

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

**ANALYTICKÉ HODNOCENÍ LÉČIV  
A POTENCIÁLNÍCH LÉČIV  
S VYUŽITÍM HPLC**  
(Disertační práce)

**Mgr. Petra Kovaříková**  
**Hradec Králové, 2006**

## **Poděkování**

Doc. RNDr. Jiřímu Klimešovi CSc. a RNDr. Milanu Mokrému CSc. za odborné vedení v době doktorského studia.

Prof. MUDr. Vladimíru Geršlovi CSc., Mgr. Martinu Štěrbovi a Mgr. Olze Popelové za spolupráci v oblasti výzkumu chelátorů železa jako potenciálních léčiv.

Ing. Jiřímu Dohnalovi CSc. za odbornou spolupráci zaměřenou na analýzu léčiv ve farmaceutickém průmyslu.

Kolektivu Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za podporu, rady, připomínky a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

## Obsah

1. ÚVOD .....	4
2. CÍL PRÁCE .....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
3.1. Význam a postavení HPLC v moderní farmaceutické analýze.....	10
3.2. Moderní HPLC instrumentace .....	14
3.3. Vývoj HPLC metod .....	24
3.3.1. Informace o vzorku a definice separace.....	25
3.3.2. Způsob úpravy vzorku a volba způsobu detekce .....	25
3.3.3. Výběr způsobu dělení a dosažení uspokojivé separace .....	26
3.4. Validace analytických metod .....	33
3.4.1. Validace analytických metod podle ICH směrnic.....	35
3.4.2. Validace metod podle USP .....	42
3.4.3. Validace bioanalytických metod podle doporučení FDA .....	43
3.5. Úprava vzorku před HPLC analýzou .....	47
3.5.1. Úprava vzorku.....	47
3.5.2. Úprava biologického vzorku .....	47
3.6. Stabilita léčiv a léčivých přípravků.....	56
3.6.1. Faktory ovlivňující stabilitu .....	57
3.5.2. Rozdělení testů stability .....	59
3.7. Chelátory železa odvozené od aroylhydrazonu.....	65
3.7.1. Chelátory železa a jejich možné využití v terapii .....	65
3.7.2. Chelátory železa ze skupiny analogů aroylhydrazonu.....	66
3.8. Vybraná léčiva a jejich stabilita .....	71
3.8.1. Glimepirid .....	71
3.8.2. Nimesulid .....	72
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST (Komentovaný soubor publikovaných prací).....	74
4.1. ANALÝZA POTENCIÁLNÍCH LÉČIV ZE SKUPINY AROYLHYDRAZONOVÝCH CHELÁTORŮ ŽELEZA .....	75
4.1.1. Chromatographic methods for the separation of biocompatible iron chelators from their synthetic precursors and iron chelates .....	76
4.1.2. HPLC study on stability of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone.....	87
4.1.3. Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an in vivo study .....	99
4.1.4. HPLC determination of novel aroyl hydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study .....	109
4.2. HODNOCENÍ STABILITY VYBRANÝCH LÉČIV .....	127
4.2.1. HPLC study on glimepiride under hydrolytic stress conditions .....	128
4.2.2. Photochemical stability of nimesulide .....	136
5. SOUHRN/ SUMMARY .....	145
6. LITERATURA.....	151

# **1. ÚVOD**



**Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)** je v dnešní době **nejčastěji používanou analytickou technikou v oblasti analýzy léčiv**. Jedná se o separační metodu, která umožňuje současné stanovení kvalitativních i kvantitativních charakteristik analyzovaných látek, a to i v poměrně složitých směsích. Tato metoda se běžně používá jak při výzkumu a vývoji nových léčiv a léčivých přípravků, tak při kontrole a jistění kvality. HPLC také zaujímá přední místo v oblasti stanovení léčiv a jejich metabolitů v biologickém materiálu a je tedy jednou ze základních metod používaných pro stanovení osudu léčiva v živém organismu (farmakokinetiky). HPLC je též běžnou metodou používanou v rámci terapeutického monitorování léčiv (TDM) a studií bioekvivalence.

Tato disertační práce se v **teoretické části** zabývá možnostmi využití HPLC v moderní farmaceutické analýze. **Farmaceutická analýza** by v moderním pojetí neměla být pouhou chemickou analýzou farmakologicky aktivních látek, ale měla by být úzce spjata s rozvojem nových moderních analytických metod a technologií. Kromě toho by měla být **oborem interdisciplinárním**, komunikujícím s vývojem v dalších farmaceutických disciplínách (např. farmaceutická technologie, farmakologie). Díky tomuto modernímu pojetí, pak farmaceutická analýza může poskytovat řadu důležitých informací, které mohou významně ovlivnit celý proces výzkumu a vývoje nových léčiv a léčivých přípravků, ale také přispívat k zajištění účinné a bezpečné farmakoterapie<sup>1,2</sup>.

V teoretické části disertační práce je věnována pozornost především těm aspektům a aplikacím HPLC, které mají vztah k experimentální části této práce. Úvodní část definuje postavení této metody v moderní farmaceutické analýze a ve stručnosti popisuje HPLC instrumentaci. Významnou částí je oddíl věnovaný postupům při vývoji HPLC metod. Z hlediska praktického užití této techniky nebylo možné opomenout problematiku týkající se validace metod a validačních parametrů. Další kapitola této části je věnována jedné ze speciálních částí farmaceutické analýzy - hodnocení stability léčiv. Poslední dva oddíly teoretické části si kladou za cíl shrnout dostupné informace jak o fyzikálně-chemických, tak i o základních farmakologických vlastnostech analyzovaných látek (aroylhydrazonových chelátorů železa, glimepiridu, nimesulidu).

**Experimentální část** tvoří soubor šesti původních vědeckých prací rozdělených do dvou tematických celků doplněných o komentáře. **První celek** se nejprve zabývá vývojem a validací HPLC metod vhodných pro stanovení tří nových potenciálních

léčiv ze skupiny chelátorů železa (pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu - PIH, salicylalehyd isonikotinoyl hydrazonu - SIH a pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu - o-108) v přítomnosti jejich rozkladných produktů a komplexů se železem. Tyto metody doplňují RP-TLC podmínky vhodné pro rychlé a jednoduché hodnocení těchto látek. Vyvinutá HPLC metoda je v další publikaci využita k systematickému studiu stability PIH·2HCl za podmínek stresových zkoušek a stability tohoto chelátoru v přítomnosti dvou farmaceutických pomocných látek. Další část tohoto celku se zabývá vývojem a validací metod vhodných pro analýzu SIH a o-108 v králičí plasmě. Tyto metodiky jsou následně použity pro stanovení profilu plasmatických koncentrací po i.v. aplikaci těchto chelátorů pokusným zvířatům.

**Druhý celek** se zabývá vývojem stabilitu hodnotících HPLC metod a studiem vybraných aspektů stability dvou moderních, klinicky užívaných léčiv - glimepiridu a nimesulidu. Hydrolytická stabilita glimepiridu byla hodnocena ve vodném prostředí o různém pH za podmínek stresových zkoušek. Pro studium fotostability nimesulidu byly vyvinuty HPLC a TLC metody, umožňující separaci léčiva a jeho potenciálních rozkladných produktů, které byly následně využity ke studiu citlivosti uvedeného léčiva k rozkladu vlivem UV záření.

## **2. CÍL PRÁCE**

**Cílem teoretické části disertační práce** bylo shrnout dosavadní poznatky týkající se významu, postavení a nejdůležitějších aplikací HPLC, jako moderní analytické metody běžně užívané v analýze léčiv. Hlavní pozornost byla věnována především těm aspektům a aplikacím, které mají přímou návaznost na experimentální část této práce.

**Cílem prvního tematického celku experimentální práce bylo:**

- 1/ Vyvinout a validovat chromatografické metody vhodné pro stanovení tří nových potenciálních léčiv ze skupiny chelátorů železa, pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu (PIH), salicylalehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) a pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108), v přítomnosti jejich rozkladných produktů a komplexů s železem.
- 2/ Studovat vybrané aspekty stability PIH·2HCl.
- 3/ Vyvinout a validovat HPLC metody pro stanovení SIH a o-108 v králičí plasmě.
- 4/ Použít vyvinuté metody pro stanovení profilu plasmatických koncentrací po i.v. aplikaci těchto chelátorů laboratorním zvířatům.

**Cílem druhého tematického celku experimentální práce bylo:**

- 1/ Vyvinout HPLC metodu vhodnou pro hodnocení stability glimepiridu a použít ji ke studiu hydrolytického rozkladu tohoto léčiva.
- 2/ Vyvinout chromatografické metody (HPLC a TLC) vhodné pro hodnocení stability nimeuslidu a následně je použít pro studium fotostability tohoto léčiva.

## **3. TEORETICKÁ ČÁST**

### **3.1. Význam a postavení HPLC v moderní farmaceutické analýze**

**Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)** zaujímá pro mnohé výhody dominantní místo ve farmaceutické analýze. HPLC metody užívající zejména tzv. reverzního módu (RP-HPLC) jsou nejčastěji používanými separačními metodami v celé oblasti zabývající se analýzou léčiv<sup>1</sup>. Na rozdíl od jiných (neseparačních) technik HPLC umožňuje nejprve efektivně rozdělit jednotlivé složky analyzované směsi do elučních zón, a poté jednotlivé zóny selektivně detekovat. V porovnání s plynovou chromatografií představuje HPLC univerzálnější přístup, který nevyžaduje převedení analytu na těkavý derivát. Starší chromatografické techniky (papírová, tenkovrstvá, gelová chromatografie) pak neumožňují dosáhnout tak efektivní separace a citlivosti<sup>3</sup>. V porovnání s HPLC elektromigrační metody nedosahují, i přes jejich některé výhody, takové robustnosti, a tak je jejich využití v moderní farmaceutické praxi zatím relativně omezené<sup>4</sup>. Předností HPLC je relativně snadné kvalitativní i kvantitativní hodnocení i poměrně složitých směsí chemických látek. Tento přístup dovoluje během jedné analýzy provádět přesné a správné stanovení aktivních, pomocných i příbuzných látek (nečistot, degradačních produktů). V bioanalýze pak tato metoda umožňuje hodnotit léčiva i jejich metabolity v biologickém materiálu bez interference s nízkomolekulárními endogenními látkami<sup>1,5</sup>. Moderním trendem v této oblasti je vývoj automatických systémů pro analýzu léčiv v biologickém materiálu spojujících on-line úpravu vzorku (např. extrakce nebo mikroextrakce na pevné fázi - SPE, SPME) s následnou chromatografickou analýzou<sup>6,7</sup>.

**HPLC systémy umožňují použití celé škály různých detektorů** - spektrofotometrických, fluorimetrických, hmotnostně spektrometrických (MS), elektrochemických, vodivostních, radiometrických, refraktometrických a jiných. Výběr způsobu detekce závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech analytů (léčiv, nečistot, metabolitů), nárocích na citlivost metody, dostupnosti a finanční náročnosti instrumentace. V dnešní době jsou v analýze léčiv nejčastěji používány detektory spektrofotometrické, avšak v poslední době je značná pozornost věnována MS detektorům, vzhledem k jejich univerzálnosti, vysoké citlivosti a možnosti současné

strukturní analýzy<sup>8</sup>. Mezi nejnovější trendy v této oblasti patří např. spojení HPLC s NMR detektory<sup>1</sup>.

Hlavní oblasti farmaceutické analýzy, ve kterých jsou HPLC metody v současnosti využívány jsou shrnuty v následujících bodech:

- **Kvalitativní a kvantitativní analýza léčiv a léčivých přípravků**

**Kvalitativní hodnocení** léčiv pomocí HPLC se provádí na základě shody retenčních časů ( $t_R$ ) analytu a referenčního standardu. Pouhá shoda retenčního času těchto látek získaná na jednom chromatografickém systému však neposkytuje dostatečné informace. Shoda musí být prokázána na více chromatografických systémech s různou selektivitou, popřípadě musí být doplněna dalšími informacemi (nejčastěji diode array (DAD), infračervená (IR) nebo MS spektra)<sup>8,9</sup>.

Pro potřeby **kvantitativního hodnocení** léčiv je HPLC standardní, rutinně užívanou analytickou metodou<sup>1</sup>. Stanovení obsahu účinných látek, degradačních produktů nebo příbuzných látek se většinou provádí na základě srovnávání ploch píků (výjimečně výšek píků) analytu a referenčních látky. Existuje několik přístupů na jejichž základě se provádí kvantifikace.

1/ Metoda vnějšího standardu - koncentrace stanovované složky se určí porovnáním plochy píku získané analýzou zkoušeného roztoku a plochy píku na chromatogramu příslušného porovnávacího roztoku. Předpokladem možnosti použití této metody je lineární závislost odezvy detektoru v očekávaném koncentračním rozmezí<sup>8,10</sup>.

2/ Metoda vnitřního standardu - koncentrace stanovované složky se určí porovnáním poměrů ploch píků analytu a vnitřního standardu (látky o podobných fyzikálně-chemických vlastnostech jako analyt) detekované na chromatogramu zkoušeného roztoku s poměrem ploch píků těchto látek na chromatogramu porovnávacího roztoku. Základním předpokladem pro použití této metody je lineární závislost odezvy detektoru v očekávaném koncentračním rozmezí. Metoda vnitřního standardu je využívána hlavně v případech, ve kterých je použita složitější příprava vzorku (např. vícezkroková extrakce)<sup>8,10</sup>.

3/ Metoda normalizace - obsah analytu se vypočítá z plochy jeho píku jako procenta celkové plochy všech píků na chromatogramu. Zanedbávají se plochy píků

rozpouštědel a píků, které jsou pod mezí zanedbatelnosti. Metoda normalizace je použitelná pouze tehdy, když jsou koncentrace všech hodnocených látek v dynamickém rozsahu detektoru a jejich odezvy jsou při dané vlnové délce srovnatelné, nebo jsou známy příslušné korekční faktory. Korekční faktor je číslo, které vyrovnává odezvy látek s různým počtem chromoforů<sup>8,10</sup>.

4/ Kalibrační postup - stanoví se vztah mezi signálem detektoru a koncentrací analytu. Pro vlastní kvantifikaci se potom použije inverzní funkce<sup>8,10</sup>.

- **Stanovení léčiv v biologickém materiálu**

Také v oblasti zabývající se stanovením léčiv a metabolitů v biologickém vzorku zaujímá tato technika přední místo. Pomocí HPLC lze relativně pohodlně vedle sebe analyzovat léčiva i jejich metabolity. Vzhledem k tomu, že jsou tyto látky v biologických materiálech přítomny často ve stopových koncentracích, hraje při těchto analýzách důležitou úlohu citlivost detekce. Tento požadavek je většinou zajištěn při spojení HPLC-MS<sup>11</sup>. Důležitou oblastí jsou studie bioekvivalence, při kterých se porovnává plocha pod křivkou plasmatických koncentrací (AUC) a maximální dosažená koncentrace ( $c_{max}$ ) generických a originálních přípravků<sup>12</sup>. Další důležitou oblastí využití HPLC je monitorování lékových hladin v průběhu terapie. Cílem TDM je určit správný režim dávkování pro jednotlivého pacienta, tím dosáhnout optimální účinnosti terapie a zabránit vzniku nežádoucích účinků<sup>13</sup>.

- **Vývoj nových léčiv**

Při vývoji nových léčiv se metody HPLC uplatňují téměř ve všech fázích vývoje. Počínaje zjišťováním čistoty a stability účinných látek, přes preformulační a formulační studie až po stanovení osudu léčiva v organismu a výpočet farmakokinetických parametrů<sup>1,14</sup>. V této oblasti jsou v dnešní době stále častěji HPLC metody využívající UV detekci nahrazovány metodami využívajícími výhody spojení HPLC-MS popř. tandemového uspořádání detektorů (HPLC-MS-MS)<sup>15</sup>.



- **Další oblasti použití**

Mezi další oblasti použití HPLC ve farmacii patří např. čištění a izolace látek (preparativní chromatografie) nebo určení struktury neznámých analytů, např. metabolitů, rozkladných produktů, nečistot (on-line spojení HPLC-MS nebo HPLC NMR)<sup>1,8</sup>.

### 3.2. Moderní HPLC instrumentace

Moderní kapalinové chromatografy bývají koncipovány jako víceúčelové systémy, nejčastěji sestavené jako stavebnice z jednotlivých součástí (pumpa, odplyňovač mobilní fáze, dávkovací systém, kolonový prostor, detektor). **Hlavními trendy v této oblasti jsou především automatizace, miniaturizace a aplikace nových detektorů.** V relativně krátkých časových intervalech jsou na trh uváděny stále nové, inovované HPLC systémy<sup>16</sup>.

#### 1/ Pumpy

Pumpa je jednou z nejdůležitějších součástí HPLC instrumentace, protože musí zajistit kontinuální průtok mobilní fáze chromatografickým systémem. Standardní pumpy pro HPLC by měly splňovat následující požadavky: průtok 0,01 - 10 ml/min, pulzace do 1 % pro reverzní a normální chromatografické separace. Kolísání toku mobilní fáze v systému ovlivňuje jak retenční časy, tak i plochy píků, a proto negativně ovlivňuje výsledky kvalitativního i kvantitativního stanovení. Pumpy bývají konstruovány z materiálů odolných vůči korozi i při použití poměrně agresivních mobilních fází. V současnosti se používají především pístová čerpadla, s malým vnitřním objemem, který umožňuje rychlou výměnu mobilní fáze a rychlý nástup gradientu. Písty čerpadel jsou řízeny elektronicky tak, aby se minimalizovala pulzace mobilní fáze způsobená střídáním sací a výtlačné fáze<sup>16,17</sup>.

Při **gradientové eluci** lze jednotlivé složky mobilní fáze míchat buď na **nízkotlaké**, nebo na **vysokotlaké straně čerpadla**. Při nízkotlakém gradientu dochází k mísení složek mobilní fáze na nízkotlaké straně (před pumpou), a tak je celý gradient řízen pouze jednou pumpou. Při vysokotlakém gradientu je každá složka mobilní fáze čerpána jednou pumpou a k jejich vzájemnému mísení dochází v mixéru za vysokého tlaku. Výhodou tohoto způsobu je přesný a reprodukovatelný nástup gradientu a také rychlá odezva na změnu koncentrace jednotlivých složek. Další výhodou je možnost použití každé pumpy zvlášť (v případě isokratické analýzy). K nevýhodám pak patří časté problémy s dokonalým mísením mobilní fáze a horší přesnost mísení při nízkém procentu jednoho ze solventů (0-10 %)<sup>17</sup>.

## 2. Odplyňovač mobilní fáze (degasser)

Odplynění mobilní fáze je jedním ze základních předpokladů dosažení úspěšné a reprodukovatelné separace. Bubliny plynu v mobilní fázi narušují plynulý průtok této fáze kolonou, ovlivňují separaci a znehodnocují signál detektorů. Moderní HPLC sestavy obsahují zařízení umožňující odstranění bublin průchodem mobilní fáze trubicemi z porézního materiálu, které jsou umístěny ve vakuovém prostoru. Bubliny plynu tak prochází ven do vnějšího prostoru<sup>16,17</sup>.

## 3. Dávkovací systémy

Dávkovací systémy by měly umožňovat dávkování variabilního množství vzorku s vysokou reprodukovatelností nástřiků. Většina komerčně dostupných sestav již dnes využívá k dávkování vzorku **automatický dávkovač (autosampler)**, který umožňuje nástřik velkého počtu vzorků bez zásahu operátora. Na některých HPLC sestavách je možné se setkat také s **manuálním dávkovacím systémem - rheodyne injector**, který využívá šesticestného ventilu<sup>17</sup>.

## 4. Detektory

**Funkcí detektorů je monitorovat látky vycházející z kolony a převést jejich kvantitativní hodnoty na proporcionálně závislý elektrický signál, který je dále vyhodnocen.** Detektory jsou důležitou součástí instrumentace, která významným způsobem ovlivňuje citlivost a selektivitu analýz. Detektory bývají rozdělovány na selektivní a univerzální. V případě selektivních detektorů je odezva přímo úměrná konkrétní vlastnosti analytu, při použití univerzálního detektoru, je jeho odezva úměrná určité celkové vlastnosti eluátu<sup>8,16,17</sup>.

