

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Marcela Effmertová

Vývoj bioanalytické metody pro studium úlohy pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu při intoxikaci isoniazidem

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petra Kovaříková, PhD.

Studijní program: FARMACIE

2009

Na tomto místě bych chtěla co nejsrdečněji poděkovat vedoucí mojí diplomové práce PharmDr. Petře Kovaříkové, PhD. za pomoc, trpělivost a odborné rady při vypracování diplomové práce. Moje díky také patří mé rodině a Martinu Hadravovi za podporu, kterou mi věnovali po dobu vypracování práce.

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

V Hradci Králové dne 15. května 2009

Marcela Effmertová

Obsah

1	Úvod	7
2	Teoretická část	9
2.1	Definice a rozdělení chromatografických metod	9
2.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	11
2.2.1	Historie	11
2.2.2	Podstata a obecná charakteristika metody	12
2.2.3	Kvalitativní analýza	12
2.2.4	Stacionární fáze	13
2.2.5	Mobilní fáze	14
2.2.6	Gradientová eluce	14
2.2.7	Základní chromatografická data	14
2.2.8	Schéma kapalinového chromatografu	16
2.3	Úprava vzorku biologického materiálu před analýzou pomocí HPLC .	19
2.3.1	Přímý nástřik biologického vzorku na chromatografickou kolonu	20
2.3.2	Precipitace	20
2.3.3	Extrakce kapalina - kapalina	21
2.3.4	Ultrafiltrace	23
2.3.5	Extrakce na pevné fázi - SPE	24
2.4	Analyzovaná léčiva	25
2.4.1	Isoniazid (INH) a Acetylisoniazid	26

2.4.2	Vitamíny skupiny B6 - pyridoxin	29
2.4.3	Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH)	31
3	Cíl práce	33
4	Experimentální část	34
4.1	Použitý chromatografický materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie .	34
4.2	Vývoj chromatografických podmínek PIH	36
4.2.1	Příprava zásobních roztoků	36
4.2.2	Příprava standardních roztoků	37
4.2.3	Výběr stacionární a mobilní fáze a detekce	37
4.3	Vývoj metod izolace analytů z plazmy	38
4.3.1	SPE extrakce	38
4.3.2	Precipitace	39
4.3.3	Výpočet výtěžnosti	40
5	Výsledky a diskuse	41
5.1	Vývoj chromatografických podmínek	41
5.2	Výsledky metod izolace analytů z plazmy	44
5.2.1	Výsledky SPE	44
5.2.2	Výsledky precipitace	45
6	Závěr	53
	Abstrakt	55
	Abstract	57
	Literatura	59

Seznam tabulek

5.1	Výsledky - SPE	44
5.2	Výsledky precipitace acetonitrilem a methanolem	45
5.3	Výsledky precipitace s použitím koncentrované kyseliny chloristé jako prvního precipitačního činidla	46
5.4	Výsledky precipitace s použitím 0,8 ml methanolu s odfoukáním du- síkem do sucha	47

Seznam obrázků

2.1	Eluční křivka	15
2.2	Kapalinový chromatograf	16
2.3	Strukturní vzorec isoniazidu	26
2.4	Strukturní vzorec acetylisoniazidu	26
2.5	Strukturní vzorec pyridoxolu	29
2.6	Strukturní vzorec pyridoxalu	29
2.7	Strukturní vzorec pyridoxal-5-fosfátu	30
2.8	Strukturní vzorec pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu	32
5.1	Vývoj chromatografických podmínek	43
5.2	HPLC analýza acetylisoniazidu, isoniazidu a pyridoxolu	49
5.3	HPLC analýza PIH a <i>o</i> -108	50
5.4	HPLC analýza pyridoxal-5-fosfátu a pyridoxalu	51
5.5	HPLC analýza pyridoxal-5-fosfátu a pyridoxalu	52

Kapitola 1

Úvod

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - High Performance Liquid Chromatography (HPLC) patří v současné době k nejpoužívanějším analytickým separačním metodám. Mezi její největší výhody patří selektivita, citlivost, rychlost a malá spotřeba analyzovaného vzorku.

HPLC se uplatňuje při kvalitativní i kvantitativní analýze látek. Další využití HPLC je při zkoumání čistoty a stability látek a při analýze léčiv a metabolitů z biologického materiálu.

Isoniazid je lékem první volby při léčbě tuberkulózy. Používá se jak k léčbě, tak i k prevenci tuberkulózy. Předávkování isoniazidem způsobuje neurotoxicitu, v jejímž klinickém obraze, kromě specifických příznaků, dominují tonicko-klonické křeče. Jako antidotum při předávkování isoniazidem se v klinické praxi používá vitamín B6 (pyridoxin). Pyridoxin se vyskytuje ve třech formách, jimiž jsou pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin. Za biologicky účinnou formu je pokládán pyridoxal-5-fosfát. V organismu se vyskytují uvedené formy včetně jejich oxidačních produktů.

Bylo nashromážděno značné množství informací týkajících se osudu isoniazidu v organismu (farmakokinetiky), jakož i profilu nežádoucích a toxických účinků této látky. Poměrně uspokojivé vysvětlení se podařilo nalézt pro hepatotoxické účinky léčiva, za které patrně zodpovídá hydrazinový metabolit isoniazidu. Na druhou stra-

nu je zajímavé, že v případě neurotoxicity není v řadě otázek stále jasno. 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. I když je v literatuře v souvislosti s léčbou akutní intoxikace isoniazidem opakovaně zmiňována tvorba kondenzačních hydrazonových produktů, o jejich existenci dosud nebyl podán žádný jednoznačný analytický důkaz. Analytická metoda umožňující současnou analýzu isoniazidu, jeho metabolitu, vitamínů skupiny B6, jejich aktivní formy, ale také příslušných hydrazonů (pyridoxal isonikotinoyl hydrazon, popřípadě pyridoxal isonikotinoyl hydrazon-5-fosfát), by mohla přinést mnoho nových informací důležitých pro vysvětlení a popř. monitorování léčby intoxikace isoniazidem.

Kapitola 2

Teoretická část

2.1 Definice a rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody jsou separační metody sloužící k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze. Při všech chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha složek analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna nepohyblivá (stacionární) fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé analyty, druhá pohyblivá (mobilní) fáze je pak vymývá (eluuje) z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí [1].

V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární fází, která je v koloně nebo plošné vrstvě, a mobilní fází, která unáší separované látky. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich separaci. K separaci tedy dochází na základě různé afinity dělených látek ke stacionární a mobilní fázi [2].

Chromatografických metod je velké množství. Vzhledem ke značné různorodosti se dělí podle několika hledisek:

- Podle skupenství mobilní fáze se chromatografie dělí na kapalinovou chromatografii, kde mobilní fází je kapalina, a plynovou chromatografii, kde mobilní fází je plyn.
- Podle uspořádání stacionární fáze se rozděluje na kolonovou chromatografii, kde stacionární fáze je umístěna v trubici, a plošné techniky, mezi které patří například tenkovrstá chromatografie (TLC) [3].
- Podle povahy děje, který převládá při separaci, rozlišujeme následující metody:
 - **Adsorpční chromatografie.** Podstatou separace je rozdílná adsorbovatelnost dělených látek na aktivní povrch sorbentu. Jako sorbenty se nejčastěji používají silikagel a oxid hlinitý. V kapalinové chromatografii se jedná o separaci pevná fáze - kapalina (LLC), v plynové chromatografii pevná fáze - plyn (GSC).
 - **Rozdělovací chromatografie.** Podstatou separačního procesu je rozdílná rozpustnost dělených látek ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn).
 - **Iontově výměnná chromatografie (IEC).** Lze ji realizovat jen jako kapalinovou chromatografii. Stacionární fází jsou iontoměniče (katexy nebo anexy). Podstatou separace je rozdílná afinita dělených látek (zpravidla ionty) k iontovýměnným skupinám iontoměniče. Rozdílnost afinity separovaných látek je dána rozdílnými hodnotami disociačních konstant ionogenních skupin, různou velikostí iontů a různým mocenstvím iontů.
 - **Gelová chromatografie.** Jedná se o kapalinovou chromatografii, při které jsou analyzované látky separovány na základě velikosti molekul. Molekuly látky jsou nesené protékající mobilní fází kolonou naplněnou porézním materiálem (gelem), přičemž pronikají (permeací) do rozpouštědlem naplněných pórů. Velké molekuly, které přesahují průměr pórů, vycházejí

z kolony bez jakéhokoliv zadržení. Separace molekul je tedy závislá na rozmezí velikosti pórů zvoleného gelu [2].

- **Afinitní chromatografie.** Je založena na specifických interakcích charakteristických pro některé biologické a biochemické procesy. Interakce probíhají mezi dvojicemi látek s vysokou selektivitou. Jako příklad lze uvést specifickou vazbu mezi protilátkou a antigenem, případně reakci enzymu pouze se svým substrátem nebo inhibitorem, přičemž ostatní látky zůstanou nedotčeny. Jestliže se jedna z dvojic látek váže kovalentní vazbou na vhodný nosič, aniž je tím porušena její funkce (insolubilizuje-li se), je možno takto vázanou látku (tzv. afinant) použít k selektivnímu zachycování druhé látky příslušné dvojice z roztoku [4].

2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

2.2.1 Historie

Klasická kolonová chromatografie používala kolon plněných náplněmi s velkými částicemi o průměru 100 až 200 μm nebo i více. Mobilní fáze protékala kolonou působením gravitační síly a eluát bylo třeba odebírat po frakcích, v nichž byla koncentrace dělených látek stanovována klasickými, případně kolorimetrickými metodami. Tato technika byla velice pracná a zdoluhavá, navíc účinnost dělení byla velice nízká. Renesance kapalinové chromatografie jako moderní, vysoce účinné analytické metody s automatickou detekcí chromatografovaných látek byla umožněna aplikací řady teoretických poznatků z plynové chromatografie. Její bouřlivý rozvoj však byl umožněn až poté, co přístrojová laboratorní technika dosáhla vysokého technologického stupně. Byly zkonstruovány vysoce citlivé detektory, důmyslné dávkovací systémy a vysokotlaká čerpadla, byla připravena celá řada vysoceúčinných universálních i selektivních sorbentů tvořících náplně chromatografické kolony [5].

2.2.2 Podstata a obecná charakteristika metody

Při analytickém hodnocení léčiv je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography, HPLC) používána velmi často. Je to především z toho důvodu, že jde o separační metodu, která umožňuje současně jak kvalitativní, tak i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, a to s vysokou selektivitou, citlivostí a v relativně krátkém čase. Pro analýzu postačuje velmi malé množství vzorku a pro rutinní použití (velké série vzorků) je možno s využitím automatického dávkovače celou metodu plně automatizovat [2].

2.2.3 Kvalitativní analýza

Pro vlastní kvantitativní hodnocení léčiv je základem plocha (event. výška) chromatografického píku. Pro stanovení jednotlivých složek ve směsi se nejčastěji používají následující metody:

- **Metoda vnějšího standardu.** Spočívá ve dvou krocích (dvojím dávkováním). V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci jeho chromatografického záznamu se v druhém kroku nastříkne roztok vnějšího standardu a opět se zaznamená jeho chromatogram. Jako vnější standard se zpravidla používá u substancí standard stanovované látky, například CRL (chemická referenční látka) u lékopisných analýz, nebo u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi [2].
- **Metoda vnitřního standardu.** Ke známému objemu roztoku vzorku se přidá definovaný objem roztoku vhodného vnitřního standardu a po promíchání se nastříkuje na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se opět vypočítá z poměru ploch (výšek) píků jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Metoda vnitřního standardu je méně časově náročná a hlavně přesnější, protože není zatížena chybou dvojího nástřiku. Vnitřní standard musí být eluován v blízkosti píků, které budou vyhodnocovány, musí mít

podobnou koncentraci jako látky, jejichž obsah je zjišťován a musí být chemicky inertní. Jeho struktura musí být podobná stanovované látce [2].

- **Kalibrační metoda** se vyhodnocuje pomocí kalibrační křivky, sestrojené jako závislost odezvy detektoru (plocha píku, nebo poměry ploch píku analytu a vnitřního standardu) na různých koncentracích analytu ve vzorku. Tento způsob kvantifikace se často využívá při analýze léčiv a metabolitů z biologického materiálu. Připraví se série kalibračních vzorků, které obsahují různé množství analytu avšak stále stejnou koncentraci vnitřního standardu. Na osu x se vynáší koncentrace analytu a na osu y poměr ploch píků analytu a vnitřního standardu. Přidáním vnitřního standardu ke vzorku před jeho úpravou se zabrání k chybné kvantifikaci analytu, ke které by mohlo dojít vlivem experimentálního postupu. Vnitřní standard musí vykazovat stejné vlastnosti při předúpravě vzorku jako analyzovaná látka [6].
- **Metoda standardního přídávku** se převážně používá v analýze se stopovými koncentracemi analytů. Známé množství analytu je přidáváno do vzorku, který již obsahuje neznámou koncentraci analytu. Zvětšení plochy píku je přímo úměrné přidanému množství analytu [6].

