

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

**Analytické hodnotenie liečiv a potenciálnych liečiv zo
skupiny látok chelatujúcich železo**

DIZERTAČNÁ PRÁCA

(súbor publikovaných vedeckých prác doplnený komentárom)

Hradec Králové, 2012

Mgr. Ján Stariat

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované.

Mgr. Ján Stariat

POĎAKOVANIE

Moja najväčšia vďaka patrí školiteľke-špecialistke PharmDr. Petre Kovaříkovej, Ph.D. za vynikajúce odborné vedenie a ohromnú dávku trpezlivosti počas môjho doktorského štúdia. Zároveň som vďačný svojmu školiteľovi Prof. RNDr. Jiřimu Klimešovi, CSc. za cenné rady a organizáciu môjho štúdia.

Taktiež si veľmi cením pomoc a spoluprácu všetkých spoluautorov vedeckých publikácií vypracovaných počas môjho štúdia.

Zároveň by som chcel poďakovať všetkým vedeckým pracovníkom z University of Sydney podieľajúcich sa na výskume a vývoji protinádorových liečiv, no najmä Prof. Desovi R. Richardsonovi a Dr. Danute S. Kalinowski.

Moja vďaka patrí aj Doc. Raimovi Ketolovi, Ph.D. z University of Helsinki za cenné skúsenosti získané počas môjho študijného pobytu v rámci programu Erasmus.

Taktiež by som sa chcel poďakovať všetkým pracovníkom a študentom z Katedry farmaceutickej chemie a kontroly liečiv za vytvorenie skvelej atmosféry pri práci aj mimo nej.

Na záver by som chcel poďakovať svojej rodine za obrovskú trpezlivosť a podporu.

Táto dizertačná práca vznikla za finančnej podpory Výskumného projektu MSM 0021620822, Grantovej agentúry Univerzity Karlovej (projekt FAF/B-CH/85510), Grantovej agentúry Ministerstva Zdravotníctva Českej republiky (projekt NT 12403-3/2011), Grantovej agentúry Českej republiky (projekt P/206/10/P439) a Univerzity Karlovej v Prahe (projekt SVV-265 001)

OBSAH

1. Úvod	7
2. Cieľ práce	11
3. Teoretická časť	13
3.1. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia	14
3.1.1. Historický vývoj a význam vo farmaceutickej analýze	14
3.1.2. Základné súčasti HPLC chromatografu	15
3.1.3. Základné charakteristiky separačného procesu	16
3.1.4. Kvalitatívna a kvantitatívna analýza	18
3.2. Vývoj HPLC metódy	19
3.2.1. Kolóny a stacionárne fázy	19
3.2.2. Separačné módy	21
3.2.3. Izokratická a gradientová separácia	23
3.2.4. Detekčné techniky	23
3.2.5. Úprava biologického vzorku	31
3.2.6. Validácia bioanalytickej metódy	34
3.3. Ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia	36
3.4. Biokompatibilné chelátory železa	38
3.4.1. Železo v ľudskom organizme	38
3.4.2. Chelátory železa	39
3.5. Dexrazoxan	46
3.6. Metabolizmus	50
3.6.1. Fáze metabolizmu	51
3.6.2. Štúdium metabolizmu liečiv	53
4. Experimentálna časť (Komentár k publikovaným prácam)	56
4.1. Využitie analytických metód pri vývoji nových potenciálnych liečiv odvodených od thiosemikarbazonu	57
4.2. Štúdium potenciálu HILIC pri analytickom hodnotení dexrazoxanu a jeho polárnych metabolitov	64
5. Záver	66
6. Abstrakt	69
7. Abstract	72
8. Použitá literatúra	75
9. Prílohy	83
9.1. Práca 1: HPLC methods for determination of two novel thiosemicarbazone anti-cancer drugs (N4mT and Dp44mT) in plasma and their application to <i>in vitro</i> plasma stability of these agents	85

9.2. Práca 2: Development of an LC-MS/MS method for analysis of interconvertible Z/E isomers of the novel anticancer agent, Bp4eT	93
9.3. Práca 3: LC-MS/MS identification of the principal <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> phase I metabolites of the novel thiosemicarbazone anti-cancer drug, Bp4eT	105
9.4. Práca 4: Identification of <i>in vitro</i> metabolites of the novel anti-tumor thiosemicarbazone, DpC, using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry	119
9.5. Práca 5: Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of a moderately lipophilic drug from its highly polar metabolites-The cardioprotectant dexrazoxane as a model case.....	149

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ADR-925	metabolit dexrazoxanu
APCI	chemická ionizácia za atmosférického tlaku
API	ionizačné techniky pracujúce za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizácia za atmosférického tlaku
Bp4eT	2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazon
DAD	detektor s diodovým poľom
DFO	deferoxamin
DpC	di(2-pyridyl)keton-4-methyl-4-cyklohexyl-3-thiosemikarbazon
Dp44mT	di(2-pyridyl)keton-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon
ESI	ionizácia elektrosprejom
HILIC	chromatografia založená na hydrofilných interakciách
IS	vnútorný štandard
LLE	extrakcia kvapalina-kvapalina
MF	mobilná fáza
MS	hmotnostná spektrometria
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
N4mT	2-hydroxy-1-naftylaldehyd-4-methyl-3-thiosemikarbazon
PEG 300	polyethylenglykol 300
PIH	pyridoxal-isonikotinoylhydrazon
PKIH	di(2-pyridyl)keton-isonikotinoylhydrazon
ROS	reaktívne formy kyslíku
RR	ribonukleotid reduktáza
SIH	salicylaldehyd-isonikotinoylhydrazon
SPE	extrakcia na pevnej fáze
UHPLC	ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
QTOF	hydridný analyzátor tvorený kvadrupólom a analyzátorom doby letu

1. ÚVOD

Neustále napredujúci proces výskumu a vývoja nových liečiv, ako aj snaha o zlepšenie bezpečnosti a účinnosti farmakoterapie kladú stále väčší dôraz na využitie moderných analytických techník pre hodnotenie liečiv. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) má v analýze liečiv dominantné postavenie, pretože patrí medzi robustné techniky, umožňujúce dosiahnutie účinnej separácie väčšiny analytov prítomných vo vzorku, a zároveň ich kvalitatívne aj kvantitatívne hodnotenie. Pokroky vo vývoji stacionárnych fáz a detekčných techník umožňujú výrazne skrátiť čas analýzy, a zároveň získať celé spektrum informácií o povahe analytov prítomných v komplexných vzorkách aj vo veľmi nízkych koncentráciách.

Navzdory výraznému pokroku v možnostiach liečby sú nádorové ochorenia stále evidované Svetovou zdravotníckou organizáciou medzi desiatimi najčastejšími príčinami úmrtia. Predpokladaný nárast v incidencii iba ďalej zväčšuje potrebu vývoja nových a účinných cytostatik. Najnovšie výskumy poukazujú na sľubný potenciál prístupu založeného na selektívnom vychytávaní železa, ktorý by mohol výraznou mierou prispieť k zlepšeniu prognózy u pacientov s nádorovými ochoreniami rezistentnými voči štandardnej chemoterapii. Tento mechanizmus antiproliferatívneho pôsobenia je aktívne rozvíjaný u novej skupiny potenciálnych liečiv štruktúrne odvodených od thiosemikarbazonu. Ich vývoj sa postupne dostáva do fázy zameranej na štúdium ich osudu v organizme. Preto je ďalší pokrok v tejto oblasti výraznou mierou závislý na dostupnosti vhodných analytických metód pre hodnotenie týchto potenciálnych liečiv v biologickom materiáli.

Princíp chelatacie železa je taktiež spomínaný aj v prípade mechanizmu kardioprotektívneho účinku dexrazoxanu – jediného klinicky dostupného liečiva, schopného chrániť myokard pred toxickým pôsobením antracyklinových cytostatik. Predpokladá sa, že jeho účinok je sprostredkovaný chelatačnou aktivitou jedného z metabolitov, no táto hypotéza nebola doposiaľ jednoznačne potvrdená. Nedávne štúdie navyše poukázali na možnosť zapojenia odlišných princípov. Detailné štúdium mechanizmu účinku je do istej miery brzdené nedostatkom v bioanalytickom hodnotení tohto liečiva a jeho metabolitov v mieste jeho pôsobenia – v srdečnom tkanive.

Náplňou teoretickej časti tejto dizertačnej práce je predstavenie metodiky využitej v experimentálnej časti. Pozornosť je venovaná historickému vývoju a postaveniu HPLC vo farmaceutickej analýze, definícii základných charakteristík

separačného procesu, hlavným aspektom vývoja metódy od výberu vhodnej kombinácie stacionárnej a mobilnej fázy, detekčnej techniky, cez úpravu biologického vzorku a konečnej validácie bioanalytickej metódy. Následne sú v stručnosti uvedené aspekty vývoja HPLC smerom k modernému UHPLC.

Teoretická časť ďalej pokračuje v predstavení významu a toxicity železa v ľudskom organizme, na čo následne nadväzuje podrobná charakteristika biokompatibilných chelátorov železa odvodených od thiosemikarbazonu, ktoré boli v rámci dizertačnej práce analyzované. Pozornosť je venovaná objasneniu mechanizmu ich účinku a popisu jeho systematického vývoja. Nakoniec je diskutovaná problematika analytického hodnotenia dexrazoxanu a jeho polárnych metabolitov.

Experimentálnu časť tvorí komentár k piatim pôvodným vedeckým prácam. Štyri práce boli publikované v časopisoch s impakt faktorom, zatiaľ čo jedna je v súčasnosti v recenznom konaní. Prvý celok experimentálnej časti sa venuje analytickému hodnoteniu chelátorov železa odvodených od thiosemikarbazonu. Tato práca priamo nadväzovala na vývoj nových protinádorových liečiv, ktorý prebieha pod vedením prof. Richardsona na Univerzite v Sydney. V úvodnej fáze boli vyvinuté a validované HPLC-UV metódy pre hodnotenie *in vitro* stability u dvoch nových potenciálnych liečiv (2-hydroxy-1-naftylaldehyd-4-methyl-3-thiosemikarbazonu - N4mT a di(2-pyridyl)keton-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazonu - Dp44mT) v plazme, ktorá bola zároveň porovnaná so stabilitou pyridoxalisonikotinoylhydrazonu - materskej látky ich aroylhydrazonových predchodcov. Následne bola vyvinutá a validovaná HPLC-MS/MS metóda schopná kvantifikácie *E/Z* izomérov 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazonu (Bp4eT). Metóda bola aplikovaná do štúdia rozpustnosti Bp4eT vo vodných médiách a použitá pre návrh vhodnej farmaceutickej formulácie pre intravenózne podanie tejto látky. Formulácia bola vzápätí využitá v ďalšej štúdiu, v ktorej sme u Bp4eT pomocou HPLC-MS/MS metódy navrhli štruktúry metabolitov 1. fáze, ktoré boli detegované *in vitro* aj *in vivo*. Posledná práca prvého celku je venovaná novo pripravenému thiosemikarbazonovému analógu, di(2-pyridyl)keton-4-methyl-4-cyklohexyl-3-thiosemikarbazonu (DpC), u ktorého bol detailne hodnotený *in vitro* metabolizmus 1. a 2. fáze pomocou UPLC-QTOF metódy.

Druhý celok sa venuje štúdiu možnosti separácie a popisu mechanizmu retencie dexrazoxanu a jeho metabolitov v HILIC móde za podmienok kompatibilných s hmotnostnou detekciou.

2. CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto dizertačnej práce bolo vyvinúť analytické techniky, ktoré by boli využité pri vývoji nových potenciálnych liečiv, prípadne dopomohli k objasneniu mechanizmu účinku u liečiva klinicky užívaného. Prvý tematicky celok je zameraný na analytické hodnotenie chelátorov železa odvodených od thiosemikarbazonu, druhý celok sa venuje analytickému hodnoteniu klinicky užívaného dexrazoxanu a jeho metabolitov.

Cieľom prvého tematického celku experimentálnej práce bolo:

1. Vyvinúť a validovať HPLC-UV metódy pre hodnotenie *in vitro* stability u dvoch nových potenciálnych liečiv (2-hydroxy-1-naftylaldehyd-4-methyl-3-thiosemikarbazonu - N4mT a di(2-pyridyl)keton-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazonu - Dp44mT) v plazme a porovnať ju so stabilitou u aroylhydrazonových predchodcov.

2. Vyvinúť a validovať HPLC-MS/MS metódu schopnú kvantifikácie *E/Z* izomérov 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazonu (Bp4eT), aplikovať ju do štúdie jeho rozpustnosti vo vodných rozpúšťadlách a súčasne navrhnúť vhodnú formuláciu pre intravenózne podanie tejto látky.

3. S využitím HPLC-MS/MS navrhnúť štruktúry hlavných metabolitov 1. fáze vznikajúcich *in vitro* aj *in vivo* u Bp4eT.

4. Štruktúrne charakterizovať hlavné *in vitro* metabolity 1. a 2. fáze u di(2-pyridyl)keton-4-methyl-4-cyklohexyl-3-thiosemikarbazonu (DpC) pomocou UPLC-QTOF.

Cieľom druhého tematického celku experimentálnej práce bolo:

1. Študovať možnosti využitia HILIC módu a popísať mechanizmus retencie pri analýze dexrazoxanu a jeho polárnych metabolitov za podmienok kompatibilných s MS detekciou.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

3.1.1. Historický vývoj a význam vo farmaceutickej analýze

Chromatografia je fyzikálno-chemická metóda využívaná za účelom rozdelenia komplexnej zmesi látok. Princíp separácie spočíva v rôznej interakcii analytov rozpustených v pohyblivej (mobilnej) fáze s povrchom nepohyblivej (stacionárnej) fáze.

Z hľadiska charakteru mobilnej fáze a spôsobu jej pohybu sa chromatografia primárne rozdeľuje na 5 skupín (Tabuľka 1) (1).

	Mobilná fáza (MF)	Transport MF	Stacionárna fáza
plynová	plyn	tlak	pevná látka, kvapalina
kvapalinová	kvapalina	tlak	pevná látka
superkritická	superkritická kvapalina	tlak	pevná látka
tenkovrstevná	kvapalina	kapilárne sily	pevná látka
kapilárna elektrochromatografia	kvapalina	elektroosmotický tok	pevná látka

Tabuľka 1: Základné rozdelenie chromatografie

Aj keď boli techniky blízke chromatografii využívané už dávno v histórii, ich princíp bol prvýkrát detailne študovaný a publikovaný v roku 1903 rusko-talianskym botanikom Tswetom, ktorý ako prvý pozoroval vznik farebných zón po separácii rastlinných pigmentov (2). Po úvodnej fáze nedôvery k novej technike boli chromatografické metódy postupne vyvíjané, čo nakoniec vyústilo v 60-tych rokoch minulého storočia k predstaveniu konceptu vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC) Prof. C. Horváthom. Ten ako prvý prišiel s nápadom stacionárnej fázy skladajúcej sa

z malých poréznych sklenených guľičiek, ktorá vykazovala vyššiu separačnú účinnosť. Takáto náplň však viedla k podstatnému zvýšeniu odporu pre pohyb mobilnej fázy v podobe kvapaliny, čo zároveň vyžadovalo použitie prístroja schopného poskytovať konštantný tok za vysokého tlaku (1).

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia patrí medzi základné analytické nástroje v oblasti farmaceutickej analýzy. Jej využitie začína už vo fáze výskumu a vývoja nových liečiv, pretože dostupnosť analytických dát má významný vplyv na efektívnosť tohto procesu, a to už od identifikácie nového potenciálneho liečiva, cez optimalizáciu jeho štruktúrnych vlastností, až po hodnotenie stability a jeho osudu v organizme. Taktiež sa využívajú pri vývoji vhodnej liekovej formy a následne k zaisteniu a kontrole kvality substancií a liečivých prípravkov. Ich využitie pokračuje aj vo fáze klinického užívania liečivého prípravku pri terapeutickom monitorovaní liečiv (3, 4).

3.1.2. Základné súčasti HPLC chromatografu

Zásobníky mobilnej fázy – umožňujú pojať dostatočné množstvo mobilnej fázy za účelom kontinuálnej prevádzky. MF je najčastejšie tvorená dvomi zložkami, ktoré sa líšia v elučnej sile, čiže schopnosti vymývania analytu (1, 5).

Odplyňovač mobilnej fázy (degasser) – umožňuje odstrániť zvyšky plynov v mobilnej fáze, čím sa zníži vplyv objemovej kontrakcie pri vysokom tlaku, a tak zvýši reprodukovateľnosť analýz (1).

Pumpy – zaisťujú konštantný a nepretržitý tok mobilnej fázy s minimom pulzácií (6).

Injektor – jeho úlohou je nástrek analyzovanej vzorky do mobilnej fázy pred jej vstupom do kolóny. Je súčasťou automatického dávkovača, čo je zariadenie schopné uchovávanía a manipulácie veľkého množstva vzoriek (1).

Kolóna – oceľová, prípadne plastová trubica obsahujúca stacionárnu fázu. Analytické kolóny majú väčšinou priemer 3-4,6 mm a dĺžku 30-250 mm, pričom trendom je ich postupné zužovanie a skracovanie (6). Pre niektoré typy analýz sú tiež využívané kolóny kapilárne. Kolóna patrí medzi najdôležitejšiu súčasť každého HPLC systému, pretože umožňuje dosiahnutie separácie analytov. V súčasnosti je

komerčne dostupných niekoľko tisíc druhov HPLC kolón líšiacich sa jednak rozmermi, ale hlavne typom stacionárnej fázy (1).

Detektor – zariadenie využívané pre kontinuálne snímanie fyzikálnych príp. chemických vlastností mobilnej fázy po jej výstupe z kolóny, a tým k detekcii analytov, ktoré sú v nej rozpustené. (1).

Kontrolný systém – jedná sa spravidla o počítač vybavený príslušným chromatografickým softvérom. Slúži na ovládanie jednotlivých súčastí HPLC systému podľa požiadaviek operátora, a zároveň sa využíva pre zber, uchovávanie a spracovanie dát (1).

3.1.3. Základné charakteristiky separačného procesu

Retenčný čas (t_R) – jedná sa o vzdialenosť maxima píku od doby nástreku vzorku na kolónu vyjadrenú v čase. Retenčný čas je jednou zo základných kvalitatívnych charakteristík analytu. Neberie však do úvahy objem mobilnej fázy v kolóne a systéme, a tým časové oneskorenie od nástreku až po samotnú detekciu – tzv. **mŕtvy retenčný čas (t_0)**, čo je vlastne retenčný čas na kolóne nezadržiavaného analytu. Z tohto hľadiska nachádza výhodnejšie uplatnenie **redukovaný retenčný čas (t'_R)**, pre ktorý platí vzťah:

$$t'_R = t_R - t_0 \quad [1]$$

Redukovaný retenčný čas tak priamo charakterizuje dobu, počas ktorej sa analyt nachádza v interakcii so stacionárnou fázou (1, 2).

Retenčný faktor (k) – niekedy sa označuje tiež ako **kapacitný faktor**, vypočítava sa podľa vzorca:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0} \quad [2]$$

Retenčný faktor popisuje retenčné chovanie analytu nezávisle na prietoku mobilnej fázy a rozmeru kolóny, čím umožňuje jeho objektívne posúdenie (1).

Účinnosť – analyt sa po nástreku na kolónu pohybuje v zóne, ktorá sa počas chromatografického procesu postupne rozširuje, pričom účinnosť definuje stupeň jej rozšírenia. Jedna z metód hodnotenia účinnosti kolóny predpokladá, že sa v kolóne

vyskytujú hypotetické oddelené vrstvy s definovanou výškou, nazývané teoretické priehradky. V nich sa analyt vyskytuje v limitovanom časovom úseku v rovnováhe medzi stacionárnou a mobilnou fázou. Počet **teoretických priehradiek (N)** sa vypočítava podľa vzorca:

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad [3]$$

w_h = šírka píku v polovici jeho výšky vyjadrená časom.

V prípade porovnania účinnosti kolón s rozdielnou dĺžkou je vhodné využiť parameter **výškový ekvivalent teoretickej priehradky (H)**.

$$H = \frac{L}{N} \quad [4]$$

L = dĺžka kolóny (m).