### **Vlastnosti „ideálního“ detektoru pro HPLC:**

- vysoká citlivost (vlastnost důležitá především pro stopové analýzy)
- vysoká selektivita
- nízký šum základní linie
- rychlá odezva
- široký lineární rozsah (umožňující snadnou kvantifikaci i v širším koncentračním rozmezí)
- nízký mrtvý objem (způsobující minimální rozšiřování chromatografických zón)

- možnost použití gradientu
- možnost poskytnutí strukturních informací o analyzovaných látkách
- rezistence ke změnám ve složení mobilní fáze, průtoku nebo teploty<sup>8</sup>.

#### a/ Spektrofotometrické detektory

Spektrofotometrické detektory pracující v UV-VIS oblasti vlnových délek jsou nejčastěji používanými detektory v analýze léčiv. Umožňují detekovat látky, které obsahují ve své molekule chromofor. **Zdrojem záření** bývá nejčastěji **deuteriová lampa** poskytující akceptovatelnou intenzitu záření od 190 do 400 nm. V případě **detekce ve viditelné oblasti** se využívá **wolframová výbojka**. Paprsek elektromagnetického záření prochází celou detektorem kde mění svoji intenzitu ( $I$ ) v důsledku absorpce záření analytem a poté dopadá na fotodiodu. Obvykle je paprsek ze zdroje přiveden také přímo na referenční fotodiodu, kde je měřena původní intenzita záření ( $I_0$ ). Elektronika detektoru převádí signál ze dvou diod na absorbanci, která je podle **Lamber-Beerova zákona** přímo úměrná molární koncentraci analytu<sup>8,16,17</sup>.

$$A = \log I_0 / I = c \cdot \varepsilon \cdot l \quad [1]$$

A - absorbance

$I_0$  - původní intenzita záření

I - intenzita záření dopadající na fotodiodu po průchodu celou

c – molární koncentrace analytu

$\varepsilon$  – molární absorpční koeficient

l – délka cely

Podle konstrukce jsou detektory schopny měřit absorbanci elektromagnetického záření jedné nebo více vlnových délek. Nejstarší, dnes již minimálně používané detektory byly schopny měřit pouze absorbanci záření o jedné vlnové délce (většinou 254 nm, tj. detektory s fixní vlnovou délkou). Většina v současnosti používaných detektorů umožňuje **vlnovou délku libovolně měnit** (detektory s proměnnou vlnovou délkou) a kromě toho, některé z dnes běžně používaných detektorů umožňují proměřit spektrum v maximu hodnoceného píku. Specifickým typem UV detektoru jsou **detektory s diodovým polem (DAD)** umožňující snímání celého

spektra za pomoci velkého počtu plošných fotodiód. K výhodám DAD patří možnost odhalení koeluze látek za pomoci vyhodnocení čistoty chromatografického píku a možnost porovnání identity analytu a referenčního standardu na základě vyhodnocení shody jejich spekter<sup>8,14,16,18</sup>.

Důležitou charakteristikou je konstrukce a objem průtokové cely detektoru. Malé objemy cely umožňují významně redukovat „rozmývání“ chromatografických píků. Citlivost těchto detektorů se pohybuje v rozmezí  $10^{-9}$ - $10^{-10}$  g/ml<sup>19</sup>, avšak je ovlivněna molárním absorpčním koeficientem analyzovaných látek a také chromatografickými podmínkami<sup>8,18</sup>.

### **b/ Fluorescenční detektory**

Fluorescenční detektory patří k citlivým a selektivním detektorům, běžně používaným v kapalinové chromatografii. Fluorescenční detekce obvykle dosahuje citlivosti o 3 řády vyšší než detekce v UV oblasti ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$  g/ml)<sup>19</sup>. Detekovat lze však pouze analyty, které **vykazují přirozenou fluorescenci** (cca 15 % látek) nebo analyty, které byly chemickou reakcí **převezeny na fluoreskující deriváty**<sup>17</sup>. Záření z lampy (např. deuteriová, xenonová nebo xenon-rtuťová) prochází přes excitační filtr (mřížku) poskytující monochromatické záření a excituje molekuly analytu. Excitované molekuly poté emitují záření o vlnové délce vyšší než je vlnová délka původního (excitačního) záření. Emisní záření prochází přes emisní filtr (mřížku), která je směřována tak, aby sbírala záření ve směru kolmém ke směru excitačního záření. Tímto způsobem dopadne na fotonásobič pouze záření emisní (pocházející ze vzorku), nikoliv záření excitační<sup>8</sup>. Intenzita fluorescence závisí jak na vlnové délce excitace, tak na vlnové délce emisního záření. Tento způsob detekce umožňuje vhodnou volbou parametrů selektivně detekovat analyty našeho zájmu, při potlačení signálu ostatních složek vzorku. Jako excitačního záření lze také použít laseru (laserem indukované fluorescence) a tím ještě zvýšit citlivost detekce přibližně o jeden řád<sup>8,18</sup>.

### **c/ Elektrochemické detektory (EC)**

**Tyto detektory využívají elektrochemických vlastností analyzovaných látek.** Svoji citlivostí ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$  g/ml) jsou podobné fluorescenčním detektorům<sup>19</sup>. Schopnost oxidovatelnosti nebo redukovatelnosti analytů využívají ampérometrické,

polarografické a coulometrické detektory. Častěji se využívá procesu oxidace než redukce. Ampérometrické detektory měří proud vznikající průchodem analytu celou, coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci nebo redukcí veškerého množství analytu. Coulometrické detektory dosahují vyšší citlivosti než detektory ampérometrické, protože pracují s celým množstvím analytu. EC detektory jsou velmi citlivé na nečistoty v mobilní fázi nebo na její nedokonalé odplynění. Většina těchto detektorů také neumožňuje vykonávat gradientové analýzy. Díky nutnosti použití vodivé mobilní fáze není tento způsob detekce použitelný v systémech s normálními fázemi. Také v případě separací v systému reverzních fází platí určité omezení týkající se použití mobilních fází s vysokým obsahem organických rozpouštědel<sup>8,17</sup>.

#### **d/ Refraktometrické detektory**

Refraktometrický detektor je nejstarším typem universálního detektoru. Refraktometrická detekce je založena na **měření rozdílu v indexech lomu mezi čistou mobilní fází s mobilní fází unášející analyt**. Mezi nevýhody tohoto způsobu detekce patří nekompatibilita s gradientovou elucí, velká teplotní závislost odezvy, vysoká citlivost k plynům v mobilní fázi a relativně nízká citlivost ( $10^{-6}$  g/ml)<sup>8,17,19</sup>.

#### **e/ Evaporating light scattering detektory (ELSD)**

Evaporating light scattering detektor je dalším typem universálního detektoru. **Eluát z kolony je při tomto způsobu detekce zmlžen, rozpouštědlo je odpařeno a částice analytu jsou detekovány při průchodu „light scattering“ celou**. Zde částice vzorku rozptylují světlo (paprsek) laseru. Rozptýlené světlo je detekováno pomocí silikonové fotodiody umístěné pod úhlem  $90^\circ$  k paprsku laseru. Tento detektor je použitelný pro všechny analyty, které nejsou těkavější než mobilní fáze a s výhodou se používá u analytů, které neobsahují chromofor (např. sacharidy, lipidy). ELSD umožňuje použití gradientových analýz<sup>17,18</sup>.

#### **f/ Vodivostní detektory**

Vodivostní detektory měří **vodivost mezi dvěma elektrodami na něž je vkládáno napětí**. Přítomnost analytu je detekována změnou vodivosti v cele

detektoru. Tyto detektory jsou vhodné pro detekci látek iontové povahy a bývají často používány v iontově-výměnné chromatografii<sup>17</sup>.

### **g/ Hmotnostní detektory**

Hmotnostní detektor je jako univerzální a vysoce citlivý detektor v současnosti stále více používán pro spojení s kapalinovou chromatografií. Přímé spojení HPLC-MS přidává k vlastní chromatografii **další dimenzi** tím, že **umožňuje identifikaci a trukturní analýzu látek** v eluátu po předchozí separaci na chromatografické koloně<sup>20,21</sup>. Detekce látek hmotnostním detektorem je založena na ionizaci analytu a následné separaci vzniklých iontů na základě hodnot  $m/z$ . Při spojení HPLC-MS je analyt, který je unášen mobilní fází z HPLC kolony zaveden do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, zde dochází k desolvataci a ionizaci molekul analytu a jejich zavedení do analyzátoru<sup>20,21</sup>.

Hmotnostní detektor se skládá se tři základních částí: **iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor**. Dalšími částmi jsou vakuový systém, systém pro zavádění vzorku, iontová optika a počítač. Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul na nabitě částice, hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení vzniklých iontů na základě jejich  $m/z$  a detektor je používán pro detekci iontů a určení jejich relativních intenzit. K ionizaci analytů může docházet různým způsobem. Pro spojení HPLC-MS bývají téměř výhradně používány měkké ionizační techniky, a to především ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Různé typy hmotnostních analyzátorů mohou využívat různé principy (magnetické analyzátor, analyzátor doby letu, kvadrupolové analyzátor, iontové pasti). Nejčastěji užívanými analyzátorů ve spojení HPLC-MS pro analýzu nízkomolekulárních léčiv jsou jednoduchý nebo trojitý kvadrupol nebo iontová past. K detekci iontů bývá používán elektronový násobič, fotonásobič nebo Faradayova klec. Tandemovou hmotnostní spektrometrii se označují MS analýzy, kde je používáno více analyzátorů, které pracují více nebo méně nezávisle na sobě. Nejběžnější tandemovou technikou je trojitý kvadrupol<sup>20,21</sup>.

Záznamem získaným pomocí hmotnostního detektoru je **hmotnostní spektrum**, ve kterém je na ose  $y$  vynesena relativní intenzita jednotlivých iontů a na ose  $x$  jejich  $m/z$ <sup>8,20,21</sup>.

## 6. HPLC sorbenty a kolony

HPLC kolony jsou „srdcem“ každého chromatografického systému. Jsou obvykle zhotoveny z nerezové oceli, která je vhodným kompromisem mezi cenou, provozuschopností a resistencí vůči korozi. Do tlaků 20 MPa lze také použít kolony ze speciálně tvrzeného skla, které se vkládají do vnějšího kovového pláště<sup>8,16</sup>. Uvnitř nerezového nebo skleněného pláště se nachází **stacionární fáze – sorbent**. Kvalitní kolona je základním předpokladem pro úspěšný vývoj i následnou rutinní aplikaci robustních a reprodukovatelných HPLC metod<sup>8</sup>. Na trhu je v dnešní době dostupné velké množství různých chromatografických kolon, které se liší charakterem sorbentu, rozměry, tvarem i velikostí částic a podobně. Vývoj v této oblasti je zaměřen jednak na zlepšování vlastností stacionárních fází, ale také na vývoj nových sorbentů. Komerčně dostupné kolony se však často liší od výrobce k výrobcu a někdy je možné pozorovat jistou variabilitu i mezi jednotlivými šaržemi stejného typu kolony. Výrobci proto testují kvalitu kolon pomocí analýz vybraných modelových látek a ověřují tím několik základních charakteristik jako např. počet teoretických pater, retenční faktor, faktor symetrie píku atd.

Většina komerčně dostupných analytických kolon má délku mezi 5-25 cm, vnitřní průměr 4,0 nebo 4,6 mm, přičemž částice sorbentu dosahují velikosti 3,5-5  $\mu\text{m}$ . Na trhu jsou dostupné také užší „narrow-bore“ kolony (vnitřní průměr 3 nebo 2 mm) nebo „mikro-bore“ (vnitřní průměr 1 mm) jejichž délka i průměr jsou menší<sup>8,17</sup>. Vedle kolon s částicovými náplněmi se začaly v poslední době používat i monolitické stacionární fáze, které umožňují velmi rychlé separace za použití vysokých průtoků<sup>22</sup>.

Vlastnosti kolony jsou dány celou řadou různých faktorů. Hlavní vliv na vlastnosti kolony mají: druh sorbentu, způsob navázání a stupeň pokrytí nosiče funkčními skupinami, velikost a tvar částic, velikost povrchu sorbentu, velikost a tvar pórů sorbentu, endkapování a rozměr kolony<sup>8</sup>.

Podle chemické podstaty nosiče mohou být HPLC kolony rozděleny do následujících skupin. Hlavní pozornost je věnována chemicky modifikovaným fázím na bázi silikagelu, které byly užity v experimentální části této práce.



- **Stacionární fáze na bázi silikagelu**

Kolony na bázi silikagelu jsou nejčastěji používanými stacionárními fázemi pro HPLC analýzy. **Nemodifikovaný silikagel** bývá používán v systému tzv. normálních fází (NP), zatím co chemicky modifikovaný silikagel bývá běžně používán na separaci v systému fází reverzních (RP). **Modifikovaný silikagel** zaujímá v analýze léčiv dominantní místo. Pro přípravu této fáze se používají vysoce čisté, většinou sférické částičky silikagelu (např. přítomnost stopového množství kovů může výrazně zhoršit symetrii píku). Před vlastní chemickou modifikací se silikagel hydrotermálně upravuje, aby se zvýšil počet volných silanolových skupin<sup>16,17</sup>. Silikagel obsahuje tři typy silanolových skupin: volné (kyselé - problematické pro analýzu bazických látek), podvojně a sdružené. **Chemicky modifikované stacionární fáze vznikají reakcí OH skupin silikagelu s organosilany**. V případě reakce s monochlor nebo monoalkoxysilany vzniká monomerní stacionární fáze, při použití di- nebo tri-chlorsilanů vzniká fáze polymerní. Pro většinu aplikací je vhodnější monomerní typ, jehož výhodou je lepší reprodukovatelnost retenčních časů. Výhodou polymerních typů je naopak lepší stálost při nízkých pH. Díky stérickému efektu navázaných ligandů nedochází k pokrytí úplně celého povrchu (pokrytí sorbentu vázanou fází se určuje z obsahu organického uhlíku). Nezareagované silanolové skupiny bývají následnou reakcí s malými silany (trimethylchlorsiloxan nebo dimethyldichlorsiloxan) deaktivovány (endkapovány)<sup>8, 17, 16</sup>. Další možností je zapouzdření do polymerního obalu, na který jsou navázány funkční skupiny. Selektivita modifikované stacionární fáze je ovlivněna stupněm pokrytí povrchu, délkou alkylového řetězce navázané funkční skupiny a složením použité mobilní fáze<sup>5,8,16,17</sup>.

Mezi **nevýhody** především starších fází na bázi silikagelu patří omezená stabilita při  $\text{pH} < 2$  a  $\text{pH} > 8$ . Při  $\text{pH}$  vyšším než 8 dochází k rozpouštění silikagelu a při  $\text{pH}$  nižším než 2 pak probíhá hydrolýza vázaných funkčních skupin. U starších typů sorbentů je pak nevýhodou omezená stálost v mobilních fázích s vysokým obsahem vody. Tyto problémy již však bývají u novějších sorbentů eliminovány (např. stérickým zabráněním hydrolytických reakcí objemnou funkční skupinou). Výrobci se různými moderními přístupy uplatňovanými při výrobě těchto sorbentů snaží překonávat omezenou chemickou stabilitu těchto stacionárních fází<sup>23</sup>. Další

nevýhodu představují interakce bazických analytů s kyselými volnými silanoly, které vedou ke zhoršení symetrie píku<sup>8,23</sup>.

Nejčastěji **navázanými funkčními skupinami** jsou alkylové řetězce C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, ale také skupiny -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CN, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCO-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-CH<sub>3</sub>. Dostupné jsou také stacionární fáze obsahující silikagel modifikovaný funkčními skupinami na bázi katexů nebo anexů, které jsou využívány pro iontově výměnnou chromatografii<sup>8</sup>. Některé stacionární fáze mohou obsahovat navázané funkční skupiny o různé polaritě, a tak umožňují analýzu látek s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi v takzvaném mix-modu (např. silikagel modifikovaný C<sub>18</sub> a -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CN)<sup>5</sup>.

- **Polymerní stacionární fáze**

Sorbenty na bázi porózních organických polymerů jsou alternativou k silikagelovým stacionárním fázím. Nejčastěji jsou tvořeny polystyrénovým a divinylbenzenovým kopolymerem, méně pak substituovanými metakryláty nebo polyvinyalkoholy. Mohou být použity pro analýzy malých molekul i makromolekul. Jejich **výhodou** je především větší chemická, mechanická a teplotní stálost<sup>23</sup>. Díky absenci volných silanolových skupin nevykazují tyto fáze nežádoucí interakce s bazickými látkami. Jsou vhodné i pro analýzy silně bazických látek, při vysokých hodnotách pH, kdy jsou tyto analyty v neionizované formě a poskytují lepší tvar píků. **Nevýhodou** těchto fází je v porovnání se silikagelovými o stejné velikosti částic nižší účinnost separace. Tyto kolony jsou vhodnější pro izokratické než gradientové analýzy, protože při různém složení mobilní fáze může docházet k různému bobtnání polymeru. Stejně jako v předchozím případě je možné povrch polymeru chemicky modifikovat, avšak modifikované kolony nejsou komerčně dostupné v takovém množství a rozmanitosti funkčních skupin jako kolony silikagelové. Své uplatnění nachází tyto sorbenty především jako iontoměniče<sup>5,8</sup>.

- **Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého**

Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého se vyznačují se vysokou tepelnou (do 200 °C) i pH stabilitou (0-14). **Selektivita** tohoto typu stacionární fáze je **odlišná** od selektivity fází na bázi silikagelu. Mají na ni zásadní vliv interakce center charakteru silných Lewisových kyselin přítomných na sorbentu a v molekule analytu. Komerčně jsou dostupné čtyři druhy těchto stacionárních fází - potažené

polystyrenem, vrstvou uhlíku, polybutadienem a fáze které jsou potaženy vrstvou uhlíku modifikovaného oktadecylovými skupinami<sup>24</sup>.

- **Další stacionární fáze**

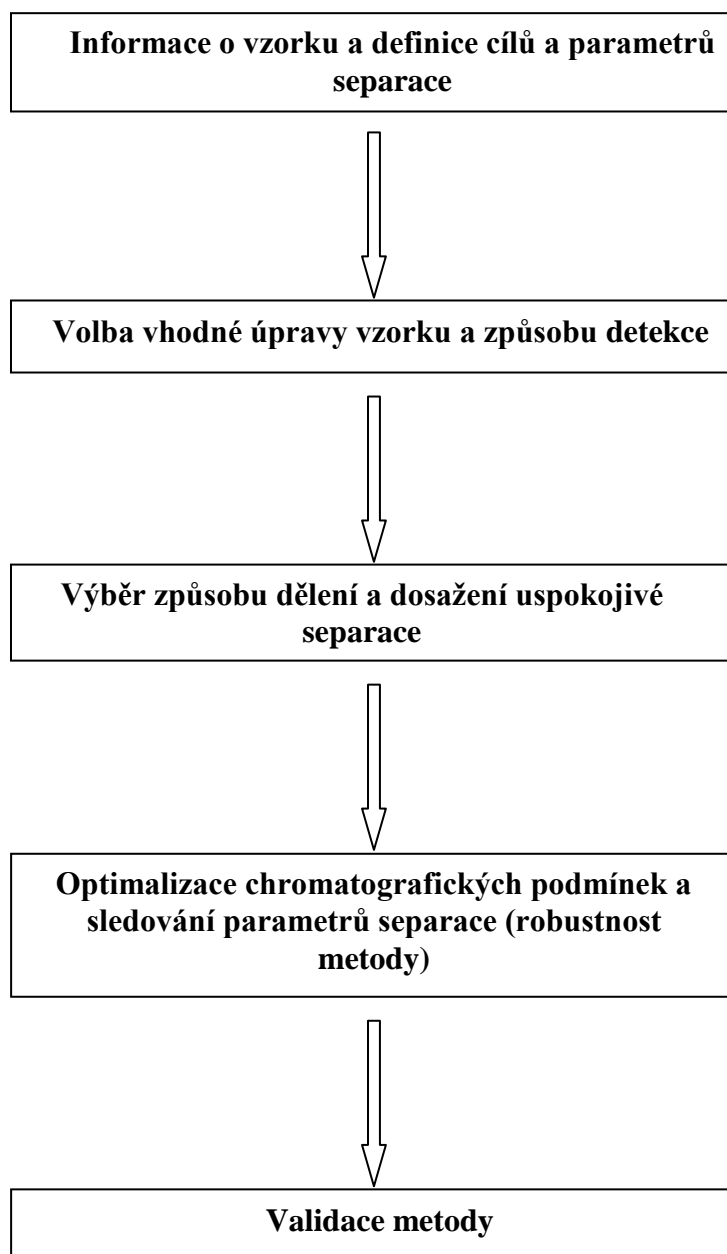
Stacionární fáze tvořené **grafitizovaným uhlíkem** jsou v porovnání s ostatními typy sorbentů používány pouze omezeně. Uhlík poskytuje i bez další modifikace hydrofobní povrch a poměrně velkou teplotní a pH stabilitu. Uplatňuje se především pro dělení geometrických izomerů. Nevýhodou těchto fází je nižší efektivita a vysoká křehkost oproti silikagelovým fázím, v neposlední řadě také citlivost k nečistotám v mobilní fázi (dochází k ireverzibilní adsorbci na povrch) a vyšší cena. Jako sorbentu lze použít také **oxid hlinitý** a to nemodifikovaný pro NP separace, chemicky modifikovaný nebo potažený polymerem pro RP separace<sup>8</sup>.