2.2.4 Stacionární fáze

Podle relativní polaritý stacionární a mobilní fáze rozlišujeme chromatografii v systémech s normálními fázemi (stacionární fáze je polárnější než fáze mobilní) a chromatografii v systémech s obrácenými fázemi (mobilní fáze má větší polaritu než fáze stacionární).

Jako první sorbent byl v kapalinové chromatografii používán silikagel (oxid křemičitý). Postupem času se začal silikagel modifikovat pomocí uhlíkových řetězců, tím vznikly sorbenty s obrácenými (reverzními) fázemi.

Při kolonové kapalinové chromatografii v systému s obrácenými fázemi se jako tuhých stacionárních fází (sorbentů) používá především nepolárních uhlovodíkových

fází imobilizovaných na anorganických nosičích (např. C8, C18). Nicméně je možno použít i čistého uhlíku, organických polymerů či náplní s chemicky vázanými arylovými či středně polárními (např. etherovými, nitrilovými či diolovými) fázemi [7].

2.2.5 Mobilní fáze

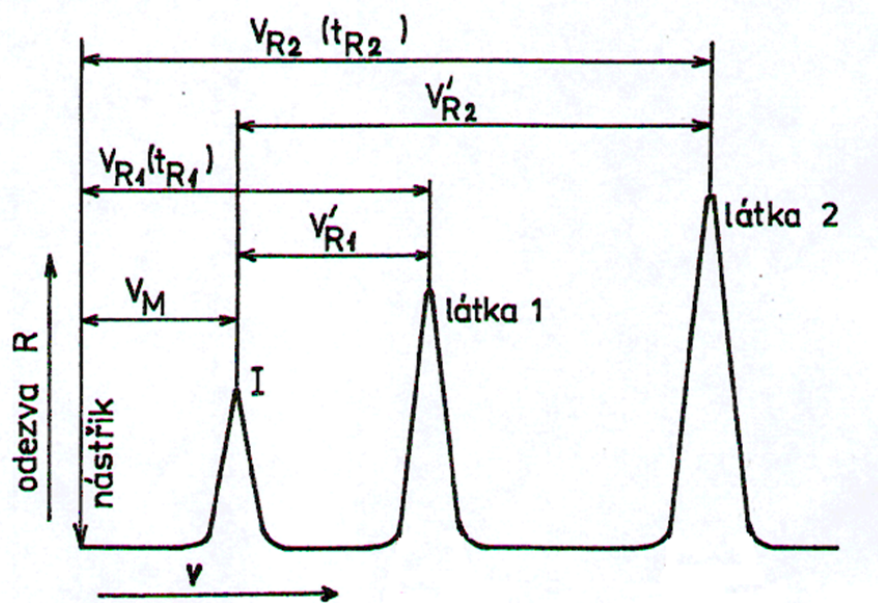
Jako mobilních fází se nejčastěji používá vodných roztoků jednoho či více organických rozpouštědel, nejčastěji methanolu, acetonitrilu a tetrahydrofuranu. Pro separaci iontových látek či látek kyselé a bazické povahy je třeba k mobilní fázím přidávat pufrы, neutrální soli, slabé kyseliny či látky vytvářející s ionizovanými soluty iontové asociáty [7].

2.2.6 Gradientová eluce

Gradientová eluce se používá k dělení směsí, jejichž složky se značně liší retencí při eluci s konstantním složením mobilní fáze. Eluce silněji zadržovaných látek se urychlí použitím mobilních fází, jejichž eluční síla se zvyšuje časem. Kontinuální změny složení mobilní fáze se dociluje mícháním několika složek mobilní fáze (většinou dvou až tří) v poměru, který se řídí předem zvoleným časovým programem. Přístroje pro gradientovou eluci lze dělit do dvou skupin podle toho, zda se složky gradientu míchají ve vysokotlaké, nebo nízkotlaké části [7].

2.2.7 Základní chromatografická data

Při chromatografii jsou dělené složky zadržovány v koloně různou dobu. Charakteristickou veličinou pro každou látku v daném chromatografickém systému je retenční (eluční) čas nebo retenční (eluční) objem označený t_R resp. V_R . Retenční čas představuje dobu od nástřiku vzorku na kolonu až po objevení se maxima píku dané složky. Retenční objem představuje objem mobilní fáze proteklý kolonou za výše uvedenou dobu.



Obrázek 2.1: Eluční křivka

Eluční křivka neboli chromatogram (záznam chromatografického dělení) Obrázek 2.1 je závislost signálu (odezvy) detektoru na objemu proteklé mobilní fáze se složkami analytu (Obrázek 2.1).

Mezi retenčním časem a retenčním objemem platí vztah:

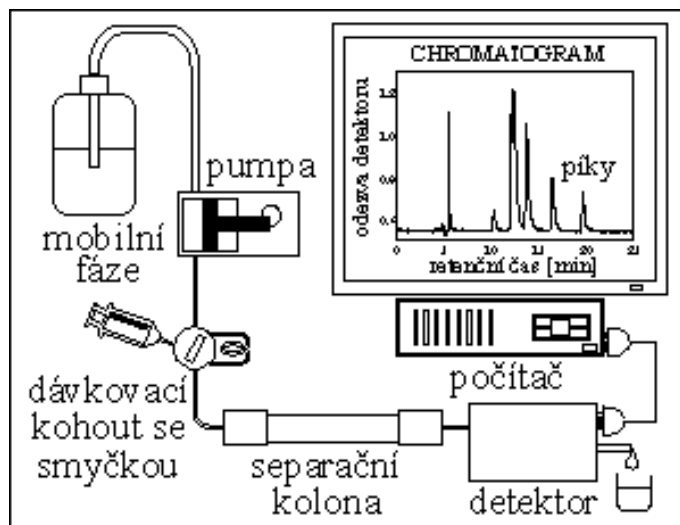
$$V_R = t_R F_m,$$

kde F_m je objemový průtok mobilní fáze (objem proteklý za jednotku času).

Retenční čas je ve skutečnosti vyjádřen součtem redukovaného retenčního času t'_R a mrtvého retenčního času t_M :

$$t_R = t_M + t'_R.$$

Mrtvý retenční čas představuje časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce složky, která není stacionární fází zadržována [3, 4].



Obrázek 2.2: Kapalinový chromatograf

2.2.8 Schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, separaci látek a jejich detekci. Těmito částmi jsou zásobník mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, směšovací zařízení, dávkovací zařízení, degaser, chromatografická kolona, detektor a počítač (Obrázek 2.2).

- *Vysokotlaká čerpadla* zajišťují stabilní proud mobilní fáze, který je pro analýzu velmi důležitý. Výstupní tlaky na čerpadlech se pohybují v rozmezí 1 - 30 MPa, tím je možno dosáhnout průtoku mobilní fáze od 0,01 do 5 ml/min [8].
- *Dávkovací zařízení.* Vzorek, který se má chromatograficky rozdělit se nejprve dokonale rozpustí ve vhodném rozpouštědle, nejlépe v mobilní fázi a dávkuje se do kolony injekčními stříkačkami malých objemů, nejlépe konstruovaných jako vysokotlaké, nebo dávkovacími kohouty, dávkovacími smyčkami a podobně. V dnešní době se používají převážně automatické šesticestné dávkovací kohouty (autosampler). Další možnost dávkování je ruční dávkování, kdy se vzorek aplikuje stříkačkou na smyčku a otočí se ventilem [8].

- *Degaser* je zařízení odstraňující plyny z mobilní fáze. Nerozpuštěný vzduch způsobuje výkyvy v plynulosti průtoku mobilní fáze. Odplynění mobilní fáze může využívat několika principů: probublávání heliem, zavedení vacua do mobilní fáze, ultrazvuk a zahřívání [9].
- *Chromatografické kolony*. V HPLC má volba a výběr kolon samých a jejich příslušenství rozhodující význam. O účinnosti kolon rozhoduje nejen kvalita použitého sorbentu, ale i jejich délka, tvar, materiál, z něhož jsou zhotoveny, spojovací součásti, jejich vnitřní povrch a další faktory, jako je způsob plnění kolon, velikost mrtvých objemů v systému apod.

Nejčastějším materiálem používaným k výrobě kolon je nerezová ocel. Kolony se vyrábějí v různých velikostech, většina kolon má poloměr (I.D.) rovný 3, 4 nebo 4,6 mm. Délka kolony je většinou 10 až 25 cm, nicméně moderním trendem je zkracování kolon a jejich poloměrů [4, 9].

V dnešní době se pro analytické aplikace používá převážně kolon plněných pórovitými náplněmi s částčkama o průměru 3 až 5 μm . Pro analýzu z biologického materiálu se používají předkolony, které chrání kolonu před poškozením [10].

- *Detektory* slouží k indentifikaci látek vycházejících z chromatografické kolony. Zpravidla se od nich žádá, aby sledovaly koncentrace separovaných složek v eluátu. Detektor sleduje pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu. Ve speciálních případech může detektor poskytnout i některé konkrétní údaje o charakteru separované složky (celé UV spektrum, molekulovou hmotnost a i další).

K detekci separovaných látek se zpravidla využívá určitých jejich vlastností, jimiž se tyto látky liší od složek mobilní fáze. V podstatě rozlišujeme dva typy detektorů - univerzální a selektivní. Z požadavků kladených na dobrý detektor je možno uvést:

- linearitu odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací
- dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou
- vysokou citlivost
- nízkou hodnotu mimokolonového příspěvku
- malou citlivost na změny tlaku a průtoku
- možnost využití gradientové eluce.

Detektor pracující v UV oblasti záření je v současné době nejpoužívanějším detektorem. Používá se buď detektor s nastavitelnou vlnovou délkou, nebo DAD (diode-array detektor), který během jednoho nástřiku proměří všechny vlnové délky v požadované oblasti. Ostatní detektory se používají v případech, kdy analyt téměř vůbec neabsorbuje v UV oblasti, nebo když je koncentrace analytu pro UV detekci příliš nízká. Pro měření v oblasti od 190 do 400 nm se používá deuteriová lampa. Pokud je požadováno měření při viditelné oblasti (400 až 700 nm), pak je používána vysoce energetická wolfram-halogenová lampa. Výhodou obou detektorů je, že jako mobilní fáze jsou používána rozpouštědla, která ve viditelné i v ultrafialové oblasti spektra neabsorbují. Dalšími typy používaných detektorů jsou fluorimetrický, elektrochemický, refraktometrický a hmotnostní spektrometr, jehož význam v dnešní době roste [4, 6].

Fluorimetrický detektor je vysoce selektivní a citlivý avšak poskytuje odezvu pouze pro látky vykazující fluorescenci. Jen velmi málo analytů vykazuje přirozenou fluorescenci, proto je třeba některé vzorky derivatizovat. Na analyt se naváže určitá chemická skupina, která vykazuje fluorescenci. Detegovaná látka v cele absorbuje ultrafialové budící (excitační) záření, jehož pohlcená energie se z části vyzáří (emituje) ve formě fluorescenčního záření o nižší energii (vyšší vlnové délce), než má záření excitační [6, 10].

Elektrochemické detektory lze použít pro detekci analytů, které jsou elektrochemicky aktivní. Jsou běžně děleny na ampérometrické a vodivostní. Vo-

divostní detektor je převážně používán pro iontově-výměnou chromatografii. Je nespecifický, měří elektrickou vodivost eluátu. Amperometrický detektor je citlivý a selektivní [6, 10].

Refraktometrický detektor je univerzální, má však nižší citlivost. Jeho odezva závisí na teplotě. Nelze jej použít při gradientové eluci. Tento detektor poskytuje odezvu úměrnou rozdílu indexů lomu eluátu v měrné cele a srovnávací kapaliny (měla by být vždy čistá mobilní fáze) v cele srovnávací. Citlivost detektoru je tedy tím větší, čím větší je rozdíl indexu lomu látky a indexu lomu mobilní fáze [10].

Hmotnostní spektrometr. Navzdory jeho vysoké ceně a náročnému ovládní se v dnešní době začíná stále více prosazovat hmotnostní spektrometr (MS) a to především v bioanalýze léčiv. Po výstupu z HPLC kolony dochází k odstranění mobilní fáze a ionizaci analytu. Nejčastěji užívané ionizační techniky pro spojení HPLC - MS jsou ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Nabité částice (molekulární a fragmentární ionty) jsou poté v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle hmotnosti a náboje. Výsledné hmotnostní spektrum (hmotnost částic/počet nábojů) je zaznamenáno. Spojení HPLC-MS je vysoce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci látek [2].