Nižšia výška teoretickej priehradky, prípadne vyšší počet teoretických priehradiek v kolóne znamená vyššiu účinnosť (1).

Selektivita (α) – vyjadruje schopnosť chromatografického systému rozlíšiť dva rozdielne analyty. Vyjadruje sa z pomeru retenčných faktorov dvoch analytov (k_1, k_2) (1):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad [5]$$

Rozlíšenie (R) – popisuje separáciu dvoch píkov, avšak oproti selektivite je táto charakteristika objektívnejšia, pretože berie do úvahy aj účinnosť vyjadrenú pomocou šírky píku. Vypočítava sa zo vzťahu:

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_2 + w_1} \quad [6]$$

t_{R1}, t_{R2} = retenčné časy píkov,

w_1, w_2 = šírky píkov pri základnej línii vyjadrené časom.

Pre dosiahnutie separácie dvoch píkov na základnú líniu je zvyčajne dostačujúca hodnota rozlíšenie 1,5 (1, 7).

3.1.4. Kvalitatívna a kvantitatívna analýza

Základnou kvalitatívnou charakteristikou analyzovanej látky je jej retenčný čas. Zhoda retenčného času analytu a štandardu pri analýze v jednom chromatografickom systéme však nie je považovaná za dostatočný dôkaz totožnosti ich chemických štruktúr. Preto sú v súčasnosti s výhodou využívané detektory, ktoré umožňujú porovnať aj špecifické vlastnosti eluovaných látok (napr. absorpčné a hmotnostné spektrum), a tým priniesť ďalšie informácie o charaktere analytu a potvrdiť tak jeho totožnosť (5).

V prípade kvantitatívneho hodnotenia je najdôležitejším parametrom plocha, eventuálne výška píku. Pre kvantitatívne stanovenie sa využívajú tieto metódy:

1. Metóda vonkajšieho štandardu – plocha píku stanovovanej látky v skúšanom vzorku sa porovná s plochou píku rovnakej látky v porovnávacom vzorku (8).

2. Metóda vnútorného štandardu – do skúšaného a porovnávacieho vzorku sa pridá vnútorný štandard (internal standard, IS), ktorým je spravidla štruktúrne podobná látka eluovaná blízko hodnoteného analytu. Následne sa vyhodnocuje pomer plôch píku analytu a vnútorného štandardu v skúšanom vzorku s analogickým pomerom získaným analýzou porovnávacieho vzorku (8). V prípade použitia hmotnostného detektoru je preferovaným IS izotopicky značený štandard stanovovanej látky (izotopolog), ktorý má identickú retenciu ako hodnotený analyt, avšak posun v hodnote m/z (9).

3. Metóda normalizácie – obsah skúmanej látky je vyjadrený ako percentuálny podiel z plochy všetkých píkov, pričom za zanedbajú píky rozpúšťadiel a ostané píky pod limitom zanedbateľnosti (8).

4. Kalibračný postup – stanoví sa vzťah medzi odozvou signálu a koncentráciou stanovovanej látky. Následne sa vypočíta kalibračná funkcia, ktorá sa využije pre výpočet koncentrácie neznámeho vzorku (8).

3.2. Vývoj HPLC metódy

HPLC metódy môžu byť využité v celej škále aplikácií, preto je dôležité definovať jej parametre a ciele hneď v úvodnej fáze ich vývoja. Pri analýze známej látky môže byť metóda selektívne optimalizovaná na rýchlosť analýzy, spotrebu rozpúšťadiel, citlivosť atď. Na druhej strane, v prípade potreby analýzy neznámych látok s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami (metabolické štúdie, štúdie rozkladných produktov atď.) je dôležitým predpokladom použitej metódy univerzálnosť. Dôležitým hľadiskom je dostupné množstvo a aj samotná povaha vzorku, ktorý môže mať charakter čistého štandardu ale aj formu multikomponentného vzorku alebo komplexnej biologickej matrice. **V úvodnej fáze vývoja HPLC metódy je preto vhodné vziať do úvahy všetky tieto aspekty a dôkladne zhodnotiť výber stacionárnej fáze, módu analýzy, detekčnej techniky i metódy úpravy vzorku (6).**

3.2.1. Kolóny a stacionárne fázy

Základnou úlohou stacionárnej fázy je zadržiavať analyt, preto je vhodné, aby tento proces prebiehal na čo najväčšom povrchu. Podľa charakteristiky sorbentu a rozmerov sa kolóny rozdeľujú na tri základne typy:

1. Náplňové – stacionárna fáza je tvorená malými, ideálne pravidelne guľatými časticami. V súčasnosti sa veľkosť častíc v HPLC pohybuje v rozmedzí 3 – 5 μm , pričom je tendencia využívať menšie častice, čím sa zvýši povrch sorbentu. Ďalšie výrazné zväčšenie povrchu, až do veľkosti 400 m^2/g , je docielené prítomnosťou pórov (1).

Novým trendom sú častice skladajúce sa z tuhého jadra obaleného tenkou vrstvou sorbentu. Menšia difúzna dráha v stacionárnej fáze umožňuje dosiahnuť vyššiu účinnosť a nižší spätný tlak (10).

2. Monolitické – stacionárna fáza je tvorená jedným kusom sorbentu, ktorý je pripravovaný priamo v kolóne a vyznačuje sa veľkou hustotou pórov (makropóry: $<8 \mu\text{m}$; mesopóry: 10 – 12 nm). Výhodou monolitických kolón je kratší čas analýzy v porovnaní s časticovými kolónami a vyššia účinnosť, no nežiaducim aspektom je vyššia spotreba rozpúšťadiel (1, 11, 12).

3. Kapilárne – sú tvorené tenkou kapilárou (vnútorný priemer zvyčajne do 100 μm), u ktorej môže byť stacionárnou fázou náplňový alebo monolitický sorbent, prípadne iba vnútorný povrch kapiláry. Ich využitie je oproti monolitickým a náplňovým kolónam minoritné (1, 13).

Vzhľadom na dosiahnutie opakovateľnej separácie pri častokrát extrémnych fyzikálnych a chemických podmienkach (vysoký tlak, rôzna hodnota pH), ktoré môžu viesť k poškodeniu štruktúry sorbentu, je kladený veľký dôraz na jeho odolnosť a pritom možnosť modifikácie povrchových funkčných skupín. Najrozšírenejším základným materiálom pre HPLC sorbenty je silikagel. Jeho fyzikálno-chemické vlastnosti boli detailne popísané, a tak je možné pripraviť sorbent s presne definovanými vlastnosťami (tvar častíc, veľkosť častíc a pórov, distribúcia veľkosti častíc a pórov, atď.), čo výraznou mierou prispieva k opakovateľnosti analýz. Povrch silikagelu je husto pokrytý silanolovými skupinami, ktoré je možné selektívne modifikovať. Prakticky je však možné doceliť obmenu max 50% silanových skupín, čo sa môže následne prejaviť pri separačnom procese vzhľadom na ich vysokú polaritu a prípadnú interakciu s bazickými analytmi. Ďalšou nevýhodou silikagelu je jeho hydrolýza pri vyššom pH (>8) a teplote ($>40^\circ\text{C}$), čo viedlo k príprave hybridných silikagelov. Jedným z nich je silikagel so zabudovanými organickými skupinami, ktorý je stabilnejší voči zmenám pH, a zároveň sa u neho prejavuje v menšej miere efekt voľných silanolových skupín (1, 14, 15).

Nežiaduce vlastnosti silikagelu viedli taktiež k vývoji alternatívnych materiálov pre HPLC sorbenty. Z dôvodu vyššej pH stability (pH 1-13) našli uplatnenie polymérne sorbenty. Ich nevýhodou je však nižšia chromatografická účinnosť spôsobená prítomnosťou mikropórov, náchylnosť k bobtnaniu polyméru vplyvom organickej zložky v mobilnej fáze a nižšia mechanická odolnosť. Ďalšími vysoko chemicky a teplotne odolnými materiálmi sú oxidy kovov (titán, zirkón, hliník). Vzhľadom k chemickému charakteru týchto materiálov je modifikácia povrchu v porovnaní so silikagelom zložitejšia (14, 15, 16).

3.2.2. Separačné módy

Chromatografia na normálnej fáze

Z historického hľadiska je to najstarší separačný systém, ktorý využíva polárnu stacionárnu a nepolárnu mobilnú fázu. Prvotným sorbentom bol silikagel, ktorý na svojom povrchu obsahuje voľné silanolové skupiny udeľujúce mu polárny charakter. Postupom času boli tieto skupiny modifikované naviazaním rôznych iných polárnych funkčných skupín, z ktorých sa v súčasnosti najviac využíva kyano, diol a amino skupina. Mobilnou fázou je najčastejšie nepolárne rozpúšťadlo (hexan, heptan atď.) s menším prídavkom polárneho rozpúšťadla (ethanol, isopropanol, tetrahydrofuran atď.), ktoré upravuje elučnú silu MF. Hlavným princípom separácie je adsorpcia analytu na povrch stacionárnej fáze. Tento chromatografický mód je vhodný hlavne pre separáciu polárnych analytov (1, 6).

Chromatografia na reverznej fáze

Jedná sa prakticky o opak systému založeného na normálnej fáze, tzn. stacionárna fáza má nepolárny charakter, zatiaľ čo MF je polárna. Polarita stacionárnej fáze je znížená modifikáciou základného sorbentu (silikagelu) rôznymi nepolárnymi funkčnými skupinami. Najčastejšie sú to alifatické nerozvetvené reťazce s rôznym počtom uhlíkov, od čoho sa odvodzuje aj samotný názov sorbentu (napr. C8, C18). Ako mobilná fáza sa používa vodný roztok menej polárneho organického rozpúšťadla (napr. acetonitril, methanol), ktoré má v tomto móde vyššiu elučnú schopnosť. Na rozdiel od normálnej fáze je retencia založená na rozdeľovaní a môže byť regulovaná nízkoenergetickými interakciami. Preto je separáciu možné upravovať tiež malými zmenami v zložení mobilnej fáze (napr. zmenou pufru, pH, teploty). Aj z tohto dôvodu patrí chromatografia na reverznej fáze medzi vôbec najrozšírenejší systém využívaný pre analýzu cca 90% nízkomolekulárnych látok (1, 6).

Superkritická chromatografia

V podstate to je chromatografia na normálnej fáze s tým rozdielom, že mobilnou fázou je superkritická kvapalina, ktorá vykazuje tokové vlastnosti plynu pri zachovaní solvatačných vlastností porovnateľných s kvapalinou. Najčastejšie sa

využíva oxid uhličitý s prídavkom polárneho modifikátoru, ktorým je možné kontrolovať elučnú schopnosť MF. Výhoda tak spočíva v nižšej viskozite a lepších difúzných vlastnostiach, čo sa prejavuje vo vyššej účinnosti separácie. (1, 6).

HILIC (Hydrophilic interaction liquid chromatography)

Jedná sa opäť o obmenu chromatografie na normálnej fáze a je vhodná predovšetkým pre analýzu polárnych látok a analytov iónového charakteru (1, 17). Ako sorbent je taktiež využívaný čistý silikagel, ktorý môže byť modifikovaný rôznymi polárnymi funkčnými skupinami (napr. amino, amido, hydroxy, kyano) prípadne zwitterionmi (napr. sulfoalkylbetainovou skupinou) (18). Rozdiel spočíva v zložení mobilnej fáze, ktorá sa najčastejšie skladá z 5-40% vodného roztoku pufru v acetonitrile. Funkciu silnejšieho elučného činidla v tomto prípade zastupuje voda (1, 17).

Mechanizmus retencie, prvýkrát prezentovaný Alpertom v roku 1990, bol založený na predpoklade vytvorenia tenkej vrstvy vody na povrchu polárnej stacionárnej fáze, do ktorej difundujú polárne analyty zo samotnej mobilnej fázy, čím sa využíva princíp rozdeľovania (18). Ďalšie štúdie navyše poukázali na možnosť zapojenia iónových a hydrofóbných interakcií medzi stacionárnou fázou a analytom v závislosti na jeho štruktúre a experimentálnych podmienkach (17, 19).

V porovnaní s chromatografiou na reverznej fáze je poradie elúcie analytov spravidla opačné. Vzhľadom na túto komplementaritu je často kombinovaná úprava vzorku pomocou SPE na reverzných fázach s HPLC analýzou v HILIC móde. Výhodou je tiež možnosť priamo nastrekovať eluát po extrakcii na SPE kolónkach bez rizika straty symetrie pík. Vysoký obsah organickej zložky je zároveň výhodný pre dosiahnutie vyššej citlivosti pri hmotnostnej detekcii (20). Medzi ďalšie pozitíva využitia HILIC patrí lepší tvar pík bazických analytov a možnosť analýzy pri vyššom prietoku mobilnej fázy vzhľadom na nižšiu viskozitu organického rozpúšťadla (19).

Ionexová chromatografia

Využíva sa hlavne pre analýzu iónov, prípadne ionizovateľných analytov. Separácia spočíva v interakcii nabitého analytu s opačne nabitou funkčnou skupinou naviazanou na stacionárnej fáze. Tá môže mať podľa veľkosti náboja charakter tzv. slabého, prípadne silného meniča iónov. Separácia je ovplyvňovaná veľkosťou

náboja na sorbente, prípadne modifikátorom prítomným v mobilnej fáze, ktorý môže kompetitívne interagovať s analytom. U slabých meničov sa k tomu navyše pripája možnosť úpravy pH MF (1, 6).

Chirálna chromatografia

Patrí medzi špeciálne typy HPLC uplatňujúce sa pri analýze opticky aktívnych liečiv. Chirálna separácia je dosiahnutá priamo chemickou modifikáciou stacionárnej fázy, prípadne prídavkom tzv. chirálneho selektoru (napr. Pirklové fázy, crown ethery, proteíny, polysacharidy, antibiotiká) do mobilnej fázy (1).

3.2.3. Izokratická a gradientová separácia

Dôležitým parametrom HPLC metódy je zloženie mobilnej fázy počas analýzy, preto môžeme z tohto pohľadu spôsoby separácie rozdeliť na dve základné skupiny:

1. Izokratická - zloženie mobilnej fázy je po celú dobu analýzy rovnaké. Vďaka konštantným podmienkam sú separácie obvykle reprodukovateľnejšie a retenčné chovanie analytov je viac predvídateľné. Nevýhodou môže byť dlhší čas analýzy u veľmi zadržovaných analytov, prípadne nižšia účinnosť (1).

2. Gradientová – zloženie mobilnej fázy sa počas analýzy mení, pričom jej elučná sila postupne stúpa. Výhoda gradientu spočíva v urýchlení vymytia silne zadržovaných analytov, zvýšení účinnosti a prípadne rozlíšenia. Gradientová elúcia však nemusí automaticky viesť ku skráteniu celkovej doby analýzy, pretože pred začiatkom analýzy je vždy potrebné ekvilibrovať zloženie mobilnej fázy na počiatočné podmienky. Ďalším limitujúcim faktorom môže byť znížená životnosť kolóny spôsobená častými zmenami v zložení mobilnej fázy (6).

3.2.4. Detekčné techniky

HPLC detektory je možné rozdeliť do dvoch základných kategórií:

- a) **selektívne** – reagujú na určitú fyzikálno-chemickú vlastnosť analytov
- b) **univerzálne** – reagujú na všetky analyty bez ohľadu na ich fyzikálno-chemické vlastnosti.

Ideálny detektor by mal disponovať nasledujúcimi parametrami:

- univerzálnosťou
- vysokou citlivosťou
- širokým lineárnym rozsahom, tzn. schopnosťou poskytovať lineárnu závislosť odozvy na koncentracii analytu v čo najväčšom koncentračnom rozpätí
- nezávislosťou odozvy na teplote a zložení mobilnej fázy (1).

Spektrofotometrické detektory

V súčasnosti sú hojne využívané vo farmaceutickom priemysle (1). Majú široký lineárny rozsah ($10^3 - 10^4$), sú citlivé (10^{-9} až 10^{-10} g.ml⁻¹) a samotná detekcia je relatívne málo ovplyvňovaná zložením mobilnej fázy či teplotou (1, 6, 21). Pracujú na princípe detekcie absorpcie (A), ktorá je podľa Lambert-Beerovho zákona pri použití monochromatického svetla priamo úmerná koncentrácii látky:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad [7]$$

ε – molárny absorpčný koeficient (l. mol⁻¹.cm⁻¹)

c – koncentrácia (mol.l⁻¹)

l – šírka mernej cely (cm) (22)

Najčastejšie sa využíva absorpcia v UV oblasti (190 - 400 nm), ktorej predpokladom je prítomnosť chromoforu v podobe dvojitej väzby, prípadne nespárovaného elektrónu (napr. Br, I, S). Pre získanie najlepšej odozvy je vhodné zvoliť vlnovú dĺžku v maxime absorpcie analytu, prípadne je možné použiť detektor s diodovým poľom (diode-array detector, DAD), ktorý je schopný detekcie celého absorpčného spektra (6).

Hmotnostné detektory

Hmotnostná spektrometria (mass spectrometry, MS) patrí v súčasnosti medzi najperspektívnejšie analytické techniky. Detektory využívajúce princíp MS vynikajú svojou vysokou citlivosťou (10^{-15} - 10^{-21} g.ml⁻¹), selektivitou, rýchlosťou a možnosťou využitia v štruktúrnej analýze (23). Detekcia je založená na schopnosti detektoru zaznamenávať hmotnostné spektrum, čiže relatívne množstvo iónov

v závislosti na pomere hmotnosti k počtu nábojov (m/z). Hmotnostný spektrometer pozostáva z troch základných častí:

- a) **iónový zdroj**
- b) **hmotnostný analyzátor**
- c) **detektor** (24).

➤ **Iónový zdroj**

Jeho základná funkcia spočíva v prevedení neutrálnych molekúl analytu do iónovej formy (23). V spojení s HPLC v ňom navyše dochádza k odstráneniu mobilnej fázy pri zachovaní dostatočného množstva iónov analytu. V súčasnosti existuje celá rada ionizačných techník, ktoré je možné voliť hlavne podľa fyzikálno-chemických vlastností analytu (predevšetkým polaritu a molekulovej hmotnosti). Pri HPLC-MS sa najviac využívajú ionizačné techniky pracujúce za atmosférického tlaku (atmospheric pressure ionisation, API) - ionizácia elektrosprejom, chemická ionizácia za atmosférického tlaku a fotoionizácia za atmosférického tlaku (25).

a) Ionizácia elektrosprejom (electrospray ionisation, ESI) – eluent je vystavený vysokému napätiu (3 – 6 kV) a súčasne je zmlžovaný prúdom plynu, najčastejšie dusíkom. Teória vzniku nabitých častíc nie je úplne jasná, no predpokladá sa, že kvapky nabitého aerosólu sa postupne zmenšujú až u nich nakoniec dôjde k prebytku nabitých častíc a následne k ich uvoľneniu (tzv. coulombická explózia). Najčastejšie dochádza k vzniku iónov $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, rôznych aduktov (napr. $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) a v prípade prítomnosti viacerých ionizovateľných skupín existuje možnosť vzniku viacnásobne nabitých iónov (23). Preto je možné pomocou ESI ionizovať i vysokomolekulárne látky (> 1 MDa) (24). Vzhľadom na prítomnosť molekulárneho iónu a nízku fragmentáciu sa ESI radí medzi šetrné ionizačné techniky. Je vhodná pre analýzu polárnych až iónových zlúčenín (26).

b) Chemická ionizácia za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionisation, APCI) – eluent je rozprášený vo vyhriatej komore pomocou plynu a následne je zbytok aerosólu nabitý korónovým výbojom (4 – 6 kV). Primárne dochádza k nabitíu zložiek mobilnej fázy, a tie následne ionizujú analyt. APCI je taktiež šetrná ionizačná technika, pomocou ktorej vznikajú hlavne ióny $[M+H]^+$ a $[M-H]^-$, tvorba aduktov a viacnásobne nabitých iónov je minimálna.