- **Stacionární fáze pro chirální separace**

Chirální fáze jsou poměrně specifickým typem stacionárních fází. Využívají především prostorové interakce mezi analytem a chirálním selektorem. Nejznámější typy HPLC kolon pro chirální separace obsahují cyklodextriny, proteiny, polysacharidy, makrocyclická antibiotika nebo syntetické polymery<sup>8</sup>.

### 3.3. Vývoj HPLC metod

Při vývoji HPLC metody postupuje každý chromatografista do značné míry individuálně, nicméně lze definovat **obecný algoritmus**, který je znázorněn v následujícím schématu. Vývoj metod někdy vyžaduje pouze několik málo pokusů, v jiných případech je však zapotřebí vykonat poměrně značné množství experimentální práce<sup>8</sup>.



Obr. 1. Obecný algoritmus vývoje HPLC metod

### 3.3.1. Informace o vzorku a definice separace

Před začátkem vlastního vývoje HPLC metody je vždy nutné shromáždit na základě literární rešerše co nejvíce **dostupných informací** o analyzovaném vzorku. V případě, že je v dostupné literatuře popsána nějaká chromatografická separace vhodná pro daný analyt a nebo látku strukturně blízkou, je vhodné při vývoji metody vycházet z těchto informací. V opačném případě, je nutné vyvíjet HPLC metody „de novo“. U známých chemických látek je důležité získat informace o jejich chemické struktuře, funkčních skupinách, izomerech, molekulové hmotnosti, pKa, log P, UV spektrech, jejich rozpustnosti atd. Dalším z důležitých prvotních kroků, je co možná nejpřesnější **definovat cíle a parametry separace** (tj. určit pro jaký typ analýz má být metoda v budoucnu použita). V této fázi před analytikem většinou vyvstává několik zásadních otázek, které musí být vyřešeny před začátkem vlastní vývojové práce např.

- Je primárním cílem kvantitativní analýza, detekce neznámé látky v analyzovaném vzorku nebo izolace některé z komponent vzorku?
- Je nutné separovat všechny složky ve vzorku?
- Jaké jsou požadavky na přesnost a správnost kvantitativního stanovení?
- Pro jaké druhy různých matric má být metoda použitelná?
- Kolik vzorků má být analyzováno současně?
- Jaké instrumentální zázemí je dostupné v laboratoři?<sup>8</sup>.

### 3.3.2. Způsob úpravy vzorku a volba způsobu detekce

Pomocí HPLC jsou analyzovány **vzorky různé povahy**, od jednoduchých roztoků obsahujících pouze jednu látku až po relativně složité směsi. V některých případech je možné vzorek analyzovat přímo bez předchozí úpravy, jindy je nutno analyt (analyty) ze vzorku izolovat, popřípadě vzorek zakoncentrovat. Požadavky na citlivost analýzy, chemická povaha analytů a charakter matrice významně ovlivňují **výběr způsobu detekce**. Detekce v UV oblasti je nejběžněji používanou detekční technikou v HPLC analýze léčiv. V mnoha případech je však nutné (např. pro zvýšení citlivosti) zvolit jiný typ detekce - fluorescenční nebo MS.

Zvýšení citlivosti detekce lze také dosáhnout derivatizací. Derivatizace je chemická reakce analytu s chemickým činidlem, která vede ke změně fyzikálních a chemických vlastností analytu. V HPLC analýze léčiv jde nejčastěji o zavedení flouoroforu nebo chromoforu do molekuly, avšak derivatizace může být použita i v jiných případech (např. zlepšení extrahovatelnosti, stability analytu atd.)<sup>8</sup>.

### 3.3.3 Výběr způsobu dělení a dosažení uspokojivé separace

#### 3.3.3.1. Volba způsobu chromatografické separace

Chromatografie na **obrácených fázích** bývá obvykle první volbou pro separaci většiny léčiv. Dochází při ní k dělení látek mezi méně polární stacionární fází a více polární fází mobilní (nejčastěji směs vody nebo pufru a organického rozpouštědla). Retence látek v RP systémech roste se zvyšující se polaritou mobilní fáze<sup>5,8,17</sup>.

V případě, že nelze dosáhnout uspokojivé separace v systému obrácených fází, je možné zvolit jiný způsob chromatografie. Nejčastěji bývá zvolena chromatografie na normálních fázích nebo iontově výměnná chromatografie. Při separaci na **normálních fázích** dochází k dělení látek mezi polární stacionární fází a méně polární fází mobilní. Stacionární fáze je většinou tvořena nemodifikovaným silikagelem nebo silikagelem modifikovaným navázanou polární funkční skupinou (aminosilikagel, kyanosilikagel atd). Mobilní fází jsou směsi organických rozpouštědel bez obsahu vody (2-propanol, hexan atd). Retence analytů vzrůstá se snižující se polaritou mobilní fáze<sup>8</sup>. Při **iontově-párové chromatografii** (ion-pair chromatography) je selektivita RP separace upravena přidávkem iontově-párového činidla (IPA) do mobilní fáze. IPA je díky svojí hydrofobní části přitahováno k stacionární fází a tak je část nesoucí náboj „ukotvena“ na povrchu stacionární fáze. Tento náboj je kompenzován opačně nabitými ionty, které jsou obsaženy v mobilní fází. Při průchodu analytu kolonou jsou ionty mobilní fáze nahrazovány za ionty analytu. Tento proces pak vede k retenci analytu na základě iontově výměnného procesu. Jako IPA se používají nejčastěji alkylsulfonáty (pro ovlivnění retence bazických látek) a tetrabutylamoniové soli (pro ovlivnění retence látek kyselých)<sup>8,17</sup>.

Jiné typy chromatografie jsou většinou používány pro **analýzu speciálních vzorků** jako jsou např. makromolekuly, sacharidy, enantiomery, anorganické ionty atd.

### 3.3.3.2. Volba stacionární fáze

**Výběr vhodné chromatografické kolony je na začátku vývoje HPLC metody jedním z klíčových problému.** Komerčně je dostupná široká škála různých HPLC kolon. Výrobci dodávají každoročně několik typů nových stacionárních fází vyrobených různými novými technologiemi a postupy nebo kolony, které jsou speciálně vhodné pro některý typ analytu (podrobnější popis stacionárních fází je uveden v kapitole 2.2).

RP separace jsou obvykle realizovány na HPLC kolonách na bázi silikagelu s modifikovaným povrchem. Retence látek na koloně v podstatě závisí na třech základních charakteristikách kolony: typu vázané fáze, procentu pokrytí a povrchu kolony (velikost porů). Obecně platí, že retence analytů roste s délkou řetězce a hydrofobicitou vázané fáze. Retenční faktor separace je proporcionální povrchu kolony. Při vývoji metody jsou jako vhodná první volba doporučovány silikagelové kolony C18 nebo C8.

Kromě charakteru použité stacionární fáze bývá na počátku vývoje metody řešena také otázka rozměrů kolony a velikosti částic. Kolona o rozměrech 25 nebo 15 x 0,46 cm, velikostí částic 5  $\mu\text{m}$  a velikostí porů 80-100  $\text{\AA}$  je doporučována jako nejvhodnější první volba. Menší částice signifikantně zvyšují počet teoretických pater kolony, avšak určitým problémem může být poněkud vyšší zpětný tlak a vyšší riziko ucpání. Kolony o délkách 25 cm mírně zvyšují počet teoretických pater kolony, avšak také částečně prodlužují analýzy<sup>8</sup>.

### 3.3.3.3. Volba složení mobilní fáze

Mobilní fáze (MF) v RP chromatografii bývá tvořena složkou nepolární a polární. **Nepolární složkou** mobilní fáze jsou nejčastěji tři organická rozpouštědla: methanol (MeOH), acetonitril (ACN) nebo tetrahydrofuran (THF). Jejich eluční síla klesá s rostoucí polaritou v pořadí THF > ACN > MeOH. Acetonitril je nejvhodnější první volbou při vývoji HPLC metody. Směs ACN a vody má nízkou viskozitu, umožňuje dosažení relativně vysokého počtu teoretických pater i poměrně nízkého zpětného tlaku. Další volbou je methanol a dále pak tetrahydrofuran. Organická rozpouštědla vykazují slabou absorpci UV záření, a proto mohou způsobit problémy při analýzách využívajících detekci při nízkých vlnových délkách. THF způsobuje problémy při práci s vlnovými délkami pod 212 nm. Methanol a acetonitril mají

tento práh (tzv. UV cut-off) nižší, 205 a 190 nm. THF vykazuje ještě některé další nevýhody, jako jsou reaktivita s kyslíkem (možnost tvorby peroxidů) a poměrně dlouhý čas nutný k ekvilibraci kolony při změně podmínek. Nicméně, v některých případech umožňuje toto rozpouštědlo účinně modifikovat selektivitu separace. MeOH a ACN jsou tedy při vývoji metody upřednostňovány a THF je přidáván do mobilní fáze pouze v malých koncentracích pro modifikaci selektivity separace<sup>8</sup>.

Pro analýzu látek neutrální povahy často postačuje jako **polární složka** mobilní fáze voda. Avšak v případě, analytů obsahujících ionizovatelné funkční skupiny, je nutné během chromatografie kontrolovat pH mobilní fáze. Pro dosažení účinné separace je většinou žádoucí, aby byl analyt buď plně ionizovaný (snížení retence) nebo neionizovaný (zvýšení retence). Tohoto stavu lze dosáhnout nastavením pH mobilní fáze tak, aby bylo asi o 1,5 stupně vyšší nebo nižší než je pK<sub>a</sub> analyzované látky. V případě amfoterních analytů ovlivňuje retenci ionizace všech funkčních skupin v molekule. Pro většinu organických kyselin postačuje k jejich úplné ionizaci pH okolo 3, avšak v případě bazických látek je často nutné upravit pH mobilní fáze na hodnotu překračující pH 8. Vzhledem k tomu, že při těchto hodnotách hrozí rozpouštění silikagelu, jsou na trhu dostupné i kolony odolné vůči vysokým hodnotám pH (např. kolony s hybridní stacionární fází nebo zirkoniové kolony). Při výběru vhodného pufru je nutné přihlídnout k jeho pufrovací kapacitě, absorpci UV záření, rozpustnosti, stabilitě a možným interakcím s analytem nebo stacionární fází. Fosfátové pufrы jsou v počátečních fázích vývoje používány nejčastěji. Avšak v oblastech pH okolo 6,2-8,2 jsou silikagelové kolony vůči působení těchto pufrů méně odolné než v případě pufrů organických<sup>5,8</sup>.

V některých případech vyžaduje charakter analytu **přídavek některého additiva** do mobilní fáze např. triethylaminu (analýza bazických látek – snížení vlivu volných silanolů stacionární fáze), iontově párového činidla (alkylsulfonové kyseliny nebo alkylamoniové soli), EDTA atd. V případě spojení HPLC s MS detekcí je nutné používat pouze těkavé pufrы (např. mravenčanový)<sup>8</sup>.

#### 3.3.3.4. Teplota na koloně, průtok mobilní fáze

Mezi další faktory ovlivňující separaci patří teplota na koloně. **Teplota** může ovlivňovat retenci látek i selektivitu separace. Většinou se doporučuje pracovat při teplotách o něco vyšších než je teplota laboratoře, které vedou ke snížení viskozity mobilní fáze, snížení zpětného tlaku i k lepší robustnosti metody<sup>8</sup>.



Změna **průtoku** mobilní fáze nevede ke změně selektivity separace, ale přesto se mírně odrazí ve změně rozlišení. Její vliv na rozlišení klesá se snižující se velikostí částic. S klesajícím průtokem mobilní fáze mírně vzrůstá počet pater kolony a rozlišení se mírně zlepšuje, avšak pouze do určitého okamžiku, kdy další snižování průtoku způsobí snížení počtu teoretických pater. Mobilní fáze proudící kolonou může mít v čase stále stejné složení (izokratická analýza) nebo se její složení může v čase měnit (gradientová analýza). Při gradientových analýzách se většinou používají binární směsi, kdy procento organické složky roste s časem většinou lineárně<sup>8</sup>.

### 3.3.3.5. Dosažení uspokojivé separace

Chromatografické podmínky vyvinuté v počátečních experimentech většinou neposkytují kvalitní separaci všech složek směsi, a tak je obvykle nutné tyto podmínky dále modifikovat. Kvalita chromatografické separace může být objektivně popisována pomocí několika základních veličin.

- **Kvantitativní popis kvality chromatografické separace**

**a/ Kapacitní faktor ( $k'$ )-** je vyjádřen následujícím vzorcem.

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} \quad [2]$$

$t_r$  - retenční čas analytu (čas od nástřiku vzorku do vrcholu píku analytu)

$t_0$  - mrtvý čas (retenční čas nezadržovaného analytu)<sup>5,8</sup>.

**Kapacitní faktor** vyjadřuje **míru retence** analytů v daném chromatografickém systému. Hodnota kapacitního faktoru není ovlivněna změnou průtoku mobilní fáze ani rozměry HPLC kolony. Jeho hodnota by se měla pohybovat v rozmezí 0,5-10, v některých případech 0,5-20. Je-li kapacitní faktor příliš velký, dochází k velké retenci látek na chromatografické koloně, k rozšiřování tvaru píků a neúměrnému prodlužování analýzy. V případě, že hodnoty kapacitních faktorů při prvních analýzách nedosahují uvedeného rozmezí, je třeba modifikovat podmínky separace<sup>8</sup>.

**b/ Rozlišení** - popisuje **míru separace složek** analyzované směsi a je vyjádřeno pomocí následujícího vzorce.

$$R_s = \frac{1,18(t_{r2} - t_{r1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad [3]$$

$t_{r1}$ ,  $t_{r2}$  - retenční časy prvního a druhého píku

$w_{h1}$ ,  $w_{h2}$  - šířka píku v polovině výšky<sup>25</sup>.

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píku na základní linii<sup>25</sup>, avšak pro kvantitativní analýzu se považuje za minimální rozlišení 1,7-2,0<sup>8</sup>. Rozlišení může být systematicky měněno se změnou chromatografických podmínek. Tři parametry –  $k'$  (kapacitní faktor),  $\alpha$  (selektivita),  $N$  (účinnost), které jsou závislé na experimentálních podmínkách, ovlivňují rozlišení podle následujícího vztahu:

$$R_s = \frac{1}{4}(\alpha - 1)N^{1/2} \left( \frac{k'}{1 + k'} \right) \quad [4]$$

$\alpha$  - selektivita;

$\alpha = k_2/k_1$  ; kde  $k_{1,2}$  jsou hodnoty kapacitních faktorů dvou následujících píků

$N$  - počet teoretických pater kolony

$k'$  - průměrný kapacitní faktor dvou následujících píků<sup>8</sup>.

Tento vztah [4] je tedy složen ze tří nezávislých parametrů.  $\alpha$  popisuje schopnost systému mobilní a stacionární fáze dělit dva různé analyty,  $k'/1+k'$  popisuje stoupající hodnotu rozlišení se zvyšující se retencí.  $N$  souvisí s kvalitou chromatografické kolony. Parametry  $\alpha$  a  $k'$  jsou ovlivněny vztahem mezi složením mobilní fáze, stacionární fází a teplotou na koloně. Zvýšení teploty o 1°C vede zpravidla k snížení retence ( $k'$ ) o 1-2 %. Změna teploty ovlivňuje také selektivitu separace.  $N$  je závislé na kvalitě kolony a může být modifikováno změnou průtoku, délky kolony nebo velikostí částic<sup>8</sup>.

**c/ Tvar píku** - ideální tvar chromatografického píku by měl odpovídat **Gaussovu rozdělení**, avšak v praxi se setkáváme s píky, které se více či méně od ideálního tvaru odchyľují. Tvar píku bývá vyjádřen **faktorem symetrie**:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad [5]$$

$w_{0,05}$  - šířka píku v jedné dvacetině výšky

$d$  - vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

**d/ Šířka píku** - je doplňujícím parametrem ke tvaru píku. Bývá většinou vyjadřována veličinou **počet teoretických pater**, která kromě vlastní šířky píku zohledňuje také čas, který pík prochází kolonou.  $N$  je vyjádřeno následujícím vztahem:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_r}{w_{0,5}} \right) \quad [6]$$

$t_r$  - retenční čas analytu

$w_{0,5}$  - šířka píku v polovině výšky<sup>8</sup>.

$N$  tedy vyjadřuje separační účinnost chromatografické kolony. Pro srovnání účinnosti více HPLC kolon se využívá veličiny **výškový ekvivalent teoretického patra (H)**, který je daný vztahem:

$$H = \frac{L}{N} \quad [7]$$

$L$  - délka kolony

Vztah mezi  $H$  a experimentálními podmínkami je možno vyjádřit pomocí následujícího vztahu (van Deemterova rovnice):

$$H = A + \left( \frac{B}{u} \right) + C'u \quad [8]$$

$A'$ ,  $B'$ ,  $C'$  - jsou konstanty pro konkrétní vzorek a experimentální podmínky ( $A'$  - vyjadřuje příspěvek turbulentní difúze,  $B'$  - příspěvek molekulární difúze a  $C'$  příspěvek proti přnosu hmoty).

$u$  - rychlost průtoku

Při optimální rychlosti průtoku mobilní fáze je  $N$  maximální a  $H$  minimální<sup>5,8</sup>.

- **Kvantifikace a zkrácená pre-validace vyvinuté metody**

Před zahájením plné, časově náročné procedury validace metody je často užitečné nejprve ve zkráceném schématu otestovat základní validační parametry a zaměřit se na odhalení všech možných problémů. Pre-validační fáze by měla umožnit zjistit kalibrační model (lineární, nelineární atd.), definovat limit detekce a kvantifikace, vyhodnotit rozsah metody a počet kalibračních úrovní, ověřit selektivitu a popřípadě stanovit absolutní výtěžnosti metody<sup>8,26, 27</sup>.

### 3.4. Validace analytických metod

Cílem validace analytických metod je pomocí experimentálních dat a jejich statistického zpracování prokázat, že jsou tyto metody vhodné pro zamýšlené užití. Konkrétní požadavky na jednotlivé validační parametry se liší v závislosti na typu vzorku a předpokládaném použití metody<sup>1,8,28</sup>. Jiné parametry budou vyžadovány pro metody používané pro stanovení obsahu účinné látky, pro analýzu léčivých přípravků, jiná kritéria budou platit pro metody stopové analýzy nebo bioanalytické studie.

V rámci procesu harmonizace byla v roce 1990 ustanovena **Mezinárodní konference pro harmonizaci technických požadavků na registraci humánních přípravků (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use - ICH)**<sup>1,28,29,30</sup>.

