76] Lázníčková, A., Kubíček, V., *Základy fyzikální chemie. Vybrané kapitoly pro posluchače farmacie*, Karolinum, Praha (2006)
- [77] Thermo Electron Corporation (17. červenec 2006),
<http://www.thermo.com/com/CDA/Category/CategoryFrames/1,,496,00.html>
- [78] Agilent (25. února 2007)
<http://www.chem.agilent.com/Scripts/generic.asp?lPage=34537&indcol=N&prodcol=Y>
- [79] Guilbault, G.G., *Practical Fluorescence*, 2. Ed., M. Dekker, New York, USA (1990)
- [80] Majer, J., Jokl, V., Schiller, P., Svobodová, D., Karlíček, R., Kettman, V., Pavelčík, F., Otrlý, S., *Analytická chémia*, Osveta, Martin (1989)
- [81] Picometrics, „Introduction to Laser Induced Fluorescence Detection for HPLC & CE.“, Ramonville, France, (2007) www.picometrics.com
- [82] U.S. Environmental Protection Agency, National Environmental Research Laboratory, Environmental Sciences Division, Las Vegas, USA (2006)
<http://www.epa.gov/nerlesd1/chemistry/org-anal/faq.htm>
- [83] Michal Holčapek, University of Pardubice, Faculty of Chemical Technology, Department of Analytical Chemistry (25. února 2005)
http://holcapek.upce.cz/teaching_CZ.htm
- [84] The Official Web Site of the Nobel Foundation, (15. června. 2006)
<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2002/index.html>, Last modified October 5, 2005

- [85] Čáslavský, J., Lineární iontová past, 3. ročník Školy HPLC-MS Sborník přednášek, Editoři Holčapek M., Kolářová L., Doubice (2005)
- [86] Nobilis, M., Pour, M., Kuneš, J., Kopecký, J., Květina, J., Svoboda, Z., Sládková, K. and Vortel, J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24** (2001) 937-946
- [87] Nobilis, M., Kopecký, J., Květina, J., Chládek, J., Svoboda, Z., Voříšek, V., Perlík, F., Pour M., Kuneš, J., *J. Chromatogr. A* **949** (2002) 11-22
- [88] Varian (26. února 2007), <http://www.varianinc.com/cgi-bin/nav?products/consum/samprep/lle/specs&cid=JLJNOJQNFN>
- [89] Fusek, M, Nový vstříkovací ventil kombinující Solid Phase Microextraction (SPME) s HPLC, *Bulletin České společnosti chemické*, Ročník 27, číslo 2 (1996) (<http://www.uochb.cas.cz/Bulletin/bulletin272/fusek.html>)
- [90] Lord, H., Smith, B., Zini, Cl., Augusto, F., Pawliszyn, J., Applications of solvent-free sampling/Hample preparation technologies to in-vivo investigation of biological systems, Abstract book of 15th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Florencie, (2004) 19
- [91] Lord, H., Grant, R., Wales, M., Incledon, B., Facie, B., Pawliszyn, J, Development and evaluation of a solid phase microextraction probe for in vivo pharmacokinetics studies, Abstract book of 15th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Florencie (2004) 346
- [92] Musteata, F.M., Pawliszyn, J., *J. Biochem. and Biophys. Methods*, **70** (2007) 181-193
- [93] Smith, R.V., Steward, J.T., Textbook of Biopharmaceutic Analysis, Lea a Fibiger, Philadelphia (1981)
- [94] Chamberlain, J., Analysis of Drugs in Biological Fluids, CRC, UK (1995)
- [95] CDER and CVM Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, (srpen 2007), <http://www.fda.gov/cder/guidance/ichq2a.pdf>
- [96] Nobilis, M., a spol, *J. Chromatogr.B* **681** (1996) 143-151
- [97] Gasparič J., Barcuchová A., Horká I., *Chemické listy* **80** (1985) 1214