Technika je vhodná pre analýzu nízko a stredne polárnych analytov do molekulovej hmotnosti cca 1500 Da (23). Je optimálna pre spojenie s HPLC, pretože je schopná pracovať pri prietoku 0,2 - 2 ml.min⁻¹ a v porovnaní s ESI je menej citlivá k prítomnosti solí a efektu matrice (24, 26).

c) Fotoionizácia za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photo ionisation, APPI) – jej princíp je analogický k APCI, ibaže koronový výboj je nahradený UV žiarením (24). Jeho energia postačuje na ionizáciu väčšiny organických látok, no nie pre zložky mobilnej fáze, čím vzniká čistejšie spektrum (23). V porovnaní s ostatnými API technikami je APPI náchylnejšia k tvorbe radikálov (26). Je vhodná pre ionizáciu nepolárnych a neutrálnych analytov do molekulovej hmotnosti 500 Da (27).

➤ **Hmotnostný analyzátor**

Úlohou hmotnostného analyzátoru je separácia iónov v plynnej fáze podľa hodnoty m/z , ktorá nutne prebieha za vysokého vákua (10^{-5} – 10^{-7} torr) (28). Separácia je dosahovaná buď vplyvom magnetického alebo elektrického poľa, ich kombináciou, prípadne rozdielom v čase doby letu u delených iónov. V súčasnej dobe je však trendom v oblasti hmotnostnej spektrometrie kombinácia rôznych typov hmotnostných analyzátorov. Týmto prístupom vznikla celá škála hybridných prístrojov, ktoré spájajú výhodné parametre pôvodných analyzátorov (23).

Hmotnostné analyzátory umožňujú získať rôzne typy skenov:

- **Sken celého spektra** (full scan, FS) – záznam spektra vo zvolenom rozsahu m/z .
- **Selektívny záznam iónu** (selected ion monitoring, SIM) – detekcia vybraného iónu o konkrétnej hodnote m/z .
- **Sken prekurzorových iónov** – pre vybraný fragment je možné zistiť jeho prekurzorový ión.
- **Sken produktových iónov** – záznam fragmentov vybraného iónu, označuje sa ako MS/MS prípadne MSⁿ.
- **Selektívny záznam jednej/viacerých reakcií** (selected reaction monitoring, SRM; multiply reaction monitoring, MRM) – detekcia konkrétneho fragmentu/fragmentov pochádzajúcich z vybraného prekurzoru.

- **Sken neutrálnych strát** (neutral loss, NL) – pomocou neho je možné určiť prekurzorový a produktový ión, medzi ktorými došlo k odštiepeniu definovanej hmotnostnej straty.

Základnými parametrami definujúcimi kvalitu analyzátoru sú:

- **Rozlíšenie** (resolution, R) – relatívne vyjadrenie schopnosti hmotnostného analyzátoru rozlíšiť blízke hodnoty m/z . Najčastejšie sa vypočítava zo vzťahu (26):

$$R = \frac{m/z}{\Delta m/z} \quad [8]$$

m/z – pomer hmotnosti a náboja hodnoteného píku

$\Delta m/z$ – šírka píku v polovici jeho výšky

Rozlíšenie hmotnostného analyzátoru nie je rovnaké v celom hmotnostnom rozsahu, preto je vhodné definovať hodnotu m/z pri ktorej bolo počítané.

- **Presnosť určenia hmoty** (mass accuracy, MA) – vyjadruje relatívnu mieru zhody teoretickej (m/z_{teor}) a experimentálnej (m/z_{exp}) hodnoty m/z (v ppm) (26):

$$MA = 10^6 \times \frac{m/z_{\text{exp}} - m/z_{\text{teor}}}{m/z_{\text{teor}}} \quad [9]$$

Kombinácia vysokého rozlíšenia ($R > 10000$) a presného určenia hmoty (< 5 ppm) dovoľuje stanoviť elementárne zloženie analytu, prípadne výrazne minimalizovať počet možných kombinácií, čo je s obľubou využívané pri identifikáciách (23, 26).

Medzi základné hmotnostné analyzátory, ktoré bývajú spojované s HPLC patria:

a) Kvadrupólový analyzátor (quadrupole, Q) – skladá sa zo štyroch rovnobežných tyčí, kde na každé dve protiľahlé je aplikované rovnaké napätie, ktoré obsahuje jednosmernú aj striedavú zložku. Ich vzájomnou kombináciou vznikajú oscilácie, ktoré umožňujú pozdĺžny prelet molekúl s presne definovanou hodnotou m/z , pričom ostatné sú buď zachytené na tyčiach, alebo odsaté vákuom. Bežne sa však zapájajú tri kvadrupoly (QqQ) za sebou, kde prostredný slúži ako kolízna cela pre dosiahnutie fragmentácie. Kvadrupól je schopný dosiahnuť rozlíšenie

2000 (pri m/z 1000) a presnosť určenia hmoty 100 ppm (23). Kvadrupól a hlavne QqQ nachádzajú hlavné využitie pri kvantitatívnej analýze (1, 9).

b) Iónová pasca (ion trap, IT) – je priestorovým analógom kvadrupólu, pričom jeho štyri tyče sú nahradené prstencovou elektródou, ktorá je uzavretá dvomi elektródami. Vhodnou kombináciou jednosmerného a striedavého prúdu je takto možné v pasci zachytiť ióny a následne ich selektívne vypúšťať do detektoru podľa špecifickej hodnoty m/z . Analyzátor nedisponuje vysokým rozlíšením ($R = 4000$, pri m/z 1000) ani presnosťou určenia hmoty (100 ppm), no jeho samostatná schopnosť práce v MS^n móde mu poskytuje výhodu pri štúdiu fragmentácie (23).

c) Analyzátor doby letu (time of flight, TOF) – mechanizmus stanovenia hodnoty m/z je založený na rôznej dobe letu iónov v potenciálovom poli, v ktorom sa ľahšie častice pohybujú rýchlejšie. Vzhľadom na veľký rozdiel v počiatkovej energii nabitých častíc dosahuje samotný TOF nízke rozlíšenie. Použitím tzv. iónového zrkadla (reflektronu) je možné zjednotiť kinetické energie častíc s blízkou hodnotou m/z , a tak výrazne zvýšiť rozlíšenie ($R = 20000$, pri m/z 1000). Analyzátor navyše disponuje vysokou skenovacou rýchlosťou a presnosťou určenia hmoty (10 ppm), preto našiel svoje hlavné uplatnenie v oblasti štruktúrnych analýz (9, 23). Jeho kombináciou s kvadrupólom vznikol QTOF – jeden z komerčne najúspešnejších hybridných MS detektorov (24).

d) Iónová cyklotrónová rezonancia (ion cyclotron resonance, ICR) – ióny majú rôzny cykloidálny pohyb v silnom magnetickom poli, v ktorom má každá hodnota m/z rôznu cyklotrónovú frekvenciu. Z nej sa vypočíta intenzita iónu pomocou Fourierovej transformácie a zhotoví sa spektrum. ICR vysoko prevyšuje ostatné analyzátory svojím rozlíšením a presnosťou určenia hmoty ($R = 500000$ pri m/z 1000, $MA = 5$ ppm), no nevýhodou je jeho vysoká cena (23).

e) Orbitrap – separácia iónov podľa hodnoty m/z je založená na rôznej frekvencii ich pohybu okolo centrálnej elektródy v elektrostatickom poli, z ktorej sa vypočíta ich intenzita podobne ako u ICR. Jedná sa o pomerne nový hmotnostný analyzátor využívaný hlavne v spojení s lineárnou iónovou pascou v štruktúrnej analýze ($R = 100000$ pri m/z 1000, $MA = 5$ ppm) (23, 24).

➤ **Detektor**

Slúži na detekciu množstva iónov prichádzajúcich z analyzátoru. Na tento účel sa využíva:

- a) **elektrónový násobič**
- b) **fotonásobič**
- c) **Faradayova klietka (23).**

Základné aspekty spojenia HPLC-MS

Základným predpokladom kvantitatívnej a kvalitatívnej analýzy s využitím MS detekcie je efektívne prevedenie analytov z eluátu do iónovej formy v plynnom stave. Z toho vyplýva požiadavka na rýchlosť prietoku mobilnej fázy, pretože pred vstupom do hmotnostného analyzátoru je nutné odstrániť všetky jej zvyšky. Z tohto dôvodu sa všeobecne preferujú nižšie prietoky (1).

Zvýšenie citlivosti je možné dosiahnuť úpravou zloženia mobilnej fázy, kde sú vhodné viac prchavé, a tým jednoduchšie odstrániteľné zložky ako acetonitril či methanol. Nežiaduci vplyv na odozvu MS detektoru majú aj rôzne prídavné zložky v mobilnej fáze (pufry, ión-párové činidlá), ktoré môžu výrazne interferovať s procesom ionizácie, preto sa taktiež kladie dôraz na ich prchavosť (1).

Častým problémom HPLC-MS analýzy je aj nežiaduce ovplyvnenie ionizácie analytu v dôsledku prítomnosti ďalších zložiek vzorku (napr. zvyškov matrice). Tento jav sa označuje ako efekt matrice (tzv. matrix effect). Jednou z klasických metód jeho hodnotenia je kontinuálna infúzia hodnoteného analytu do hmotnostného detektoru za kolónou, počas ktorej sa analyzuje blanková vzorka. Miera zmeny ionizácie je vyjadrená ako pokles/nárast v odozve detekcie v retenčnom čase analytu. Avšak v tomto prípade je výsledná miera ovplyvnenia signálu závislá prakticky iba na subjektívnom posúdení (29).

Vhodnejším prístupom sa preto javí objektívnejšie vyjadrenie vplyvu matrice pomocou tzv. maticového faktoru. Ten sa vypočíta z pomerov plochy píku analytu v matrici (pričom sa prázdna matrica upraví predpokladanou technikou a až následne sa k nej pridá známe množstvo analytu) k ploche píku analytu vo vzorku bez prítomnosti matrice obsahujúceho rovnaké množstvo analytu (30).

Ostatné detektory

- **Fluorescenčné detektory** - sú vysoko selektívne a citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml) pri detekcii látok vykazujúcich fluorescenciu (21). Tento jav sa vyskytuje u rigidných molekúl s delokalizovanými π elektrónmi, ktoré po excitácii elektromagnetickým žiarením emitujú pri návrate do základného stavu žiarenie o vyššej vlnovej dĺžke (1).

- **Elektrochemické detektory** - sa mierou citlivosti pohybujú na úrovni fluorescenčných a ich selektiva spočíva v schopnosti detekcie látok podliehajúcich oxido-redukčnému procesu, prípadne ionizácii (1, 6).

- **Refraktometrické detektory** - patria medzi univerzálne, no málo citlivé detektory (10^{-6} g.ml⁻¹). Pracujú na princípe zmeny indexu lomu mobilnej fázy, ktorá je ovplyvnená jej zložením. Z tohto dôvodu je vylúčená možnosť gradientovej elúcie a aj preto je ich využitie minoritné (21).

- **Detektory rozptylu svetla** (evaporative light-scattering detectors, ELSD) - mechanizmus detekcie spočíva v zmene rozptylu svetla v rozprášenom a následne odparenom eluente. Sú to univerzálne detektory, ktoré sú vhodné pre látky bez chromoforu, no podmienkou je ich termostabilita. Citlivosť je na úrovni 10^{-8} g.ml⁻¹ no majú pomerne malý lineárny rozsah (1, 5).

- **Detektory koronového výboja** (corona-charged aerosol detectors, CAD) - princíp fungovania je podobný ako v prípade ELSD s tým rozdielom, že častice výsledného aerosolu sa nabijú korónovým výbojom a následne sa vyhodnocuje tok náboja. Oproti ELSD sú citlivejšie (10^{-9} g.ml⁻¹) a disponujú širším lineárnym rozsahom (1, 5).

- **Chemiluminiscenčné detektory** (chemiluminescent detectors, CLND) – patria medzi veľmi selektívne a citlivé (10^{-9} g.ml⁻¹). Sú schopné detegovať iba látky obsahujúce v molekule dusík (1, 5).

- **Radiometrické detektory** – sú selektívne a veľmi citlivé voči rádioaktívnym látkam, hlavne β žiaričom (³H, ¹⁴C, ³²P). Využívajú sa hlavne pre štúdium osudu liečiv v organizme, prípadne v degradačných štúdiách (5, 31).

3.2.5. Úprava biologického vzorku

Úprava vzorku je dôležitou súčasťou HPLC analýzy a jej význam spočíva v príprave homogénnych vzoriek použiteľných k nástreku na kolónu. Cieľom je získať vzorku, ktorá je:

- bez interferencií
- nezničí kolónu
- kompatibilná so zamýšľanou HPLC metódou.

Niekedy je v priebehu úpravy vzorku spravené zakoncortovanie alebo derivatizácia za účelom zvýšenia citlivosti alebo zlepšenia separácie (6).

Medzi komplexné vzorky, ktorých HPLC analýza vyžaduje krok úpravy vzorku patria vzorky biologickej matrice. V týchto vzorkách sú stanovované koncentrácie liečiv, metabolitov a endogénnych látok. Vzhľadom ku komplexnému charakteru biologickej matrice je nutné odstrániť nežiaduce zložky (napr. soli, kyseliny, zásady, proteíny, lipidy, lipoproteíny, malé organické molekuly), ktoré sú prítomné v nadbytku. Úprava biologického vzorku zaberá asi 80% z celkového času bioanalýzy, a zároveň je najväčším zdrojom chýb (32).

Najčastejšími metódami úpravy biologických vzoriek je deproteinácia, extrakcia kvapalina-kvapalina (liquid-liquid extraction, LLE) a extrakcia na pevnej fáze (solid-phase extraction, SPE) (32, 33).

Deproteinácia

Patrí medzi najstaršie a časovo najmenej náročné metódy určené pre odstránenie proteínov zo vzorku. Zahrňuje denaturáciu (zmenu terciárnej a kvartérnej štruktúry) použitím silných kyselín/zásad, solí, pomocou tepla, alebo najčastejšie prídavkom organického rozpúšťadla (acetonitril, methanol, ethanol) (32, 34). Centrifugáciou je možné oddeliť proteínové pelety a následne priamo analyzovať supernatant. Vzhľadom na denaturáciu je metóda hojne využívaná v analýze liečiv v biologickom materiáli, pretože je ňou možné hodnotiť celkové množstvo liečiva/metabolitu (32, 33).

Ďalšou formou deproteinácie je ultrafiltrácia, vďaka ktorej je možné vhodným výberom veľkosti pórov membrány selektívne odstrániť proteíny nad určitou molekulovou hmotnosťou. Metóda je preto vhodná pre stanovenie voľnej frakcie analytu (6).

Nevýhodou denaturácie aj ultrafiltrácie je prítomnosť stále veľkého množstva endogénnych produktov vo vzorku (35).

LLE

LLE je založená na Nernstovom rozdeľovacom zákone, ktorý definuje rozdeľovaciu rovnováhu látky medzi dvomi nemiešateľnými kvapalinami. Tento princíp je prakticky využívaný pri izolácii požadovaného analytu (6):

$$K_D = \frac{C_o}{C_{aq}} \quad [10]$$

K_D – distribučná konštanta

C_o – koncentrácia analytu v organickej fáze

C_{aq} – koncentrácia analytu vo vodnej fáze

Jednou z fáz je biologická vzorka, druhou je organické rozpúšťadlo nemiešateľné s vodou. Dôležitým aspektom ovplyvňujúcim účinnosť extrakcie je rozpustnosť analytu v organickej fáze. Výhodnou vlastnosťou organického rozpúšťadla je jeho nízka teplota varu, čo je možné využiť v prípade potreby jeho odfúkaniu. Množstvo vyextrahovaného analytu je samozrejme závislé na objeme použitej organickej fázy, no efektívnejším princípom je viacnásobná extrakcia s menšími objemami (33).

V prípade ionizovateľných látok je možné distribučnú konštantu ovplyvniť zmenou pH vodnej zložky, pretože neionizované látky sa podstatne ľahšie extrahujú do organickej fázy (33).

Nevýhoda LLE spočíva v slabej opakovateľnosti a nízkej selektivite voči extrahovaným látkam (32).

SPE

Extrakcia na pevnej fáze je v súčasnosti jednou z najdôležitejších extrakčných techník (32). Základný princíp izolácie je analogický k mechanizmom retencie uplatňujúcich sa v HPLC, pričom najvyužívanejšia je izolácia v reverznom móde. Hlavný rozdiel v porovnaní s HPLC spočíva v použití väčších častíc (40-60 μm) a diskontinualite extrakčného procesu, skladajúceho sa z viacerých krokov. SPE

sorbent je podobne ako v prípade HPLC kolóny uzavretý medzi dvomi chrániacimi fritami, najčastejšie v kolónke podobnej polypropylénovej striekačke (6).

SPE extrakcia prebieha v nasledujúcich fázach:

1. Aktivácia sorbentu – v prípade reverznej fáze je to najčastejšie premytie metanolom alebo acetonitrilom. Následne je vhodné premyť stacionárnu fázu vodným rozpúšťadlom kompatibilným so vzorkou, čím sa odstránia zvyšky organickej fázy, ktoré by mohli spôsobiť precipitáciu proteínov vo vzorke a upchanie kolónky.

2. Nanosenie vzorku.

3. Vymytie balastov – hydrofilné balasty sa vymyjú vodným rozpúšťadlom, zatiaľ čo menej polárne analyty zostanú naadsorbované na stacionárnej fáze.

4. Elúcia analytu – premytím silným elučným činidlom (metanol, acetonitril) sa z kolónky extrahuje analyt.

Za účelom rýchlejšieho prietoku jednotlivých kvapalných zložiek je celý proces SPE extrakcie urýchľovaný najčastejšie pomocou vákua. Dosiachnutie optimálnej extrakcie je možné docieľiť optimalizáciou každého kroku, od výberu typu sorbentu, rozpúšťadiel a taktiež ich objemu (6).

V porovnaní s LLE ponúka SPE nasledujúce výhody:

- kompletnejšia extrakcia analytu
- efektívnejšia separácia interferencií od analytu
- nižšia spotreba organických rozpúšťadiel
- ľahšie odoberanie frakcie obsahujúcej analyt
- pohodlnejšie manuálne prevedenie
- odstránenie častíc
- väčšia možnosť automatizácie (6).

3.2.6. Validácia bioanalytickej metódy

Posledným krokom vývoja metódy je jej validácia, čím sa preukáže, že daná metóda poskytuje spoľahlivé a reprodukovateľné výsledky pri analýzach, pre ktoré je určená (6). V prípade bioanalytických metód je vo farmaceutickej analýze asi najznámejšou a najviac využívanou smernica amerického Úradu pre lieky a potraviny (Food and Drug Administration, FDA) „Bioanalytical method validation“, ktorá obsahuje odporúčania pre validáciu metód kvantitatívne hodnotiacich liečivá, prípadne metabolity v biologickom materiáli (napr. krv, sérum, plazma, moč, vzorky tkaním a kože). Vedľa separačných metód je smernica aplikovateľná aj na bioanalytické metódy akými sú imunologické a mikrobiologické (36).

Smernica FDA definuje tri základné druhy validácie:

1. Úplná validácia – využíva sa spravidla pri validácii novo vyvinutej metódy, pri analýze nového liečiva, alebo pri potrebe dodatočného hodnotenia metabolitov.

2. Čiastočná validácia – vyžaduje sa ako doplnok k úplnej validácii napr. v prípade prenosu metódy do iného laboratória, alebo miernych modifikáciách samotnej metódy zmenou metodológie (napr. detekčnej techniky), biologickej matrice, úpravy vzorku atď.

3. Kros-validácia – je porovnaním validačných parametrov napr. v prípade použitia dvoch analytických metód (porovnávanej a referenčnej), prípadne rovnakej metódy v rozdielnych laboratóriách (36).

Medzi základné požadované validačné parametre patrí:

- **Selektivita** – je to schopnosť metódy detegovať a kvantifikovať konkrétny analyt v prítomnosti ostatných zložiek vzorky (interferencií). Väčšinou sa stanovuje analýzou blankových vzoriek príslušného biologického materiálu získaných minimálne zo šiestich zdrojov (36).