Požadavky a doporučení pro validaci metod užívaných ve farmaceutickém průmyslu jsou uvedeny v **ICH směrnici Q2(R1)**<sup>31</sup>, vydané s cílem harmonizovat požadavky na validační parametry v oblastech EU, USA a Japonska. Tento dokument postihuje především čtyři typy testů: určení totožnosti, kvantitativní test pro stanovení obsahu účinné látky, kvantitativní test pro stanovení obsahu nečistot a limitní zkoušky na nečistoty<sup>31</sup>. V případě **bioanalytických studií** (farmakokinetické studie, bioekvivalenční studie atd.) je vodítkem pro validace dokument **Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry** vypracovaný **Federálním úřadem pro léčiva a potraviny (FDA), Centrem pro hodnocení a výzkum léčiv (CDER) a Centrem pro veterinární medicínu (CVM)**<sup>21,32</sup>. Při validacích lze také postupovat podle národních monografií (USP) nebo doporučení Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL). Všechny tyto dokumenty mají spíše obecný charakter a míra jejich uplatnění závisí na konkrétní analytické metodě a požadavcích na ni<sup>33</sup>.

Analytická metoda se považuje za validovanou, jestliže její parametry vyhovují předepsaným požadavkům. Směrnice FDA rozlišuje tři typy validací: kompletní validaci (full validation), částečnou validaci (partial validation) a zkříženou validaci (cross-validation)<sup>32</sup>. V případě, že došlo ke změně metody, je nutné provést revalidaci, jejíž rozsah závisí na charakteru provedených změn. Termín zkřížená

validace se používá v případě srovnání parametrů dvou různých analytických metod, kde metoda původně validovaná slouží jako referenční pro jinou metodu<sup>1,32</sup>.

Validované metody určené pro rutinní laboratorní použití, musí mít přesně definované podmínky, za kterých mohou být používány bez nutnosti opětovné validace. Tato kritéria jsou označována jako **test způsobilosti systému (system suitability test)**. Jejich přesný popis závisí na charakteru metody a účelu jejího použití. Mohou zahrnovat celou řadu různých parametrů (např. maximální R.S.D. ploch opakovaných nástřiků, minimální rozlišení sousedních píků nebo poměr signálu k šumu). V případě chromatografických metody mají tato kritéria zajistit dostatečnou reprodukovatelnost a účinnost systému. Před každou novou sérií vzorků, při změně chromatografického systému nebo při přenosu metody do jiné laboratoře musí být provedeno ověření metody testem způsobilosti systému<sup>1,31</sup>. Parametry testů způsobilosti jsou uvedeny v národních lékopisných monografiích<sup>28</sup>.

Při validaci analytických metod, je nutné používat referenční standardy, které mají přesně definovanou čistotu. Referenční standard by měl být naprosto identický s analytem. V případě, že toto není možné, může být použita i jiná chemická forma téže látky o známe čistotě. Obecně lze použít tři typy standardů: certifikované referenční standardy (lékopisné standardy), komerčně dostupné standardy nebo jiné standardy o doložené čistotě<sup>32,34</sup>.

#### **Základními validačními parametry jsou:**

- Selektivita
- Správnost
- Přesnost
- Detekční a kvantitativní limit
- Linearita a rozsah
- Extrakční výtěžnost
- Robustnost
- Stabilita vzorků<sup>31,32</sup>.

### 3.4.1. Validace analytických metod podle ICH směrnice

ICH směrnice obsahuje doporučení pro validaci především čtyř typů běžných analytických testů: **zkoušky totožnosti, hodnocení čistoty - kvantitativní a limitní testy a stanovení obsahu účinné látky** v substancích, léčivých přípravcích nebo jiných komponentech léčivých přípravků<sup>31</sup>. Tabulka č.1 uvádí validační údaje doporučené pro jednotlivé typy analytických testů.

Stanovení	Totožnosti	Čistoty		Obsahu
Charakteristika		Limitní test	Kvantitativní test	
Správnost (Accuracy)	-	-	+	+
Přesnost (Precision)	-	-	+	+
<i>Opakovatelnost (Repeatability)</i>	-	-	+	+
<i>Intermediální přesnost (Intermediate precision)</i>	-	-	+	+
<i>Reprodukovatelnost (Reproducibility)</i>	-	-	+	+
Selektivita (Selectivity)	+	+	+	+
Detekční limit (Detection limit)	-	+	-	-
Kvantitativní limit (Quantification limit)	-	-	+	-
Linearita (Linearity)	-	-	+	+
Rozsah (Range)	-	-	+	+

Tabulka č. 1. Údaje doporučené pro validaci analytických metod podle ICH směrnice<sup>31</sup>.

## 1/ Selektivita (Selectivity)

Selektivita je schopnost metody správně a specificky analyzovat stanovenou látku v přítomnosti jiných látek (např. pomocných látek, nečistot, rozkladných produktů atd.) Selektivita by měla být stanovena u všech čtyřech typů analytických testů<sup>28,31</sup>.

### a/ Zkoušky totožnosti

Vhodný test totožnosti má být schopen rozlišit přítomnost látek s blízkou strukturou k analyzované látce, které mohou být přítomny ve vzorku. Porovnávají se výsledky analýz vzorků, které obsahující analyzovanou látku s výsledky analýz vzorků, které ji neobsahují.

### b/ Stanovení obsahu a hodnocení čistoty

Pro doložení selektivity chromatografických (nebo jiných separačních) metod může být použit chromatografický záznam ve kterém musí být označeny jednotlivé složky směsi. V případě kritických separací (separace dvou analytů s malým rozlišením) může být selektivita doložena rozlišením dvou složek směsi s velmi blízkými vlastnostmi, které jsou eluovány v těsné blízkosti.

#### ○ *Dostupné (známé) nečistoty*

V případě metod určených pro **stanovení obsahu účinné látky**, se selektivita potvrdí přidáním známého množství nečistoty nebo pomocné látky (látek) do modelového vzorku, který obsahuje známé množství látky účinné. Porovnáním výsledků stanovení takto připraveného modelového vzorku a vzorku obsahujícího pouze látku účinnou, musí být prokázáno, že přídavek nečistoty (pomocné látky) neovlivňuje výsledky stanovení účinné látky.

Při zkouškách určených pro **hodnocení čistoty** se selektivita prokazuje analýzou vzorku připravených přidáním známého množství nečistoty (nečistot) k účinné látce nebo léčivému přípravku. Následně se sleduje separace mezi těmito nečistotami navzájem a/nebo mezi jinými složkami matrice.

#### ○ *Nedostupné nečistoty*

V případě, že nečistoty a/nebo rozkladné produkty nejsou známé, hodnotí se selektivita metody porovnáním výsledků analýzy vzorků obsahujících danou nečistotu nebo rozkladný produkt s výsledky jiné dobře definované validované analytické metody (nezávislá metoda). Pro tento účel je vhodné použít vzorky ze zátěžových testů (např. kyselá, zásaditá hydrolýza, světlo, vlhkost atd).



Při hodnocení selektivity metody je **vhodné provést ověření čistoty chromatografického píku**. Pro tyto účely se nejčastěji používá DAD (popř. MS) detekce<sup>28,31</sup>

## 2/ Správnost (Accuracy)

Správnost metody je vyjádřena jako shoda výsledků stanovení prováděných danou metodou a skutečných hodnot.

### a/ Stanovení obsahu účinné látky

- *Stanovení obsahu účinné látky v substanci* je možno provádět následujícími způsoby:
  - a/ použít vyvinutou metodu pro analýzu látky o známé čistotě (referenční látka)
  - b/ porovnávat výsledky dané metody s výsledky jiné dobře popsané metody o předem definované správnosti (nezávislá metoda)
  - c/ odvodit správnost souběžně s určováním přesnosti, linearitu a selektivity metody
- *Stanovení obsahu v léčivém přípravku* je možno provádět následujícími způsoby:
  - a/ použít vyvinutou metodu pro analýzu směsi všech komponent (obsažených v daném přípravku), do které bylo přidáno známé množství stanovované látky
  - b/ v případě, že není možné získat směs všech komponent přípravku, je možné buď přidat známé množství analytu do léčivého přípravku nebo porovnat výsledky dané metody s výsledky jiné metody s přesně definovanou přesností (nezávislá metoda)
  - c/ odvodit správnost souběžně s určováním přesnosti, linearitu a selektivity metody

**b/ Hodnocení čistoty - kvantitativní test,** je možno provádět následujícími způsoby:

- a/ zjistit správnost metody analýzou vzorku s přidavkem známého množství nečistoty
- b/ v případě, že není možné získat danou nečistotu je možné porovnat výsledky dané metody s výsledky získané jinou nezávislou metodou.

Je doporučeno provádět nejméně **3 stanovení** na minimálně **3 koncentračních hladinách** pokrývajících celé rozmezí metody. Správnost může být vyjádřena jako procento výtěžnosti stanovení známého množství analytu přidaného ke vzorku nebo jako rozdíl mezi průměrem a akceptovanou skutečnou hodnotou<sup>28,31</sup>.

### 3/ Přesnost (Precision)

Přesnost metody je míra těsnosti výsledků měření získaných vícenásobnou analýzou téhož homogenního vzorku. Přesnost bývá hodnocena na třech úrovních: opakovatelnost, intermediální přesnost a reprodukovatelnost.

#### a/ Stanovení obsahu účinné látky a hodnocení čistoty (kvantitativní test)

- *opakovatelnost* - je požadováno minimálně **9 stanovení pokrývajících celý rozsah měření** (např. 3 definované koncentrace o 3 vzorcích v jedné koncentraci) nebo minimálně **6 stanovení na 100 % koncentrační hladině**.
- *intermediální přesnost* - jde o určení náhodných vlivů na přesnost metody (stejně analýzy prováděné jiným analytikem nebo na jiném přístroji atd.). Rozsah závisí na předpokládaném použití metody.
- *reprodukovatelnost* - jde o přesnost měření mezi více laboratořemi

Pro každou úroveň přesnosti je doporučeno uvádět **směrodatnou odchylku, relativní směrodatnou odchylku a interval spolehlivosti**<sup>28,31</sup>.

### 4/ Detekční limit (Detection limit)

Detekční limit je definován jako nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být danou metodou detekováno, avšak nemusí být přesně kvantifikováno. Přístupy pro určení detekčního limitu se liší v závislosti na tom, je-li daná metoda instrumentální nebo neinstrumentální.

- **Vizuální hodnocení** je používané především u neinstrumentálních metod, nicméně lze tento způsob použít i u metod instrumentálních. Analýzou vzorků se známým obsahem analytu se určí nejnižší koncentrace, která může být ještě spolehlivě detekována.
- **Porovnání poměru signál-šum** - porovnáním záznamů analýz vzorků se známým nízkým obsahem analytu a záznamu slepého (blankového) vzorku se určí koncentrace, při které je signál vzorku trojnásobně větší než signál šumu na záznamu blanku. Tato koncentrace bývá považována za detekční limit.

- **Metoda vycházející ze směrodatné odchylky signálu a její směrnice** - detekční limit je vyjádřen jako DL.

$$DL = \frac{3,3\sigma}{S} \quad [9]$$

$\sigma$  - směrodatná odchylka signálu

S - směrnice kalibrační křivky

Směrnice „S“ bývá zjištěna z kalibrační křivky,  $\sigma$  může určeno různými způsoby např.:

- *Metoda vycházející ze směrodatné odchylky slepého vzorku (blanku)* - analýzou vhodného počtu slepých vzorků se změní velikost analytického pozadí a vypočítají se směrodatné odchylky těchto signálů.
- *Metoda založená na kalibrační křivce* - sestrojí se specifická kalibrační přímka ze vzorků obsahujících danou látku v koncentračním rozsahu blízkému detekčního limitu. Linearita této přímky se vyhodnotí metodou lineární regrese. Residuální směrodatná odchylka této regresní přímky nebo směrodatná odchylka y – hodnot regresních přímek může být použita jako  $\sigma$ .

**Detekční limit i metoda, kterou byl stanoven by měly být doloženy ve validační zprávě.** V případě vizuálního hodnocení nebo porovnání signálu a šumu je za akceptovatelné považováno doložení relevantního chromatogramu<sup>28,31</sup>.

## 5/ Kvantitativní limit (Quantification limit)

Kvantitativní limit je nejnižší koncentrace látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Pro stanovení kvantitativního limitu lze použít řadu způsobů, v závislosti na tom, jestli je daná metoda instrumentální nebo ne. Akceptovatelné jsou i jiné metody než které jsou uvedeny níže.

- **Vizuální hodnocení** je možné použít u instrumentálních i neinstrumentálních metod. Analýzou vzorků o známém obsahu dané látky se určí nejnižší koncentrace, která je ještě kvantifikovatelná s přijatelnou přesností a správností.
- **Porovnání poměru signál-šum detektoru** - porovnáním analýz vzorků se známým nízkým obsahem analytu a slepých vzorků se určí se koncentrace, jejichž signál je roven desetinásobku šumu. Tato koncentrace bývá považována za kvantitativní limit.

- **Metoda vycházející se směrodatné odchylky signálu a její směrnice** - kvantitativní limit je vyjádřen jako QL

$$QL = \frac{10\sigma}{S} \quad [10]$$

$\sigma$  - směrodatná odchylka signálu

S - směrnice kalibrační křivky

S bývá zjištěno z kalibrační křivky,  $\sigma$  může být určeno obdobným způsobem jako v případě stanovení limitu detekce. V případě užití metody založené na kalibrační křivce se však sestrojí kalibrační závislost se vzorků obsahujících analyt v koncentračním rozmezí blízkém QL.

**Kvantitativní limit a metoda, kterou byl stanoven by měla být doložena ve validační zprávě.** Kvantitativní limit by měl být následně potvrzen analýzou vhodného množství vzorků o známém obsahu analytu v blízkosti QL<sup>31</sup>.

## 5/ Linearita (Linearity)

Linearita je schopnost metody poskytovat výsledky přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Linearita se vyhodnocuje s ohledem na rozsah metody. Může být prokázána přímo analýzami standardních roztoků účinné látky (získané zředěním standardních zásobních roztoků) a/nebo analýzou směsí složek léčivého přípravku. Závislosti signálu detektoru na koncentraci nebo obsahu analytu ve vzorku se zpravidla vyhodnocuje pomocí vhodných statistických metod (např. vypočítání regresní přímky za použití metody nejmenších čtverců). V některých případech se výsledky stanovení musí matematicky transformovat, aby bylo dosaženo lineární závislosti.

Korelační koeficient, úsek na ose „y“ a směrnice přímky musí být součástí validační zprávy. Vhodným doplněním výsledků linearity mohou být analýzy odchylek naměřených výsledků od regresní křivky.

Pro stanovení linearity se doporučuje použít nejméně **5 koncentrací analyzované látky**<sup>28,31</sup>.

## 6/ Rozsah (Range)

Rozsah obvykle vychází ze studie linearity a závisí na předpokládaném použití dané metody. Je definován jako interval mezi nejnižší a nejvyšší koncentrací analytu ve vzorku, ve kterém vykazuje daná metoda dostatečnou míru správnosti, přesnosti a linearity.

### ICH uvádí následující doporučení týkající se minimálního rozsahu:

- 80-120 % - pro stanovení obsahu účinné látky nebo konečného produktu
- 70-130 % - pro stanovení obsahové stejnoměrnosti (pokud charakter lékové formy nevyžaduje rozsah širší)
- $\pm 20\%$  nad specifikovaného rozsahu pro disoluční testy
- pro stanovení nečistot - od limitu nad který musí být nečistoty uvedeny (reporting level) do 120 % stanoveného limitu pro obsah dané nečistoty

V případě hodnocení obsahu a čistoty v jednom testu a použití pouze standard v jedné 100 % koncentraci, by linearita metody měla pokrýt rozsah od limitu nad který musí být nečistoty uvedeny (reporting level) až po 120 % stanoveného limitu pro obsah dané nečistoty<sup>28,31</sup>.

## 7/ Robustnost (Robustness)

Robustnost metody je míra její schopnosti zůstat neovlivněna při malých změnách parametrů. Robustnost tak poskytuje informace o vhodnosti metody pro každodenní použití. Robustnost by měla být testována již během vývoje, přičemž jednotlivé testované parametry závisí na typu vyvíjené metody. V případě, že je metoda citlivá na změny analytických podmínek, mají být tyto podmínky vhodně kontrolovány a nebo zahrnuty do metody v podobě předběžných opatření. Výsledkem hodnocení robustnosti má být stanovení série parametrů nazývaných **systém způsobilosti systému**, který zajistí validitu analytické metody při každodenním použití.

Typické parametry robustnosti jsou: stabilita analytických roztoků, extrakční doba, změny pH, složení a průtok mobilní fáze, změny teploty na koloně atd.<sup>28,31</sup>.

## 8/ Test způsobilosti systému (system suitability test - SST)

Test způsobilosti systému je součástí mnoha analytických metod, především však metod separačních. SST vychází z předpokladu, že přístrojové vybavení, elektronika analytické operace a vzorky použité pro analýzu vytváří integrálním systémem, který se hodnotí jako celek. SST je souborem kritérií, které musí být splněny, aby daná metoda mohla být používána v každodenní praxi, bez toho aniž by byla pokaždé znovu validována. Parametry SST jsou uvedeny v národních lékopisech<sup>28,31</sup>.

### 3.4.2. Validace metod podle USP

Americký lékopis (USP) obsahuje, na rozdíl od lékopisu Evropského podrobnější definice jednotlivých validačních pojmů, avšak některé pojmy a charakteristiky jsou poněkud odlišné od požadavků uvedených v ICH směrnících. Tabulka č.2 srovnává parametry požadované pro validace metod v USP a ICH. Podrobnější srovnání validačních parametrů USP a ICH směrníc je shrnuto v kapitole týkající se validace v monografii kolektivu autorů – Stabilita léčiv a liekov<sup>28</sup> nebo přehledného článku G.A. Shabir<sup>34</sup>.

Validační parametr	ICH	USP
Správnost (Accuracy)	+	+
Přesnost (Precision)	+	+
<i>Opakovatelnost (Repeatability)</i>	+	
<i>Intermediální přesnost (Intermediate precision)</i>	+	
<i>Reprodukovatelnost (Reproducibility)</i>	+	
Selektivita (Selectivity)	+	+
Detekční limit (Detection limit)	+	+
Kvantitativní limit (Quantification limit)	+	+
Linearita (Linearity)	+	+
Robustnost (Robustness)	+	+
Odolnost (Ruggedness)	-	+

Tabulka č. 2. Porovnání validačních parametrů pro analytické metody podle ICH a USP<sup>28</sup>.

### 3.4.3. Validace bioanalytických metod podle doporučení FDA

Dokument „**Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry**” poskytuje obecné **doporučení pro validaci bioanalytických metod**, používaných pro účely klinických studií u nichž jsou zjišťovány farmakokinetické parametry (např. studie biologické dostupnosti, bioekvivalence). Tento dokument pokrývá také validace metod používaných pro potřeby nehumáních (experimentálních) farmakologických a toxikologických studií. Základní validační parametry tohoto dokumentu jsou: selektivita, správnost, přesnost, citlivost, opakovatelnost a stabilita<sup>32,35,36</sup>.

#### 1/ Selektivita (Selectivity)

Selektivita analytické metody je schopnost správně měřit koncentrace analytu v přítomnosti jiných komponentů vzorku (např. endogenní látky z biologické matrice, metabolity atd.). U bioanalytických metod by selektivita měla být ověřena analýzou **vzorků matrice** (blankových vzorků) získaných z minimálně **šesti různých zdrojů**. Selektivita by měla být testována již při vývoji analytické metody, ale také by měla být ověřována při analýzách reálných vzorků (možnost interference léčiva a metabolitů)<sup>32,37,38</sup>.

#### 2/ Správnost (Accuracy)

Správnost vyjadřuje míru těsnosti výsledků získaných danou metodou a skutečných hodnot (koncentrací) analytu ve vzorcích. U bioanalytických metod se správnost vyjadřuje jako výtěžnost (R) nebo jako odchylka zjištěné koncentrace od přijaté referenční hodnoty (bias).

$$R = \frac{c}{c_{real}} \cdot 100(\%) \quad [11]$$

$$Bias = \frac{c - c_{real}}{c} \cdot 100(\%) \quad [12]$$

R - výtěžnost

c – stanovená koncentrace

c<sub>real</sub> – skutečná koncentrace

Správnost musí být ověřena minimálně na **3 koncentračních úrovních** (horní, střední a nízká) a aspoň **pěti samostatně připravenými vzorky** na každé z nich.