2.3 Úprava vzorku biologického materiálu před analýzou pomocí HPLC

Biologický materiál je zpravidla tvořen velmi komplikovanou směsí navzájem se ovlivňujících složek, které mohou působit kladně nebo záporně na chování analytu.

Účelem úpravy je tedy oddělení analytu od nežádoucích interferujících látek z matrice (proteinů, lipidů a jiných endogenních látek), zakoncentrování vzorku, snížení

obsahu nečistot a zvýšení selektivity.

Výběr vhodné metody úpravy záleží na volbě biologického materiálu a na vlastnostech stanovované látky. Nejčastěji používanými biologickými materiály jsou plazma, sérum, krev a moč. Dále se pak mohou používat sliny, likvor, mateřské mléko, slzy, žluč, pot a stolice.

Nejvyužívanějšími metodami úpravy vzorku jsou extrakce kapalina - kapalina, precipitace, SPE (solid phase extraction) extrakce, ultrafiltrace. Mezi moderní metody se pak řadí superkritická fluidní extrakce a mikroextrakce pevnou fází [11].

2.3.1 Přímý nástřik biologického vzorku na chromatografickou kolonu

Jen v některých případech lze biologický vzorek nastříkovat na kolonu bez předchozí úpravy. Metoda je použitelná pouze u biologických vzorků s minimálním obsahem proteinů jako jsou likvor, sliny a moč. Nevýhodou přímé aplikace biologických tekutin na analytickou kolonu je zvýšené riziko znečištění a znehodnocení kolony v důsledku vysokého obsahu balastů, dále pak snížení separační účinnosti a možnosti zakoncentrování vzorku [12].

2.3.2 Precipitace

Nejjednodušší úprava vzorku při analýze látek obsažených v séru, plazmě, krvi je precipitace proteinů vhodnými deproteinačními činidly. Tímto způsobem se zabrání vysrážení proteinů na chromatografické koloně při styku vzorku s mobilní fází obsahující organická rozpouštědla nebo koncentrovanější pufrů. Po centrifugaci je alikvot čirého supernatantu buď nastříknut na kolonu přímo, nebo při nízké koncentraci sledované látky je supernatant odpařen do sucha a odparek je rozpuštěn v minimálním objemu mobilní fáze.

Deproteinace bývá prováděna:

- přidáním organických rozpouštědel mísitelných s vodou např. methanolem, ethanolem, acetonitrilem, acetonem;
- silnými kyselinami: trifluoroctovou, trichloroctovou, chloristou, mravenčí;
- solemi těžkých kovů:
 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ba}(\text{OH})_2$;
- nebo kombinací několika deproteinačních činidel.

Výhodou této metody je, že je jednoduchá, rychlá a snadno proveditelná. Ze vzorku jsou odstraněny proteiny, ostatní endogenní látky jsou v supernatantu zachovány. To může být i v některých případech nevýhoda. Tato metoda je nevhodná pro látky, které se vážou na precipitát a na vzorky se stopovým množstvím analytu, dochází totiž ke značnému naředění vzorku [12].

2.3.3 Extrakce kapalina - kapalina

Extrakce složky v systému dvou omezeně mísitelných kapalných fází zaujímá významné místo mezi separačními technikami.

Podmínkou je ustanovení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami - výchozím vzorkem s analytem a rozpouštědlem, do kterého máme zájem analyt v co největší míře převést.

Obvyklým úkolem je extrahovat složku z biologického materiálu do organického rozpouštědla, které je s vodou nemísitelné. Po čase se mezi množstvím analytu v obou fázích ustanoví rovnováha, kterou popisuje Nernstův rozdělovací zákon:

$$K_D = \frac{c_{org}}{c_{aq}}$$

K_D ... rozdělovací konstanta (Nernstův rozdělovací koeficient)

c_{org} ... rovnovážná látková koncentrace složky v organickém rozpouštědle

c_{aq} ... rovnovážná látková koncentrace složky ve vodě

Rozdělovací konstanta charakterizuje danou látku v systému voda - organické rozpouštědlo při určité teplotě a tlaku. Větší hodnota K_D znamená vyšší podíl složky v organickém rozpouštědle. Její hodnota pro extrahovanou látku by měla být výrazně vyšší než jedna.

Extrakční proces závisí na řadě faktorů:

- *Vliv fyzikálně chemických vlastností rozpouštědla.* Rozpouštědlo jako extrakční fázi volíme podle charakteru extrahované látky. Látky hydrofobní se snáze rozpouštějí v rozpouštědlech nepolárních, rozpouštědla polární jsou vhodná pro hydrofilní látky.

Volba extrakčního rozpouštědla (čínidla) vychází z následujících požadavků:

- omezená mísitelnost s extrahovanou směsí (tvorba 2 fází)
 - velmi dobrá rozpustnost extrahované složky (výhodný rozdělovací koeficient)
 - rozdílná hustota rozpouštědla a směsi (nutné rozdělení obou fází)
 - dostatečná těkavost (s ohledem na destilační zahuštění vzniklého extraktu a regeneraci rozpouštědla) [13].
- *Vliv pH vodné fáze.* Úpravou pH vodné fáze dosahujeme vyšší selektivity a efektivity extrakce. Obecně lze říci, že při pH nižším (< 5) se méně disociují a tudíž lépe extrahují látky kyselého charakteru. Naopak při pH vyšším (> 7) snáze přecházejí do extrakčního čínidla látky bazické. Cílem je upravit pH vzorku tak, aby byla potlačena ionizace analytu.

Vztah mezi pH a poměrem nedisociované a disociované formy analytu vyjadřuje Henderson - Hasselbalchova rovnice:

$$pKa = pH + \log \frac{[\text{nedisoc. kys}]}{[\text{disoc. kys}]} \quad \dots \text{ pro kyseliny}$$

$$pKa = pH + \log \frac{[\text{disoc. baze}]}{[\text{nedisoc. baze}]} \quad \dots \text{ pro baze}$$

Obecně je vhodné nastavit takové pH, aby poměr nedisociované formy k disociované formě byl nejméně 100 : 1, tj. aby nedisociovaný podíl tvořil nejméně 99%.

- *Vliv vzájemného poměru nemísitelných fází.* Vhodně zvoleným poměrem vodná : organická fáze zlepšujeme extrahovatelnost látky. Na druhé straně větší objem rozpouštědla způsobuje nižší koncentrace extrahované látky v extraktu nebo obtížnější odběr organické fáze ze směsi.
- *Způsob a doba trvání extrakce.* Intenzita extrakce a doba třepání musí být natolik účinná, aby přechod látky do rozpouštědla byl co nejúplnější. Doba extrakce nemá být z praktických důvodů neúměrně dlouhá, ani při ní nesmí docházet ke vzniku těžko odstranitelných emulzí.
- *Způsob předchozího zpracování vzorku.* Předchozí zpracování vzorku může výrazným způsobem ovlivnit výtěžek extrakce, např. při deproteinaci může působit nepříznivě změna pH vodné fáze vlivem přídavku deproteinačního činidla, nebo absorpce analytu na precipitované proteiny [11].

2.3.4 Ultrafiltrace

Při ultrafiltraci zůstává vázaná složka léčiva společně s proteiny na stejné straně membrány a membránou prošlý ultrafiltrát obsahuje jen volnou složku. Na velikosti pórů semipermeabilní membrány závisí, jak velké molekuly budou membránou ještě zadržovány. V principu lze ultrafiltraci zachytit na membránách sloučeniny o velikosti 1 až 10 nm, tj. sloučeniny o molekulové hmotnosti 500 až 1 000 000. Jedná se především o viry, pyrogeny, proteiny a peptidy.

Separace na membráně je urychlena tlakem, který může být docílen dvěma způsoby: pomocí pístu (přetlak) nebo pomocí centrifugy (podtlak).

Výhodou metody je, že nedochází k naředění vzorku, ultrafiltrát je bez proteinů a reziduí činidel [11].

2.3.5 Extrakce na pevné fázi - SPE

SPE (solid phase extraction) je metoda, kdy se analyt selektivně zadrží na pevném sorbentu, tím se zakoncentruje a přečistí. V podstatě jde o různé modifikace sloupcové nebo tenkovrstevné chromatografie. Mechanismus retence v SPE je stejný jako v kapalinové chromatografii, a proto i používané sorbenty jsou vlastně velice podobné. Obdobně jako u HPLC se nejčastěji využívají nepolární nebo polární sorbenty. Jako polární sorbent se používá například silikagel, oxid hlinitý nebo sorbenty s modifikovanými fázemi CN, NH₂. Z nepolárních sorbentů to jsou C18 nebo C8. Dále se mohou použít ionto-výměnné fáze. Rozdíl mezi HPLC a SPE je v tom, že u HPLC jsou látky separovány kontinuálním proudem mobilní fáze a u SPE jednorázovým prolitím roztokem.

Sorbenty pro SPE existují v několika provedení. Sorbent je uložen v trubičkách z polypropylenu nebo ze skla (SPE kolonka) nebo slisován se skleněnými vlákny do disků (SPE disk). Disky jsou k dispozici v různých velikostech od 4 do 90 mm. Standardní velikost disku je 47 mm. Kolonky mívají od 1 do 25 ml a hmotnost výplně se pohybuje mezi 0,1 až 2 g. SPE extrakce je snadná, časově nenáročná a vysoce účinná. Oproti LLE se značně snižuje objem použitého rozpouštědla. Analyt se zakoncentrovává. Selektivita extrakce se zvyšuje tím, že se vybere pevná fáze s vyšší afinitou k analytu než k dalším komponentům vzorku [14].

Postup SPE:

- **Aktivace kolonky.** Kolonka je nejprve promývána roztokem, kterým je většinou methanol, acetonitril nebo jiné organické rozpouštědlo, aby došlo k solvataci sorbentu. Navíc vzduch, který je v kolonce, je vytěsněn a prázdná místa jsou zaplněna roztokem.

Po solvataci se provede nasycení kolonky čistým rozpouštědlem analytu. Ustaví se rovnováha mezi sorbentem v kolonce a tímto rozpouštědlem. Např., je-li vzorkem pufovaná fyziologická tekutina, je vhodné promýt kolonu odpovídajícím puforem; je-li extrahován vzorek v organickém rozpouštědle, kolona by se

měla upravit týmž organickým rozpouštědlem. Tento stupeň vytváří podmínky podporující retenci analytu [14].

- **Aplikace vzorku.** Vzorek je aplikován na kolonku a nechá se dostatečný čas protékat. Zvláště při iontově-výměnné extrakci by příliš rychlé provedení mohlo způsobit, že se analyt nezadrží úplně.
- **Promývání kolonky.** Účelem jednoho nebo více promývacích kroků je selektivně eluovat nežádoucí sloučeniny z vázaných fází, aniž by byly eluovány analyty. Často jsou velmi vhodnou volbou rozpouštědla, ve kterých jsou analyty nerozpustné. Používáme-li iontově-výměnné nebo nepolární sorbenty, je pro eluci nežádoucích příměsí důležité dodržování pH. Průtok pro eluci příměsí by měl být řízen. Při velkém průtoku by se nemusely příměsí dostatečně vymýt.
- **Eluce analytu z kolony.** Závěrečným stupněm v SPE extrakci je znovuzískání analytů z extrakční kolonky. To je provedeno promytím kolonky rozpouštědlem, které eluuje analyty z vázaných fází do vhodné jímací nádoby. Opět je nezbytná kontrola rychlosti průtoku, protože při rychlém průtoku se nemusí vymýt všechny analyty [14].

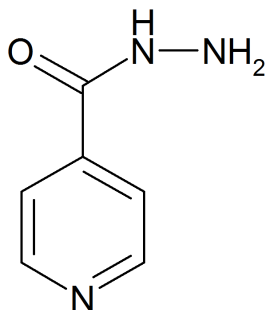
2.4 Analyzovaná léčiva

Jedním ze závažných toxických účinků isoniazidu, který se projevuje především při akutním předávkování, je neurotoxicita. Je známo, že je spojena se snížením koncentrace aktivní formy vitamínu B6 (pyridoxal-5-fosfátu-PLP) v buňkách. Zvláště závažné je snížení koncentrací PLP v centrální nervové soustavě, v jehož důsledku v klinickém obraze předávkování dominují, vedle specifických příznaků, také závažné tonicko-klonické křeče. Jako antidotum při předávkování se v klinické praxi používá vitamín B6 (pyridoxin). Pyridoxin se vyskytuje ve třech formách: pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin. Za biologicky účinnou formu je považován pyridoxal-5-fosfát. Jedním z možných a dosud nepopsaných metabolitů při intoxici isoniazidem by mohl

být pyridoxal isonikotinyol hydrazon (PIH), popřípadě jeho fosfátovaná forma pyridoxal isonikotinyol hydrazon-5-fosfát.

