

Vysokou účinná kapalinová chromatografie je v oblasti stanovení léčiv z biologického materiálu jednou z nejpoužívanějších separačních metod. Je vhodná ke kvantitativní i kvalitativní analýze léčiv.

Isoniazid se používá jak k léčbě, tak i k prevenci tuberkulózy. Předávkování isoniazidem způsobuje neurotoxicitu. Akutní intoxikace isoniazidem se projevuje tonicko-klonickými křečemi centrálního původu. Jako antidotum se v klinické praxi podává vitamín B6 (pyridoxin). Přestože je zřejmé, že je tento druh toxicity spojen s deficitem vitamínu B6 (respektive jeho aktivní formy pyridoxal-5-fosfátu - PLP), konkrétní důkazy o mechanismech a dějích, které jsou za tento jev zodpovědné, stále chybí.

Cílem pilotní studie bylo vypracovat chromatografické podmínky, vhodné pro monitorování intoxikace isoniazidem a detekci případných hydrazonových metabolitů. Tyto podmínky by měly umožnit separaci sedmi analytů (isoniazid, acetylisoniazid, pyridoxal, pyridoxol, pyridoxal-5-fosfát, PIH a o-108 - vnitřní standard). Dále pak bylo cílem studovat možnosti izolace všech uvedených látek z králičí plazmy. Nejlepší chromatografická separace byla dosažena použitím kolony LiChroCART 250 × 4 nm I.D., s náplní Lichrospher 100 RP-18 (5 μm).

Mobilní fáze byla ve složení pufr - složka A (NaH_2PO_4 0,01 mol/l, s přidavkem EDTA 0,001 mol/l a kyseliny hexansulfonové 0,005 mol/l; pH 3,0 - upravené 30% H_3PO_4) a methanol, za využití gradientu: 0 - 18 min. 15 - 55% B, 18 - 21 min. 55% B, 21 - 22 min. 55 - 15% B, 22 - 29 min. 15% B (v/v). Průtok byl 0,1 ml/min a detekce 55

při 260 a 294 nm.

Pro extrakci byly testovány metody SPE a precipitace. Jako vhodnější metoda se v tomto případě jeví precipitace. Precipitace methanolem se ukázala jako vhodná pro izolaci isoniazidu, acetylisoniazidu, pyridoxolu, PIH a o-108, v případě pyridoxalu a pyridoxal 5-fosfátu bylo potřeba před methanolem přidat ještě kyselinu chloristou. Výsledky této práce budou dále využity při další optimalizaci metody extrakce. Tato práce představuje pilotní studii zaměřenou na vývoj HPLC metodiky vhodné pro monitorování průběhu intoxikace isoniazidem a detekci nových dosud nepopsaných hydrazonových metabolitů tohoto antituberkulotika.