U bioanalytických metod by se průměrná hodnota správnosti na každé koncentrační úrovni měla pohybovat **v rozmezí 85 – 115 %** s výjimkou **limitu kvantifikace**, kde může dosahovat hodnot **80 - 120 %**<sup>32,38,39</sup>.

### 3/ Přesnost (Precision)

Míra těsnosti shody výsledků jednotlivých měření. Vyjadřuje se jako relativní směrodatná odchylka R.S.D. resp. variační koeficient (CV%).

$$CV = \frac{S_d}{x} \cdot 100(\%) \quad [13]$$

$s_d$ - směrodatná odchylka

$x$ - střední hodnota měření

Přesnost musí být ověřena minimálně na **3 koncentračních úrovních** (horní, střední a nízké) a aspoň **pěti samostatně připravenými vzorky** na každé z nich. Přesnost bývá běžně hodnocena **v sériích** v rámci jednoho dne (intra-batch, intra-day) a mezi sériemi a v rámci více dní (inter-batch, inter-day). Hodnocení přesnosti může mít tři úrovně (opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost). Hodnota variačního koeficientu u bioanalytických metod by měla být **maximálně 15 %**, kromě přesnosti na **limitu kvantifikace**, kde je povolena hodnota **20 %**<sup>32,38,39</sup>.

### 4/ Extrakční výtěžnost (Recovery)

Extrakční výtěžnost vyjadřuje ztráty, které jsou způsobené izolací analytu z biologické matrice. Extrakční výtěžnost bývá zjišťována porovnáním plochy (popř. výšky) pík analytu extrahovaného vzorku a plochy (popř. výšky) píku standardu o stejné koncentraci. Extrakční výtěžnost může být závislá na koncentraci analytu, a tak musí být testována ve více koncentracích (aspoň třech). Nemusí vždy dosahovat hodnot blízcím se 100 %, ale má být **koncizní a reprodukovatelná**.

Kromě extrakční výtěžnosti analytu, bývá stejným způsobem zjišťována také výtěžnost vnitřního standardu v koncentraci užívané při analýzách<sup>32,38,39</sup>.



## 5/ Kalibrační křivka (Calibration curve)

Kalibrační křivka vyjadřuje závislost mezi odezvou detektoru a známým množstvím analytu ve vzorku. Kalibrační křivka by měla být sestrojena pro každý analyt ve vzorku za použití dostatečného množství standardů pro popsání závislosti mezi koncentrací a odezvou.

Kalibrační vzorky se připravují přidavkem známého množství referenčního standardu do vzorku prázdné plasmu (blank). **Počet kalibračních vzorků a jejich koncentrace záleží na předpokládaném rozsahu metody.** Kalibrační přímka by měla obsahovat vzorek matrice bez analytu (blank), nulový vzorek (matrice s vnitřním standardem) a šest až osm nenulových kalibračních vzorků pokrývajících koncentrační rozmezí včetně limitu kvantifikace.

Aby mohla být kalibrační přímka používána, musí aspoň **čtyři body** (šesti bodová kalibrace) **splňovat podmínku maximálně 15 %** odchylky od nominální koncentrace analytů ve vzorku. Na **limitu kvantifikace** je povolena **20 % odchylka**. Maximálně dva nenulové body mohou nesplňovat toto kritérium, ale nesmí jít o body na horním (ULOQ) a dolním limitu kvantifikace (LLOQ). Aspoň dvě ze tří připravených kalibračních křivek musí tato kritéria splňovat, aby mohla být metoda považována za lineární<sup>32, 38, 39</sup>.

## 6/ Dolní limit kvantifikace (LLOQ)

Podle směrnice FDA je za kvantitativní limit (LLOQ) považována taková koncentrace analytu, při které je **poměr signálu a šumu 5:1** a při které je pík analytu dobře identifikovatelný, oddělený a reprodukovatelný s **přesností 20 % a správností minimálně 80-120 %**. LLOQ by měl být určen na základě analýz minimálně **pěti nezávislých standardních vzorků** a vyhodnocení jejich CV a/nebo příslušného konfidenčního intervalu. LLOQ je považováno za dolní mez pro stanovení, horní mez (ULOQ) bývá definována bodem o nejvyšší koncentraci na kalibrační křivce. Vzorky o vyšší koncentraci mohou být analyzovány po adekvátním zředění. Toto zředění však musí být validačně doloženo<sup>32,38,39</sup>.

## 7/ Stabilita (Stability)

Jedním z důležitých předpokladů pro získání reprodukovatelných a hodnověrných výsledků měření je stabilita vzorků i standardů během celého procesu přípravy, skladování i vlastní HPLC analýzy. Stabilita vzorků v biologické

matrici je funkcí skladovacích podmínek, chemických vlastností léčiva, matrice a obalového materiálu. Design stabilitní studie by vždy měl odrážet podmínky, kterým budou vystaveny reálné vzorky během přípravy, přepravy a vlastní analýzy. V případě biologických vzorků je potřebné vyhodnotit stabilitu analytu v biologické matrici při odběru, zpracování (např. zamražení), transportu, skladování, následném rozmražení, stabilitu analytů při úpravě vzorku i při vlastní analýze.

Zpravidla se hodnotí:

- **Krátkodobá stabilita analytu v biologické matrici** - obvykle bývá hodnocena za laboratorní teploty v intervalech 4 - 24 hodin.
- **Dlouhodobá stabilita analytu v biologické matrici** - stabilita za běžných skladovacích podmínek – doba experimentu by měla být delší než je časový úsek mezi prvním odběrem vzorku a analýzou posledního vzorku.
- **Stabilita analytu v matrici po rozmrazení a opětovném zamrazení** - obvykle se provádí v několika cyklech.
- **Stabilita zásobních roztoků** - stabilita zásobních roztoků analytu i vnitřního standardu za laboratorní teploty by měla být hodnocena po dobu aspoň 6 hodin. V případě, že jsou zásobní roztoky zamrazeny nebo uchovávány v chladu, měla by být jejich stabilita za těchto podmínek doložena.
- **Stabilita zpracovávaných vzorků (stabilita v automatickém dávkovači)** – účelem těchto hodnocení je ověřit stabilitu analytu a vnitřního standardu během doby, kdy jsou vzorky uchovávány v automatickém dávkovači před vlastní HPLC analýzou<sup>32,38,39</sup>

### 3.5. Úprava vzorku před HPLC analýzou

#### 3.5.1. Úprava vzorku

Úprava vzorku je nedílnou součástí většiny HPLC analýz, protože umožňuje získat homogenní roztok obsahující analyzované látky, který může být nastříkovaný na chromatografickou kolonu. **Cílem tohoto procesu je upravit vzorek aby:**

- byl zbaven nečistot a možných interferencí
- nepoškozoval kolonu
- byl kompatibilní s používanou HPLC metodou
- v případě nutnosti umožňoval zakoncentrování nebo derivatizaci vzorku, vhodnou pro zlepšení citlivosti detekce nebo zlepšení kvality separace<sup>8</sup>.

Na rozdíl od HPLC analýzy není proces úpravy vzorku tolik automatizovaný, často zabere více času než vlastní analýza, avšak má obvykle významný vliv na přesnost, správnost nebo citlivost metody<sup>8,40</sup>. Moderním trendem v této oblasti je snaha o automatizaci a on-line spojení procesu úpravy vzorku a vlastní HPLC analýzy (SPE-HPLC, SPME-HPLC). Automatizace umožňuje eliminovat chyby vzniklé při manuální úpravě vzorku a je zvláště cenná na pracovištích, které zpracovávají denně velké množství vzorků (např. TDM). Ideální metoda úpravy vzorku by měla být rychlá, automatizovatelná, jednoduchá, levná a kompatibilní s širokou škálou analytických technik<sup>41</sup>.

Pomocí HPLC lze po předchozí úpravě analyzovat vzorky různého charakteru (organické, anorganické) i skupenství (kapalné, pevné, polotuhé)<sup>8,40</sup>.

#### 3.5.2. Úprava biologického vzorku

Biologické vzorky jsou poměrně složité matrice, které většinou nelze (s výjimkou vzorků moči nebo žluči) přímo nastříkovat na chromatografickou kolonu. Mezi nejběžnější biologické materiály patří: plasma, sérum, krev, erytrocyty, moč nebo feces. Mezi méně běžné materiály patří sliny, pot, vlasy nebo kůže. V experimentálních podmínkách mohou být analyzovány také vzorky žluči nebo lyzátů různých tkání<sup>13,42</sup>.

Při výběru metody úpravy biologického vzorku je nutné brát v úvahu charakter a povahu biologického materiálu, chemickou strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti analytů (polaritu, rozpustnost, schopnost ionizace), ale také předpokládané koncentrační rozmezí, ve kterém se bude analyt ve vzorcích vyskytovat<sup>13</sup>.

**K nejčastěji užívaným technikám pro úpravu biologických vzorků patří: deproteinace, extrakce kapalina-kapalina (LLE: liquid-liquid extraction) a extrakce na pevných fázích (SPE: solid-phase extraction).** V poslední době se začíná využívat také mikroextrakce na pevných fázích (SPME: solid phase microextraction) nebo technika přepínání kolon (column-switching).

Mezi další metody úpravy biologických vzorků patří např. superkritická fluidní extrakce (supercritical fluid extraction) nebo mikroextrakce do kapalné fáze (LPME: liquid phase microextraction) a další<sup>41,43,44</sup>.

### 3.5.2.1. Deproteinace

Deproteinace patří k nejjednodušším metodám úpravy biologických vzorků před HPLC analýzou. **Během deproteinace jsou pomocí chemických činidel (výjimečně pomocí proteolytických enzymů) proteiny ve vzorku vysráženy a čirý supernatant je poté nastříkovan přímo na HPLC kolonu.** Někdy bývá mezi deproteinace zařazována také metoda ultrafiltrace, avšak tento způsob úpravy vzorku umožňuje stanovit, na rozdíl od ostatních způsobů deproteinace, pouze volnou frakci léčiva<sup>13,42,45</sup>.

- **Precipitační deproteinace**

Precipitační deproteinace bývá prováděna pomocí **organických rozpouštědel** mísitelných s vodou, **pomocí silných kyselin, solemi těžkých kovů** nebo **kombinací několika těchto činidel**. Nejčastěji jsou pro precipitaci používána organická rozpouštědla. Schopnost precipitace klesá v řadě: acetonitril > aceton > ethanol > methanol. Silnými precipitačními činidly jsou také kyseliny trichloroctová a chloristá. Soli těžkých kovů bývá používáno pouze zřídka, protože většinou nevykazují dostatečnou účinnost. Při výběru vhodného činidla je nutné zvážit vlastnosti analytů a jejich možné interakce s precipitačním činidlem (např. stabilitu v kyselém prostředí, schopnost vytvářet komplexy s kovy atd.)<sup>13,42,46</sup>.

- **Ultrafiltrace**

Při ultrafiltraci dochází k **oddělení nízko a vysokomolekulární frakce vzorku** za využití **semipermeabilní membrány** (umožňující pouze průchod látek o molekulové hmotnosti menší než 30 000) a **odstředivé síly** (centrifugy). Na rozdíl od precipitační deproteinace, při nichž do supernatantu přechází také frakce léčiva vázaná na plasmatické proteiny, do ultrafiltrátu přejde pouze volná frakce léčiva. Membrány mají anizotropní strukturu a jsou připraveny tak, aby zachycovaly co nejmenší množství ultrafiltrátu, a také minimalizovaly možnost nespecifické vazby léčiv na membránu. Ultrafiltrační membrány jsou schopné obvykle zachytit 99,9 % sérových proteinů. Množství ultrafiltrátu závisí na době a rychlosti centrifugace, přičemž lepších výsledků je obvykle dosahováno při použití centrifugy s fixním rotorem. Pro každý analyt je potřeba stanovit optimální pH a čas nutný pro ustálení rovnováhy. Důležitým parametrem je také teplota, která by měla být udržována během celého procesu ultrafiltrace konstantní, aby se minimalizoval její vliv na míru vaznosti léčiv<sup>13,47,48</sup>.

**Ultrafiltrace může být použita:**

- a/ jako metoda odstranění proteinů z biologických vzorků, použitelná spíše pro léčiva s nízkou vazbou na plasmatické proteiny<sup>49, 50</sup>.
- b/ pro stanovení volné frakce léčiva (např. stanovení volné frakce některých léčiv v rámci TDM - fenytoin, kyselina valproová, karbamazepin atd.)<sup>51,52</sup>.
- c/ stanovení vazby léčiv na plasmatické proteiny (vývoj nových léčiv, studie vaznosti atd.)<sup>48</sup>.

- **Enzymová deproteinace** - jde o odstranění proteinů pomocí proteolytických enzymů (trypsin, papain atd.). Tento způsob úpravy vzorku však zatím nenašel v analýze léčiv širší uplatnění<sup>13</sup>.

### 3.5.2.2. Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE: liquid-liquid extraction)

**Základním principem této metody je dělení látek mezi dvě nemísitelné kapalně fáze.** První fází je vodná složka a druhou tvoří s vodou nemísitelné organické rozpouštědlo. Více hydrofilní analyty preferují polární - vodnou složku, zatímco hydrofobní látky přecházejí snadno do organického rozpouštědla. Během

extrakce tedy přechází léčivo z biologického materiálu (vodná složka) do s vodou nemísitelného organického rozpouštědla. Rozpouštědlo se odpaří dosucha, odparek je většinou rozpuštěn v mobilní fázi a nastříkovan na kolonu.

Rozpouštědla používaná pro LLE by měli mít následující vlastnosti:

- nízká rozpustnost ve vodě (< 10%)
- těkavost
- kompatibilita s HPLC detekcí
- vhodná polarita pro maximální výtěžnost
- vysoká čistota pro minimální kontaminaci vzorku

Látka se rozděluje mezi dvě nemísitelné fáze na základě svého rozdělovacího koeficientu:

$$K_D = \frac{c_o}{c_{aq}} \quad [14]$$

$K_D$  - rozdělovací koeficient

$c_o$  - koncentrace analytu v organické fázi

$c_{aq}$  - koncentrace analytu ve vodné fázi

Přesnější vyjádření extrahovatelné frakce (E) je pomocí následujícího vztahu:

$$E = \frac{K_D V}{(1 + K_D V)} \quad [15]$$

V - poměr mezi objemem vodné a organické fáze ( $V_o/V_{aq}$ )

Aby proběhla jednokroková kvantitativní extrakce, musí být hodnota  $K_D$  dostatečně vysoká (>10), aby byl zachován zároveň realizovatelný fázový poměr ( $0,1 < V < 10$ ).

V případě, že je  $K_D$  příliš malé, je nutné provést několikanásobnou extrakci. **Zvýšení  $K_D$  a tím i účinnosti extrakce lze dosáhnout několika různými způsoby:**

- změnou organického rozpouštědla
- potlačením ionizace analytu úpravou pH
- použitím iontově-párového činidla

- vysolením analytu – po přidání inertní soli (např. síran amonný) do vodné fáze jsou anorganické ionty solvatovány molekulami vody. Dojde tím ke snížení rozpustnosti analytu ve vodné složce a podpoří se jeho přechod do organické fáze.
- úpravou doby extrakce<sup>8, 13</sup>.

Typickými rozpouštědly pro L-L extrakci jsou alifatické uhlovodíky (hexan, isooktan), ethery, dichlormethan, chloroform, ethylacetát atd. Kromě nemísitelnosti s vodou je důležitým kritériem polarita rozpouštědla ve vztahu k analytu. Maximální výtěžnosti extrakce bývá dosaženo, když je polarita rozpouštědla blízká polaritě analytu. V některých případech může být pro redukci interferencí použito **zpětné extrakce**. Tato extrakce probíhá ve dvou krocích. Např. je-li analyt kyselého charakteru, je nejdříve při nízkém pH extrahován do organického rozpouštědla, přičemž hydrofilní neutrální a bazické interference zůstávají ve vodné fázi. Poté je k organické fázi přidána vodná složka o vysokém pH, analyt je ionizován a zpětně extrahován do této vodné fáze. Nepolární interference pak zůstávají v organické fázi<sup>8</sup>.

**Mikroextrakce** je jiný způsob L-L extrakce, kdy je fázový poměr  $V_o/V_{aq}$  velmi malý (0,001 až 0,01). Výtěžnost extrakce bývá v porovnání s klasickou LLE nižší, avšak dochází ke zvýšení koncentrace analytu v organické fázi a k redukci objemu použitých rozpouštědel. Některé moderní autosamplery jsou schopné provádět mikroextrakci při malých objemech přímo ve vialkách<sup>8</sup>.

Mezi nejběžnější **praktické problémy** spojené s úpravou vzorků pomocí L-L extrakcí patří např.:

- tvorba emulzí
- silná adsorpce analytu na částice vzorku
- vazba analytu na vysokomolekulární komponenty (proteiny)
- vzájemná rozpustnost obou fází
- velká spotřeba rozpouštědel<sup>8, 41</sup>.

### 3.5.2.3. Extrakce na pevných fázích (SPE: Solid-phase extraction)

Extrakce na pevných fázích je jednou z nejběžněji užívaných technik pro úpravu vzorku před HPLC analýzou. **Principem metody je sorbce analytu ze vzorku na**

**SPE sorbent, která je následována selektivním vymytím analytu příslušným organickým rozpouštědlem.** Tento proces je principiálně podobný chromatografické separaci na HPLC koloně, avšak SPE kolonky jsou naplněny většími částicemi (>40  $\mu\text{m}$ ) než HPLC kolony a mají také výrazně nižší účinnost separace ( $N < 100$ ). Při SPE extrakci je možno využít tradiční mechanismy retence: reverzní fáze, normální fáze nebo iontově výměnný mechanismus<sup>8,53</sup>. SPE překonává některé nevýhody výše zmiňované L-L extrakce (především spotřebu rozpouštědel nebo riziko tvorby emulzí<sup>8,41</sup>).

Při správném použití má SPE následující **výhody**:

- vyšší účinnost extrakce
- efektivní separace analytů od balastů (vyšší čistota vzorku pro HPLC analýzu)
- nízké nároky na objem rozpouštědel
- dovoluje snazší sběr frakcí analytů
- představuje manuálně pohodlný proces s možností zpracování většího množství vzorků současně<sup>8</sup>.

**Nevýhodou** tohoto způsobu úpravy vzorku může být jistá variabilita různých šarží sorbentů, poněkud vyšší cena SPE kolonek a možnost ireverzibilní sorbce některých analytů na sorbent<sup>8,41</sup>.

Sorbenty pro SPE bývají dodávány ve třech základních provedeních, a to jako disky, sorbenty naplněné v kolonkách (kartridžích) nebo ve stříkačkách. **Kartridže** bývají plněny 100 mg - 1g sorbentu, kolonky ve tvaru „**stříkaček**“ jsou dostupné v různých objemech (1 - 20 ml) s různým množstvím sorbetu (50 mg - 10 g)<sup>8,41,53</sup>. SPE **disky** jsou tvořeny sítí skleněných vláken vyplněnými silikagelovou náplní nebo se jedná o derivatizované membrány. Disky umožňují ve srovnání s kolonkami vyšší průtoky a rychlejší extrakci<sup>53</sup>. Pro analýzu léčiv jsou nejčastěji používány SPE sorbenty naplnění v kolonkách, které jsou komerčně dostupné v poměrně široké škále různých sorbentů.

K průchodu analytů kolonkou je možno použít gravitaci, avšak tento způsob provedení je extrémně pomalý a nevhodný pro praktické použití. Častěji se používají stříkačky, kterými jsou vzorky manuálně tlačeny přes kolonku. Tento způsob provedení však může být problematický v případě, že je vzorek viskózní nebo obsahuje mechanické částice. Nejčastěji se proto používá vakua, které umožňuje poměrně rychlý průchod vzorku kolonkou. V případě sériových analýz je vhodné



používat vakuové zařízení (tzv. „vacuum manifold“) umožňující úpravu více vzorků najednou<sup>8,53</sup>.