- **Správnosť** – definuje blízkosť nameranej koncentrácie analytu a skutočnej hodnoty. Stanovuje sa analýzou min. piatich vzoriek o známej koncentrácii pri troch očakávaných koncentračných úrovniach. Nameraná hodnota sa môže líšiť max. o 15% od skutočnej hodnoty s výnimkou dolného limitu kvantifikácie (lower limit of

quantitation, LLOQ - najnižšia kvantitatívne hodnotená koncentrácia), u ktorého je prípustná odchýlka 20% (36).

- **Presnosť** – hodnotí rozptyl nameraných výsledkov u vzoriek pripravených rovnakým postupom a vyjadruje sa percentuálne pomocou relatívnej smerodajnej odchýlky. FDA znovu požaduje hodnotenie troch koncentračných úrovní ($n = 5$), pričom presnosť nesmie prekročiť 15% RSD, resp. 20% RSD u LLOQ. Rozdeľuje sa na:

- a) presnosť v rámci jednej série analýz (within-run/intra-batch precision)
- b) presnosť medzi rôznymi sériami analýz (between run/inter-batch precision) (36).

- **Výtlačnosť** – vyjadruje efektívnosť metódy úpravy vzorku, tj. podiel analytu extrahovaného z biologickej matrice do výsledného vzorku. Prakticky sa hodnotí porovnaním extrakcie matrice obsahujúcej analyt a matrice s prídavkom známeho množstva analytu až po extrakcii (37). Nie sú kladené požiadavky na konkrétnu veľkosť výtlačnosti, no výsledky by mali byť reprodukovateľné (36).

- **Kalibračná krivka** – jedná sa o závislosť medzi odozvou detektoru a koncentráciou analytu. Zvyčajne sa požaduje 6-8 vzoriek v očakávanom koncentračnom rozmedzí (36). Miera lineárnej závislosti sa vyjadruje pomocou korelačného koeficientu (1).

- **Stabilita** – hodnotí stabilitu analytu s ohľadom na predpokladané podmienky počas manipulácie vzorku od jeho odberu až po samotnú analýzu. Rozdeľuje sa na:

- c) stabilitu počas cyklu zmrazenia a rozmrazenia,
- d) krátkodobá stabilitu pri laboratórnej teplote po dobu 4-24 hod,
- e) dlhodobú stabilitu - hodnotí vplyv dlhodobého uskladnenia od prvého predpokladaného odberu vzorku až po poslednú očakávanú analýzu,
- f) stabilitu analytu v zásobnom roztoku,
- g) stabilitu po úprave vzorku - hodnotí sa ako stabilita v autosampleri počas sekvencie analýz (36).

Najnovšie (1.2.2012) vošiel v platnosť dokument Európskej liekovej agentúry“ Guideline on validation of bioanalytical methods“ (30). Principiálne sú jednotlivé validačné parametre FDA a EMEA smerníc veľmi podobné a líšia sa iba málo v definíciách niektorých kritérií.

3.3. Ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Potreba analýzy veľkého množstva, často komplexných vzoriek (napr. genomika, proteomika, metabolomika), viedla k vývoji chromatografických techník, schopných poskytovať účinnú separáciu v čo najkratšom čase. Jednou z možností dosiahnutia týchto požiadaviek v prípade HPLC bolo predstavenie nových chromatografických kolón, obsahujúcich stacionárnu fázu s veľkosťou častíc do 2 μm . Zníženie veľkosti častíc viedlo k zväčšeniu povrchu sorbentu, a tým k zefektívneniu separačného procesu (38). Z analýzy Van Deemterovej krivky (závislosť výšky teoretickej priehradky na prietoku mobilnej fázy, Obrázok 1) vyplýva, že pre využitie optimálnej účinnosti u menších častíc bolo potrebné zachovať vhodný prietok mobilnej fázy (1). Z krivky je taktiež badateľné, že optimálnu účinnosť je možné zachovať aj pri vyššom prietoku, a tým kratšej dobe analýzy. To však limitovalo využitie dostupných HPLC systémov, pretože malé častice sorbentu vytvárali veľký spätný tlak. Tieto nedostatky HPLC viedli k ďalšiemu vývoju a predstaveniu konceptu ultra vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC (38, 39). Prvý komerčne dostupný UHPLC systém uviedla na trh v roku 2004 firma Waters pod registrovaným obchodným názvom UPLC (ultra performance liquid chromatography), ktorý je považovaný za synonymum k skratke UHPLC (40).

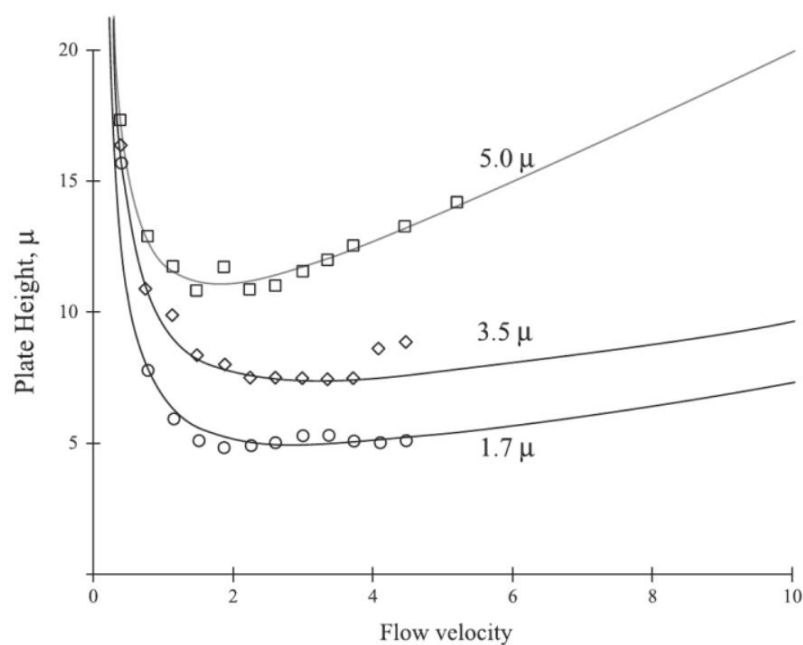
Pretože UHPLC systémy pracujú pri vyšších tlakoch v porovnaní s HPLC (400-1200 bar pre UHPLC, <400 bar pre HPLC), bolo nutné kompletne modernizovať inštrumentálnu techniku tak, aby pracovala spoľahlivo aj za takýchto podmienok (38). Okrem základnej požiadavky na použitie výkonnejších púmp musela byť pozornosť venovaná aj:

- a) vylepšeniu techniky nástreku – boli potrebné rýchlejšie cykly nástreku a zároveň jeho menšie objemy,
- b) zníženiu mŕtveho objemu v systéme, aby nedochádzalo k rozmývaniu pík, a tým k strate účinnosti,
- c) zvýšeniu skenovacej frekvencie detektoru (>20Hz) vzhľadom na užšie píky (39).

Podstatnou výhodou UHPLC v porovnaní s HPLC je možnosť dosiahnutia niekoľkonásobne kratšej separácie pri zachovaní vysokého rozlíšenia, nižšej spotreby vzorku a vyššej citlivosti (38, 41).

Nežiaducim javom pri použití vysokého tlaku je v prípade UHPLC strata účinnosti a selektivity separácie, ktorá pramení z prítomnosti teplotného gradientu vznikajúceho väčším trením mobilnej a stacionárnej fázy. Tento problém je možné obmedziť využitím užších kolón alebo znížením teploty na kolóne (42).

Vďaka svojim nesporným výhodám našla UHPLC široké uplatnenie vo farmaceutickej analýze. S obľubou sa využíva v kombinácii s QTOF v štúdiách metabolizmu, pretože takéto spojenie umožňuje štruktúrne charakterizovať zmes neznámych látok (metabolitov) pri súčasnom zachovaní rýchlosti analýzy (43).



Obrázok 1: Van Deemterová krivka, prevzaté z ref. (1).

3.4. Biokompatibilné chelátory železa

3.4.1. Železo v ľudskom organizme

Železo sa radí medzi nenahraditeľné biogénne prvky potrebné hlavne pri transporte kyslíka, energetickom metabolizme, delení a raste buniek (44, 45, 46). Jeho biologický význam pramení z možnosti reverzibilného prechodu medzi oxidovanou a redukovanou formou, a tým schopnosti prijmu/poskytnutia elektrónu. V tele dospelého muža je približne 3,5-5g železa (~55 mg/kg), zatiaľ čo u ženy sú iba 2-3 g (~45 mg/kg). Najväčší výskyt je v:

- hemoglobíne v červených krvinkách ~ 44%
- skladovacej forme (pečeňový feritin a hemosiderin) ~ 25%
- endoteliálnych makrofágoch ~ 15%
- svaloch (myoglobin) ~ 7,5%
- kostnej dreni ~ 7,5%
- transportnej forme (transferin v plazme) ~ 0,15% (47).

Malá časť je prítomná v enzýmoch a v tzv. voľnej katalyticky aktívnej zásobe (labile iron pool, LIP) v cytoplazme. Za normálnych okolností sa iba stopové množstvo vyskytuje v elementárnej forme (44, 48).

Dôležitú funkciu plní homeostáza železa, pretože musí zabezpečiť potrebu Fe v organizme, no zároveň minimalizovať jeho toxicitu v priebehu absorpcie, uskladnenia a využitia. Nedostatok aj prebytok tohto prvku má pre organizmus nepriaznivý vplyv. Na rozdiel od príjmu Fe, u ľudí neexistuje mechanizmus, ktorým by bolo možné aktívne regulovať jeho vylúčenie z tela. To môže prebiehať iba odlupovaním odumretých enterocytov obsahujúcich ferritín, prípadne krvnými stratami (napr. zranenia, parazity, menštruácia u žien) (44). Ľudský organizmus si preto vyvinul dômyselný systém, ktorý železo z tela nevyučuje, ale ho znovu využije a prakticky iba reguluje jeho absorpciu z potravy v prípade potreby. Denný príjem z potravy (približne 1-2 mg) tvorí iba malú časť z celkovej dennej spotreby v množstve asi 20-25 mg. Zvyšok je získaný katabolizmom hemoglobínu po fagocytóze starých erytrocytov (45, 49).

Toxicita voľných iónov železa pramení z jeho oxido-redukčných vlastností, možnosti účasti na Fentonovej reakcii vedúcej k vzniku reaktívnych foriem kyslíka

(reactive oxygen species, ROS). Počas nej sú železnaté ióny oxidované peroxidom vodíka za vzniku Fe^{III} , hydroxylového radikálu ($\cdot\text{OH}$) a hydroxyly (HO^-) (Rovnica 1). Hydroxylový radikál sa radí medzi najreaktívnejšie formy ROS a je schopný deštrukcie celej rady biomolekúl (napr. DNA, proteíny, lipidy). Celý proces má však cyklický charakter, pretože v biochemických dráhach sú železité ióny vplyvom redukčných činidiel v bunke zredukované, a tak opäť schopné vstupu do Fentonovej reakcie.

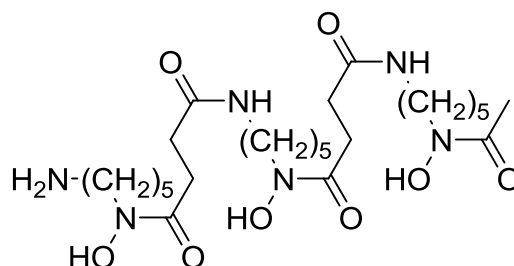
Za normálnych fyziologických podmienok patrí endogénna tvorba ROS medzi dôležité biochemické procesy. Jej zvýšená produkcia, prípadne nedostatok antioxidantov naopak spôsobuje tzv. oxidačný stres, ktorému sa pripisuje úloha v procese starnutia, vzniku neurodegeneratívnych chorôb, aterosklerózy ako aj nádorových chorôb (50, 51).



Rovnica 1: Fentonová reakcia

3.4.2. Chelátory železa

Primárnym impulzom k vývoji liečiv zo skupiny chelátorov železa bola snaha liečby pacientov trpiacich chronickým preťažením železa (napr. β -thalasemia, hemochromatóza). Prvým klinicky dostupným chelátorom bol deferoxamin (DFO, Obrázok 2), hydroxamový derivát získaný zo *Streptomyces pilosus*. Postupom času bol u liečiva pozorovaný *in vitro* aj *in vivo* antiproliferatívny účinok u rakovinových buniek, ktorý bol dokázateľne sprostredkovaný chelataciou železa. Po objavení tohto cytostatického účinku bol vývoj chelátorov železa smerovaný taktiež k protinádorovej terapii (51).



Obrázok 2: Deferoxamin

Mechanizmus cytostatického účinku chelátorov železa

Nádorové bunky, v porovnaní s bunkami normálneho tkaniva, majú omnoho vyššiu spotrebu železa zapríčinenú ich rýchlejšou proliferáciou. Výsledkom toho je aj zmena regulácie ich metabolizmu, prejavujúca sa najmä vo zvýšenej expresii receptora pre transferin, a tým jeho vyššieho vstupu do bunky. Táto vlastnosť tak spôsobuje výrazne vyššiu citlivosť nádorových buniek k nedostatku železa v porovnaní s bunkami normálneho tkaniva (51).

Mechanizmus protinádorového účinku týchto látok priamo súvisí s chelataciou železa a najčastejšie je vysvetľovaný inhibíciou ribonukleotid reduktázy (RR). Jedná sa o enzým katalyzujúci redukciu ribonukleotidov na deoxyribonukleotidy – hlavných stavebných jednotiek DNA. Aktívne centrum enzýmu pozostáva z tyrozylového radikálu stabilizovaného dvomi iónmi železa. Jeho deficit vedie k poruche funkcie enzýmu a k zástave bunčného delenia. Ďalší z možných mechanizmov niektorých chelatačných látok je pripisovaný redoxnej aktivite komplexu chelátora so železom, vedúcej k cyklickej tvorbe ROS, a tým súvisiacemu cytotoxickému pôsobeniu na nádorové bunky (52).

Nedávne experimenty navyše odhalili zapojenie ďalších mechanizmov v rámci protinádorového účinku u nových chelátorov železa. Vzhľadom na to, že niektoré gény sú regulované hladinou železa v bunke, ich expresia je modifikovaná priamo úmerne s jeho vychytávaním. V súvislosti s tým bol pozorovaný účinok na rôzne transkripčné faktory a gény inhibujúce bunčného delenie (napr. p53, p21, p21^{CIP1/WAF1}, HIF1, NDRG1), ktorý sa významne uplatňuje hlavne u rýchlo sa množiacich nádorových buniek (52).

Vývoj chelátorov železa ako protinádorových liečiv

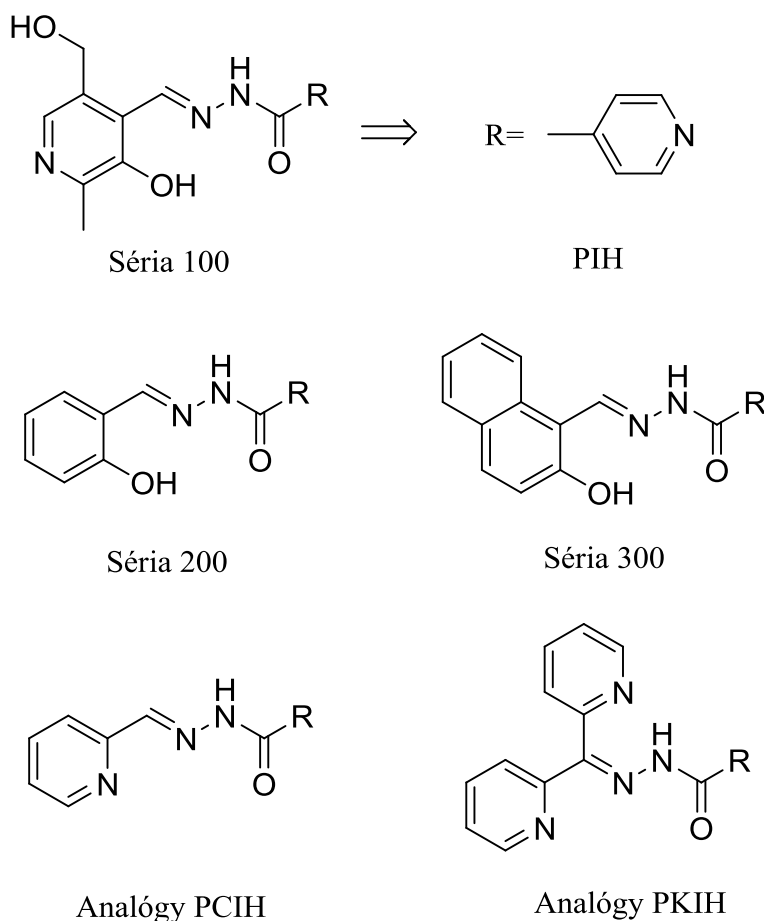
➤ **Aroylhydrazony**

Materským liečiv tejto skupiny je pyridoxal-isonikotinoylhydrazon (PIH), ktorý je možné pripraviť jednoduchou Schiffovou kondenzáciou pyridoxalu a hydrazidu kyseliny isonikotinovej. Jedná sa o perorálne účinný chelátor, schopný vytvárať komplexy v pomere 2:1 (ligand : Fe) prostredníctvom troch donorových atómov: fenylového kyslíku, iminového dusíku a karbonylového kyslíku (ONO). Vyššia afinita k Fe^{III} bola vysvetľovaná prítomnosťou kyslíkových donorových

atómov stabilizujúcich železo v oxidovanej forme. Komplexy s železnatými iónmi navyše podliehajú oxidácii kyslíkom, a nie sú tak dostupné pre Fentonovú reakciu, v ktorej by sa podieľali pri tvorbe ROS (51).

Zvýšená schopnosť chelatácie železa u PIH v porovnaní s DFO súvisí s jeho vyššou lipofilitou, umožňujúcou mu ľahší prestup cez bunecnú membránu, a tým prístup k železu prítomnom priamo v intracelulárnom priestore buniek. Nižší antiproliferatívny účinok PIH než u DFO ale naznačil, že samotná chelácia železa nemusí byť dostačujúca pre dosiahnutie výrazného protinádorového efektu. Pri vývoji nových antiproliferatívne účinných chelátorov železa boli následne obmenou aromatického aldehydu pripravené štruktúrne analógy PIH pri zachovaní pôvodnej donorovej skupiny atómov (ONO) nutných pre cheláciu. Samotný PIH patril do tzv. série 100, deriváty salicylaldehydu boli štruktúrnym základom série 200 a použitie štruktúrneho základu 2-hydroxy-1-naftylaldehydu viedlo k vývoji série 300 (Obrázok 3). Pri hodnotení závislosti štruktúry a účinku v sériách 100 až 300 bol so zvyšujúcou sa lipofilitou pozorovaný vyšší antiproliferatívny efekt *in vitro* (51).

Výskum aroylhydrazonovej skupiny naďalej pokračoval a viedol k príprave ďalších lipofilnejších derivátov. Najprv boli študované analógy 2-pyridylkarboxaldehyd-isonikotinoylhydrazonu (PCIH, Obrázok 3), ktoré boli schopné tvorby koordinačnej väzby pomocou pyridinového dusíku, iminového dusíku a karbonylového kyslíku (NNO). Nevykazovali však výraznejší antiproliferatívny účinok, pravdepodobne kvôli ionizácii PCIH za fyziologických podmienok vedúcej k neschopnosti penetrácie biologickej membrány a tým chelatácie železa priamo v LIP. Následne boli pripravené chelátory odvodené od di(2-pyridyl)keton-isonikotinoylhydrazonu (PKIH, Obrázok 3). Obsahovali rovnaké donorové atómy ako PCIH, boli lipofilnejšie, no nepodliehali ionizácii. Štúdium mechanizmu účinku viedlo k poznatku, že ich komplexy so železom vykazovali redoxnú aktivitu, a zároveň boli rovnako účinné ako samotné chelátory. Ligandy boli schopné tvorby komplexov s Fe^{II} aj Fe^{III} , vďaka čomu sa železo mohlo podieľať na tvorbe ROS vo Fentonovej reakcii. Pozorovaná redoxná aktivita bola pripisovaná zavedeniu pyridínu, čím došlo k zámene donorového atómu kyslíka za dusík ($\text{ONO} \rightarrow \text{NNO}$), a poukázalo tak na dôležitosť jeho výberu (51).