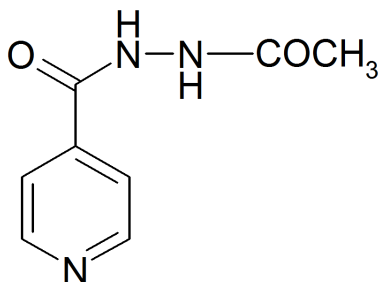
2.4.1 Isoniazid (INH) a Acetylisoniazid

- *Indikace:* Isoniazid je antimykobakteriální látka, která působí baktericidně proti extracelulárním i intracelulárním organismům. Je to lék první volby používaný pro léčbu tuberkulózy. Většinou se podává v kombinaci s rifampicinem, ethambutolem a pyrazinamidem.



Obrázek 2.3: Strukturní vzorec isoniazidu

- *Sumární vzorec isoniazidu:* $C_6H_7N_3O$
- *Molární hmotnost isoniazidu:* $M_R = 137,1$



Obrázek 2.4: Strukturní vzorec acetylisoniazidu

- *Sumární vzorec acetylisoniazidu:* $C_7H_9N_3O_2$

- *Molární hmotnost acetylisoniazidu: $M_R = 169,2$*
- *HPLC analýza isoniazidu:*

Protože je isoniazid v klinické praxi již dlouho užívaným léčivem, pro jeho stanovení v biologickém materiálu byla popsána řada metod.
- *Vybrané studie zabývající se analýzou isoniazidu a acetylisoniazidu v biologickém materiálu:*
 - Autoři Eugene B. et al. vyvinuli metodu stanovení 2 antituberkulotických léků isoniazidu a aconiazidu z potkaní plazmy. Isoniazid byl z plazmy získán pomocí precipitace, která probíhala ve dvou krocích: 250 μ l plazmy se smíchalo s 10 μ l 10% roztoku síranu zinečnatého (w/v). Zkumavka byla centrifugována 1000 g po dobu 1 minuty. 250 μ l supernatantu bylo převedeno do nové tuby a přidáno 100 μ l methanolu. Po promíchání a centrifugaci vzorku bylo 5 μ l čistého supernatantu nastříknuto na HPLC. Vzorek byl separován na CN koloně 250 mm \times 4,6 mm I.D., 5 μ m. Jako mobilní fáze byl použit 5% isopropanol obsahující 5 g/l fosforečnanu amonného. Průtok byl 1 ml/min. Pro detekci byl použit elektrochemický detektor [15].
 - Studie autorů Ng K. et al. se zabývá stanovením isoniazidu a acetylisoniazidu z plazmy za pomoci LC/MS systému přepínání kolon. Jako vnitřní standard byl použit iproniazid. Nejprve byla plazma deproteinována 400 μ l acetonitrilu a centrifugována při 10 000 rpm (otáčky za minutu) po dobu 10 minut při 4 °C. Supernatant byl převeden do nové konické zkumavky a vysušen proudem dusíku. Zbytek byl rozpuštěn v 1 ml vody obsahující 0,1% kyseliny mravenčí a centrifugován při 10 000 rpm při 4 °C po dobu 30 min. před přímým nastříknutím na extrakční systém. Jako extrakční kolona byla použita Eclipse XDB-C8 s parametry 4,6 mm \times 12,5 mm, s částicemi o velikosti 5 μ m. Jako mobilní fáze byla použita

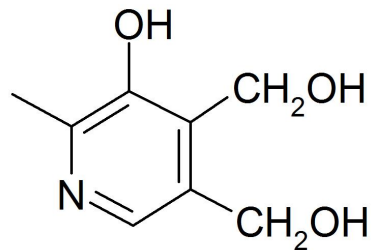
0,1% kyselina mravenčí s průtokem 0,1 ml/min. Po uplynutí 0,14 min byl přepnut ventil a analyt byl vnesen na analytickou kolonu Aquasil C18, 3 mm × 300 mm, s velikostí částic 3 μm. Mobilní fáze se skládala z methanolu a 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě. Byla použita následná gradientová eluce: 0-6 min, 8% methanol; 6 - 9 min, 8 – 98% methanol; 9 - 16 min, 98% methanol; 16 - 18 min, 98 – 8% methanol, průtok byl 0,2 ml/min [16].

- P. J. Smith et al. stanovovali kromě isoniazidu také rifampicin a pyrazinamid z plazmy pomocí HPLC s kolonou C8, 150 mm × 4,6 mm I.D., s velikostí částic 5 μm a mobilní fází 3% acetonitril v 0,06% triflouroctové kyselině. Detekce byla při 254 nm. Extrakce z plazmy byla prováděna na kolonkách C18, které byly promyty 2 × 2 ml methanolu, 2 × 2 ml vody a 2 ml 0,05M fosfátovým puforem (pH 4,5) před aplikací vzorku. 0,5 ml plazmy bylo pomalu aplikováno na kolonu a na ní ponecháno po dobu 5 min. Poté byly nevázané složky vymyty. Kolona byla promyta 1 ml pufru a analyt eluován 0,5 ml acetonitrilu a 0,5 ml methanolu. 0,5 ml ze spojeného eluátu bylo vysušeno ve vakuové centrifuzě a přidáno k 0,5 ml 3% acetonitrilu v 0,06% triflouroctové kyselině [17].
- G. A. Ellard et al. ve své studii popsali extrakci isoniazidu a dalších jeho pěti metabolitů (včetně acetylisoniazidu) ze séra a moči. 3 ml vzorku séra nebo moči byly po dobu 10 sekund jemně ručně protřepávány s 1 ml 4M octanem sodným a 13 ml butan-1-olu. Hned poté byly přidány 4 g (NH₄)₂SO₄ a zkumavka byla znovu protřepána. Oddělené fáze byly separovány pomocí centrifugy a horní butan-1-ol odebrán Pasteurovou pipetou. 10 ml tohoto extraktu bylo třepáno 10 s na vortexu s 1 ml 4M octanem sodným a 10 ml ethylacetat-n-heptanem (1:1, v/v). Po centrifugaci byl isoniazid a acetylisoniazid extrahován z organické fáze třepáním 18 ml roztoku se 4 ml 0,1M HCl po dobu 10 s na vortexu. Určité množství ex-

traktu kyseliny chlorovodíkové bylo pak analyzováno kolorimetricky nebo fluorimetricky [18].

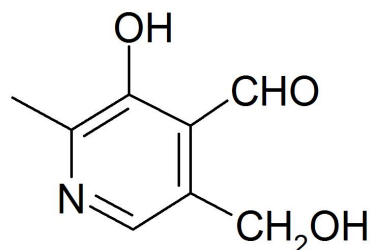
2.4.2 Vitamíny skupiny B6 - pyridoxin

- *Indikace:* Vitamín B6 existuje ve třech formách: pyridoxin (alkohol), pyridoxamin (amin) a pyridoxal (aldehyd). Také může existovat ve fosforylované formě. Pyridoxal-5-fosfát je hlavní aktivní koenzym v lidském těle, který se účastní dekarboxylace aminokyselin za vzniku biologicky aktivních aminů (např. adrenalin, histamin, serotonin, dopamin, tyramin). Dále se účastní transaminace aminokyselin v anabolických a katabolických procesech a štěpení a syntézy aminokyselin.



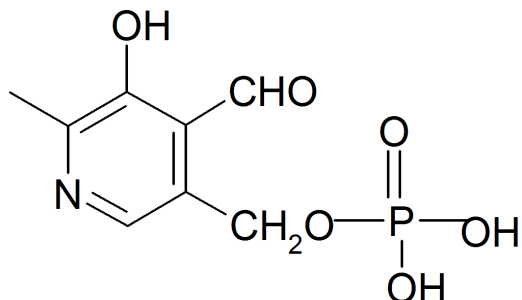
Obrázek 2.5: Strukturní vzorec pyridoxolu

- *Sumární vzorec pyridoxolu:* C₈H₁₁NO₃
- *Molární hmotnost pyridoxolu:* M_R = 169, 2



Obrázek 2.6: Strukturní vzorec pyridoxalu

- *Sumární vzorec pyridoxalu:* $C_8H_9NO_3$
- *Molární hmotnost pyridoxalu:* $M_R = 167,2$



Obrázek 2.7: Strukturní vzorec pyridoxal-5-fosfátu

- *Sumární vzorec pyridoxal-5-fosfátu:* $C_8H_{10}NO_6P$
- *Molární hmotnost pyridoxal-5-fosfátu:* $M_R = 247,17$
- *HPLC analýza pyridoxinu:*

O stanovení pyridoxinu a jeho všech biologických formách z biologického materiálu pojednává velký počet studií. Byly použity mikrobiologické, enzymatické, radioimunologické metody analýzy. Největším problémem analýzy je, že se koncentrace některých forem vitamínu B6 pohybují i v nanomolech na litr plazmy a méně. Většina analýz vitamínu B6 je založena na HPLC analýze s fluorescenční detekcí, která požaduje derivatizaci pyridoxal-5-fosfátu.

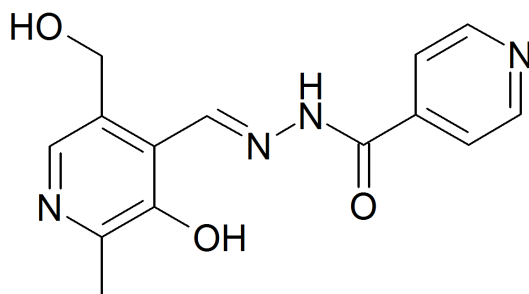
- *Vybrané studie zabývající se stanovením vitamínu B6 v biologickém materiálu:*
 - Bisp M. R. et al. vyvinuli HPLC metodu pro detekci a kvantifikaci vitamínu B6 (pyridoxal, pyridoxal-5-fosfát, pyridoxamin-5-fosfát, pyridoxin, pyridoxamin a degradační produkt kyselina 4-pyridoxinová). Separace byla prováděna za použití analytické kolony C18 (ODS) a iontově-párové chromatografie. Pro analýzu byla použita gradientová eluce acetonitrilem

(0,5 - 15 %) ve fosforečnanovém pufru s kyselinou 1-octansulfonovou a triethylaminem, pH 2,16. Koncentrace vitamínu byla stanovena fluorescenční detekcí (328 nm excitační záření, 393 nm emisní záření) po předchozí postkolonové derivatizaci pomocí fosfátového pufru obsahujícího 1 g/l hydrogensířičitanu sodného.[19].

- Midttun Ø et al. stanovovali pomocí HPLC/MS z plazmy současně vitamín B6 a B2. Proteiny z plazmy byly precipitovány smícháním 60 µl plazmy se stejným množstvím kyseliny trichloroctové ve vodě (50 g/l) obsahující vnitřní standardy pyridoxal-5-fosfát, pyridoxal a riboflavin (100 nmol/l). Roztok byl míchán 30 s na robotu, poté nechán 60 min na ledu a nakonec centrifugován při 6000 g po dobu 12 min. Supernatant (65 µl) byl převeden do nové vialky, která byla umístěna do autosampleru chlazeného na 4 °C. Vzorke byly chráněny před světlem. Jako kolona pro HPLC byla použita s reverzní fází C8 (150 mm × 4,6 mm I.D. s velikostí částic 5 µm). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 ml/min. Byla použita gradientová eluce se složením mobilní fáze ze 3 komponent: roztok A (650 mmol/l kyselina octová), roztok B (100 mmol/l kyselina heptafluorobutanová - HFBA v roztoku A) a roztok C (900 ml/l acetonitrilu ve vodě). Časové rozložení gradientové eluce bylo následovné: 0-0,2 min (97,5% A a 2,5% B), 6 min (28% A, 2,5% B, a 69,5% C), 6,1-6,6 min (2,5% B a 97,5% C), 6,7-8 min (97,5% A a 2,5% B) [20].