**SPE zahrnuje následující kroky:**

- aktivace sorbentu
- nanesení vzorku
- odstranění interferencí
- izolace analytu

**Aktivace kolonky** je prováděna ze dvou důvodů. Prvním je odstranění nečistot, které by mohly být v kolonce přítomny. Druhým důvodem je zvlhčení sorbentu. Pro kondicionaci by mělo být použito rozpouštědlo o silnější eluční síle než má mobilní fáze, aby se vymyly všechny možné nečistoty. Nejběžněji používaným rozpouštědlem pro aktivaci RP-SPE sorbentů nebo polárních vázaných fází (kyano, amino nebo diol) je methanol. Methanol však způsobuje deaktivaci silikagelového sorbentu, a tak se pro kondicionaci kolonek obsahujících sorbent charakteru nemodifikovaného silikagelu používají rozpouštědla o střední polaritě (např. dichlormethan). Po aktivaci sorbentu je ještě nutné na kolonku nanést rozpouštědlo, které je kompatibilní se vzorkem. V případě analýz vzorků biologických tekutin se kolonky obvykle promývají vodou nebo pufrům o fyziologickém pH. V případě, že kolonka během doby mezi aktivací a aplikací vzorku vyschne, je nutné proces aktivace opakovat<sup>8,53</sup>.

Vzorek je **nanesen** na kolonku rozpuštěný v rozpouštědle o nízké eluční síle, aby se analyt dostatečně naadsorboval na sorbent. Poté je kolonka propláchnuta rozpouštědlem nebo rozpouštěly (pro RP-SPE voda nebo pufr) o malé eluční síle, aby se **odstranily interference** zadržované méně než analyt. V tomto kroku se často používají roztoky o různém pH. Někdy se také přidává malé množství organického rozpouštědla (5 %), aby došlo k vymytí také více hydrofobních interferencí.

Dalším krokem extrakce je selektivní **eluce analytu**. V případě, že je nutné dosáhnout co největší citlivosti metody, je hlavním cílem použít co nejmenší, nezbytně nutné množství rozpouštědla pro eluci analytu. Tento požadavek bývá obvykle nejlépe splněn použitím mobilní fáze o velké eluční síle. Eluce obvykle vyžaduje objem mobilní fáze rovný asi 5-10 objemům sorbentu<sup>8,53</sup>.

V zájmu získání přesných a reprodukovatelných výsledků je nutné, aby všechny kroky SPE extrakce probíhaly stále stejným způsobem. Tento požadavek je nejlépe

splněn při použití automatizovaných systémů. Použití automatizovaných systémů zvyšuje přesnost výsledků, redukuje jejich variabilitu a možné chyby způsobené zaviněním operátora<sup>8,53</sup>.

V poslední době je věnována pozornost novým, speciálním selektivním typům sorbentů (affinity-based SPE sorbents). Tyto sorbety obsahují afinitní ligand (lecitin, protein A nebo G, peptidy, protilátky, polymery s molekulárním otiskem - MIP - molecularly imprinted polymers atd.). Velmi nadějně se zdají být především sorbenty na bázi imunosorbentů nebo MIPs, protože vykazují vysokou selektivitu k určitému typu analytu nebo skupině analytů<sup>53, 54, 55</sup>.

#### 3.5.2.4. Mikroextrakce na pevných fázích (SPME: Solid-phase microextraction)

**Mikroextrakce na pevných fázích využívá procesu sorbce analytů** obsažených v kapalných a plynných vzorcích **na tenké vlákno**. Většinou jde o křemenná vlákna pokrytá polymerní stacionární fází nebo v některých případech o polymerní fáze kombinované s pevným sorbentem (např. polydimethylsiloxan, divinylbenzen atd.). Vlákno je přichyceno pomocí pístu v držáku, který připomíná mikrostríkačku. Tento píst umožňuje vysunutí a opětovné zasunutí vlákna do duté jehly držáku. Během extrakce je vlákno ponořeno do vzorku a po ustálení rovnováhy mezi koncentrací analytu sorbovaného na vlákně a koncentrací analytu ve vzorku je přeneseno buď do prostoru GC nebo HPLC, kde dochází k desorpci analytu teplem nebo mobilní fází. Kromě desorpce analytu přímo v GC nebo HPLC systému, lze tuto techniku využít také v off-line uspořádání. Množství analytu, které se adsorbuje na vlákno závisí na typu a tloušťce polymerní vrstvy a na distribuční konstantě analytu. Úpravu selektivity izolace lze provést také úpravou podmínek (sorbční čas, teplota extrakce, hloubka ponoru vlákna nebo rychlost míchání vzorku). Všechny tyto parametry je nutné během vývoje metody optimalizovat. Vliv na účinnost extrakce má také pH nebo iontová síla vzorku<sup>40,41,56,57</sup>.

### 3.5.2.5. Přepínání kolon (Column-switching - CS - multidimenzionální chromatografie)

Multidimenzionální chromatografie je vhodným nástrojem pro separaci a purifikaci **multikomponentních vzorků**. Tato technika umožňuje selektivní převedení části vzorku z jedné kolony (koncentrační, předseparační) k separaci na kolonu druhou (analytickou). Technika přepínání kolon bývá používána pro:

- odstranění látek poškozujících kolonu 2 (např. proteiny)
- odstranění pozdních eluentů
- odstranění látek, které interferují s analytem
- jako alternativa ke gradientové eluci

V HPLC je column-switching realizován spojením dvou kolon pomocí vysokotlakého vícecestného přepínacího ventilu. Jednotlivé složky vzorku jsou nejprve částečně separovány (předseparace) na první koloně, a poté frakce obsahující analyt putuje do druhé kolony, kde dochází ke konečné separaci. Obě kolony mohou být naplněny stejným nebo rozdílným sorbentem.

Column-switching může být realizován buď manuálně nebo automaticky, nicméně většina aplikací je dnes prováděna plně automaticky. Důležitým experimentálním požadavkem je kompletní přenos analytu z jedné kolony do druhé, který vyžaduje přísnou kontrolu času přepnutí. **I když je tato metoda podobná HPLC analýzám vzorků předem upravených pomocí SPE, existují zde následující rozdíly:**

- SPE kolonky jsou vyrobeny pouze na jedno použití, ale prekoncentrační kolonu v CS je možné používat cca 50-100 nástřiků. Pozornost však musí být věnována dostatečnému proplachu této kolony po každém vzorku.
- Prekoncentrační kolony mají větší účinnost než SPE kolonky, a tak jsou zóny analytů užší a extrakty jsou čistší než v případě SPE<sup>8,58</sup>.

### 3.6. Stabilita léčiv a léčivých přípravků

Jedním ze základních požadavků pro zajištění účinné a bezpečné farmakoterapie je předpoklad, že si léčiva udrží patřičné kvalitativní a kvantitativní parametry, tj. že budou bezpečná a dostatečně účinná po celou dobu použitelnosti. Regulační orgány proto vyžadují, aby výrobce zajistil, že léčiva budou po celou tuto dobu dostatečně stabilní a tak nedojde k negativnímu ovlivnění účinnosti a bezpečnosti terapie<sup>1</sup>.

Pojem „**stabilita**“ ve farmacii **zahrnuje jak stabilitu účinné látky, tak stabilitu léčivého přípravku**. Stabilita léčiv je ověřována výrobcem pomocí stabilitních testů. Cílem těchto testů je zjistit, jak se mění kvalita účinné látky nebo léčivého přípravku v čase vlivem působení různých faktorů (např. teplo, vlhkost a světlo), doporučit podmínky uchovávání a stanovit dobu reatestace pro účinnou látku („re-test period“) nebo dobu použitelnosti pro léčivý přípravek („shelf-life“)<sup>59, 60</sup>.

Testování stability nových účinných látek je integrální součástí výzkumu a vývoje **nových léčiv**. Poskytuje řadu informací důležitých pro vývoj lékové formy, vývoj a validaci stability hodnotících analytických metod a také pro stanovení mezí přijatelnosti – specifikací. Specifikace je soubor fyzikálních, chemických a mikrobiologických zkoušek a kritérií pro jejich vyhodnocení, které znamenají, že léčivo vyhovuje kvalitativním požadavkům<sup>28, 61</sup>. Při vývoji **nových lékových forem** jsou informace o stabilitě účinné látky většinou dostupné v literatuře nebo v příslušné dokumentaci. Hlavní pozornost tedy bývá upřena na hodnocení stability nové lékové formy. Stabilita léčivého přípravku je určena především jeho složením a vnitřním obalem, avšak významnou roli může hrát také postup zpracování jednotlivých složek. Nezanedbatelný vliv na stabilitu má také kompatibilita, a to jak jednotlivých složek navzájem, tak i lékové formy jako celku a obalu<sup>1, 28</sup>.

Požadavky na stabilitu léčiv jsou součástí mnoha mezinárodních dokumentů. V Evropě jde o **sérii předpisů** „Directive and Regulatory Requirements“, které byly zpracovány a vydány prostřednictvím **Mezinárodní harmonizační konference** (International Conference on Harmonization - ICH) a **Výboru pro chráněné léčivé přípravky** (Committee on Proprietary Medicinal products - CPMP). Aktivity ICH zahrnují nejen oblasti Evropy, ale i USA a Japonska, a tak jsou tyto dokumenty závazné pro velkou část světa. Jsou akceptované a přebírané do závazných předpisů i v zemích nepřihlášených do ICH (Kanada, Austrálie atd.). Kromě těchto

dokumentů je zde řada dalších předpisů vydávaných WHO zaměřených na generická léčiva<sup>28</sup>. Důležitou otázkou všech těchto dokumentů je přípustný rozsah změn, které ještě nevedou k zásadnímu ovlivnění původní kvality léčiva. Mírou stability je čas po který léčivo splňuje všechny kvalitativní parametry. Podle mezinárodních doporučení je léčivo stabilní pokud neklesne obsah účinné látky pod 90 % a kdy chemické, fyzikální a mikrobiologické změny negativně neovlivňují jeho aplikaci, biologickou dostupnost, nezvyšují toxicitu nebo nevyvolávají nedůvěru k jeho kvalitě<sup>28, 59</sup>.

### 3.6.1. Faktory ovlivňující stabilitu

Faktory ovlivňující stabilitu léčiv bývají rozdělovány na **vnitřní a vnější**.

**Vnitřní faktory** jsou determinovány především vlastnostmi jednotlivých složek lékové formy. Hlavní úlohu hrají chemické vlastnosti účinných i pomocných látek, vlastnosti obalových materiálů, ale také mnohé další faktory (velikost částic, vlastnosti použitých rozpouštědel, přítomnost chemických reziduí a nečistot z výroby). **Vnější faktory** zahrnují především teplo, světlo, vzduch, ale také technologické způsoby zpracování jednotlivých složek do výsledné formy, způsob balení a uchování<sup>28</sup>.

#### Hlavní faktory ovlivňující stabilitu léčiv:

- **Chemické a fyzikálně-chemické rozkladné reakce**

**Hydrolyza** je nejčastějším druhem chemické rozkladné reakce, která může negativně ovlivnit stabilitu léčiv. Voda přítomná v léčivém přípravku jako pomocná látka nebo jako vzdušná vlhkost může významně ovlivňovat stabilitu účinných i pomocných látek. Léčiva obsahující ve své molekule esterovou, amidovou, laktámovou nebo laktonovou funkční skupinu jsou k tomuto způsobu rozkladu poměrně citlivá<sup>1,28,62</sup>. Chemická stabilita vodných roztoků řady léčiv je závislá na hodnotě pH. **Aktuální acidita** těchto roztoků je důležitou vlastností, kterou je nutné monitorovat, aby se zabránilo nežádoucím rozkladným reakcím. Další častou rozkladnou reakcí léčiv charakteru především aldehydů, alkoholů, ketonů nebo alkaloidů je **oxidace**. Oxidace je komplexní chemická reakce, která bývá obvykle katalyzována kyslíkem, těžkými kovy nebo světlem. V případě léčiv, u kterých je

biologický účinek vázán pouze na jeden enantiomer je **izomerizace** možným rizikem vedoucím ke snížení účinnosti terapie.

Všechny výše zmíněné rozkladné reakce mohou být katalyzované anebo spouštěné působením slunečního nebo umělého světla, v jehož důsledku nastává **fotolýza**. Expozice světlem často vede rozkladu léčiv nebo k nežádoucím změnám v jejich barvě<sup>28</sup>.

- **Pomocné látky**

Pomocné látky jsou vedle látek účinných důležitými složkami léčivého přípravku. Jejich úlohou je napomáhat výrobě, aplikaci, optimalizovat biologickou dostupnost a také pomáhat udržovat kvalitu léčivého přípravku. Jejich vzájemné interakce však mohou, v některých případech, vést ke zhoršení kvality léčivého přípravku. Kromě toho, pomocné látky mohou interagovat s látkami účinnými a tím negativně ovlivňovat kvalitu léčivého přípravku. Chemické interakce způsobené pomocnými látkami mohou zrychlit rozklad účinné látky a tím snížit její obsah potřebný pro terapeutický účinek. Navíc reaktivní meziproducty těchto reakcí pak mohou ohrožovat bezpečnost a snášenlivost terapie. Fyzikální interakce mohou snížit rozpustnost nebo obsahovou rovnoměrnost léčivého přípravku<sup>28</sup>.

- **Nečistoty z výroby**

Mezi další faktory ovlivňující stabilitu léčiv patří nečistoty. Nečistoty a rezidua pocházející z výroby účinných i pomocných látek mohou sami o sobě nebo svými nežádoucími interakcemi se složkami léčivého přípravku výrazně přispívat k urychlení rozkladu účinných látek, popř. pomocných látek, a tím výrazně snižovat kvalitu léčivého přípravku (např. ovlivněním pH lékové formy)<sup>28</sup>.

- **Ostatní faktory**

Významný vliv na stabilitu léčiv má také výběr technologického způsobu zpracování jednotlivých složek do finální lékové formy<sup>28</sup>.

### 3.5.2. Rozdělení testů stability

- **Zátěžové testy**
- **Zrychlené testy**
- **Dlouhodobé testy**
- **Ostatní testy (testy při změnách v registraci, testy stability při používání léčiv)**

#### 3.5.2.1. Zátěžové testy (Stress tests)

Cílem zátěžových testů je definovat vlastní stabilitu molekuly léčiva, popsat mechanismy rozkladu a identifikovat možné rozkladné produkty. Kromě toho zátěžové testy poskytují informace důležité pro vývoj a validaci stability hodnotících analytických metod. V případě, že je léčivo popsáno v některé ze závazných lékopisných monografií, není nezbytně nutné vykonávat stresové zkoušky. Pro ověření způsobů a mechanismů rozkladu léčiv může být využito informací dostupných ve vědecké literatuře.

Doporučení týkající se provedení stresových zkoušek nových substancí jsou popsány ve **směrnici ICH – Q1A**<sup>63</sup>, pro generická léčiva platí **směrnice CPMP/QWP/122/03**<sup>64</sup>. ICH předpisy neobsahují přesné pokyny týkající se způsobu vykonávání stresových zkoušek, mají spíše charakter všeobecných rámcových pokynů<sup>28,59,63</sup>.

Stabilita účinné látky se testuje jak v pevném stavu, tak v roztoku. Zátěžové testy jsou testy krátkodobé, přičemž doba trvání závisí na charakteru léčiva. V případě léčiv citlivých k rozkladu mohou tyto testy trvat pouze několik hodin, avšak v případě stabilnějších léčiv bude tato doba výrazně delší (týdny, zpravidla maximálně tři měsíce). Také intervaly odběrů vzorků a jejich počet nejsou přesně definovány. Pro matematicko/statistické zpracování je však nutné mít aspoň 4 časové hodnoty<sup>1, 28, 63</sup>.

### Podmínky zátěžových testů

- **Studium vlivu pH**

ICH směrnice doporučují, aby byla účinná látka ve formě roztoku nebo suspenze vystavena vlivu **působení různých hodnot pH**. pH vodného prostředí pro zátěžové testy bývá upravováno pomocí série pufrů (nejčastěji o pH 3, 4, 5, 6, 7 a 8) nebo roztoků zředěných kyselin (1M HCl) a zásad (1M NaOH). Pro praktické provedení těchto zkoušek je důležitou charakteristikou **rozpustnost léčiva** ve vodných roztocích. Doporučená koncentrace je aspoň 1 mg/ml kyselého i zásaditého roztoku, avšak v případech špatně rozpustných léčiv je možné se spokojit s koncentrací nižší. Pro zlepšení rozpustnosti mohou být použity ko-solventy, avšak vždy je nutné zvážit jejich možné interakce s léčivem. Např. v případě léčiv obsahujících v molekule skupinu karboxylovou, amidovou, esterovou nebo hydroxylovou, není vhodné používat jako ko-solvent pro kyselou zátěž methanol, nebo jiné alkoholy. Omezená mísitelnost acetonitrilu a NaOH může způsobit praktické problémy při použití tohoto rozpouštědla jako ko-solventu pro některé experimenty<sup>1,62</sup>.

První pokusy by měly být prováděny za laboratorní teploty a teprve v případě, že za těchto podmínek nedochází k dostatečnému rozkladu, má být reakční teplota zvýšena. Doporučuje se, aby došlo k rozkladu asi 10-20 % účinné látky. Doba experimentů by měla být závislá na rychlosti rozkladu (hodiny, dny)<sup>1,62</sup>.

- **Vliv teploty a vlhkosti**

**Pevná substance by měla být během stresových zkoušek vystavena účinkům vyšší teploty a vlhkosti.** Pro praktické provedení je důležité zvolit vhodnou teplotu při níž bude docházet k dostatečnému rozkladu. ICH směrnice doporučují, aby testy probíhaly při několika **teplotách v intervalech o 10 °C vyšších** než jsou teploty, které budou použity při zrychlených stabilitních testech (např. 50 °C, 60 °C atd.) a relativní vlhkosti 75 % RV nebo vyšší<sup>1,63</sup>.

- **Vliv oxidačních činidel**

**Citlivost molekuly léčiva k oxidativnímu rozkladu bývá testována za použití vhodných oxidačních činidel, nejčastěji peroxidu vodíku.** V některých případech může být použito i silnějších činidel, jako je např. dichroman draselný nebo manganistan draselný<sup>28</sup>. Léčiva, citlivá k oxidaci obvykle obsahují heteroatomy (dusík a síru) nebo mají charakter aldehydů nebo ketonů. Nejčastějším zdrojem



oxidačních rozkladných produktů bývá reakce léčiva s molekulárním kyslíkem. Oxidace způsobená přímo molekulárním kyslíkem je tedy podle některých autorů více realistický model, než zátěž způsobená již zmíněným peroxidem vodíku<sup>1</sup>. Peroxid vodíku je vhodné použít v případě studií stability lékových forem v nichž se předpokládá přítomnost této látky jako nečistoty pocházející z pomocných látek. (Některé polymerní farmaceutické pomocné látky bývají ko-polymerizovány za použití peroxidu vodíku a jeho rezidua pak mohou způsobit problémy s oxidační stabilitou lékové formy)<sup>1</sup>.

Před začátkem oxidačního experimentu by měla být provedena předběžná studie rozpustnosti léčiva. Studie oxidační stability většinou vyžadují rozpustnost léčiv v nepufrovaném roztoku v koncentracích 1-10 mg/ml, aby se dosáhlo přiměřeného stupně rozkladu<sup>1</sup>.

- **Vliv světla**

**Cílem fotostabilitních studií je urychlit rozklad léčiva pomocí intenzivního záření a odhalit tak možné rozkladné produkty.** Studie fotostability by měly zahrnovat jak experimenty s roztokem léčiva, tak i s pevnou substancí. Substance i roztok bývají vystaveny působení rozptýleného denního světla, UV záření o vlnových délkách 254 a 366 nm nebo definovaného zdroje světla (např. xenonová výbojka). Přímé denní světlo není pro tyto experimenty vhodné, protože jeho intenzita je proměnná a závisí na mnoha externích faktorech (roční období, čas atd.)<sup>1,28</sup>. **Standardní zdroje světla** jsou definovány ve **směrnici ICH Q1B**<sup>65</sup>. Mezi funkční skupiny, které jsou náchylné k fotodegradaci patří např. karbonylová skupina, nitroaromatické skupiny, N-oxidy, alkeny, arylchloridy. Studie fotostability léčiv jsou podle ICH směrnice rozděleny na studie stresové (stress tests) a studie potvrzující (confirmatory tests). **Stresové** zkoušky se provádějí za účelem ověření celkové stability léčiva (nechráněná účinná látka nebo léčivý přípravek) pro účely vývoje metody a/a nebo pro zjištění způsobu rozkladu. **Potvrzující** testy hodnotí, zda je nutné před světlem chránit finální formulaci<sup>1,65, 66</sup>.