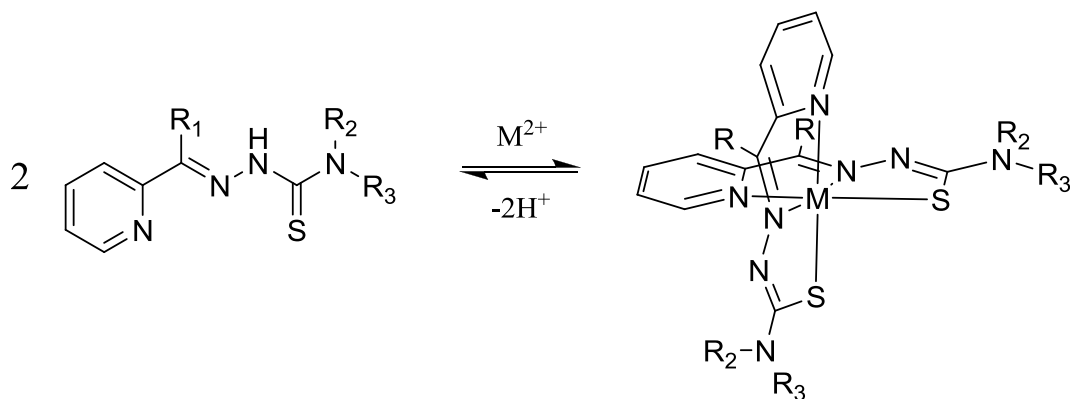


Obrázok 3: Chelátory železa odvodené od aroylhydrazonu.

➤ Thiosemikarbazony

Už pomerne dlhú dobu bolo známe, že zlúčeniny odvodené od thiosemikarbazonu vykazujú zreteľný cytostatický účinok. Najviac preskúmanou skupinou schopnou chelatacie sú deriváty 2-pyridylu, ktoré umožňujú tvorbu donor-akceptorovej väzby s iónmi Fe^{II} a Fe^{III} (s nižšou afinitou aj s inými prechodnými kovmi - napr. Cu^{II} , Zn^{II}) pomocou pyridinového dusíku, iminového dusíku a síry (NNS,

Obrázok 4). Za fyziologických podmienok sú ligandy neutrálne, a tak môžu ľahko prestupovať cez bunecnú membránu. Protinádorový účinok je u nich zvýraznený, pretože je založený nielen na klasickom modeli vychytávania železa a inhibícii RR, ale aj na výraznej redoxnej aktivite železa v rámci komplexu a tvorbe ROS (51).



Obrázok 4. Vznik komplexu u derivátov 2-pyridylu.

Prvým liečivom odvodeným od thiosemikarbazonu, ktorý vstúpil do klinických štúdií (momentálne 2. fáza) je 3-aminopyridin-2-karboxaldehyd-3-thiosemikarbazon (Triapin, Obrázok 5). Látka vykazovala vyššiu aktivitu proti nádorovým bunkám ako hydroxymočovina, ďalší klinicky používaný inhibítor RR. Napriek sľubnému potenciálu Triapinu bolo pozorované množstvo nežiaducich účinkov a niektoré štúdie preto museli byť ukončené (48).

Vzhľadom na perspektívu uplatnenia chelátorov železa pri liečbe onkologických chorôb prebieha pod vedením Prof. Richardsona (University of Sydney) rozsiahly výskum thiosemikarbazonových derivátov, počas ktorého bol pripravený celý rad nových potenciálnych liečiv (51).

NT séria

Táto skupina chelátorov vznikla kombináciou 2-hydroxy-1-naftylaldehydu z aroylhydrazonovej série 300 a rôznych thiosemikarbazidov (Obrázok 5). Cytotoxický účinok bol porovnateľný s aroylhydrazonovou sériou 300 a priamo úmerný lipofilite. Jedným s najúčinnějších anológov bol 2-hydroxy-1-naftylaldehyd-4-methyl-3-thiosemikarbazon (N4mT) (51).

DpT séria

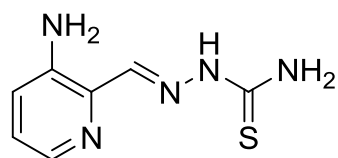
Využitie poznatkov pri štúdiu antiproliferatívneho pôsobenia aroylhydrazonov, a najmä pozorovanej vysokej účinnosti PKIH, viedlo k príprave thiosemikarbazonovej série odvodenej od di(2-pyridyl)ketonu (DpT, Obrázok 5). Ďalšie zvýšenie antiproliferatívneho účinku bolo v tomto prípade vysvetľované nižším redoxným potenciálom DpT série oproti PKIH, a tým možnosťou

reverzibilnej redoxnej aktivity komplexov so železom. Najúčinnjším liečivom bol di(2-pyridyl)keton-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon (Dp44mT, Obrázok 5), ktorý vykazoval *in vitro* aj *in vivo* vyšší antiproliferatívny účinok v porovnaní s doposiaľ pripravenými chelátormi. Napriek sľubnému potenciálu však bola pri podávaní vyšších dávok pozorovaná srdečná fibróza u myši (51, 53).

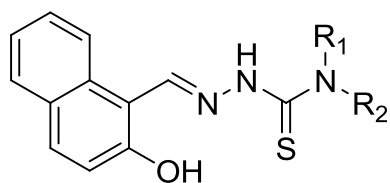
Ďalšou cieľenou obmenou štruktúry bol v nedávnej dobe pripravený nový analóg – di(2-pyridyl)keton-4-methyl-4-cyklohexyl-3-thiosemikarbazon (DpC, Obrázok 5). Látka vykazovala nižšiu toxicitu v porovnaní s Dp44mT a v rámci *in vivo* experimentov bolo pozorované silné cytostatické pôsobenie na modeli nádoru pankreasu *in vivo* (52).

BpT séria

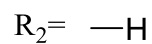
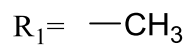
Tieto analógy vznikli zamenou jedného z pyridinov nezapojeného do tvorby koordinačnej väzby u DpT série za fenyl (Obrázok 5). Dôvodom tohto kroku bola snaha o zníženie lipofility a zníženie $Fe^{III/II}$ potenciálu, čo by viedlo k navýšeniu redoxnej aktivity. Dôkladným štúdiom bol následne potvrdený vyšší antiproliferatívny účinok, a zároveň najúčinnším analógom bol 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazon (Bp4eT, Obrázok 5) (51, 54). U tejto látky bola pozorovaná asi 1500-3000 krát vyššia hodnota IC_{50} pre nádorové bunky ako pre bunky normálneho tkaniva. Na rozdiel od DpT série bol účinok zatiaľ preukázaný iba *in vitro*, zatiaľ čo *in vivo* experimenty už v súčasnosti prebiehajú (48).



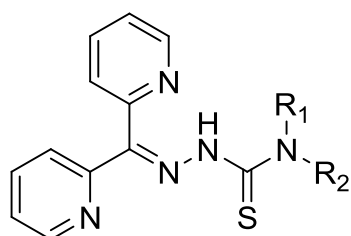
Triapin



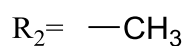
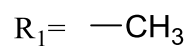
Analogy NT



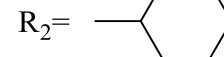
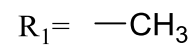
N4mT



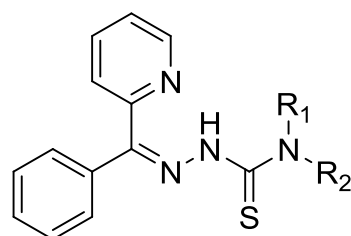
Analogy DpT



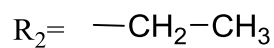
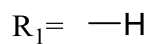
Dp44mT



DpC



Analogy BpT



Bp4eT

Obrázok 5: Chelátory železa odvozené od thiosemikarbazonu.

3.5. Dexrazoxan

Ochrana nenádorových tkanív pred toxickým účinkom cytostatik patrí medzi dôležité oblasti biomedicínskeho výskumu. Medzi zvlášť ohrozené a životne dôležité orgány/tkaniva patrí srdce (myokard), u ktorého je známa citlivosť voči toxických účinkov rady cytostatik – najmä však často indikovaných antracyklinových antineoplastik (doxorubicin, daunorubicin, epirubicin atd.) (55). Jediným klinicky dostupným liečivom, u ktorého bol jasne preukázaný kardioprotektívny účinok proti antracyklinovej kardiotoxicite je bisdioxopiperazinový derivát dexrazoxan (Obrázok 6) (56).

Aj keď je dexrazoxan registrovaným a v klinickej praxi užívaným liečivom, mechanizmus jeho kardioprotektívneho pôsobenia nebol doposiaľ detailne popísaný. Bolo však zistené, že dexrazoxan je s najväčšou pravdepodobnosťou tzv. pro-liečivom, ktoré je dostatočne lipofilné pre prienik do intracelulárneho priestoru, kde je enzymaticky bioaktivované hydrolytickým otvorením heterocyklov. Cez jednotlivé medziprodukty, polohové izoméry B a C, vzniká vlastný aktívny metabolit ADR-925 (Obrázok 6). Predpokladá sa, že kardioprotektívny účinok dexrazoxanu je sprostredkovaný práve chelatačnými vlastnosťami aktívneho metabolitu (ADR-925) (57). Je totiž známe, že antracyklinové cytostatika tvoria v srdečných bunkách (kardiomyocytoch) komplexy s iónmi železa, ktoré sú z redoxného hľadiska veľmi aktívne a cyklickým mechanizmom produkujú veľké množstvo vysoko cytotoxických hydroxylových radikálov (58). ADR-925 je schopné odnímať ióny železa z týchto komplexov, a tak zabrániť vzniku oxidačného stresu a následnému nevratnému poškodeniu a smrti srdečných buniek (59). Nedávne výskumy však odhalili, že samotná chelatacia železa nemusí byť zodpovedná za kardioprotektívny účinok, na ktorom sa taktiež môže podieľať inhibícia topoizomerázy II (60).

Okrem najznámejšieho (kardioprotektívneho) účinku dexrazoxanu, bolo v nedávnej dobe tiež preukázané, že dexrazoxan významne chráni tkanivá zasiahnuté nechceným únikom antracyklinu mimo krvné riečisko pri infúznej aplikácii (tzv. extravazácii). Včasná systémová (i.v.) aplikácia dexrazoxanu zásadným spôsobom obmedzuje nekrotické a zápalové zmeny, spôsobené prítomnosťou značného množstva cytostatika v okolí cievy (61).

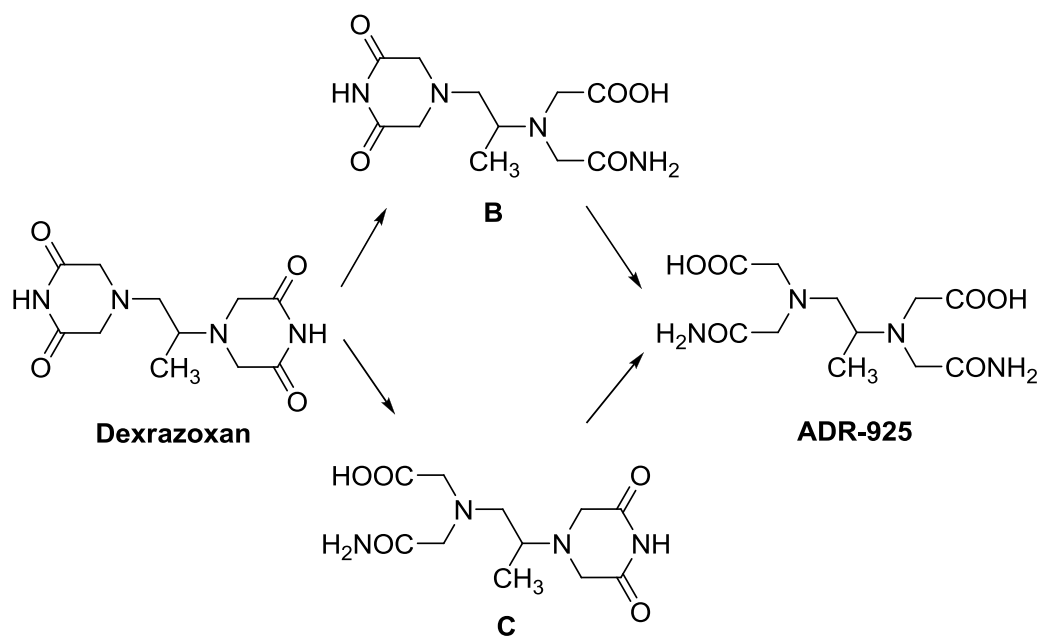
V súčasnosti v podstate nie je dostupná žiadna jednoduchá, presná, citlivá, selektívna, dostatočne robustná a adekvátne validovaná analytická metóda pre analýzu dexrazoxanu a jeho metabolitov. Tento fakt by do istej miery mohol byť zapríčinený istou komplikovanosťou analytov - dexrazoxanu i jeho aktívnych metabolitov. Bežná analýza tohto liečiva, a najmä jeho metabolitov je totiž komplikovaná absenciou absorpcie UV žiarenia v oblastiach vlnových dĺžok bežne využívaných pre detekciu analytov (nad 220 nm). Priama detekcia dexrazoxanu a metabolitov sa síce ukázala byť možná v oblastiach nízkych vlnových dĺžok (205 nm), avšak relatívne problematická vzhľadom k absorpcii zložiek mobilnej fáze, a hlavne však matrice vzorku (62).

Pokus o posun absorpčných maxim analyzovaných látok do vyšších vlnových dĺžok bol vykonaný pomocou derivatizácie založenej na deproteinácii imidových dusíkov pomocou NaOH. Vzhľadom na acidobazickú nestabilitu dexrazoxanu, sa však tento prístup nejavil ako príliš vhodný. Okrem toho, tento postup principiálne neumožňuje detegovať aktívny metabolit ADR-925 a pri analýze (pri 227 nm) je stále veľmi zjavný vplyv analytického pozadia (63). V literatúre je tiež možné nájsť HPLC metódu, pri ktorej bol ADR-925 detegovaný po derivatizačnej reakcii ako fluoreskujúci komplex s terbiom. Táto metóda je však pomerne komplikovaná, málo robustná a logicky neumožňuje súčasnú detekciu materskej látky - dexrazoxanu. Dá sa tiež predpokladať, že v prípade iónov terbia, rovnako ako u iných viacmocných iónov kovov, môže v prítomnosti materskej látky dochádzať k urýchleniu jej hydrolýzy, čím môže byť vlastné stanovenie ADR-925 vplyvom experimentálneho postupu nadhodnotenú (64). Taktiež je možné v literatúre nájsť pre stanovenie ADR-925 staršiu HPLC metódu s prepínaním kolón a elektrochemickou detekciou (65). V literatúre bola tiež nájdená metóda zahrňujúca preparatívnu HPLC analýzu a následu off-line identifikáciu hydrolytických produktov dexrazoxanu pomocou FAB-MS. Tato metóda však nie je vhodná pre rutinnú analýzu vzhľadom k off-line zapojeniu detektoru a komplikovanej viackrokovej úprave vzorku (62). V rámci štúdia farmakokinetiky dexrazoxanu bola vyvinutá a validovaná HPLC-MS/MS metóda, u ktorej však nebola pozornosť venovaná hodnoteniu jeho metabolitov (66).

Ďalšou komplikáciou sprevádzajúcou HPLC analýzu dexrazoxanu a predovšetkým ADR-925 je tiež fakt, že sa jedná o látky značne hydrofilné, a tak sú pomerne málo zadržované na bežných HPLC kolónach (67). Dostupné metodiky využívajú mobilné fáze s vysokým obsahom vodnej zložky (viac ako 90 %) a v

niektorých prípadoch tiež prídavok ión-párového činidla (napr. kys. heptansulfonovej). Za týchto podmienok síce dôjde k istému zvýšeniu retencie, avšak stále existuje (predovšetkým v prípade ADR-925) možnosť interferencie s analytickým pozadím. V neposlednom rade je potrebné uviesť tiež fakt, že analyzované látky sú pomerne silnými chelátormi dvoj- a viacmocných iónov, a tak táto ich vlastnosť do istej miery tiež komplikuje ich analytické hodnotenie (64). Taktiež bola publikovaná metóda založená na nepriamom stanovení ADR-925 pomocou tvorby príslušných komplexov s Co^{II} iónmi, následnej reakcii nadbytočného Co^{II} s fluorescenčným indikátorom calceinom a fluorimetrickom stanovení nezreagovaného calceinu. Na základe stechiometrie reakcie bolo z výsledkov tohto stanovenia vypočítané množstvo ADR-925 vo vzorku (59). Z vyššie uvedených skutočností je evidentné, že sa jedná o pomerne komplikované analyty a doposiaľ používané metodické prístupy sa stretávajú so značnými problémami, a to predovšetkým z hľadiska náročnosti prevedenia, citlivosti detekcie, a tiež validácie metódy pre využitie vo farmaceutickej analýze. Spomenuté metodiky boli aj napriek diskutovaným problémom aplikované do štúdia chemickej i enzymatickej hydrolýzy (*in vitro*), ako aj k stanoveniu dexrazoxanu a jeho metabolitov v plazme, krvi a médiách pre kultiváciu hepatocytov a myocytov (nie však v bunkách samotných) (63, 68, 69, 70). Do dnešného dňa však nebola vykonaná štúdia zaoberajúca sa stanovením koncentrácie dexrazoxanu a jeho metabolitov priamo v mieste jeho farmakologického účinku – v srdečnom tkanive.

Nedostatok detailných informácií o presnom osude dexrazoxanu v organizme a obzvlášť v srdečných bunkách však do značnej miery komplikuje ďalší výskum týkajúci sa optimalizácie farmakologických vlastností dexrazoxanu, ako aj vývoj nových, účinnejších a bezpečnejších kardioprotektív.



Obrázok 6: Schéma bioaktivácie dexrazoxanu.

3.6. Metabolizmus

Všetky živé organizmy sú otvorené systémy, schopné permanentného príjmu energie a stavebnej hmoty z vonkajšieho prostredia, a zároveň odstraňovania nevyužiteľného odpadu. Prijaté fyziologické zlúčeniny (cukry, tuky, proteíny, minerály, vitamíny, kyslík, voda atď.) podliehajú v organizme rôznym katabolickým/anabolickým reakciám a nevyužiteľné produkty sú následne vylučované. Celý tento proces je základom fyziologického metabolizmu (71).

Okrem týchto zlúčenín však do tela vstupujú aj látky nefyziologické, tzv. xenobiotiká. Jedná sa o zlúčeniny, ktoré sa v organizme normálne nevyskytujú, prípadne sú prítomné v nefyziologicky vysokých koncentráciách, a preto majú na organizmus spravidla nežiaduci vplyv. Medzi ne patria napr.:

- liečivá
- zložky potravy bez fyziologickej funkcie
- potravinárske aditíva (ochucovadla, farbivá atď.)
- kozmetika
- dopingové látky
- drogy (heroín, kokaín, THC atď.)
- prírodné toxíny (živočíšne a rastlinné jedy, bakteriálne toxíny)
- technické a priemyselné zlúčeniny (insekticídy, herbicídy, zpomaľovače horenia) (71)

Metabolizmom (biotransformáciou) je možno označiť ako súhrn procesov, ktoré majú vplyv na osud xenobiotika v tele. Úlohou biotransformácie je detoxifikácia xenobiotika prostredníctvom jeho chemickej modifikácie a následného vylúčenia z organizmu. Spravidla je to dosiahnuté ich premenou na produkty, ktoré majú vyššiu polaritu, a tým vyššiu možnosť exkrécie. Výsledkom biotransformácie môže byť jeden produkt, prípadne celá škála rôznych metabolitov (71).

Okrem zubov a kostí prebieha metabolizmus prakticky vo všetkých tkanivách. Najdôležitejším metabolicky aktívnym orgánom je však pečeň, ďalej sú to obličky, tenké črevo, pľúca, mozog, koža, krvné sérum, placenta a črevná mikróflóra. (71).