2.4.3 Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH)

- Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) je kondenzační produkt isoniazidu a pyridoxalu. Při akutní intoxikaci isoniazidem a následné aplikaci antidota pyridoxinu by mohl být PIH jedním z možných v literatuře dosud nepopsaných metabolitů isoniazidu.
- *Sumární vzorec PIH:* $C_{14}H_{14}N_4O_3$



Obrázek 2.8: Strukturální vzorec pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu

- *Molární hmotnost PIH: $M_R = 286,3$*
- *Studie zabývající se stanovením PIH:*
 - Autoři Kovaříková P. et al. se zabývali stanovením PIH a jiných chelátorů železa pomocí HPLC. Účelem studie bylo vyvinout metodu vhodnou pro hodnocení čistoty a stability PIH. Byla použita kolona se stacionární fází C18 (250 mm × 4 mm I.D.) Mobilní fáze se skládala z fosfátového pufru (0,01M NaH₂PO₄, 5 mM sodné soli 1-heptansulfonové kyseliny, 2 mM EDTA, pH 3,0) a methanolu (55:45, v/v). Průtok byl 0,8 ml/min. Chromatogram byl detekován pomocí UV při 254 nm a 297 nm [21].
 - Další studie se zaměřila na stabilitu 3 aromatických hydrazonů v různých biologických materiálech. Autoři Kovaříková P. et al. popsali metodu extrakce PIH z plazmy a následné stanovení pomocí HPLC. 200 µl plazmy bylo smícháno s 0,3 ml směsi methanol/acetonitril (1:1), poté třepáno na vortexu 2 minuty a centrifugováno při 1000 g 4 minuty. 0,4 ml supernatantu bylo smícháno s 0,2 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) a následně analyzováno na koloně C18, 250 mm × 4,6 mm I.D., s rozměrem částic 5 µm, chráněné předkolonkou. Jako mobilní fáze byl využit fosfátový pufr a směs methanolu a acetonitrilu (1:1 v/v) v poměru 50:50. UV detektor byl nastaven na absorpci při vlnových délkách 254 a 297 nm [22].

Kapitola 3

Cíl práce

1. Vypracovat vhodné chromatografické podmínky umožňující separaci 7 analytů (isoniazidu, acetylisoniazidu, pyridoxalu, pyridoxolu, pyridoxal-5-fosfátu, PIH a vnitřního standardu *o*-108).
2. Studovat možnosti využití precipitace a SPE jako metod úpravy vzorku pro extrakci všech uvedených léčiv z plazmy.

Kapitola 4

Experimentální část

4.1 Použitý chromatografický materiál, přístroje, pomůcky a chemikálie

Chromatografický materiál:

Chromatografická kolona: LiChroCART 250 × 4 mm I.D., s náplní Lichrospher 100 RP-18 (5 μm), Merck, Německo

Přístroje:

- Analytické váhy Helago, Česká republika
- Acidimetr, Eutech Instruments pH 510, Nizozemí
- Centrifuga, Trigon Plus, Česká republika
- Ultrazvuková koupel K10, Kraintek Slovenská Republika
- Vákuové zařízení SUPELCO VISIPREP, Německo
- Chromatografická sestava Shimadzu LC 20 prominence, Japonsko
- PC s chromatografickým programem - LC Solution 1.22 SP1, Japonsko

Pomůcky:

- Laboratorní sklo
- Pipety
- Mikropipeta
- Kolonky na SPE extrakci - Supelco, Německo
 1. Discovery DSC-18
 2. Discovery DSC-Ph (s fenylovou skupinou)
 3. Discovery DPA-6S (s polymerním absorbentem)
- Mikrostříkačka - 25 μ l, Hamilton, Švýcarsko

Chemikálie:

- Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH), syntetizovaný na katedře anorganické a organické chemie FAF UK, Hradec Králové, totožnost ověřena NMR
- Isoniazid, Sigma-Aldrich, Německo
- Acetylisoniazid, syntetizovaný na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv FAF UK, Hradec Králové, totožnost ověřena NMR
- Pyridoxal hydrochlorid, Sigma-Aldrich, Německo
- Pyridoxol hydrochlorid, Sigma-Aldrich, Německo
- Pyridoxal-5-fosfát monohydrát, Sigma-Aldrich, Německo
- Pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (*o*-108), syntetizovaný na katedře anorganické a organické chemie FAF UK, Hradec Králové, totožnost ověřena NMR

- Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové p.a. (EDTA), Lachema Brno, Česká Republika
- Dihydrogenfosforečnan sodný p.a., Penta, Česká republika
- Kyselina hexansulfonová (sodná sůl) monohydrate, Fluka, Švýcarsko
- Methanol, Merck, Německo
- Acetonitril, Merck, Německo
- Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Německo
- Čištěná voda
- Fosfátový pufr (phosphate buffered saline - PBS), Sigma-Aldrich, Německo
- Biologický materiál - prázdná králičí plazma, Zooservis Dvůr Králové nad Labem

4.2 Vývoj chromatografických podmínek PIH

Nejprve bylo potřeba najít chromatografické podmínky, které umožňují dosáhnout dostatečné separace poměrně značného množství analytů (PIH, isoniazid, acetylisoniazid, pyridoxal-5-fosfát, pyridoxal, pyridoxol a vnitřní standard *o*-108). Cílem bylo najít vhodnou stacionární fázi, mobilní fázi a průtokovou rychlost. Bylo potřeba zvolit dvě vlnové délky, při kterých by mohlo být detekováno všech sedm analytů.

4.2.1 Příprava zásobních roztoků

Pro vývoj chromatografických podmínek byly používány zásobní roztoky jednotlivých analytů o koncentraci 1 mg/ml. Pyridoxal-5-fosfát byl používán o koncentraci 2 mg/ml.

Isoniazid a acetylisoniazid byly rozpuštěny v methanolu, PIH v dimethylsulfoxidu a pyridoxal-5-fosfát, pyridoxal a pyridoxol ve vodě.

Všechny vzorky byly naváženy jednotlivě do odměrných baněk a doplněny příslušným rozpouštědlem. Pyridoxal-5-fosfát byl uchováván v tmavé odměrné baňce, protože je nestabilní na světle.

4.2.2 Příprava standardních roztoků

Standardní roztoky byly připraveny příslušným naředěním zásobních roztoků tak, aby výsledný roztok měl stejnou koncentraci a složení jako extrahovaný vzorek. Standardní roztoky byly používány pro výpočet výtěžnosti SPE extrakce a precipitace.

4.2.3 Výběr stacionární a mobilní fáze a detekce

Jako stacionární fáze byla použita kolona LiChroCART 250 × 4 mm, s náplní Lichrospher 100 RP-18 (5 μm).

Na této koloně byly zkoušeny různé gradientové eluce pro dostatečné oddělení látek a pufrů s různou koncentrací kyseliny hexansulfonové:

- Složka A - fosfátový pufr (NaH_2PO_4 0,01 mol/l, s přídatkem EDTA 0,001 mol/l a kyseliny hexansulfonové 0,005 mol/l; pH 3,0 - upravené 30 % H_3PO_4) a složka B - methanol, průtok 1 ml/min gradientová eluce:
 - 0 - 16 min. 15 - 55% B, 16 - 17 min. 55 - 15% B, 17 - 25 15% B (v/v)
 - 0 - 10,50 min. 15 - 40% B, 10,50 - 17 min. 40 - 65% B, 17 - 20 min. 65% B, 20 - 22 min. 65 - 15% B, 22 - 30 min. 15% B (v/v)
 - 0 - 10,50 min. 15 - 40% B, 10,50 - 13 min. 40 - 65% B, 13 - 20 min. 65% B, 20 - 22 min. 65 - 15% B, 22 - 30 min. 15% B (v/v)
 - 0 - 10,50 min. 15 - 40% B, 10,50 - 17 min. 40 - 85% B, 17 - 20 min. 85% B, 20 - 22 min. 85 - 15% B, 22 - 30 min. 15% B (v/v)

- 0 - 10,50 min. 15 - 40% B, 10,50 - 17 min. 40 - 75% B, 17 - 20 min. 75% B, 20 - 22 min. 75 - 15% B, 22 - 30 min. 15% B (*v/v*)
- 0 - 16 min. 15 - 55% B, 16 - 19 min. 55% B, 19 - 22 min. 15 - 55% B, 20 - 27 min. 15% B (*v/v*)
- 0 - 18 min. 15 - 55% B, 18 - 21 min. 55% B, 21 - 22 min. 55 - 15% B, 22 - 29 min. 15% B (*v/v*)
- Složka A - fosfátový pufr (NaH_2PO_4 0,01 mol/l, s přidavek EDTA 0,001 mol/l a kyseliny hexansulfonové 0,0025 mol/l; pH 3,0 - upravené 30 % H_3PO_4) a složka B - methanol, průtok 1 ml/min, gradientová eluce:
 - 0 - 16 min. 15 - 55% B, 16 - 17 min. 55 - 15% B, 17 - 25 min. 15% B (*v/v*)
 - 0 - 16 min. 15 - 55% B, 16 - 30 min. 55% B (*v/v*)

Stanovení pomocí UV detekce při 260 a 297 nm.

4.3 Vývoj metod izolace analytů z plazmy

Pro extrakci léčiv z plazmy byly vyzkoušeny SPE extrakce a precipitace.

4.3.1 SPE extrakce

Při vývoji metody extrakce bylo vyzkoušeno několik různých typů SPE kolonek.

- Nejprve byly vyzkoušeny kolonky DSC-18. Do králičí plazmy o objemu 0,2 ml bylo přidáno 10 μl zásobního roztoku. Kolonka byla aktivována 1 ml methanolu a následně promyta 1 ml fosfátového pufru (pH 7). Dále byl na kolonku aplikován vlastní vzorek v plazmě. Balast byl vymyt fosfátovým pufrem o objemu 0,5 ml. Nakonec byla kolonka promytá methanolem o objemu 0,5 ml. Celý eluát byl převeden do vialky a k němu bylo přidáno 0,5 ml vody. Na kolonu bylo nastříkováno 50 μl analytu.

- Dále byly použity kolonky DSC-Ph. Do 0,2 ml plazmy bylo přidáno 10 μ l zásobního roztoku. Kolonka byla aktivována 1 ml methanolu a následně promyta 1 ml fosfátového pufru (pH 7). Následně byl na kolonku aplikován vlastní vzorek. Nečistoty byly vymyté fosfátovým pufrem o objemu 0,5 ml a analyt se z kolonky vymyl pomocí 0,5 ml methanolu. Eluát o objemu 0,5 ml byl převeden do vialky, do které bylo následně přidáno 0,5 ml vody. Na kolonu bylo nastříknuto 50 μ l.
- Kolonky s DPA-6S byly aktivovány 1 ml methanolu a promyty 1 ml fosfátového pufru (pH 7). Následně bylo na kolonku nanášeno 0,2 ml plazmy, do které bylo přidáno 10 μ l zásobního roztoku. Nečistoty byly vymyty 0,5 ml fosfátového pufru. Analyt byl eluován 0,5 ml methanolu. 0,5 ml eluátu bylo převedeno do vialky a přidáno 0,5 ml vodné složky mobilní fáze. Na kolonu bylo nastříknuto 50 μ l.

4.3.2 Precipitace

- Nejprve byl použit k precipitaci proteinů z plazmy 0,5 ml acetonitrilu, který byl přidán do 0,2 ml plazmy s přídatkem 10 μ l zásobního roztoku. Sraženina byla 2 minuty třepána a 5 minut centrifugována. Do vialky bylo odebráno 0,4 ml supernatantu, ke kterému bylo přidáno 0,4 ml vody. Na kolonu bylo nastříknuto 20 μ l.
- 0,5 ml methanolu bylo použito k precipitaci 0,2 ml plazmy, do které bylo aplikováno 10 μ l zásobního roztoku. K plazmě bylo přidáno 0,5 ml methanolu a sraženina byla třepána po dobu 5 minut a poté stočena po dobu 5 minut. Do vialky bylo převedeno 0,5 ml supernatantu a bylo přidáno 0,2 ml vodné složky mobilní fáze. Na kolonu bylo nastříknuto 20 μ l.
- Dále byla tato izolace upravena přidáním 5 μ l kyseliny chloristé jako prvního precipitačního činidla před přidáním 0,5 ml methanolu. Vzorek byl třepán

a stáčen po dobu 5 minut. Do vialky bylo odebráno 0,4 ml supernatantu a k němu bylo přidáno 0,2 ml vodné složky mobilní fáze. Na kolonu bylo nastříknuto 20 μ l.