Fotostabilitní studie definované v ICH směrnici Q1B doporučují systematický přístup ke studiu fotostability a pokrývají kromě testů aktivních substancí také testy výsledných lékových forem, a to i ve finálních obalech<sup>65</sup>.

### 3.5.2.2. Zrychlené stabilitní testy (Accelerated tests)

Cílem zrychlených stabilitních testů je zvýšením zátěžového faktoru (především teploty) urychlit rozklad účinné látky nebo léčivého přípravku. Extrapolací získaných údajů na běžné skladovací podmínky je možné (po matematicko-statistickém vyhodnocení) odhadnout dobu použitelnosti přípravku. Častá je aplikace těchto testů v experimentálních studiích stability, kde je sledován vliv teploty na rychlost rozkladných reakcí. Tyto studie využívají **Arrheniem popsaný vztah** [16] pro závislost rychlostní konstanty na teplotě.

$$K_t = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad [16]$$

$K_t$  – rychlostní konstanta rozkladné reakce získaná při různých teplotách

A – frekvenční faktor

$E_a$  - aktivační energie

R – molární plynová konstanta

T – skladovací teplota v K

V případě, že jsou experimentálně zjištěné hodnoty rychlostních konstant korelovány s teplotou a je-li známá aktivační energie rozkladné reakce, je možná extrapolace výsledků těchto experimentů na běžnou skladovací teplotu (zpravidla 25 °C). Základním předpokladem však je, že rozkladná reakce při vyšších teplotách bude probíhat stejným mechanismem jako při skladovací teplotě<sup>28,67,68</sup>.

**Směrnice** pro nová i generická léčiva vyžaduje standardní zkoušku **vlhkým teplem** při teplotě 40 °C a relativní vlhkosti (RV) 75 %. Stabilita by měla být testována v 0, 3 a 6 měsíci. Jestliže je léčivo stále za těchto podmínek po dobu 6 měsíců, je možné předběžně navrhnout použitelnost 24 měsíců. Jestliže léčivo při těchto podmínkách není po dobu 6 měsíců stále, používá se podle ICH alternativní test při teplotě 30 °C a RV 60 % s dobou trvání 12 měsíců (intermediate conditions)<sup>28, 63, 64</sup>.

### 3.5.2.3. Dlouhodobé stabilitní testy (Long-term tests)

V celém systému stabilitního testování mají rozhodující postavení dlouhodobé testy stability probíhající za skladovacích podmínek. **Tyto testy poskytují nejobektivnější údaje o stabilitě léčiv i o změnách kvality, které mohou nastat při dlouhodobém skladování.** Testované vzorky jsou skladovány za podmínek odpovídajících klimatickému pásmu ve kterém leží země, kde bude léčivý přípravek registrovaný a distribuovaný. Pro schválení doby použitelnosti léčiva příslušnou regulační autoritou přináší výsledky těchto testů zásadní informace a tvoří proto důležitou část registrační dokumentace. **Cílem těchto testů je potvrdit výsledky zrychlených stabilitních studií, ověřit stabilitu šarží připravených pro klinické testy a především již zmíněné určení doby použitelnosti a způsobu uschování**<sup>28</sup>.

Celý svět byl rozdělen do 4 pásem (I-IV.) s ohledem na průměrnou teplotu během roku a pro každé pásmo byly ustanoveny příslušné teplotní režimy. ICH Q1A zohledňuje především I. a II. klimatické pásmo. V těchto pásmech je za **běžné skladovací podmínky** považována teplota **25 °C ± 2 °C a RV 60 % ± 5 %**. Vzorky se analyzují v 0., 3., 6., 9., 12., 18., 24., 36., 48. a 60. měsíci. Výrobce může dlouhodobé stabilitní testy provádět také v režimu 30 °C ± 2 °C/RV 65 % ± 5 %<sup>63</sup>. Při žádosti o registraci musí být doloženy výsledky z minimálně 6 měsíčních stabilit při dlouhodobých skladovacích podmínkách (nebo intermediálních). Dlouhodobé testy pokračují dál až pokryjí celou dobu použitelnosti přípravku. Výběr skladovacích podmínek a intervalů pro analýzu je mimo jiné dán charakterem lékové formy (pevné, polotuhé a tuhé lékové formy) a způsobem uskladnění (např. běžná skladovací teplota, chlad)<sup>63,64</sup>. Směrnice Q1E poskytuje doporučení pro statistické zpracování dat získaných během stabilitních testů<sup>69</sup>.

#### Postupy redukcí rozsah stabilitních zkoušek

V některých případech (např. když je na trh uváděn zároveň přípravek s různým počtem tablet nebo balení o různé síle) by stabilitní testování v plném rozsahu bylo časově velmi náročné. V těchto případech se může použít redukovaný rozsah stabilitních testů, při kterém se hodnotí v každém okamžiku jen **extrémní hodnoty** jednoho parametru např. nejvyšší nebo nejnižší síla přípravku (Bracketing) nebo se v určitém časovém intervalu hodnotí pouze **určitá část vzorků** (Matrixing). Výsledky se pak zpracovávají statisticky. Doporučení týkající se těchto redukovaných stabilitních zkoušek jsou uvedeny ve směrnici Q1D<sup>28,70</sup>.

#### 3.5.2.4. Další test stability

##### Testy stability při změnách v registraci a testy při používání léčiv

Výsledky stabilitní studie doložené v registraci platí pro přesně definované složení léčivého přípravku, příslušný typ obalu, přesně popsany a validovaný způsob přípravy a výrobní zařízení. V případě, že dojde ke změně některého z uvedených parametrů, musí se znovu prověřit vliv této změny na stabilitu přípravku. Způsob testování v tomto případě závisí na rozsahu a charakteru provedených změn<sup>28,63</sup>.

Většina léčivých přípravků není uživatelem spotřebována hned po prvním použití, ale zpravidla až po opakovaném dávkování. Přípravek je pak během této doby vystavován působení faktorů vnějšího prostředí, které mohou ovlivnit jeho stabilitu. Cílem stabilitních testů při používání léčiv je ověřit vliv opakovaného otvírání a zavírání obalu, které může především u vícedávkových přípravků negativně ovlivnit stabilitu, především s ohledem na mikrobiální kontaminaci. Toto testování pokrývá směrnice CPMP/QWP/2934/99<sup>28,71</sup>.

### 3.7. Chelátory železa odvozené od aroylhydrazonu

#### 3.7.1. Chelátory železa a jejich možné využití v terapii

Chelátory jsou látky, které mají díky své chemické struktuře vysokou afinitu k vícemocným kovům se kterými vytvářejí pomocí koordinačně-kovalentních vazeb komplexy. **Biokompatibilní chelátory železa jsou schopny v biologických systémech selektivně vázat volné ionty železa bez významné interference s ostatními biogenními prvky**<sup>72,73</sup>.

Prvotním impulzem k vývoji nových léčiv ze skupiny biokompatibilních chelátorů železa byla potřeba léčby pro pacienty, kteří trpí přetížením organismu železem tzv. „iron-overload“. **Tento stav** se vyvíjí jako důsledek dlouhodobých krevních transfúzí, na které jsou odkázáni pacienti s hereditárními poruchami krvetvorby (např.  $\beta$ -thalasémie)<sup>74</sup>. Pro tuto terapeutickou indikaci je v dnešní době registrováno pouze jedno léčivo - **deferoxamin (DFO)**, které však trpí řadou nevýhod a nedostatků. Relativně vysoká hydrofilita této látky striktně vyžaduje její intravenózní podání, což jednak snižuje komfort terapie a tedy i compliance pacientů, ale také výrazně zvyšuje náklady na léčbu<sup>72</sup>. V posledních letech byla patrná výrazná snaha vyvinout perorálně účinný chelátor, který by překonal již zmíněné nevýhody DFO. Velké naděje byly v této oblasti vkládány do nového chelátoru - **deferipronu (L1)**, který je v současné době registrován v několika zemích. Nicméně jeho účinnost a bezpečnost jsou stále předmětem odborných diskuzí<sup>75,76</sup>. Poměrně velké naděje jsou vkládány také do látky s kódovým jménem **ICL-670**, která je v současnosti ve 2. fázi klinického výzkumu<sup>77</sup>.

V poslední době bylo prokázáno, že železo hraje důležitou úlohu v rozvoji řady závažných patologických stavů. Bylo zjištěno, že chelátory železa mohou být účinné při léčbě řady různých onemocnění spojených s **oxidačním stresem** (antracyklinová kardiomyopatie, neurodegenerativní onemocnění – např. Alzheimerova nemoc)<sup>78,79,80,81</sup>. Dále bylo zjištěno, že k dočasné deprivaci železa jsou na rozdíl od člověka **citlivé mnohé mikroorganismy** (např. viry, bakterie) a také **nádorové buňky**. V této oblasti byl dosud zaznamenán největší úspěch s thiosemikarbazonovým chelátorem **Triapinem (3-AP)**, který je nyní ve 2. fázi klinického hodnocení pro léčbu tumorů<sup>82</sup>. Silný protinádorový účinek srovnatelný

s účinkem doxorubicinu (jednoho z nejúčinnějších cytostatik) byl prokázán na modelech *in vitro* a *in vivo* u thiosemikarbazonového derivátu s kódovým označením **Dp44mT**<sup>83</sup>. Je tedy patrné, že selektivní chelatace železa se zdá být vhodnou strategií pro vývoj řady nových léčiv.

### 3.7.2. Chelátory železa ze skupiny analogů aroylhydrazonu

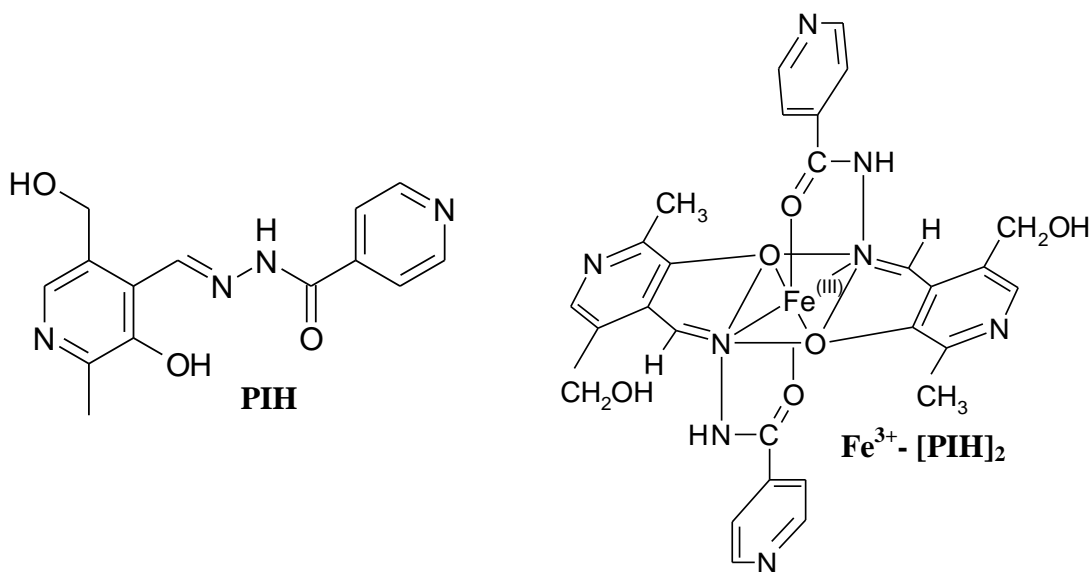
#### 3.7.2.1. Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH)

Chelátory železa odvozené od aroylhydrazonu jsou pro své zajímavé farmakologické účinky jako potenciální léčiva předmětem poměrně intenzivního výzkumu. Mateřskou látkou této skupiny je **pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH)**, který byl připraven v 70-tých letech prof. Poňkou. Chelatační účinek této látky byl objeven náhodným experimentem, během kterého byly retikulocyty inkubovány s transferinem (s navázaným <sup>59</sup>Fe) a isoniazidem (inhibitor hemové syntézy). V průběhu tohoto experimentu bylo pozorováno významné hromadění Fe uvnitř buněk (v různých non-hemových kompartmentech). Po přidání pyridoxalu do média však došlo k značné mobilizaci Fe z buněk ven. Při studiu tohoto jevu se ukázalo, že mobilizace Fe je zapříčiněná chelatačními schopnostmi PIH, který vzniká spontánní kondenzační reakcí pyridoxalu a isoniazidu v buněčném médiu<sup>84,85</sup>.

#### Fyzikálně-chemické vlastnosti PIH

PIH (Obr. 2) je poměrně malá molekula s molekulovou hmotností 287, která vzniká jednoduchou reakcí - Schiffovou kondenzací pyridoxalu a isoniazidu. Jde o krystalickou látku nažloutlé barvy, která je ve formě baze velmi těžce rozpustná ve vodných roztocích o neutrálním pH. Špatná rozpustnost této látky však působí praktické problémy při aplikaci a může mít také negativní vliv na vstřebání této látky v organismu<sup>86,87,88</sup>. **Nejnovějším přínosem v této oblasti je patent, který popisuje přípravu ve vodě rozpustné soli PIH·2HCl, která má při zachování stejných chelatačních vlastností o dva řády lepší rozpustnost než baze**<sup>87</sup>. PIH může vytvářet různé hydráty a soli (hydrochloridy, sulfáty), které mohou mít odlišnou barvu (od světle žluté až po oranžovou) i rozdílné fyzikální vlastnosti. Tato látka má čtyři hodnoty pKa (3,0 ; 4,4; 7,9 a 10,2), jako převážně neutrální molekula se vyskytuje při fyziologickém pH (7,4)<sup>89</sup>.

PIH vytváří **komplexy s trojmocným železem** (Obr. 2) v molárním poměru 2:1 (molekulová hmotnost komplexu je 657). Pomocí spektrofotometrie bylo zjištěno, že tyto komplexy jsou nejstabilnější v roztoku o pH 5,5; zatímco ve vodných prostředích o pH kolem 2 dochází k jejich rychlému rozpadu. V alkalickém prostředí jsou tyto komplexy stabilnější. Je možné je detekovat i v roztocích o pH kolem 12. PIH je poměrně selektivní ligand, protože za fyziologických podmínek má velmi malou afinitu k jiným biogenním prvkům ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )<sup>88</sup>.



Obr. 2 Chemická struktura PIH a jeho komplexu s železem  $\text{Fe}^{3+}$ ; převzato z<sup>88</sup>.

Stabilita PIH a některých jeho analogů v různých vodných prostředích (roztoky zředěné kyseliny a baze, ve fyziologickém pufru (PBS), různá buněčná média, sérum) byla studována pomocí **UV/VIS spektrofotometrie**. U všech studovaných chelátorů byla pozorována schopnost hydrazonové vazby podstupovat hydrolytickou degradaci a to především v kyselých a bazických roztocích<sup>90,91</sup>.

Farmakologické účinky PIH jsou shrnuty v následujících bodech:

- Mobilizace Fe z buněk - bylo zjištěno, že PIH je účinný v mobilizaci Fe v podmínkách *in vitro* a *in vivo*<sup>86,92</sup>.
- Antioxidační a cytoprotektivní působení - PIH působil signifikantně antioxidačně ve studiích využívajících různé biochemické modely (*in vitro*) – např. železem indukované tvorby toxických hydroxylových radikálů, oxidaci 2-deoxyribozy atd<sup>93,94</sup>. V *in vivo* studii bylo prokázáno protektivní působení tohoto chelátoru při poškození sítnice vyvolané oxidačním stresem<sup>95</sup>.

- Klinická studie - ačkoliv se PIH jevil jako poměrně účinný a málo toxický chelátor, byla provedena pouze 1. fáze klinického hodnocení, zaměřená na volbu dávky a její snášenlivost. V této studii však byla zjištěna nižší účinnost indukce exkrece železa, než jaká byla na základě preklinických údajů očekávána. Navzdory těmto zjištěním, se tato studie jeví jako poměrně cenná, protože prokázala dobrou snášenlivost tohoto chelátoru. Nižší účinnost v indukci exkrece železa mohla být zapříčiněna nevhodnou farmaceutickou formulací<sup>86</sup>.

### 3.7.2.2. Analogy PIH - salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) a pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (o-108)

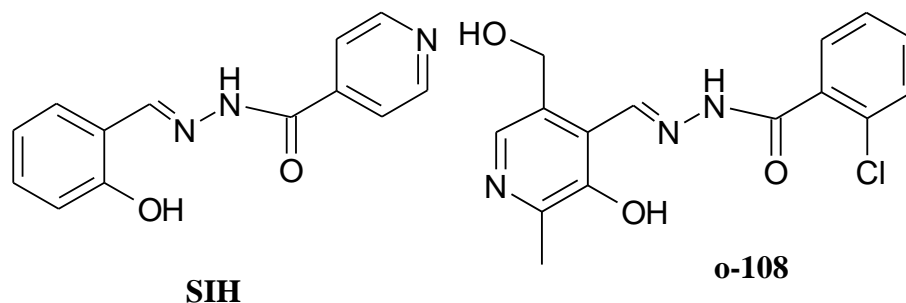
V dnešní době představuje PIH „mateřskou látku“ aroylhydrazonových chelátorů železa od které byla odvozena celá řada dalších analogů s rozdílnými fyzikálně-chemickými i biologickými vlastnostmi. Všechny tyto analogy byly připraveny Schiffovou kondenzací aromatických aldehydů s aromatickými hydrazid<sup>86</sup>. Bylo připraveno několik sérii látek odvozených jednak přímo od pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu, a dále pak od salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu, 2-pyridylkarbaldehyd isonikotinoyl hydrazonu a di-2-pyridyl isonikotinoyl hydrazonu. **Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) a pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (o-108)** (Obr. 3) jsou dva novější analogy mateřské látky, které byly vybrány pro detailnější studium, protože vykazovaly zajímavé antioxidantní, Fe mobilizující účinky a dílem též antiproliferativní a antimalarické účinky.

#### Fyzikálně-chemické vlastnosti SIH a o-108

SIH byly připraveny kondenzací salicylaldehydu a isoniazidu. Pro zlepšení rozpustnosti tohoto chelátoru ve vodných roztocích byla ve spolupráci s Dr. Vávrovou (Katedra anorganické a organické chemie) **připravena ve vodě lépe rozpustná sůl (SIH·HCl)**. Tato sůl byla následně používána jak při vývoji chromatografických metod, tak v primární farmakokinetické studii. o-108 byl připraven reakcí pyridoxalu s 2-chlorbenzoyl hydrazidem. SIH a o-108 jsou krystalické látky nažloutlé barvy, které vytváří komplexy se železem analogicky jako látka mateřská. SIH má tři hodnoty pKa (3,34; 8,29 a 9,8)<sup>89</sup>, v případě o-108 nejsou tyto hodnoty v literatuře dostupné. Oba analogy jsou v porovnání s mateřskou látkou



(PIH) lipofilnější, a proto lépe prostupují do intracelulárního prostoru buněk. Lipofilita, jako základní chemická charakteristika, určuje průchod léčiv do buněk a tím má zásadní vliv na chelataci intracelulárního Fe<sup>96</sup>.



Obr. 3 Chemická struktura SIH a o-108

Farmakologické účinky SIH a o-108 jsou shrnuty v následujících bodech:

- Mobilizace Fe z buněk - oba uvedené chelátory jsou účinné v mobilizaci Fe z intracelulárního prostoru<sup>96,97</sup>.
- Antioxidační působení – nejsilnější antioxidační působení bylo zaznamenáno u SIH. Tento chelátor byl vysoce účinný *in vitro* (buněčné kultury) na modelu oxidačního stresu experimentálně vyvolaného H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i anatracyklinovým cytostatikem<sup>98,99</sup>.
- Antiproliferativní působení - experimenty dokazují schopnost SIH působit antiproliferativně a indukovat apoptický zánik nádorových buněk<sup>100</sup>.
- Antimalarické působení - působení vůči plasmodium falciparum bylo prokázáno především u SIH<sup>101</sup>.