Xenobiotika sú biotransformované pomocou enzýmov určených pre metabolizmus fyziologických substrátov (napr. hormóny). Na rozdiel od nich je však špecifickosť enzýmov voči xenobiotikám nízka, čo je z evolučného hľadiska obrovskou výhodou pre organizmus. Vďaka tomu je schopný biotransformovať širokú škálu pre organizmus neznámych látok, vrátane významnej skupiny xenobiotik - liečiv (71).

3.6.1. Fáze metabolizmu

Vzhľadom na charakter prebiehajúcich reakcií sa metabolizmus rozdeľuje na tzv. 1. a 2. fázu (71).

1. fáza (funkcionalizačná)

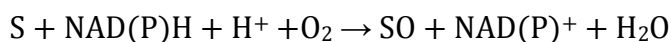
Úlohou tejto fázy je zavedenie funkčnej skupiny do molekuly xenobiotika. Medzi najčastejšie reakcie patrí oxidácia, hydrolýza, redukcia a hydratácia. Tieto reakcie vedú k zavedeniu polárnej funkčnej skupiny (OH, COOH, NH₂, SH atď.) do molekuly xenobiotika a tým k uľahčeniu jeho priameho vylúčeniu z organizmu, prípadne umožňujúcej ďalšiu konjugáciu s polárnym kofaktorom (72).

Najčastejšími skupinami enzýmov 1. fázy metabolizmu sú:

- cytochromy P450 (CYP450)
- monoaminoxidázy (MAO)
- flavin-monooxygenázy (FMO)
- alcohol dehydrogenázy
- aldehyd dehydrogenázy
- xanthin oxidázy
- epoxid hydrolázy
- karboxylesterázy a peptidázy
- karbonyl reduktázy (71)

Medzi najvýznamnejšiu skupinu enzýmov patrí CYP450 (73). Odhaduje sa, že zo všetkých v súčasnosti predpisovaných liečiv je zhruba 75% metabolizovaných práve pomocou CYP450 a z niekoľko tisíc isoformiem sa iba päť z nich (1A2, 2C9,

2C19, 2D6, 3A4) z 95% podieľa na spomínanom účinku (74). Okrem metabolizmu xenobiotik majú CYP450 nezastupiteľnú úlohu v syntéze a regulácii steroidných hormónov. V ľudskom tele sú prakticky všadeprítomné, no najdôležitejším orgánom zodpovedným za metabolizmus liečiv pomocou CYP50 je pečeň. Tieto enzýmy, obsahujúce vo svojej štruktúre hem, sú lokalizované na endoplazmatickom retikulu spolu s flavoproteínom - NADPH cytochrom reduktázou, ktorý je potrebný na prenos elektrónov z NADPH na CYP450. Oproti iným enzýmom zapojeným v metabolizme xenobiotik majú CYP450 najširšiu substrátovú špecifiku, čo im umožňuje metabolizovať široké spektrum cudzorodých látok (33). Najčastejším typom reakcie katalyzovanej CYP450 je oxidácia (Rovnica 2) (72):



S = substrát

Rovnica 2: Oxidácia substrátu katalyzovaná CYP450.

2. fáza (konjugačná)

V priebehu tejto fázy je molekula obsahujúca vhodnú funkčnú skupinu naviazaná zvyčajne na polárnu endogénnu zlúčeninu, čím sa významne zvýši možnosť jej vylúčenia z organizmu (Tabuľka 2). Výnimkou môže byť metylácia, a tak možnosť zvýšenia lipofility. Terminologicky je však označenie „2. fáza“ mierne zavádzajúce, pretože chronologicky nemusí striktne nadväzovať na 1. fázu. Xenobiotikum obsahujúce vhodnú funkčnú skupinu môže byť metabolizované primárne iba cestou konjugačnej fázy, prípadne 1. fáza môže byť vynechaná alebo nasledovať až po 2. fáze (33).

Najdôležitejšou konjugačnou reakciou 2. fázy je glukuronidácia. Reakcia je katalyzovaná uridin difosfát (UDP) glukuronosyltransferázami (UGT), membránovo viazanými proteínmi, lokalizovanými na vnútornej strane endoplazmatického retikula a membráne jadra. Najvyššia koncentrácia je v pečeni, no vyskytujú sa aj v tenkom čreve, obličkách, pľúcach a koži. Väčšina UGT vykazuje úzku špecifitu voči endogénne prítomným zlúčeninám (androgény, estrogény, bilirubín) avšak nízku v prípade xenobiotik. Enzýmy sú zodpovedné za prenos glukuronidovej kyseliny z uridin 5'-difosfoglukuronidovej kyseliny na rôzne zlúčeniny obsahujúce nukleofilnú funkčnú skupinu. Vzniknutý glukuronid je spravidla menej toxický, vo

vode rozpustný, a tým jednoduchšie z tela vylúčený v porovnaní s materskou látkou (33, 75).

Reakcia	Funkčná skupina
Glukuronidácia	-OH, -COOH, -NH, -NOH, -NH ₂ , -SH, aromatický dusík
Glykozidácia	-OH, -COOH, -SH
Sulfatácia	-OH, -NH, -NOH, -NH ₂
Methylácia	-OH, -NH ₂
Acetylácia	-OH, -NH ₂ , -SO ₂ NH ₂ ,
Konj. s aminokys.	-COOH
Konj. s glutathionom	epoxid, organický halid
Konj. s mastnou kys.	-OH

Tabuľka 2: Niektoré reakcie 2. fáze a príslušné funkčné skupiny

3.6.2. Štúdium metabolizmu liečiv

Vplyvom biotransformácie sa môže tvoriť metabolit, ktorý má v porovnaní s materskou látkou farmakologický účinok nižší, rovnaký, vyšší, prípadne kvalitatívne rozdielny (76). Metabolizmus takto môže mať zásadný vplyv taktiež na toxikologický profil liečiv. Z tohto dôvodu je dôležité študovať metabolizmus už v rannej fáze vývoja potenciálneho liečiva (3).

In vitro modely

Inkubácia študovaného liečiva *in vitro* patrí medzi jednoduché a lacné metódy poskytujúce rýchlu informáciu o biotransformácii vyvíjaného liečiva, štruktúre hlavných metabolitov, enzýmoch zapojených do metabolizmu a odhaliť možnosť prípadných interakcií medzi rôznymi liečivami. Ďalší prínos spočíva v jednoduchom porovnaní metabolizmu medzi človekom a rôznymi živočíšnymi druhmi, ktorý je následne využiteľný pre *in vivo* modely v preklinickej fáze vývoja (76).

Pri *in vitro* modeloch sa zvyčajne využíva biotransformácia pomocou:

1. Bunečných rezov alebo hepatocytov – jedná sa o fyziologicky najrelevantnejší *in vitro* model pre kvalitatívne aj kvantitatívne hodnotenie metabolitov 1. a 2. fáze, pretože obsahuje prakticky kompletnú škálu enzýmov a kofaktorov. Nevýhodou je však nestála enzymatická aktivita, možné problémy s difúziou testovaného liečiva do hepatocytov ako aj vysoké nároky na samotné manuálne zaobchádzanie.

2. Subcelulárnych frakcií – patrí medzi najpoužívanejšiu metódu. Východným materiálom je najčastejšie tkanivo pečene. Frakcie sa ďalej rozdeľujú na:

- a) **S9 frakciu** - supernatant vznikajúci centrifugáciou homogenátu tkaniva pri otáčkach $12\,000 \times g$ počas 10 min. Je zmesou mikrozómov a cytosolu, obsahuje celú škálu enzýmov zapojených v 1. aj 2. fáze biotransformácie.
- b) **Cytosol** - supernatant vznikajúci ďalšou centrifugáciou S9 frakcie pri otáčkach $100\,000 \times g$ počas 1 hod. Obsahuje hlavne enzýmy zapojené v konjugačnej fáze.
- c) **Mikrozómy** - výsledny sediment centrifugácie. Jedná sa o vezikuly endoplazmatického retikula obsahujúceho enzýmy CYP450, a preto sa najčastejšie využívajú pri štúdiu metabolizmu 1. fázy.

3. Rekombinantných enzýmov – umožňujú sledovať metabolizmus konkrétnym enzýmom. Výhodou je možnosť prípravy minoritne sa vyskytujúceho enzýmu (76).

***In vivo* modely**

Využitie *in vitro* modelu biotransformácie potenciálneho liečiva poskytuje cenné informácie pre jeho ďalší vývoj, no v žiadnom prípade nemôže nahradiť komplexnosť *in vivo* modelu. Z tohto dôvodu by pri akýchkoľvek rozdieloch medzi oboma prístupmi mali mať výsledky získané z *in vivo* pokusov vždy prednosť (76).

In vivo modely v preklinických štúdiách najčastejšie využívajú rôzne laboratorne zvieratá (napr. myš, potkan, králik, opica, pes). Po aplikácii liečiva testovanému zvieraťu je následne odobraný biologický materiál (napr. krv, moč, faeces, sliny, žlč), ktorý je využitý pre vyhľadávanie produktov biotransformácie (77).

Dôležitým hľadiskom sú však interindividuálne rozdiely v metabolizme medzi živočíšnymi druhmi, a to najmä vo vzťahu k metabolizmu u človeka.

V niektorých prípadoch totiž môže u človeka vznikáť metabolit, ktorý nebol detegovaný u žiadneho laboratórneho zvierat'a, prípadne sa metabolit môže tvoriť vo výrazne väčšom množstve (78).

**4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ
(KOMENTÁR
K PUBLIKOVANÝM PRÁCAM)**

4.1. Využitie analytických metód pri vývoji nových potenciálnych liečiv odvodených od thiosemikarbazonu

V úvodnej fáze vývoja potenciálnych liečiv odvodených od thiosemikarbazonu bolo potrebné vyhodnotiť ich *in vitro* stabilitu. Táto požiadavka vyplynula z výsledkov predchádzajúcich experimentov, ktoré poukázali na nízku stabilitu u aroylhydrazonových predchodcov a predovšetkým ich krátky biologický polčas. Tie podliehali rýchlemu rozkladu v *in vitro* podmienkach vplyvom štiepenia iminovej väzby a následne boli tieto rozkladné produkty detegované aj *in vivo*. Vzhľadom na prítomnosť rovnakej funkčnej skupiny aj u thiosemikarbazonových nástupcov bolo preto vhodné overiť aj u nich prítomnosť tohto nežiaduceho javu (79, 80).

Rozhodli sme sa otestovať *in vitro* stabilitu u dvoch modelových thiosemikarbazonov (2-hydroxy-1-naftylaldehyd-4-methyl-3-thiosemikarbazonu - N4mT a di(2-pyridyl)keton-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazonu - Dp44mT) v priebehu ich inkubácie v ľudskej, hovädzej a králičej plazme (PRÁCA 1). Okrem hodnotenia náchylnosti iminovej väzby k hydrolýze sme sa chceli zamerať aj na detekciu prípadných oxidačných produktov vznikajúcich možnou konverziou thiokarbonylovej skupiny na karbonylovú. Pre obe látky sme museli vyvinúť nové analytické metódy, pretože v literatúre nebol nájdený záznam o vhodných metodikách. Zvolili sme HPLC s UV detekciou, u ktorej bola základnou požiadavkou separácia materskej látky, aromatických produktov hydrolýzy (2-hydroxy-1-naftylaldehyd – HnA v prípade N4mT a di(2-pyridyl)keton – DpK u Dp44mT), produktu oxidácie a vybraného vnútorného štandardu (2-hydroxy-1-naftylaldehyd-3-thiosemikarbazonu – NT). Thiosemikarbazidové hydrolytické produkty neboli hodnotené vzhľadom na ich rýchlu elúciu spolu s balastmi z plazmy.

V prípade N4mT bola najlepšia separácia dosiahnutá na kolóne Discovery HS F5 (250×4 mm, 5µm, Sigma-Aldrich), pri použití mobilnej fázy zloženej z 2 mM vodného roztoku EDTA a acetonitrilu (50:50; v/v). Rovnaká kolóna bola využitá aj u Dp44mT, no mobilná fáza pozostávala z vodnej složky (2 mM roztoku EDTA v 10 mM octane amónnom - pH 4,5) a acetonitrilu (62:38, v/v). Ako metóda

úpravy vzorku bola zvolená extrakcia na pevnej fáze na kolónkach C18 (Discovery C18, Sigma-Aldrich) v prípade N4mT a fenylových (Discovery Ph, Sigma-Aldrich) u Dp44mT. Vyvinuté analytické metódy boli následne validované podľa smerníc FDA, kde medzi testovanými validačnými parametrami bola selektivita, kalibračná krivka, správnosť, presnosť, limit kvantifikácie, výťažnosť metódy úpravy vzorku a stabilita.

Oba chelátory boli inkubované počas 24 hod pri koncentrácii 100 μM a $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$ ($n=4$). Za účelom porovnania bola do experimentu pridaná aj materská látka aroylhydrazonovej skupiny (pyridoxal-isonikotinoylhydrazon – PIH). Miera stability bola vyjadrená ako pokles koncentrácie východiskovej látky v čase.

Výsledky tejto štúdie poukázali na vyššiu stabilitu nových thiosemikarbazonových chelátorov v porovnaní s aroylhydrazonmi. Po 24 hod bolo v králičej plazme 68%, v hovädzej 72% a v ľudskej 63% počiatočného množstva N4mT. V prípade Dp44mT bolo na konci experimentu v králičej plazme 65%, v hovädzej 80% a v ľudskej 93% tejto látky. Pre porovnanie, koncentrácia PIH klesla pod 40% z pôvodnej hodnoty v priebehu 20-40 min. Nižšia stabilita N4mT v porovnaní s Dp44mT v ľudskej plazme by mohla byť spôsobená rozdielom v ich štruktúre. Zatiaľ čo N4mT je derivát aldehydu, Dp44mT je štruktúrne odvodený od ketonu. Vo vzorkách Dp44mT sa nám na konci experimentu podarilo detegovať DpK a oxidačný produkt. U N4mT sme prítomnosť adekvátnych zlúčenín nepozorovali, čo je v prípade HnA spôsobené jeho vlastným rozkladom v plazme.

Poznatky získané v tejto práci mali zásadný význam pre ďalšie pokračovanie výskumu thiosemikarbazonových protinádorových liečiv. Ich vyššia stabilita v plazme v porovnaní s aroylhydrazonovými predchodcami môže byť výhodou z pohľadu farmakokinetiky a trvania farmakologického účinku.

Predpokladom ďalšieho vývoja tejto skupiny potenciálnych liečiv je štúdium ich osudu v organizme. Pre tento účel bol zvolený 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazon (Bp4eT), ktorý vykazoval vysoký antiproliferatívny účinok *in vitro*. **Vzhľadom na nízku rozpustnosť Bp4eT vo fyziologickom roztoku bolo potrebné navrhnúť vhodné zloženie pilotnej farmaceutickej formulácie pre *i.v.* podanie tejto látky v preklinických experimentoch (PRÁCA 2).** Táto látka je taktiež zaujímavá z analytického hľadiska z dôvodu jej výskytu v dvoch izomérnych

formách. Pevnú substanciu tvorí *Z* izomér, ktorý vo vodnom prostredí konvertuje na *E* izomér, pričom obe štruktúry spolu koexistujú. Ďalšou komplikáciou je absencia štandardu *E* izoméru, a tiež rozdiel v absorpčných spektrách oboch foriem, ktorý by komplikoval kvantifikáciu založenú na jednoduchom sčítaní plôch oboch píkovi pri UV detekcii. Riešením sa preto zdala byť hmotnostná detekcia, ktorá by zároveň mohla poskytnúť výhodu vyššej citlivosti a selektivity.

Základnú charakteristiku Bp4eT pri použití MS detektoru (iónovej pasce) sme získali priamou infúziou jeho štandardu do zdroja s využitím ionizácie ESI a APCI. Látka vykazovala vyššiu odozvu v pozitívnom móde, v ktorom bola pozorovaná prítomnosť najmä protonizovanej formy ($[M+H]^+$ pri m/z 285). Pri ionizácii elektrosprejom bol taktiež viditeľný vznik sodíkových aduktov ($[M+Na]^+$ pri m/z 307). Súčasne bola popísaná fragmentácia MS^2 a MS^3 u Bp4eT a zamýšľaného vnútorného štandardu (N4mT).

Následne sme sa sústredili na vývoj chromatografických podmienok pre dosiahnutie dostatočného rozdelenia oboch izomérov a IS, ktoré sme docielili na kolóne Synergi 4u Polar RP (150×3 mm, 4 μ m, Phenomenex) pri použití mobilnej fázy zloženej z 2 mM mravenčanu amónneho, acetonitrilu a metanolu (30:63:7; $v/v/v$). Bp4eT vrátane N4mT boli detegované v SRM móde (m/z 285 \rightarrow m/z 240 pre Bp4eT; m/z 260 \rightarrow m/z 229 pre N4mT). Opakovaná analýza vodného roztoku Bp4eT v priebehu jednej hodiny poukázala na rýchlu konverziu medzi oboma izomérmi.

Napokon sme sa zamerali na nastavenie optimálnych podmienok ionizácie, kde hlavným kritériom bolo dosiahnutie kvantifikácie Bp4eT pomocou jednoduchého sčítania plôch píkovi oboch jeho izomérov. ESI sa ukázala ako nevhodná, pretože obe štruktúry boli rozdielnou mierou náchylné k tvorbe aduktov so sodíkom ($[M+Na]^+$). Na druhej strane, v prípade APCI nebol vznik aduktov pozorovaný, a zároveň sme potvrdili rovnakú odozvu detektoru pre ióny $[M+H]^+$ u oboch izomérov. Metóda bola validovaná s ohľadom na selektivitu, kalibračnú krivku, presnosť, správnosť a efekt matrice.

Metódu sme následne využili pri optimalizácii zloženia formulácie pre *i.v.* aplikáciu tejto látky. V úvode sme sledovali vplyv pH na rozpustnosť Bp4eT v octanovom a fosforečnanovom pufri, pričom zvolené pH rozmedzie (3,0 – 7,0) reflektovalo povolené rozmedzie pre *i.v.* podanie liečiv. Zároveň sme hodnotili rozpustnosť vo fyziologickom roztoku (pH 5,5), pufrovanom fyziologickom roztoku

(phosphate buffered saline - PBS, pH 7,4) a v roztokoch vybraných farmaceutických kosolventoch (prolypenglykol – PG, polyethylenglykol 300 – PEG 300, ethanol 96% – EtOH) vo fyziologickom roztoku. Testované boli nasledujúce koncentrácie kosolventov: 20 a 60% PG, 20 a 50% PEG 300, 20% EtOH, pričom vyšší obsah pomocného rozpúšťadla reprezentoval jeho maximálnu koncentráciu, ktorá nespôsobuje lokálne podráždenie, hemolýzu alebo výraznú toxicitu po *i.v.* aplikácii maximálneho odporúčaného objemu u myši alebo potkana.