- Další postup využil zakoncentrování vzorku odfoukáním supernatantu dusíkem do sucha. 10 μ l zásobního roztoku bylo aplikováno do 0,2 ml plazmy. Bylo přidáno 5 μ l HClO_4 a methanol (0,5 nebo 0,8 ml). Analyt byl 5 minut třepán a 5 minut centrifugován. Bylo odebráno 0,5 ml supernatantu, který byl odfoukán do sucha a poté rozpuštěn v 200 μ l směsi methanol : vodná složka mobilní fáze (2 : 8). Na kolonu bylo nastříknuto 20 μ l.
- K 0,2 ml plazmy s 10 μ l zásobního roztoku bylo přidáno 0,8 ml methanolu. Analyt byl třepán a centrifugován po dobu 5 minut. Supernatant byl odfoukán do sucha a rozpuštěn v 0,2 ml směsi methanol : vodná složka mobilní fáze (2 : 8) a následně převeden do inzertu. Na kolonu bylo nastříknuto 20 μ l.
- Posledním precipitační směsí byla zvolena směs methanolu a koncentrované kyseliny chloristé (jen pro pyridoxal-5-fosfát a pyridoxal). 10 μ l zásobního roztoku bylo přidáno do 0,2 ml plazmy. 0,8 ml směsi methanol (4 ml) a kyseliny chloristé (12,5 μ l nebo 50 μ l) bylo přidáno k plazmě. Vzorek byl třepán a centrifugován po dobu 5 min. Supernatant byl odfoukán do sucha a posléze rozpuštěn v 200 μ l směsi methanol : vodná složka mobilní fáze (2 : 8). Analyt byl převeden do inzertu. Na kolonu bylo nastříknuto 20 μ l.

4.3.3 Výpočet výtěžnosti

Výtěžnost byla vypočtena v procentech porovnáním ploch píku analytu po extrakci a plochy píku patřičně naředěného standardního vzorku.

Kapitola 5

Výsledky a diskuse

5.1 Vývoj chromatografických podmínek

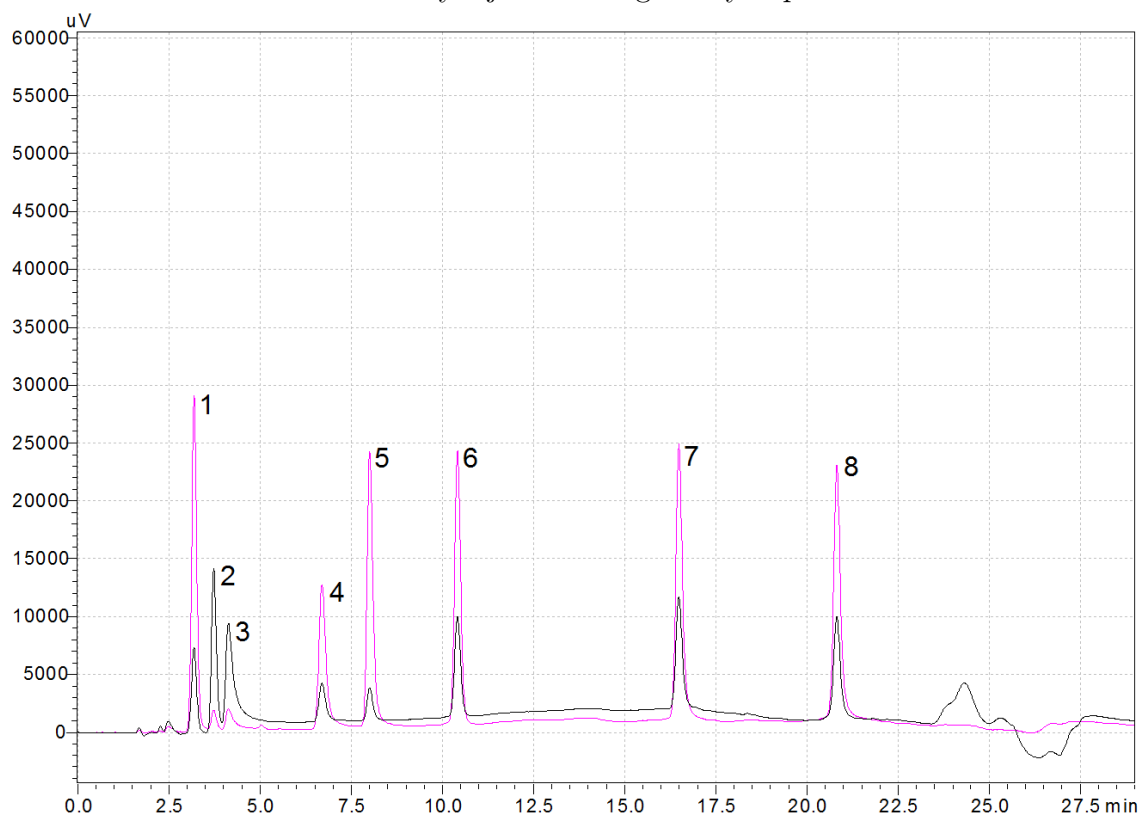
Při vývoji chromatografických podmínek se stala základem metoda vyvinutá školicím. Tato metoda však neumožňovala dosáhnout separace všech 7 analyzovaných léčiv, proto byl optimalizovaný gradientový profil. Hlavním problémem se ukázalo dosažení separace isoniazidu a acetylisoniazidu. Byly zkoušeny různé gradientové eluce pro ideální rozdělení těchto dvou léčiv. Výsledná metoda se tím prodloužila o několik minut. Jako nejvhodnější se ukázala následující gradientová eluce: Složka A - pufr (NaH_2PO_4 0,01 mol/l, s přísávkem EDTA 0,001 mol/l a kyseliny hexansulfonové 0,005 mol/l; pH 3,0 - upravené 30% H_3PO_4), složka B - methanol:

0 - 18 min. 15 - 55% B, 18 - 21 min. 55% B, 21 - 22 min. 55 - 15% B, 22 - 29 min. 15% B (*v/v*)

Jako vnitřní standard byl použit pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (*o*-108), který je strukturně podobný PIH. Detekce byla měřena při dvou vlnových délkách: 260 nm (vhodné pro detekci isoniazidu a acetylisoniazidu) a 297 nm (pro detekci pyridoxalu, pyridoxolu, pyridoxal-5-fosfátu, PIH a vnitřního standardu). Na chromatogramu znázorňujícím separaci směsi všech uvedených analytů byl detekován další neznámý

pík, který pravděpodobně patří kondenzačnímu produktu pyridoxal-5-fosfátu a isoniazidu. Výsledná separace léčiv je uvedena na Obrázku 5.1.

Obrázek 5.1: Vývoj chromatografických podmínek



Legenda:

- 1 - pyridoxal-5-fosfát (3 min.)
- 2 - acetylisoniazid (3,5 min.)
- 3 - isoniazid (4 min.)
- 4 - pyridoxal (6 min.)
- 5 - pyridoxol (8 min.)
- 6 - pravděpodobně PIH-5-fosfát (vzniklý kondenzací isoniazidu a pyridoxal-5-fosfátu)
- 7 - PIH (17 min.)
- 8 - vnitřní standard *o*-108 (21 min.)

Růžově je znázorněna detekce při 297 nm a černě detekce při 260 nm.

5.2 Výsledky metod izolace analytů z plazmy

Jako extrakční metody byly vyzkoušeny SPE extrakce a precipitace

5.2.1 Výsledky SPE

Při izolaci analytů pomocí SPE extrakce bylo vždy 10 μ l zásobního roztoku aplikováno do 0,2 ml plazmy. Bylo využito několika kolon. Výsledky SPC extrakce jsou uvedeny v Tabulce 5.1.

Analyt	Výtěžnost izolace analytů z plazmy v %	
	DSC-18	DCS-Ph
Isoniazid	61,93	26,52
Acetylisoniazid	26,77	18,22
Pyridoxal	10,25	7,59
Pyridoxal-5-fosfát	3,49	2,39

Tabulka 5.1: Výsledky - SPE

Extrakční výtěžnosti PIH, vnitřního standardu a pyridoxolu na kolonkách DSC-18 i DSC-Ph byly zjištěny již dříve, a tak byla v této části práce pozornost zaměřena pouze na zbývající analyty. V případě SPE na kolonce DSC-6S nebyly píky analytů vůbec detekovány zřejmě proto, že byly vymyty spolu s balasty. Jak je patrné z výsledků v Tabulce 5.1, ani jedna ze zkoušených kolonek nebyla vhodná k izolaci uvedených analytů. Výtěžnost izolace analytů na koloně DSC-18 a na koloně DSC-Ph nepřesahovaly 30%, jen výtěžnost izolace isoniazidu na koloně C18 se pohybovala kolem 60%. Nejmenší výtěžnost na kolonách DSC-18 a DSC-Ph měl pyridoxal-5-fosfát, jehož pík byl stěží detekovatelný. Ze všech sedmi analytů jde o nejpolárnější látku, která nebyla na koloně dostatečně zadržována, došlo pravděpodobně k jejímu vymytí pufrem společně s nečistotami. Ani při použití kolony DSC-Ph nedošlo ke zvýšení účinnosti extrakce.

5.2.2 Výsledky precipitace

Jako další extrakční metoda byla zvolena precipitace. Bylo vyzkoušeno několik precipitačních činidel o různých objemech. Při některých precipitacích bylo využito odfoukání supernatantu proudem dusíku do sucha. Výsledky precipitace jsou uvedeny v Tabulkách č. 5.2, 5.3, 5.4.

Analyt	Výtěžnost izolace analytů z plazmy v %	
	Prec. 0,5 ml ACN	Prec. 0,5 ml MeOH
Isoniazid	55,22	73,51
Acetylisoniazid	86,51	83,84
Pyridoxal	21,66	29,90
Pyridoxol	70,13	68,44
Pyridoxal-5-fosfát	8,08	9,08

Tabulka 5.2: Výsledky precipitace acetonitrilem a methanolem

Nejprve byly vyzkoušeny jednoduché precipitace pomocí acetonitrilu a methanolu (opět nebyla analyzována všechna léčiva), viz Tabulka 5.2. Výtěžnost isoniazidu, acetylisoniazid a pyridoxolu byla přes 50%. U precipitace acetonitrilem nebyl píků pyridoxal-5-fosfátu symetrického tvaru. U precipitace methanolem se tvar jeho píků zlepšil, avšak výtěžnost pyridoxalu-5-fosfátu v obou případech nebyla vyšší než 10%. Výtěžnost pyridoxalu nepřesáhla 30%. Kromě pyridoxalu a pyridoxal-5-fosfátu byly výtěžnosti ostatních analytů v akceptovatelných rozmezích, tj. > 70%. Bylo potřeba upravit precipitaci tak, aby i pyridoxal a pyridoxal-5-fosfát měly vyšší výtěžnost. Výtěžnost PIH a o-108 pomocí precipitace byly již dříve stanoveny, proto jim v této části práce nebyla věnována pozornost.

Vzhledem k výsledkům jednoduché precipitace s použitím organických rozpouštědel, kdy byly největším problémem výtěžnosti pyridoxalu a pyridoxal-5-fosfátu, byla v další části práce věnována pozornost zvýšení výtěžnosti extrakce těchto dvou

Výtěžnost izolace analytů z plazmy v %			
Analyt	Precipitace s 5 μ l kys. chloristé		
	+ 0,5 MeOH	+ 0,5 MeOH (odf.)	+ 0,8 MeOH (odf.)
Isoniazid	85,07	34,39	54,72
Acetylisoniazid	53,55	58,41	79,83
Pyridoxal	98,32	32,42	41,24
Pyridoxol	73,03	57,92	93,71
Pyridoxal-5-fosfát	95,59	26,36	74,69
PIH	65,71	55,28	93,30
<i>o</i> -108	103,33	55,87	81,37

Tabulka 5.3: Výsledky precipitace s použitím koncentrované kyseliny chloristé jako prvního precipitačního činidla

látek. Původní postup byl modifikován přidáním 5 μ l kyseliny chloristé jako prvního precipitačního činidla s následným přidavkem methanolu jako činidla druhého (Tabulka 5.3). Protože výtěžnosti precipitace kyselinou pro PIH a *o*-108 nebyly dosud stanoveny, byla stanovena výtěžnost také těchto dvou analytů. Použití kyseliny chloristé jako prvního precipitačního činidla se ukázalo jako vhodná metoda pro stanovení pyridoxalu i pyridoxal-5-fosfátu. Tato metoda se však neukázala být vhodná pro stanovení isoniazidu a acetylisoniazid. Jejich píky koeluovaly. Tento problém byl vyřešen tím, že supernatant byl odfoukán do sucha a následně rozpuštěn ve vodné složce mobilní fáze. Využití odfoukání supernatantu dusíkem do sucha mělo za následek snížení výtěžností některých analytů.