Výsledky experimentov poukázali na nízku rozpustnosť Bp4eT v oboch pufroch, avšak možnosť jej modifikácie vplyvom ionizácie testovanej látky s markantným nárastom rozpustnosti až pri pH 3,0 (cca 5×). Takto kyslý roztok už predstavuje dolný limit pre *i.v.* podanie a môže spôsobovať lokálnu dráždivosť, preto sme zvolili pH 4, pri ktorom bola najvyššia rozpustnosť pozorovaná u octanového pufru. Na druhej strane, v prípade farmaceutických kosolventov došlo k podstatne výraznejšiemu nárastu rozpustnosti (cca 10 - 100×) s najvyššou hodnotou 0,5 mg.ml⁻¹ u kombinácie PEG 300 a fyziologického roztoku (50:50, *v/v*). Následná zámena fyziologického roztoku za octanový pufr o pH 4,0 nemala na rozpustnosť žiadny vplyv, avšak ďalší výraznejší nárast (cca 3,5×) bol dosiahnutý nahradením 10% fyziologického roztoku za EtOH. Na základe výsledkov tejto štúdie bola **formulácia zložená z PEG 300, fyziologického roztoku a EtOH (50:40:10, *v/v/v*) zvolená pre využitie v ďalšej fáze *in vivo* experimentov.**

Štúdium metabolizmu patrí medzi základné predpoklady pre ďalší pokrok vo výskume a vývoji nových liečiv. U nových derivátov thiosemikarbazonu je tento aspekt zvýraznený nedostatkom informácií o biotransformácii štruktúrne podobných látok. Jedine v prípade Triapinu, thiosemikarbazonového derivátu testovaného v 2. fáze klinických skúšok, boli v literatúre publikované dáta o možnom metabolizme pomocou hydroxylácie a acetylácie, avšak aj u tejto látky chýba detailný štruktúrny popis metabolitov. **V ďalšej fáze analytického hodnotenia thiosemikarbazonových liečiv sme sa preto zamerali na charakterizáciu štruktúry *in vitro* a *in vivo* metabolitov 1. fáze u Bp4eT (PRÁCA 3).**

Za účelom získania prvotných informácií o štruktúre možných metabolitov sme inkubovali Bp4eT s ľudskou resp. potkaňou mikrozomálnou a cytosolickou frakciou pečene. Po centrifugácii a nariedení sme vzorky analyzovali na kolóne Discovery HS C18 (75×4,6 mm, 3 μm, Sigma-Aldrich) s využitím mobilnej fáze

zloženej z 2 mM mravenčanu amónneho (A) a acetonitrilu (B) v gradientovom móde: 0-20,0 min (20-60% B); 20,0-33,0 min (60% B); 33,0-33,1 min (60-20% B); 33,1-44,0 min (20% B). Metabolity sme identifikovali na základe analýzy dát z MS (iónová pasca). Štúdiom fragmentácie sme navrhli, že by sa Bp4eT mohlo biotransformovať cestou oxidácie thiokarbonylovej skupiny pri súčasnom vzniku produktov so štruktúrou semikarbazonu (metabolit 1 – M1, m/z 269) a amidrazonu (metabolit 2 – M2, m/z 253). V prípade metabolitu M1 sme detegovali dva dostatočne separované píky s rovnakou fragmentáciou. To by mohlo byť vysvetľované prítomnosťou *E/Z* izomérov podobne ako u materskej látky. V prípade m/z 253 (metabolit M2) boli objavené dva koelujúce píky, ktoré by mohli patriť jednak jeho *E/Z* izomérom, prípadne aj tautomérom.

Hypotézu, že oba metabolity vznikajú oxidáciou materskej látky sme následne taktiež potvrdili HPLC-MS/MS analýzou roztoku Bp4eT, ktorý bol podrobený oxidácii pomocou H_2O_2 . Oba navrhnuté metabolity sme detegovali v tejto reakčnej zmesi. Následne sme ich izolovali s využitím preparatívnej TLC chromatografie a ich štruktúra bola potvrdená pomocou NMR a IČ spektrometrie.

Nakoniec sme Bp4eT aplikovali intravenózne potkanovi ($n=3$) pomocou formulácie vyvinutej v predchádzajúcej práci. Cieľom tohto experimentu bolo potvrdenie prítomnosti metabolitov identifikovaných *in vitro*, a súčasne hľadanie nových metabolických produktov vznikajúcich *in vivo*. Potkanovi sme 120 min po aplikácii odobrali krv, zatiaľ čo sa moč a faeces kontinuálne zhromažďovali v metabolickej klietke po dobu 24 hod. Vzorky plazmy a moči sme upravili pomocou SPE, no v prípade faeces sme zvolili LLE. Vo všetkých biologických vzorkách sme potvrdili prítomnosť metabolitov M1 a M2. V prípade iónu pri m/z 269 bol však vedľa dvoch izomérov M1 vo všetkých biologických vzorkách detegovaný nový metabolit - M3. Vzhľadom na fragmentáciu podobnú metabolitu M2 sme navrhli, že by sa mohlo jednať o jeho hydroxylovaný, prípadne *N*-oxidovaný analóg. Pretože je obvykle problematické rozlíšiť tieto metabolity s využitím ESI, sledovali sme ionizáciu metabolitu M3 pomocou APCI, s využitím ktorej je možné pozorovať u hydroxylovaných metabolitov stratu vody, ktorá chýba u *N*-oxidov (81, 82). V našej štúdií sme pri použití APCI pozorovali vyššie diskutovanú stratu vody ($\Delta m/z$ 18), čo poukazuje na prítomnosť hydroxy skupiny, zatiaľ čo deoxygenácia ($\Delta m/z$ 16), typická pre *N*-oxidy, nebola detegovaná. Okrem toho výrazne nižšia

retencia M3 v porovnaní s M2 taktiež favorizuje hydroxyláciu pred *N*-oxidáciou (26).

V žiadnych *in vivo* vzorkách neboli nájdené produkty štiepenia iminovej väzby, ktoré sme v malej miere pozorovali u Dp44mT v *in vitro* podmienkach po 24 hod (PRÁCA 1). **Výsledky tejto štúdie naznačujú, že enzýmy prítomne v pečeni nie sú zodpovedné za hydrolýzu thiosemikarbazonových liečiv a v ich biotransformácii sa v najväčšej miere uplatňuje oxidácia thiokarbonylovej skupiny a následná hydroxylácia.** Tieto poznatky budú využité pri vývoji a validácii analytickej metódy vhodnej pre stanovenie Bp4eT a jeho metabolitov v biologickom materiáli, ktorú následne uplatníme v plánovanom farmakokinetickom experimente.

Pokračujúci výskum thiosemikarbazonových chelátorov železa viedol k vývoji nového potenciálneho liečiva di(2-pyridyl)keton-4-methyl-4-cyklohexyl-3-thiosemikarbazonu – DpC. Látka vykazovala vysoký cytostatický efekt a súčasne boli potlačené nežiaduce účinky popísané u štruktúrne blízkeho analóga (Dp44mT), preto sme sa rozhodli zamerať na štúdium metabolizmu u tohto nového cytostatika. **Cieľom ďalšej práce bola identifikácia metabolitov 1. a 2. fáze u DpC vznikajúcich *in vitro* (PRÁCA 4).** Táto práca bola vykonaná na zahraničnom pracovisku (Centre for Drug Research, University of Helsinki, Fínsko).

Biotransformáciu 1. fáze sme simulovali inkubáciou DpC s ľudskou mikrozomálnou frakciou pečene. Pre štúdium tvorby glukuronidov sme taktiež využili mikrozomálnu frakciu, no v prípade sulfonátov a konjugátov s glutathionom sme DpC inkubovali s S9 frakciou pečene. Po centrifugácii a nariedení sme vzorky analyzovali pomocou UPLC systému na kolóne Acquity UPLC BEH C18 (100 × 2,1 mm, 1,7 μm). Dostatočnú separáciu materskej látky a metabolitov sme dosiahli využitím mobilnej fáze pozostávajúcej z 2 mM octanu amónneho (A) a acetonitrilu (B) pri použití nasledujúceho gradientu: 0-7,0 min (10-95% B); 7,0-9,5 min (95% B); 9,5-9,7 min (95-10% B) a 9,7-12,0 min (10% B). V prípade detekcie sme využili hybridný hmotnostný spektrometer QTOF v kombinácii s ESI a internou kalibráciou. Tento systém umožňoval vykonať analýzu s vysokým rozlíšením ($R \sim 10000$) a presným určením hmoty (<5 ppm). Už pri vývoji metódy sme však narazili na markantný problém s citlivosťou detekcie materskej látky, ktorá v priebehu analýzy tvorila komplexy so železom. Tento problém sme eliminovali

jednorazovým prepláchnutím kolóny vodným roztokom EDTA, a zároveň jej nástrekom pred každou analýzou s elúciou do odpadu.

V prípade identifikácie metabolitov sme porovnávali testované a kontrolné vzorky jednak s využitím softvéru Metabolynx XS (verzia V4.1) ako aj manuálne. Štruktúru metabolitov sme spočiatku navrhli na základe dát získaných analýzou s vysokým rozlíšením a presným určením hmoty. Predpokladané štruktúry metabolických produktov sme následne potvrdili pomocou štúdia ich fragmentácie. **Spolu sme identifikovali 10 metabolitov 1. fáze a 2 konjugačné metabolity. Veľkú skupinu metabolitov 1. fáze tvorili produkty oxidácie thiokarbonylovej skupiny podobne ako u Bp4eT, za súčasného vzniku semikarbazonového a amidrazonového skeletu. Medzi ďalšie identifikované biotransformačné procesy patrila N-demethylácia, hydroxylácia, otvorenie cyklohexylu spojeného s adíciou vody, a zároveň rôzne kombinácie týchto reakcií. Jedine u metabolitu M10 sme však nemohli pomocou MS/MS fragmentácie jednoznačne rozlíšiť medzi prítomnosťou hydroxyly alebo N-oxidu, pretože nebolo možné využiť APCI. V prípade konjugačných metabolitov sme objavili glukuronid materskej látky a metabolitu M10, no sulfonáty ani konjugáty s glutathionom neboli detegované.**

Táto práca potvrdila veľký potenciál ultra vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie v kombinácii s modernou MS detekciou v oblasti identifikácie metabolitov. Získané dáta budú využité v plánovaných experimentoch zameraných na identifikáciu metabolitov DpC *in vivo*.

4.2. Štúdium potenciálu HILIC pri analytickom hodnotení dexrazoxanu a jeho polárnych metabolitov

Dexrazoxan je v súčasnosti jediným klinicky dostupným liečivom určeným pre ochranu myokardu proti toxickým účinkom antracyklinových cytostatik. Napriek predpokladu, že je dexrazoxan pro-liečivo, ktorého kardioprotektívny účinok je sprostredkovaný aktívnymi metabolitmi, predovšetkým ADR-925, nie je v tejto otázke doposiaľ úplne jasno. Tento fakt do istej miery bráni vývoju nových kardioprotektív. Posun v tejto oblasti je čiastočne limitovaný nedostatkom vhodných a hlavne citlivých analytických techník, schopných stanovenia dexrazoxanu a jeho polárnych metabolitov (B, C, ADR-925) priamo v mieste účinku. Všetky doposiaľ publikované práce využívali pri ich spoločnej analýze reverzný mód za podmienok, ktoré nedovoľovali použitie citlivejšej MS detekcie. **V tejto práci sme sa preto zamerali na možnosť využitia HILIC módu pre analýzu dexrazoxanu a jeho metabolitov, pričom sme sa predovšetkým sústredili na porovnanie vhodnosti vybraných fáz pre separáciu a štúdium jej mechanizmu za podmienok kompatibilných s MS detekciou.**

Do štúdie sme zahrnuli HILIC kolóny s dvomi základnými typmi stacionárnych fáz: (1) čistý silikagel (Ascentis Express HILIC, 150×2,1 mm, 2,7 µm, Sigma-Aldrich; Atlantis HILIC Silica, 150×2,1 mm, 3 µm, Waters), (2) silikagel modifikovaný zwiterionmi (ZIC HILIC, 150×2,1 mm, 3,5 µm, Merck; Obelisc N, 150×3,2 mm, 5 µm, Sielc). Medzi zwiterionovými kolónami bol navyše rozdiel v rozložení náboja - u ZIC HILIC boli prítomné sulfoalkylbetainové skupiny s distálnou pozíciou záporného náboja, zatiaľ čo Obelisc N mal rozloženie náboja opačné. Retenčné chovanie všetkých analytov sme spočiatku hodnotili pomocou HPLC-UV, kde sme sledovali vplyv elučnej sily mobilnej fáze, pH, pufru a teploty na kolóne. Rozmedzie experimentálnych podmienok sme zvolili s ohľadom na dosiahnutie najlepšej separácie všetkých analytov za izokratických podmienok v akceptovateľnom čase (<40 min), kompatibilitu s MS detekciou a pri súčasnom rešpektovaní medzných hodnôt odporúčaných výrobcami jednotlivých kolôn.

Poradie elúcie analytov bolo na všetkých kolónach rovnaké, pričom najmenej zadržovaný bol dexrazoxan ($k < 0,35$), zatiaľ čo sa ADR-925 vymývalo najpomalšie. Retenčné faktory všetkých analytov boli závislé na podiele vody v mobilnej fáze a znižovali sa s jej vyšším obsahom.

Separáciu pozičných izomérov B a C sme nemohli dosiahnuť použitím kolón na báze čistého silikagelu, pretože koeluovali buď navzájom alebo s dexrazoxanom. Na kolóne Obelisc N došlo k ich rozdeleniu pri použití mobilnej fáze iba bez prídavku pufru, zatiaľ čo jeho prídavok bol nutný pre elúciu ADR-925. Jedine na kolóne ZIC HILIC sme boli schopní separovať všetky sledované analyty v jednej analýze.

Mechanizmus retencie sme sa snažili objasniť pomocou analýzy vplyvu jednotlivých zmien v chromatografických podmienkach na retenčné správanie analytov. Prítomnosť rozdeľovania alebo adsorpcie sme hodnotili porovnaním závislosti retenčného faktoru na objeme vodnej frakcie v lineárnom a logaritmickom rozmedzí. Na všetkých kolónach sme v prípade dexrazoxanu pozorovali prevahu adsorpcie, no u ostatných analytov nebola ostrá hranica medzi adsorpciou a rozdeľovaním. Na druhej strane, zvýšenie teploty viedlo k vyššiemu zadržaniu všetkých analytov, čo poukázalo skôr na zapojenie rozdeľovania. Retencia všetkých analytov, okrem dexrazoxanu, bola taktiež závislá na zmenách pH v mobilnej fáze, čo naznačilo aj na zapojenie iónovej interakcie.

Na základe výsledkov systematického hodnotenia retenčného správania sme najlepšie chromatografické podmienky nakoniec otestovali pri HPLC-MS analýze. **Spoločnú separáciu dexrazoxanu a jeho metabolitov pri použití hmotnostnej detekcie sme dosiahli iba na kolóne ZIC HILIC s využitím mobilnej fáze zloženej z 0,5 mM mravenčanu amónneho a acetonitrilu (25:75, v/v).**

Táto štúdia ukázala, že je princíp HILIC možné využiť pre analýzu dexrazoxanu a jeho polárnych metabolitov, no komplikáciou je nízka retencia materskej látky, a tak možnosť koelúcie s hydrofilnými balastmi prítomnými v biologickej matrici. Výsledky tejto práce taktiež poukazujú na prítomnosť komplexného mechanizmu retencie v HILIC móde, v ktorom sa môže uplatniť adsorpcia, rozdeľovanie a iónová interakcia.

5. ZÁVER

Teoretická časť dizertačnej práce sa venovala popisu základných aspektov HPLC s dôrazom na analýzu liečiv v biologickom materiáli. Ďalšia pozornosť bola venovaná charakterizácii analyzovaných látok a najmä ich mechanizmu účinku založenom na chelatácii železa.

Náplňou prvého tematického celku experimentálnej časti bolo analytické hodnotenie potenciálnych liečiv odvodených od thiosemikarbazonu. V úvode boli vyvinuté a validované HPLC-UV metódy pre analýzu N4mT a Dp44mT v biologickom materiáli a následne boli aplikované do štúdie zameranej na hodnotenie ich *in vitro* stability v plazme. Stabilita týchto thiosemikarbazonov bola porovnaná s aroylhydrazonovými predchodcami. Práca preukázala, že nové potenciálne liečiva odvodené od thiosemikarbazonu sú oproti aroylhydrazonom v plazme odolnejšie voči hydrolýze iminovej väzby.

Ďalšia práca sa venovala analytickému hodnoteniu nového thiosemikarbazového chelátoru – Bp4eT pomocou HPLC-MS/MS. Vďaka využitiu MS detektoru, a najmä optimalizácii ionizácie, bolo možné dosiahnuť kvantifikáciu jednoduchým sčítaným plôch píkovo jeho *E/Z* izomérov. Metóda bola úspešne validovaná a aplikovaná do štúdie rozpustnosti Bp4eT a návrhu formulácie pre *i.v.* aplikáciu tejto látky v preklinických experimentoch.

Vzápätí bola pozornosť venovaná štúdiu *in vitro* a zároveň *in vivo* metabolizmu 1. fáze u Bp4eT pomocou HPLC-MS/MS. Vo vzorkách z *in vitro* inkubácií boli detegované dva oxidačné metabolity, ktorých štruktúra bola spočiatku navrhnutá na základe fragmentácie. Následne boli u oboch pripravené štandardy a ich štruktúra bola potvrdená pomocou NMR a IČ spektrometrie. Tieto metabolity boli taktiež detegované vo vzorkách z *in vivo* experimentu, u ktorého bol navyše objavený aj hydroxylovaný metabolický produkt.

Posledná práca prvého tematického celku bola zameraná na štruktúrnu charakterizáciu *in vitro* metabolitov 1. a 2. fáze u DpC s použitím UPLC-QTOF. Štruktúra metabolických produktov bola spočiatku navrhnutá na základe analýz s vysokým rozlíšením a presným určením hmoty a napokon definitívne potvrdená rozborom fragmentácie. Spolu bolo detegovaných 10 metabolitov 1. fáze medzi ktoré patrili produkty oxidácie thiokarbonylovej skupiny, *N*-demethylácie, hydroxylácie, otvorenia cyklohexylu spojeného s adíciou vody, a zároveň rôzne kombinácie týchto reakcií. V prípade konjugačných metabolitov bol detegovaný glukuronid materskej

látky a jedného z metabolických produktov 1. fáze, zatiaľ čo sulfáty a konjugáty s glutathionom neboli identifikované.

Druhý celok bol zameraný na štúdium možnosti separácie klinicky užívaného liečiva – dexrazoxanu a jeho polárnych metabolitov (B, C, ADR-925) pomocou HILIC za podmienok kompatibilných s MS, a zároveň popisu mechanizmu ich retencie. Rozdelenie všetkých analytov bolo dosiahnuté iba na stacionárnej fáze modifikovanej zwiterionmi. Experimenty taktiež potvrdili prítomnosť rôznych retenčných mechanizmov v HILIC móde.

6. ABSTRAKT

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické chemie a kontroly liečiv

Kandidát Mgr. Ján Stariat

Školiteľ Prof. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.

Názov dizertačnej práce Analytické hodnotenie liečiv a potenciálnych liečiv zo skupiny látok chelatujúcich železo

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) má v analýze liečiv dominantné postavenie, pretože patrí medzi robustné techniky, umožňujúce dosiahnutie účinnej separácie väčšiny analytov prítomných vo vzorku, a zároveň ich kvalitatívne aj kvantitatívne hodnotenie. Pokroky vo vývoji stacionárnych fáz a detekčných techník umožňujú výrazne skrátiť čas analýzy, a zároveň získať celé spektrum informácií o povahe analytov prítomných vo vzorkách aj vo veľmi nízkych koncentráciách.

Nádorové ochorenia sa stále radia medzi významné príčiny smrti, z čoho vyplýva požiadavka na vývoj nových liečebných postupov. Stratégia založená na chelatácii železa vnútri nádorových buniek by mohla výraznou mierou prispieť k zlepšeniu prognózy u pacientov s tumormi rezistentnými voči štandardnej chemoterapii. Tento mechanizmus antiproliferatívneho pôsobenia je aktívne rozvíjaný u novej skupiny potenciálnych liečiv štruktúrne odvodených od thiosemikarbazonu, u ktorých bol cytostatický účinok pozorovaný *in vitro* aj *in vivo*. Ďalší pokrok v tejto oblasti je výraznou mierou závislý na dostupnosti vhodných bioanalytických metód pre hodnotenie týchto potenciálnych liečiv v biologickom materiáli.

Princíp chelatácie železa je taktiež spomínaný aj v prípade mechanizmu účinku dexrazoxanu – jediného klinicky dostupného kardioprotektíva schopného chrániť myokard pred toxickými účinkami antracyklinov. Tento princíp však doposiaľ nebol jednoznačne potvrdený, čo je do istej miery spôsobené nedostupnosťou bioanalytickej metódy schopnej hodnotenia tohto liečiva a jeho aktívnych metabolitov v mieste jeho pôsobenia – v srdečnom tkanive.

Prvý tematický celok tejto dizertačnej práce bol zameraný na analytické hodnotenie chelátorov železa odvodených od thiosemikarbazonu. V úvodnej fáze boli vyvinuté a validované HPLC-UV metódy pre hodnotenie *in vitro* stability u 2-hydroxy-1-naftylaldehyd-4-methyl-3-thiosemikarbazonu (N4mT) a di(2-pyridyl)keton-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazonu (Dp44mT) v plazme, ktorá bola zároveň porovnaná so stabilitou pyridoxal-isonikotinoylhydrazonu (PIH) – materskej látky aroylhydrazonových chelátorov. Výsledky tejto práce poukázali na vyššiu stabilitu nových thiosemikarbazonov v porovnaní s ich aroylhydrazonovými predchodcami.

Následne bola vyvinutá a validovaná HPLC-MS/MS metóda schopná kvantifikácie *E/Z* izomérov 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazonu (Bp4eT). Metóda bola využitá v štúdiu rozpustnosti Bp4eT vo vodných rozpúšťadlách a farmaceutických kosolventoch, a súčasne bolo navrhnuté zloženie formulácie vhodné pre *i.v.* podanie tejto látky.

Vzápätí bol študovaný *in vitro* a *in vivo* metabolizmus 1. fáze u Bp4eT. Štruktúry dvoch metabolitov detegovaných v *in vitro* vzorkách boli navrhnuté na základe výsledkov HPLC-MS/MS experimentov, a následne potvrdené pomocou NMR a IČ spektrometrie. Oba oxidačné metabolity boli taktiež detegované *in vivo*, a zároveň tu bol identifikovaný nový

hydroxylovaný metabolický produkt.

Posledná práca prvého celku bola venovaná novo pripravenému thiosemikarbazonovému analógu - di(2-pyridyl)keton-4-methyl-4-cyklohexyl-3-thiosemikarbazonu (DpC), u ktorého bol detailne skúmaný *in vitro* metabolizmus 1. a 2. fáze pomocou UPLC-QTOF metódy. Štruktúry metabolitov boli spočiatku navrhnuté na základe dát získaných analýzou s vysokým rozlíšením a presným určením hmoty a vzápätí potvrdené pomocou štúdia ich fragmentácie. Spolu bolo detegovaných 10 metabolitov 1. fáze medzi ktoré patrili produkty oxidácie thiokarbonylovej skupiny, *N*-demethylácie, hydroxylácie, otvorenia cyklohexylu spojeného s adíciou vody, a zároveň rôzne kombinácie týchto reakcií. V prípade konjugačných metabolitov boli detegované dva glukuronidy, zatiaľ čo sulfáty a konjugáty s glutathionom neboli objavené.

Náplňou druhého celku bolo štúdium možnosti separácie a popisu mechanizmu retencie u dexrazoxanu a jeho metabolitov v HILIC móde za podmienok kompatibilných s hmotnostnou detekciou. Separácia všetkých analytov bola dosiahnutá iba na kolóne so stacionárnou fázou na báze zwitterionov. Výsledky tejto práce taktiež potvrdzujú prítomnosť komplexného mechanizmu retencie v HILIC móde, v ktorom sa môže uplatniť adsorpcia, rozdeľovanie a iónová interakcia.

7. ABSTRACT

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate Mgr. Ján Stariat

Supervisor Prof. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.

Title of Doctoral Thesis Analytical evaluation of drugs and drug candidates from the
group of iron chelating agents

High performance liquid chromatography (HPLC) ranks among the most important analytical techniques in the field of pharmaceutical analysis thanks to its robustness and the ability to separate and qualitatively and quantitatively analyse the compounds presented in various samples. The ongoing progress in the development of novel stationary phases and detection techniques allows rapid analysis and to get comprehensive characterization of the analytes presented in the complex samples even at very low concentrations.

Cancer still remains a leading cause of death, thus the need for novel, efficient treatment strategies is of crucial importance. The mechanism based on iron chelation (Fe) inside the tumour cells represents one of the most promising strategy which could enhance the prognosis of patients suffering from cancer resistant to standard chemotherapy. Thiosemicarbazone iron chelators are currently under intensive development as novel anticancer drugs. Their strong antiproliferative activity has been already described both *in vitro* and *in vivo*. However, the further progress of their development strongly requires proper analytical techniques for their analysis in biological materials.

The mechanism of action of the only clinically used cardioprotectant efficient against anthracycline toxicity - dexrazoxane is also supposed to be mediated by iron chelation. However, this assumption has never been unambiguously confirmed. This could be partially caused by the lack of bioanalytical methods capable to simultaneously evaluate the drug and its active metabolites in the target organ – in a myocardium.

The first part of this doctoral thesis was focused on analytical evaluation of the thiosemicarbazone iron chelators. At the beginning, novel HPLC-UV methods were developed and validated for the determination of *in vitro* stability of 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde-4-methyl-3-thiosemicarbazone – (N4mT) and di(2-pyridyl)ketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT) in plasma. Their stability was subsequently compared with stability of the parent compound of the aroylhydrazone chelators - pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH). The results of these experiments pointed on apparently higher stability of thiosemicarbazones in comparison to their aroylhydrazone forerunners.

Novel HPLC-MS/MS method capable to quantify *E/Z* isomers of 2-benzoylpyridine-4-ethyl-3-thiosemikarbazone (Bp4eT) was developed and validated. The method was successfully applied to solubility study of Bp4eT in various aqueous media as well as pharmaceutical cosolvents. Furthermore, it was utilized to propose the composition of a pharmaceutical formulation suitable for *i.v.* application of this drug.

The phase I metabolism of Bp4eT was studied *in vitro* and *in vivo*. Two metabolites were detected *in vitro* and their chemical structures were proposed based on HPLC-MS/MS experiments. These suggestions were subsequently confirmed by the analysis of their standards characterized by NMR and IR spectrometry. Both oxidative metabolites were also

detected *in vivo* together with the newly found hydroxylated metabolic product.

The last work of the first part was focused on identification of *in vitro* phase I/II metabolites of newly developed thiosemicarbazone analog - di(2-pyridyl)ketone-4-methyl-4-cyclohexyl-3-thiosemicarbazone (DpC) using UPLC-QTOF. Initially, the chemical structures of the metabolites were proposed based on the high resolution analysis with accurate mass measurement. These were subsequently confirmed by the fragmentation study. Ten phase I metabolites were detected, among which the products of the thiocarbonyl group oxidation, *N*-demethylation, hydroxylation, cyclohexyl ring opening coupled with water addition as well as the various combinations of these reactions were identified. In the case of phase II conjugates, only two glucuronides were detected, while the sulphates and glutathione conjugates were not found.

The second part of the thesis was intended to investigate the feasibility of the HILIC mode for the simultaneous analysis of dexrazoxane and its polar metabolites (B, C, ADR-925). The particular attention was also pay on description of the retention mechanism under MS compatible chromatographic conditions. The separation of all compounds in one analytical run was achieved only on the zwitterion-based stationary phase. This systematic study of the retention behavior confirmed the participation of mixed mode retention mechanism, among which the partitioning, adsorption and ion-exchange could be involved.

8. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. **Kazakevich, Y., Lobrutto, R.** *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2007.
2. **Braithwaite, A., Smith, F. J.** *Chromatographic methods*. Heidelberg : Springer, 1995.
3. **Ramanathan, R.** *Mass spectrometry in drug metabolism and pharmacokinetics*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2009.
4. **Ahuja, S., Scypinski, S.** *Handbook of modern pharmaceutical analysis*. London : Academic Press, 2011.
5. **Dong, M. W.** *Modern HPLC for practicing scientists*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2006.
6. **Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L.** *Practical HPLC method development*. Hoboken : John Wiley & Sons, 1997.
7. **Ahuja, S., Dong, M. W.** *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. San Diego : Elsevier, 2005.
8. *Český lékopis 2009*. Praha : Grada Publishing, 2009.
9. **Boyd, R. K., Basic, C., Bethem, R. A.** *Trace quantitative analysis by mass spectrometry*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2008.
10. **Brice, R. W., Zhang, X., Colón, L. A.** Fused-core, sub-2 μm packings, and monolithic HPLC columns: a comparative evaluation. *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 2723-2731.
11. **Bunch, D. R., Wang, S.** Application of monolithic columns in liquid chromatography-based clinical chemistry assays. *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 2003-2012.
12. **Samanidou, V. F., Karageorgou, E. G.** An overview of the use of monoliths in sample preparation and analysis of milk. *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 2013-2025.
13. **D'Orazio, G., Fanali, S.** C18 silica packed capillary columns with monolithic frits prepared with UV light emitting diode: Usefulness in nano-liquid chromatography and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 2012, 1232, 176-182.
14. **Nawrocki, J., et al.** Part I. Chromatography using ultra stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chromatogr. A*. 2004, 1028, 1-30.
15. **Wyndham, K. D., et al.** Characterization and evaluation of C18 HPLC stationary phases based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles. *Anal. Chem.* 2003, 75, 6781-6788.

16. **Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W.** *Introduction to modern liquid chromatography*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2010.
17. **Jandera, P.** Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography. *Anal. Chim. Acta*. 2011, 692, 1-25.
18. **Hemström, P., Irgum, K.** Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1784-1821.
19. **McCalley, D. V.** Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compound? *J. Chromatogr. A*. 2007, 1171, 45-55.
20. **Spagou, K., et al.** Hydrophilic interaction chromatography coupled to MS for metabonomic/metabolomic studies. *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 716-727.
21. **Klimeš, J. et al.** *Kontrola léčiv I*. Praha : Karolinum, 2006.
22. **Gerstein, A. S.** *Molecular biology problem solver. A laboratory guide*. New York : John Wiley & Sons, 2001.
23. **de Hoffmann, E., Stroobant, V.** *Mass spectrometry principles and applications*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2007.
24. **Gross, J. H.** *Mass spectrometry. A Textbook*. Heidelberg : Springer, 2011.
25. **Himmelsbach, M.** 10 years of MS instrumental developments - Impact on LC-MS/MS in clinical chemistry. *J. Chromatogr. B* 2012, 883-884, 3-17.
26. **Holcapek, M., Kolářová, L., Nobilis, M.** High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 59-78.
27. **Brack, W.** *Effect-direct analysis of complex environmental contamination*. Heidelberg : Springer, 2011.
28. **McMaster, M. C.** *LC/MS. A practical user's guide*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2005.
29. **Bonfiglio, R., et al.** The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionisation response for model drug compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999, 13, 1175-1185.
30. **EMEA.** Guideline on validation of bioanalytical methods. [Online] [Cit. 10. 3. 2012.] Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.

31. **Shayne, C. G.** *Preclinical development handbook: ADME and biopharmaceutical properties*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2008.
32. **Kole, P. L., et al.** Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr.* 2010, 25, 199-217.
33. **Evans, G.** *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*. Boca Raton : CRC Press, 2004.
34. **Pawliszyn, J., Lord, H. L.** *Handbook of sample preparation*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2010.
35. **Pawliszyn, J.** *Sampling and sample preparation for field and laboratory*. Amsterdam : Elsevier, 2002.
36. **FDA, CDER and CVM.** Guidance for industry. Bioanalytical method validation. [Online] [Cit. 10. 3. 2012.] Dostupné z: www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf.
37. **Causon, R.** Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B* 1997, 689, 175-180.
38. **Guillarme, D., et al.** New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 397, 1069-1082.
39. **Nguyen, D. T., et al.** Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1836-1848.
40. **Fekete, S., Oláh, E., Fekete, J.** Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. *J. Chromatogr. A.* 2012, 1228, 57-71.
41. **Nováková, L., Vlčková, H.** A review of current trends and advances in modern bioanalytical methods: chromatography and sample preparation. *Anal. Chim. Acta.* 2009, 656, 8-35.
42. **Nováková, L., Veuthey, J. L., Guillame, D.** Practical method transfer from high performance liquid chromatography to ultra-high performance liquid chromatography: The importance of frictional heating. *J. Chromatogr. A.* 2011, 1218, 7971-7981.
43. **Youdim, K. A., Saunders, K. C.** A review of LC-MS techniques and high throughput approaches used to investigate drug metabolism by cytochrome P450s. *J. Chromatogr. B* 2010, 878, 1326-1336.

44. **Andrews, N. C.** Disorders of iron metabolism. *New Eng. J. Med.* 1999, 341, 1986-95.
45. **Johnson, E. E. a Wessling-Resnick, M.** Iron metabolism and the innate response to infection. *Microbes Infect.* 2011, 1-10.
46. **Königsberger, E., Königsberger, L.** *Bio-mineralization - medical aspects of solubility.* Hoboken : John Wiley & Sons, 2006.
47. **Moon, J.** *Iron. The most toxic metal.* Chico : George Ohsawa Macrobiotic Foundation, 2008.
48. **Kovacevic, Z., et al.** The medicinal chemistry of novel iron chelators for the treatment of cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011, 11, 483-499.
49. **Sheftel, A. D., Mason, A. B., Ponka, P.** The long history of iron in the Universe and in health disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012, 1820, 161-187.
50. **Prousek, J.** Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.* 2007, 79, 2325-2338.
51. **Yu, Y., et al.** Thiosemicarbazones from the old to new: iron chelators that are more than just ribonucleotide reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2009, 52, 5271-5294.
52. **Kovacevic, Z., et al.** Novel thiosemicarbazone iron chelators induce up-regulation and phosphorylation of the metastasis suppressor N-myc down-stream regulated gene 1: a new strategy for the treatment of pancreatic cancer. *Mol. Pharmacol.* 2011, 80, 598-609.
53. **Whitnall, M., et al.** A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *PNAS.* 2006, 103, 14901-14906.
54. **Kalinowski, D. S., et al.** Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: Structure-activity relationships of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 3716-3729.
55. **Barry, E., et al.** Anthracycline-induced cardiotoxicity: course, pathophysiology, prevention and management. *Expert. Pharmacother.* 2007, 8, 1039-1058.
56. **Cvetković, R. S., Scott, L. J.** Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs* 2005, 65, 1005-1024.

57. **Weiss, G., Loyevsky, M., Gordeuk, V. R.** Dexrazoxane (ICRF-187). *Gen. Pharmacol.* 1999, 32, 155-158.
58. **Hershko, C., et al.** The role of iron and iron chelators in anthracycline cardiotoxicity. *Leuk. Lymphoma* 1993, 11, 207-214.
59. **Schroeder, P. E., Hasinoff, B. B.** The doxorubicin-cardioprotective drug dexrazoxane undergoes metabolism in the rat to its metal ion-chelating form ADR-925. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002, 50, 509-513.
60. **Martin, E., et al.** Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology* 2009, 255, 72-79.
61. **Mouridsen, H. T., et al.** Treatment of anthracycline extravasation with Savene (dexrazoxane): results from two prospective clinical multicentre studies. *Ann. Oncol.* 2007, 18, 546-550.
62. **Burke, T. G., et al.** Characterization of the aqueous decomposition products of (+)1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)-propane (ICRF-187) by liquid chromatographic and mass spectral analysis. *J. Pharm. Sci.* 1991, 80, 338-340.
63. **Hasinoff, B. B. a Aoyama, R. G.** Relative plasma levels of the cardioprotective drug dexrazoxane and its two active ring-opened metabolites in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 1999, 27, 265-268.
64. **Hasinoff, B. B.** Quantitation of the dexrazoxane hydrolysis product ADR-925 by fluorescence detection of its terbium (III) complex after high-performance liquid chromatographic separation. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1994, 656, 451-455.
65. **Lewis, R. C., et al.** A sensitive and specific procedure for quantitation of ADR-925 in biological fluids by high-performance liquid chromatography (HPLC) with column switching and amperometric detection. *Pharm. Res.* 1992, 9, 101-108.
66. **Brier, M. E., et al.** Pharmacokinetics of dexrazoxane in subjects with impaired kidney function. *J. Clin. Pharmacol.* 2011, 51, 731-738.
67. **Schroeder, P. E., et al.** Metabolism of dexrazoxane (ICRF-187) used as a rescue agent in cancer patients treated with high-dose etoposide. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2003, 52, 167-174.
68. **Hasinoff, B. B.** An HPLC and spectrophotometric study of the hydrolysis of ICRF-187 (dexrazoxane, (+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane) and its one-ring opened intermediates. *Int. J. Pharm.* 1994, 107, 67-76.

69. **Schroeder, P. E., et al.** Metabolism of the cardioprotective drug dexrazoxane and one of its metabolites by isolated rat myocytes, hepatocytes, and blood. *Drug Metab. Dispos.* 2005, 33, 719-725.
70. **Schroeder, P. E., Hasinoff, B. B.** Metabolism of the one-ring open metabolite of the cardioprotective drug dexrazoxane to its active metal-chelating form in the rat. *Drug Metab. Dispos.* 2005, 33, 719-725.
71. **Testa, B., Krämer, S. D.** The biochemistry of drug metabolism - an introduction. Part 1. Principles and overview. *Chem. Biodivers.* 2006, 3, 1053-1101.
72. **Guengerich, P. F.** Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 2001, 14, 611-650.
73. **Roos, P. H. a Jakubowski, N.** Cytochrome P450. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 392, 1015-1017.
74. **Lamb, D. C., et al.** Cytochromes P450 and drug discovery. *Curr. Opin. Biotech.* 18, 2007, 504-512.
75. **Ketola, R. A., Hakala, K. S.** Direct analysis of glucuronides with liquid chromatography-mass spectrometric techniques and methods. *Curr. Drug Metab.* 11, 2010, 561-582.
76. **Jia, L., Liu, X.** The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): *In vitro* experiments. *Curr. Drug. Metab.* 2007, 8, 822-829.
77. **Liu, X., Jia, L.** The conduct of drug metabolism studies considered good practise (I): Analytical systems and *in vivo* studies. *Curr. Drug. Metab.* 2007, 8, 815-821.
78. **FDA, CDR.** Guidance for industry. Safety testing of drug metabolite. [Online] [Cit. 10. 3. 2012.] Dostupné z: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079266.pdf>.
79. **Kovaříková, P., et al.** HPLC determination of a novel aroylhydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B* 2006, 838, 107-112.
80. **Kovaříková, P., Mrkvičková, Z., Klimeš, J.** Investigation of the stability of aromatic hydrazones in plasma and related biological material. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 47, 360-370.
81. **Peiris, D. M., et al.** Distinguishing *N*-oxide and hydroxyl compounds: impact of heated capillary/heated ion transfer tube in inducing atmospheric pressure ionization source decompositions. *J. Mass Spectrom.* 2004, 39, 600-606.

82. **Ma, S., Chowdhury, S. K., Alton, K. B.** Thermally induced N-to-O rearrangement of tert-*N*-oxides in atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry: differentiation of *N*-oxidation from hydroxylation and potential determination of *N*-oxidation site. *Anal. Chem.* 2005, 77, 3676-3682.

9. PRÍLOHY

Jedná sa o súbor publikovaných prác (Práca 1-5), z ktorých Práca 4 bola v dobe vzniku tejto dizertačnej práce v recenznom konaní.

- Práca 1** Stariat J., Kovaříková P., Klimeš J., Lovejoy D. B., Kalinowski D. S., Richardson D. R. HPLC methods for determination of two novel thiosemicarbazone anti-cancer drugs (N4mT and Dp44mT) in plasma and their application to *in vitro* plasma stability of these agents. *J. Chromatogr. B* 2009, 877, 316-322.
- Práca 2** Stariat J., Kovaříková P., Klimeš J., Kalinowski D. S., Richardson D. R. Development of an LC-MS/MS method for analysis of interconvertible Z/E isomers of the novel anticancer agent, Bp4eT, *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 397, 161-171.
- Práca 3** Stariat J., Šesták V., Vávrová K., Nobilis M., Kollárová Z., Klimeš J., Kalinowski D. S., Richardson D. R. LC-MS/MS identification of the principal *in vitro* and *in vivo* phase I metabolites of the novel thiosemicarbazone anti-cancer drug, Bp4eT, *Anal. Bioanal. Chem.* doi:10.1007/s00216-012-5766-4.
- Práca 4** Stariat J., Kovaříková P., Pasáková I., Klimeš J., Kalinowski D. S., Richardson D. R., Ketola R. A. Identification of *in vitro* metabolites of the novel anti-tumor thiosemicarbazone, DpC, using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, v recenznom konaní.
- Práca 5** Kovaříková P., Stariat J., Klimeš J., Hrušková K., Vávrová K., Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of a moderately lipophilic drug from its highly polar metabolites-The cardioprotectant dexrazoxane as a model case *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 416-426.