Přidání kyseliny chloristé jako prvního precipitačního činidla, zvýšilo výtěžnosti pyridoxalu a pyridoxal-5-fosfátu, avšak snížilo výtěžnosti ostatních látek. Proto byly v poslední části práce všechny látky kromě pyridoxalu a pyridoxal-5-fosfátu extrahovány čistým methanolem s následným odfoukáním do sucha. Pyridoxal a pyridoxal-5-fosfát byly precipitovány stejným objemem methanolu, který byl okyse-

Výtěžnost izolace analytů z plazmy v %			
Analyt (vše v plazmě)	0,8 MeOH	Precipitace s	
		0,8 ml směsi: + 50 µl HClO ₄	4 ml MeOH + 12,5 µl HClO ₄
Isoniazid	94,17		
Acetylisoniazid	99,52		
Pyridoxal		20,83	95,95
Pyridoxol	97,08		
Pyridoxal-5-fosfát		66,03	35,67
PIH	78,54		
<i>o</i> -108	88,06		

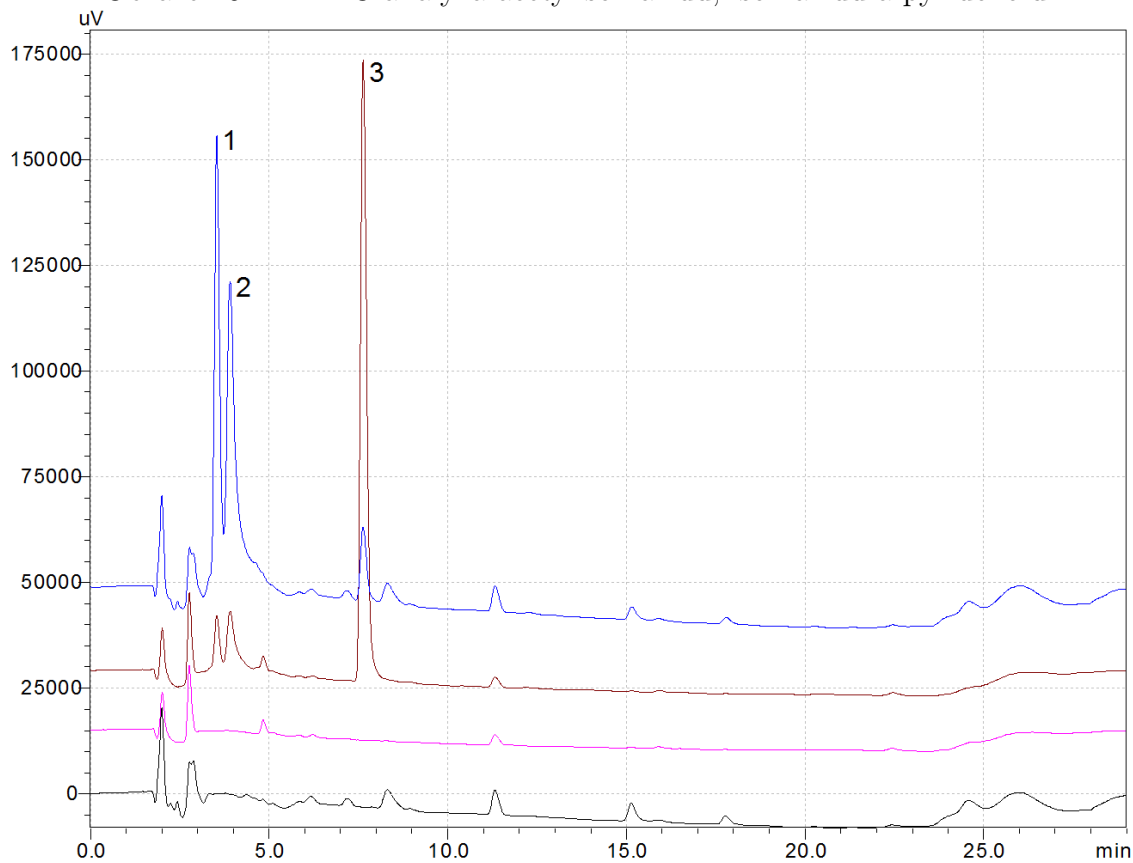
Tabulka 5.4: Výsledky precipitace s použitím 0,8 ml methanolu s odfoukáním dusíkem do sucha

len různými koncentracemi kyseliny chloristé (Tabulka 5.4). Výtěžnosti isoniazidu, acetylisoniazidu, pyridoxalu, PIH a *o*-108 byly vyšší než 80%. Pyridoxal dosáhl vyšší výtěžnosti při nižší koncentraci kyseliny chloristé v methanolu, pyridoxal-5-fosfát zase při vyšší koncentraci kyseliny chloristé v methanolu.

Z výsledků této pilotní studie je tedy zřejmé, že extrakční postup bude muset být dále modifikován tak, aby bylo možné jednou metodou dosáhnout akceptovatelných výtěžností pro všechny uvedené analyty. Pozornost musí být také věnována tvaru píků (především dříve eluovaných léčiv), které jsou výrazně zhoršovány použitím rozpouštědla o vyšší eluční síle než je mobilní fáze. Tento problém by mohl být vyřešen buď již zmiňovaným odfoukáním vzorku a jeho následným rozpuštěním ve vodné složce mobilní fáze, nebo jeho větším naředěním. Chromatogramy analýzy vzorků po precipitaci společně s příslušnými blanky zachycují Obrázky 5.2 - 5.5. Analýza vzorků plazmy obsahující isoniazid, acetylisoniazid a pyridoxol (Obrázek 5.2), PIH a vnitřní standard (Obrázek 5.3) za využití precipitace methanolem. Chro-

matogramy na Obrázcích 5.4 a 5.5 demonstrují vliv přidavku různého množství kyseliny chloristé na výtěžnost extrakce pyridoxal-5-fosfátu a pyridoxalu.

Obrázek 5.2: HPLC analýza acetylisoniazidu, isoniazidu a pyridoxolu

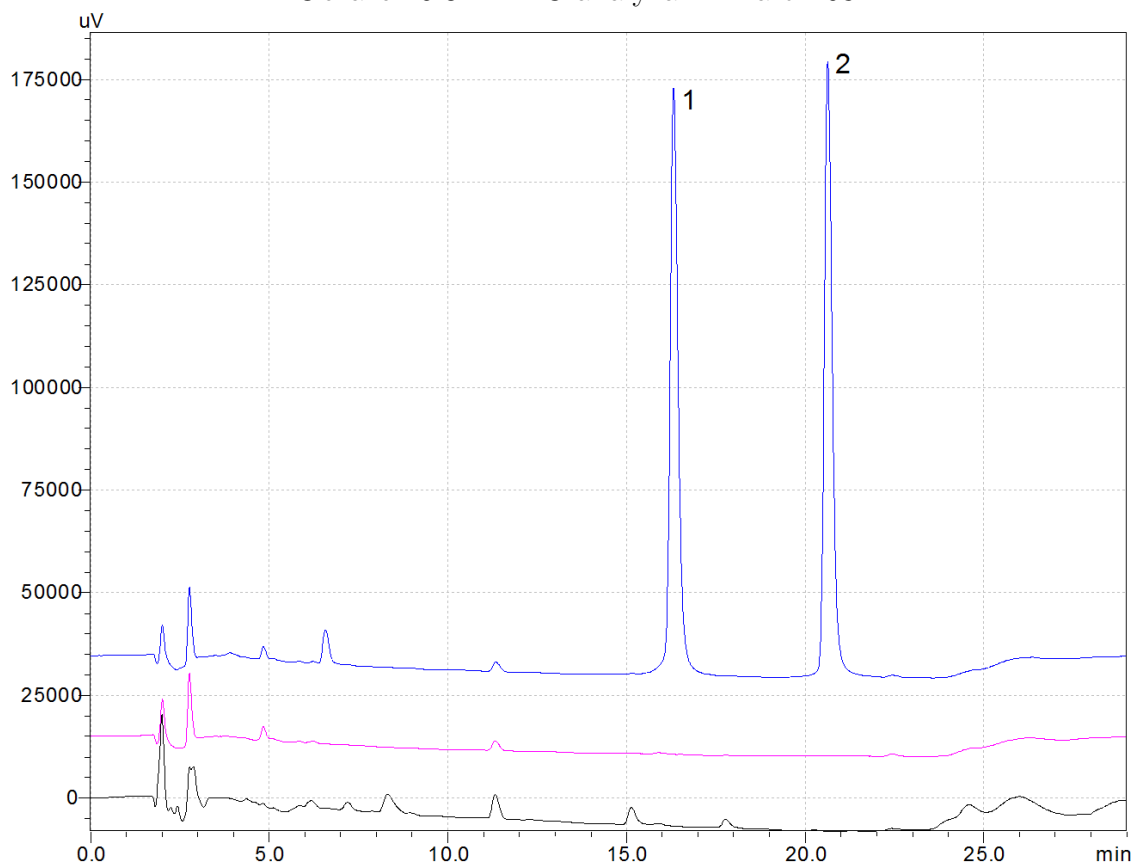


Legenda:

- 1 - acetylisoniazid
- 2 - isoniazid
- 3 - pyridoxol

Černý (detekce 260 nm) a růžový (detekce 297 nm) chromatogram znázorňují analýzu čisté plazmy bez vzorků. Modrý (detekce 260 nm) a hnědý (detekce 297 nm) chromatogram znázorňují analýzu acetylisoniazidu, isoniazidu a pyridoxolu po předchozí precipitaci 0,8 ml methanolu s odふうáním dusíkem do sucha.

Obrázek 5.3: HPLC analýza PIH a *o*-108



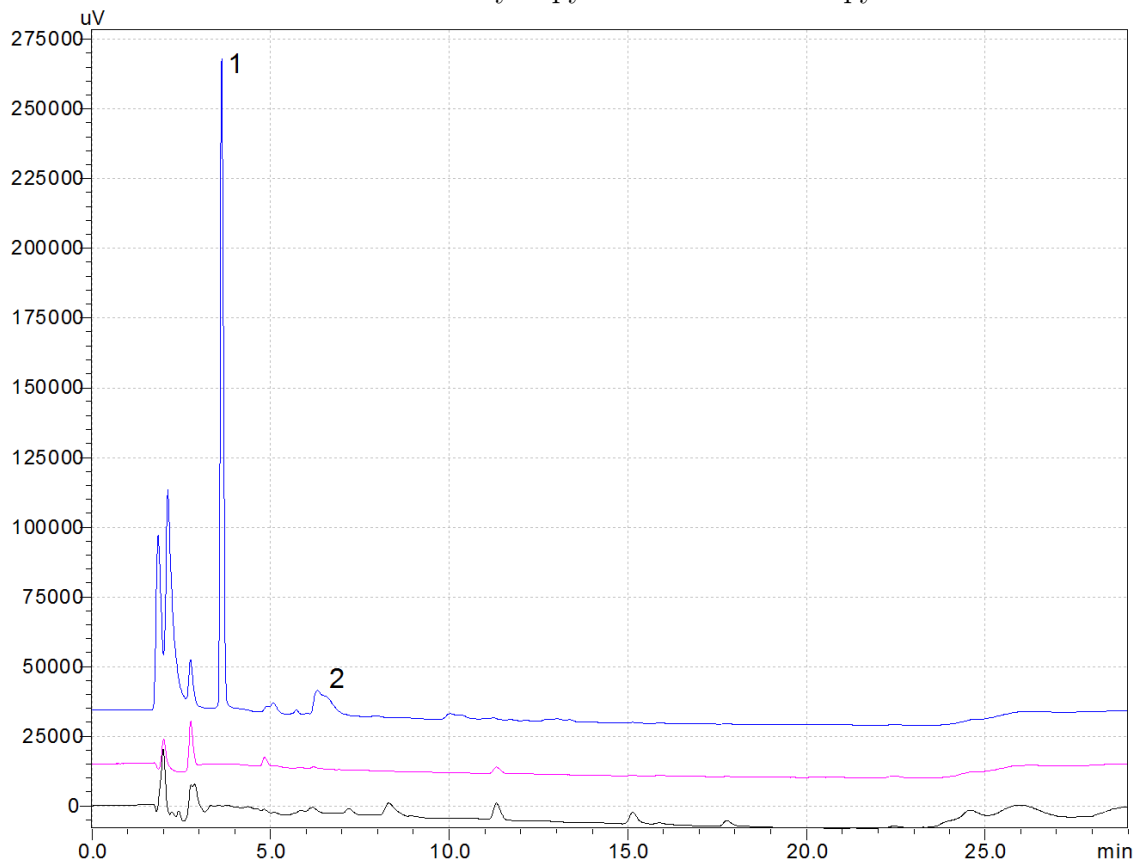
Legenda:

1 - PIH

2 - *o*-108

Černý (detekce 260 nm) a růžový (detekce 297 nm) chromatogram znázorňují analýzu čisté plazmy bez vzorků. Modrý (detekce 297 nm) chromatogram znázorňuje analýzu PIH a vnitřního standardu *o*-108 po předchozí precipitaci 0,8 ml methanolu s odfoukáním dusíkem do sucha.

Obrázek 5.4: HPLC analýza pyridoxal-5-fosfátu a pyridoxalu



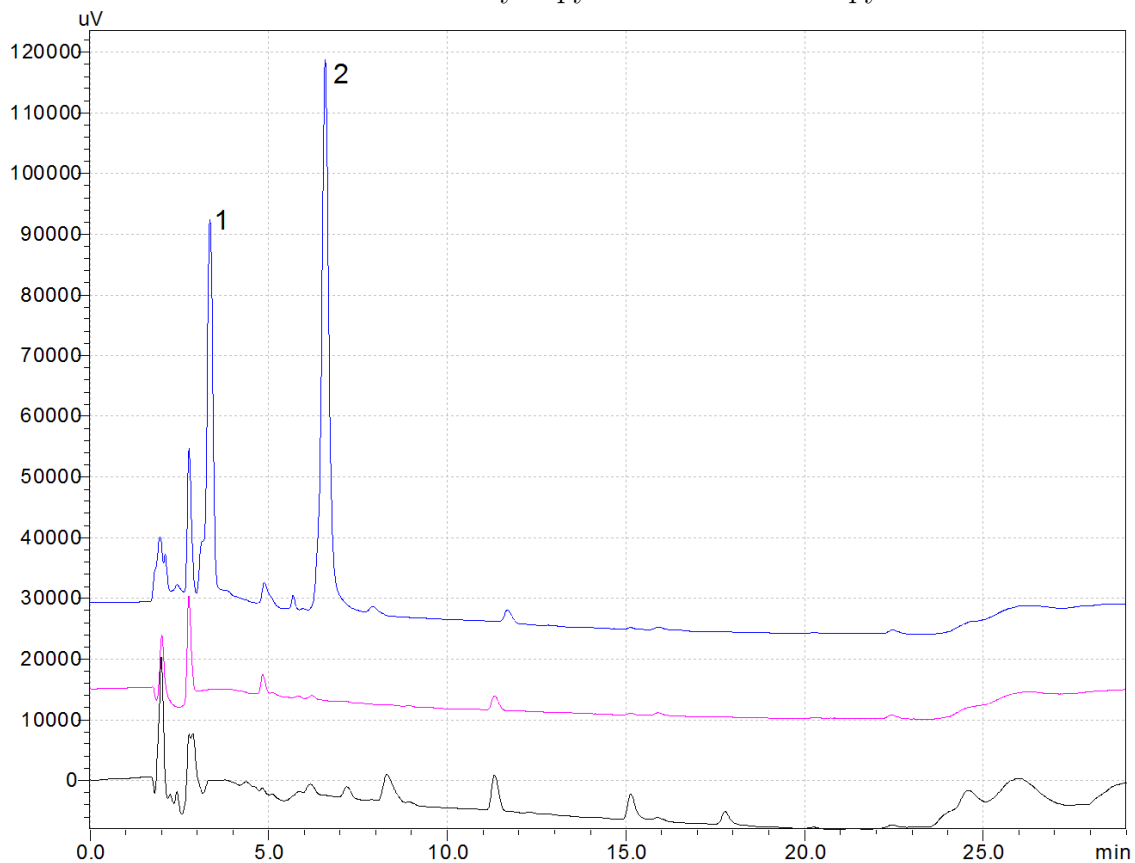
Legenda:

1 - pyridoxal-5-fosfát

2 - pyridoxal

Černý (detekce 260 nm) a růžový (detekce 297 nm) chromatogram znázorňují analýzu čisté plazmy bez vzorků. Modrý (detekce 297 nm) chromatogram znázorňuje analýzu pyridoxal-5-fosfátu a pyridoxalu po předchozí precipitaci 0,8 ml směsi methanolu a kyseliny chloristé (4 ml + 50 μ l) s odfoukáním dusíkem do sucha.

Obrázek 5.5: HPLC analýza pyridoxal-5-fosfátu a pyridoxalu



Legenda:

1 - pyridoxal-5-fosfát

2 - pyridoxal

Černý (detekce 260 nm) a růžový (detekce 297 nm) chromatogram znázorňují analýzu čisté plazmy bez vzorků. Modrý (detekce 297 nm) chromatogram znázorňuje analýzu pyridoxal-5-fosfátu a pyridoxalu po předchozí precipitaci 0,8 ml směsi methanolu a kyseliny chloristé (4 ml + 12,5 μ l) s odfoukáním dusíkem do sucha.

Kapitola 6

Závěr

Cílem diplomové práce bylo vypracovat vhodné chromatografické podmínky umožňující separaci sedmi analytů (isoniazid, acetylisoniazid, pyridoxal, pyridoxol, pyridoxal-5-fosfát, PIH a *o*-108) a následně nalézt vhodnou metodu pro izolaci všech uvedených látek z králičí plazmy.

Pro separaci uvedených léčiv byla použita kolona LiChroCART 250 × 4 nm I.D., s náplní Lichrospher 100 RP-18 (5 μm).

Jako mobilní fáze byla použita směs pufru - složka A (NaH₂PO₄ 0,01 mol/l, s přídavkem EDTA 0,001 mol/l a kyseliny hexansulfonové 0,005 mol/l; pH 3,0 - upravené 30% H₃PO₄) a methanolu - složka B. Jako nejvhodnější se ukázalo použití této gradientové eluce: 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 1,0 ml/min, UV detekce 260 a 297 nm, jako vnitřní standard byl použit *o*-108.

Jako metody úpravy vzorku byly testovány metody SPE a precipitace. V rámci této pilotní studie se sice nepodařilo nalézt vhodnou metodu úpravy vzorku, která by umožnila současně extrahovat všechny analyty z plazmy s akceptovatelnou výtežností, avšak bylo získáno mnoho cenných informací pro další optimalizaci metody. Metoda SPE extrakce s využitím DSC-C18 nebo DSC-Ph kolonek se ukázala být zcela nevhodná pro analýzu extrakce uvedených léčiv, protože neumožnila dosáhnout

dostatečných výtěžností především hydrofilních analytů. Precipitace se jeví jako vhodnější metoda úpravy vzorku.

Jako vhodné precipitační činidlo pro pyridoxal a pyridoxal-5-fosfát se ukázala směs methanolu s různým množstvím kyseliny chloristé. Pro extrakci ostatních analytů se jeví jako vhodné extrakční činidlo čistý methanol. Po precipitaci je potřeba supernatant odfoukat a rozpustit v mobilní fázi.

Výtěžnosti analytů výše popsanými extrakcemi jsou: isoniazid 94,17%, acetylisoniazid 99,52%, pyridoxal 95,95%, pyridoxol 97,07%, pyridoxal-5-fosfát 66,03%, PIH 78,53% a *o*-108 88,06%. Metodu je potřebné dále modifikovat tak, aby došlo k ideální izolaci všech léčiv pomocí jednoho precipitačního postupu. Jako další postup by mohla být použita precipitace acetonitrilem s přidavkem malého množství silné kyseliny jako prvního precipitačního činidla. 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.

Abstrakt

Vysokoúčinná 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 (NaH₂PO₄ 0,01 mol/l, s přidavkem EDTA 0,001 mol/l a kyseliny hexansulfonové 0,005 mol/l; pH 3,0 - upravené 30% H₃PO₄) 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

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.

Abstract

High-performance liquid chromatography is one of the most frequently used separation methods for an analysis of drugs in biological material. It is suitable both for quantitative and qualitative drug analysis.

Isoniazid is used for the treatment and a prevention of tuberculosis. Acute isoniazid intoxication is manifested by tonic-clonic convulsions. Vitamine B6 (pyridoxine) is used in clinical practice as an antidotum. Although this type of toxicity is considered to be associated with the deficiency of vitamine B6 (or its active form, pyridoxal-5-phosphate - PLP), description of mechanisms and processes, which are responsible for this effect, is still missing.

The aim of this study was to develop suitable chromatographic conditions for monitoring intoxication by isoniazid and detection of potential hydrazone metabolites. These conditions should allow a separation of seven analytes (isoniazid, acetylisoniazid, pyridoxal, pyridoxol, pyridoxal-5-phosphate, and the *o*-108 - internal standard). Furthermore, the aim was to study possibilities of isolating all those substances from rabbit plasma.

The best chromatographic separation was achieved using the HPLC column LiChroCART 250 × 4 nm I.D., packed with Lichrospher 100 RP-18 (5 μm). The mobile phase was composed of a buffer - component A (NaH₂PO₄ 0.01 mol/l, with the addition of 0.001 mol/l EDTA and 0.005 mol/l 1-hexansulfonic acid, pH 3.0 - modified with 30% H₃PO₄) and methanol - component B, using a gradient: 0 - 18 min. 15 - 55% B, 18 - 21 min. 55% B, 21 - 22 min. 55 - 15% B, 22 - 29 min.

15% B (v/v). The flow rate was 1 ml/min, the detection was performed at 260 and 294 nm. The SPE method and the precipitation procedure were tested as sample pretreatment techniques. In this case the precipitation procedure appears to be more convenient. Precipitation using methanol was proved to be suitable isolation of isoniazid, acetylisoniazid, pyridoxol, PIH and o-108. The precipitation employing addition of perchloric acid prior to methanol proved the best results for pyridoxal and pyridoxal-5-phosphate. The outcomes of this work will be used for further optimization of extraction methods. This work represents a pilot study aimed at the development of HPLC analysis for monitoring of isoniazid intoxication and detection of new hydrazone metabolites, which have not been described yet.

Literatura

- [1] Karlíček R. a kolektiv: *Analytická chemie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha 2005.
- [2] Klimeš J. a kolektiv: *Kontrola léčiv I*, Karolinum, Praha 2002.
- [3] Klouda P.: *Moderní analytické metody*, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- [4] Mikeš O. a kolektiv: *Laboratorní chromatografické metody*, SNTL, Praha 1980.
- [5] Churáček J., Jandera P.: *Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*, Nakladatelství technické literatury, Praha 1986.
- [6] Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L.: *Practical HPLC Method Development*, A Wiley-Interscience Publication, USA 1997.
- [7] Churáček J. a kolektiv: *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*, Academia, Praha 1993.
- [8] <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>, 2. 4. 2009.
- [9] <http://www.lcresources.com/resources/getstart/index.htm>, 2. 4. 2009.
- [10] Churáček J. a kolektiv: *Analytická separace látek*, Nakladatelství technické literatury, Praha 1990.
- [11] Babjuk J., Perlík F., Šídlo Z.: *Bioanalytika léků*, Avicenum - zdravotnické nakladatelství, Praha 1990.

- [12] Klíma J., Grafnetterová J.: *Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii*, AVICENUM, Praha 1987.
- [13] Hanika J.: *Speciální separační procesy*, Ediční a audiovizuální centrum VŠCHT, Praha 1995.
- [14] Thurman E. M., Mills M. S.: *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*, Wiley-Interscience Publication, USA 1998.
- [15] Hansen E. B., Dooley K. L., Thompson H. C.: *High-performance liquid chromatographic analysis of the antituberculosis drugs aconiazide and isoniazid*, J. Chromatogr. B. 670 (1995), 259–266.
- [16] Ng K., Zhou H., Zhang Y. L., Hybertson B., Randolph T., Christians U.: *Quantification of isoniazid and acetylisoniazid in rat plasma and alveolar macrophages by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with on-line extraction*, J. Chromatogr. B. 847 (2007), 188–198.
- [17] Smith P. J., Dyk J. van, Fredericks A.: *Determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by high performance liquid chromatography after their simultaneous extraction from plasma*, Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 3 (1999), 325–328.
- [18] Ellard G. A., Gammon P.T., Wallace S.M.: *The determination of isoniazid and its metabolites, acetylisoniazid, monoacetylhydrazine, diacetylhydrazine, isonicotinic acid and isonicotinylglycine in serum and urine*, Biochem. J. 126 (1972), 449–458.
- [19] Bisp M. R., Bor M. V., Heinsvig E., Kall M. A., Nexø E.: *Determination of Vitamin B6 Vitamers and Pyridoxic Acid in Plasma: Development and Evaluation of a High-Performance Liquid Chromatographic Assay*, Anal. Biochem. 305 (2002), 82–89.
- [20] Midttun Ø., Hustad S., Solheim E., Schneede J., Ueland P. M.: *Multianalyte Quantification of Vitamin B6 and B2 Species in the Nanomolar Range in Human*

Plasma by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry, Clin. Chem. 51 (2005), 1206–1216.

[21] Kovaříková P., Mokrý M., Klimeš J., Vávrová K.: *Chromatographic methods for the separation of biocompatible iron chelators from their synthetic precursors and iron chelates*, J. Sep. Sci. 27 (2004) 1503–1510.

[22] Kovaříková P., Mrkvičková Z., Klimeš J.: *Investigation of the stability of aromatic hydrazones in plasma and related biological material*, J. Pharm. Biomed. Anal. 47 (2008), 360–370.