### 3.7.2.3. Analytické hodnocení PIH a analogů

I když aroylhydrazonové chelátory železa vykazují zajímavé farmakologické účinky nebyla tato skupina látek dosud dostatečně definována analyticky. Z analytických metod byla dostupná pouze **UV/VIS spektrofotometrie**, zabývající se vybranými aspekty stability těchto chelátorů a **chromatografie na tenké vrstvě (TLC)**<sup>90,91,102</sup>. **Absence moderních separačních** metod dosud neumožnila přesně definovat čistotu nebo stabilitu těchto látek pomocí HPLC, a také neumožnila

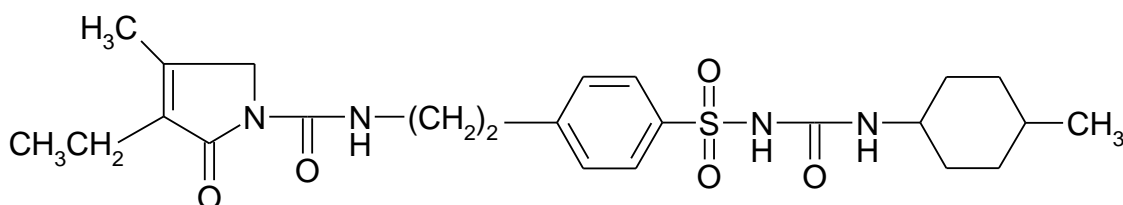
analyzovat tyto chelátory v biologickém materiálu a stanovit základní farmakokinetické parametry těchto potenciálních léčiv.

**Při vývoji HPLC metod pro hodnocení těchto látek bylo možno čerpat pouze z obecných poznatků získaných při analýze chelátorů jiné struktury.** Jde především o publikované informace o vývoji HPLC metod pro stanovení Triapinu nebo ICL 670<sup>103,104,105,106</sup>. Také je možné, avšak pouze omezeně, čerpat některé informace z již dříve publikovaných prací zabývajících se HPLC hodnocením jiných, strukturně vzdálenějších chelátorů železa<sup>107,108, 109</sup>. Specifickým jevem, který může komplikovat analýzu uvedených látek je např. tvorba komplexů s volnými ionty kovů, přítomnými byť v malém množství, v chromatografickém systému. Tyto komplexy mohou výrazně zhoršovat symetrii chromatografických píků. Tato komplikace však může být odstraněna přidávkem malého množství EDTA do mobilní fáze<sup>104,109</sup>.

### 3.8. Vybraná léčiva a jejich stabilita

#### 3.8.1. Glimepirid

**Glimepirid** (Obr. 4) je **perorální antidiabetikum** – derivát sulfonylurey III. generace. Hlavním mechanismem účinku tohoto léčiva je stimulace sekrece inzulínu v  $\beta$ -buňkách pankreatu. Glimepirid je stejně jako ostatní deriváty sulfonylurey indikován k léčbě nemocných s diabetem 2. typu, kteří nejsou dostatečně kompenzováni dietou. Glimepirid se podává jak v monoterapii, tak v kombinaci s jinými hypoglykemiky. V porovnání se staršími léčivy této skupiny se vyznačuje větší reverzibilitou vazby na specifické receptory, větší specificitou k  $\beta$ -buňkám pankreatu a tedy nižší vazbou na receptory kardiovaskulárního systému. Výhodou glimepiridu je dávkování jednou denně, nižší riziko hypoglykémie a menší nežádoucí účinky na kardiovaskulární systém, než tomu bylo u straších hypoglykemických léčiv. Glimepirid bývá obvykle podáván v dávce 1 - 8 mg denně<sup>110, 111</sup>.



Obr. 4 Chemická struktura glimepiridu, Sumární vzorec:  $C_{24}H_{34}N_4O_5S$ ,

Molekulová hmotnost: 490,62

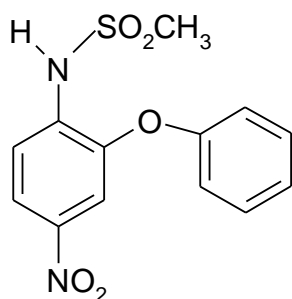
Glimepirid je bílý až nažloutlý krystalický prášek, bez zápachu. Je prakticky nerozpustný ve vodě, avšak jeho rozpustnost je závislá na pH. Rozpustnosti glimepiridu ve vodných roztocích o různém pH při 37 °C byly publikovány v článku autorů Frick A., a kolektiv, zabývajícím se disolucí tohoto léčiva<sup>112</sup>.

V nedávné době byl glimepirid zařazen do **oficiální lékopisné monografie** (USP 28) a byl uveden také v monografii **Pharmeuropa** (svazek 16.3)<sup>113,114</sup>. Hlavními metabolity glimepiridu jsou trans-hydroxyglimepirid a karboxyglimepirid.

Jejich totální syntéza byla v nedávné době publikována<sup>115</sup>. Pro **stanovení tohoto léčiva** a jeho metabolitů v biologickém materiálu bylo v dostupné literatuře popsáno několik **HPLC metod využívajících jak UV, tak MS detekci**. V těchto publikacích byl jako vnitřní standard pro stanovení používán strukturně blízký glibenklamid. Glimepirid byl izolován z biologického vzorku pomocí liquid-liquid extrakce za použití různých rozpouštědel a různých extrakčních postupů<sup>116,117,118,119,120,121,122</sup>. Pro stanovení obsahu glimepiridu v léčivém přípravku byla publikována **UV spektrofotometrická metoda**<sup>123</sup>.

### 3.8.2. Nimesulid

**Nimesulid** (Obr. 5) je léčivo patřící do skupiny **modernějších nesteroidních antiflogistik (NSAID)**. Mechanismem účinku nimesulidu je inhibice cyklooxygenasy, přednostně směřovaná k tzv. inducibilní izoformě – COX 2. V porovnání se staršími antiflogistiky vykazuje nimesulid lepší gastrointestinální snášenlivost. Má poměrně silné analgetické a protizánětlivé účinky, a proto bývá používán pro léčbu revmatoidní artritidy a dalších zánětlivých stavů různé etiologie<sup>124, 125</sup>. V roce 2002 byl zaznamenán vyšší výskyt hepatálních nežádoucích účinků, což vedlo k přehodnocení poměru přínosu a rizika terapie. Odborné skupiny EMA (European Medicinal Agency) a CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products) však došly k závěru, že tento poměr „risk/benefit“ je příznivý a riziko závažných nežádoucích účinků léčby nimesulidem je považováno za velmi nízké<sup>126</sup>. Hlavním metabolitem nimesulidu je hydroxy-nimesulid, avšak v různých studiích byly detekovány, především ve formě konjugátů, také další minoritní metabolity<sup>127</sup>.



Obr. 5 Chemická struktura nimesulidu, Sumární vzorec:  $C_{13}H_{12}N_2O_5S$

Molekulová hmotnost: 308,31

Nimesulid je světle žlutý krystalický prášek, prakticky bez zápachu. Má charakter kyseliny a je rozpustný ve středně polárních rozpouštědlech. Nižší rozpustnost této látky byla stanovena v rozpouštědlech o nižší polaritě. Ve vodě je nimesulid prakticky nerozpustný, avšak ve vodných roztocích o vyšším pH dochází k zvýšení jeho rozpustnosti. Fyzikálně-chemické vlastnosti tohoto léčiva jsou podrobně uvedeny v 28 díle monografie **Analytical Profiles of the Drug Substances and Excipients**<sup>128</sup>.

Nimesulid byl zařazen do **oficiálních lékopisných monografií** (Ph. Eur. a British Pharmacopoeia)<sup>129, 130</sup>. Pro stanovení nimesulidu je v literatuře dostupné poměrně velké množství analytických metod. Mnoho autorů popisuje **HPLC metody** pro stanovení tohoto léčiva a metabolitů v různém biologickém materiálu (např. plasma, cerebrospinální tekutina, tkáně) za využití různých metod úpravy vzorků (např. SPE, L-L extrakce, precipitace) i detekčních technik (UV, MS, MS/MS). Jde hlavně o RP-HPLC metody používající různé druhy stacionárních fází v kombinaci s různými fázemi mobilními<sup>131,132,133,134,135,136</sup>. V literatuře jsou také dostupné HPLC, TLC a spektrofotometrické metody vhodné pro hodnocení nimesulidu v různých lékových formách<sup>137,138,139</sup>. **Ucelený přehled dosud publikovaných metod pro stanovení nimesulidu je dostupný v recentní publikaci autora Rao R.N., a kol.**<sup>140</sup>.

# **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

**(Komentovaný soubor publikovaných prací)**

**4.1. ANALÝZA POTENCIÁLNÍCH LÉČIV ZE  
SKUPINY AROYLHYDRAZONOVÝCH  
CHELÁTORŮ ŽELEZA**

### **4.1.1. Chromatographic methods for the separation of biocompatible iron chelators from their synthetic precursors and iron chelates**

**Petra Kovaříková, Milan Mokrý, Jiří Klimeš, Kateřina Vávrová**

J.Sep. Sci. 27 (2004) 1503-1510.



Petra Kovaříková<sup>1</sup>  
Milan Mokry<sup>1</sup>  
Jiří Klimeš<sup>1</sup>  
Kateřina Vávrová<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

## Chromatographic methods for the separation of biocompatible iron chelators from their synthetic precursors and iron chelates

Chromatographic methods have been developed for the separation of the three novel biocompatible iron chelators pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH), salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH), and pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108) from their synthetic precursors and iron chelates. The chromatographic analyses were achieved using analytical columns packed with 5  $\mu$ m Nucleosil 120-5 C<sub>18</sub>. For the evaluation of all chelators in the presence of the synthetic precursors, EDTA was added to the mobile phase at a concentration of 2 mM. The best separation of PIH and its synthetic precursors was achieved using a mixture of phosphate buffer (0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM 1-heptanesulfonic acid sodium salt; pH 3.0) and methanol (55:45, v/v). For separation of SIH and its synthetic precursors, the mobile phase was composed of 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0) and methanol (60:40, v/v). o-108 was analyzed employing a mixture of 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0), methanol, and acetonitrile (60:20:20, v/v/v). These mobile phases were slightly modified to separate each chelator from its iron chelate. Furthermore, a RP-TLC method has also been developed for fast separation of all compounds. The chromatographic methods described herein could be applied in the evaluation of purity and stability of these drug candidates.

**Key Words:** Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone; Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone; Pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone; HPLC; TLC

Received: June 26, 2004; revised: August 20, 2004; accepted: August 22, 2004

DOI 10.1002/jssc.200401878

### 1 Introduction

Biocompatible iron chelating agents are currently under extensive investigation from the perspective of novel drug development [1]. Interest in this class of compounds originally arose from the need to treat patients suffering from iron overload. However, the range of their potential therapeutic use has dramatically widened in the last decades. Iron chelation has recently been identified as an effective principle of antiproliferative, antimalarial, antioxidative, cardioprotective, and neuroprotective action [2–5]. Unfortunately, further progress in this area has been hindered by the lack of the iron-selective and non-toxic chelators.

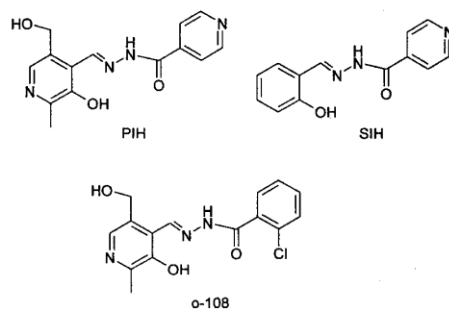
**Correspondence:** Petra Kovaříková, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.  
Phone: +420 495067236. Fax: +420 495 512423.  
E-mail: kovarikova@faf.cuni.cz.

**Abbreviations:** PIH, pyridoxal isonicotinoyl hydrazone; PIH · 2HCl, pyridoxal isonicotinoyl hydrazone dihydrochloride; SIH, salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone; SIH · HCl, salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone hydrochloride; o-108, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone; Fe (III)-[chelator]<sub>2</sub>, iron complex of chelator; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt.

Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) is an iron-selective chelator developed by Ponka et al. [6]. It can be readily synthesized by Schiff-base condensation of isoniazid with pyridoxal. It is a yellow crystalline substance, which can exist in the form of different hydrates. The free base of PIH is poorly soluble in aqueous solutions at neutral pH. In order to increase the solubility of this compound, the water-soluble salt (PIH · 2HCl) has been synthesized [7]. The investigation of its iron-binding ability showed that the drug preferentially forms the complex of molar ratio 2:1 selectively with Fe<sup>3+</sup> ions [6]. In acid and alkaline solutions a hydrolysis of PIH resulting in the formation of its synthetic precursors has been reported [8, 9].

PIH has been shown to be an effective iron chelator both in vitro and in vivo [10]. Although it has several interesting biological effects (e.g. antioxidative and cytoprotective), nowadays it is rather a structurally original "lead compound". A number of novel analogues of PIH has been prepared and these have been subjected to extensive in vitro screening [11, 12]. Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) and pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108) are among the most promising chelators of this class (Figure 1). Both compounds are even more effective than PIH in mobilization of intracellular iron [12].

1504 Kovaříková, Mokry, Klimeš, Vávrová



**Figure 1.** Chemical structures of chelators used in this study.

Moreover, SIH recently exhibited powerful antioxidant, antiproliferative and antimalarial effects [13, 14].

While recent publications have suggested PIH and its analogues as promising drug candidates, further progress in preclinical development strongly requires solid, preferably separative analytical methodology. The only analytical methods available in literature to date are UV-VIS spectrophotometry [8, 9] and silica based TLC [15]. Thus, a rapid, accurate, and precise HPLC method for the analysis of these agents might be of great value for further investigation in this field.

The aim of this study was to develop simple, accurate and precise HPLC methods for separation of PIH, SIH, and o-108, respectively, from their synthetic precursors. Subsequently the chromatographic conditions have been partially modified to allow the sufficient separation of each chelator from its iron chelate. Furthermore, a RP-TLC method, suitable for the fast separation of all compounds (chelators, their synthetic precursors and iron chelates) has been developed. The chromatographic methods presented in this paper may represent a useful tool for purity and stability evaluation of these iron-chelating agents.

## 2 Experimental

### 2.1 Chemicals and reagents

Pyridoxal hydrochloride, salicylaldehyde, 2-chlorobenzoic acid hydrazide, isonicotinic acid hydrazide, and 1-heptanesulfonic acid sodium salt were purchased from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). EDTA,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ , phosphoric acid, sodium hydroxide, sodium citrate, methanol p.a., acetonitrile p.a. were obtained from Lachema a.s. (Brno, Czech Republic). Water was purified using reverse osmosis.

PIH, SIH, and o-108 were prepared by condensation of isoniazid or 2-chlorobenzoic acid hydrazide with the corre-

sponding aldehydes, pyridoxal hydrochloride and salicylaldehyde, respectively, as described previously [16].

The dihydrochloride salt of PIH was synthesized according to Lewis [7]. SIH (2.41 g, 10 mmol) in 30 mL of anhydrous ethanol was stirred with 3 equivalents of dry HCl (1 g, 30 mmol) in 5 mL of anhydrous ethanol overnight. The resulting hydrochloride was filtered, washed with ethanol and dried in vacuum over  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Yield 95%, yellow crystals, mp 203–204°C. IR (KBr) 3417, 2472, 1682, 1608, 1288, 762  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  12.42 (1H, s, NHCO); 9.05 (2H, d,  $J = 6.6$  Hz, Py); 8.89 (1H, s, CH = N); 8.40 (2H, d,  $J = 6.6$  Hz, Py); 7.60 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, Ph); 7.31 (1H, t,  $J = 8.8$  Hz, Ph); 7.00–6.85 (2H, m, Ph); 3.14 (1H, s, OH) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO):  $\delta$  159.72, 157.81, 149.88, 145.98, 143.26, 132.22, 129.08, 126.10, 124.76, 119.70, 118.95, 116.74 ppm.

The structure and purity of the synthesized compounds were confirmed by FTIR (Nicolet Impact 400 spectrophotometer) and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (Varian Mercury-Vx BB 300 instrument, operating at 300 MHz for  $^1\text{H}$ , 75 MHz for  $^{13}\text{C}$ ). The melting points were measured using the Kofler apparatus and are uncorrected.

### 2.2 Chromatographic apparatus and conditions

The Spectra-Physics HPLC chromatographic system (Watrex, Czech Republic) was composed of an isocratic pump (Costametric 3500), automatic injector (AS 1000), and UV/VIS detector (UV 3000 HR). The HPLC data were processed with PC 1000 Software running under the OS/2 Warp operating system.

All separations were achieved on analytical column packed with 5  $\mu\text{m}$  Nucleosil 120-5  $\text{C}_{18}$  (Watrex, Czech Republic). The 12.5 cm long analytical column was sufficient for the analysis of SIH, while for both PIH and o-108 a 25 cm long column had to be employed. A flow rate of 0.8 mL/min was optimal for all separations. The UV detector was set to the dual wavelength mode. In all cases, the first channel was set to 254 nm, while the second channel monitored either at 297 nm (for analysis of PIH) or 288 nm (SIH and o-108). All separations of chelators and their synthetic precursors were carried out with mobile phase containing EDTA (in aqueous part) at a concentration of 2 mM. The optimal composition of mobile phases for the separation of each chelator is specified below.

#### 2.2.1 Analysis of PIH

The mobile phase for separation of PIH  $\cdot$  2HCl from its synthetic precursors was composed of phosphate buffer (0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM 1-heptanesulfonic acid sodium salt; adjusted to pH 3.0 using 5% phosphoric acid) and methanol (55:45, v/v). In order to separate PIH and iron complex  $\text{Fe(III)-[PIH]}_2$ , the composition of the mobile phase had to be changed in following manner: phosphate

buffer [0.01 M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; adjusted to pH 7.0 with 5% phosphoric acid], methanol, and acetonitrile (60:20:20, v/v/v).

### 2.2.2 Analysis of SIH

The mobile phase for separation of SIH · HCl from its synthetic precursors was mixed from phosphate buffer (0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; adjusted using 1 M NaOH to pH 6.0) and methanol (60:40, v/v). For appropriate separation of SIH and  $\text{Fe(III)-[SIH]}_2$  the composition of mobile phase was changed as follows: phosphate buffer [0.01 M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; adjusted using 5% phosphoric acid to pH 7.0], methanol, and acetonitrile (55:25:15, v/v/v).

### 2.2.3 Analysis of o-108

The mobile phase for separation of o-108 from its synthetic precursors consisted of phosphate buffer [0.01 M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; adjusted with 5% phosphoric acid to pH 7.0], methanol, and acetonitrile (60:20:20, v/v/v). The same composition of mobile phase, however without EDTA, allowed the sufficient separation of o-108, its synthetic precursors as well as its iron chelate  $\text{Fe(III)-[o-108]}_2$ .

### 2.2.4 RP-TLC conditions

Plates for nano-RP-TLC, 0.20 mm Silica gel  $\text{C}_{18}$ -100 UV<sub>254</sub> with fluorescent indicator (Macherey-Nagel Düren, Germany) were used for the analysis. The mixture of phosphate buffer [0.01 M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , adjusted with 5% phosphoric acid to pH 7.0] and acetonitrile (60:40, v/v) was employed as the mobile phase. After a saturation time of 30 min, 2  $\mu\text{L}$  of standard solutions was spotted on the TLC plates. The length of chromatographic run was 84 mm. All components were detected at the UV-light wavelength of 254 nm.

### 2.3 Sample preparation

The stock solutions (500  $\mu\text{g/mL}$ ) of studied chelators were prepared by dissolving an appropriate amount of pure substance in methanol.

### 2.4 Preparation of iron chelates

The solutions of iron complexes were prepared according to the procedure described in reference [17]. The solution of  $\text{FeCl}_3$  (dissolved in sodium citrate 100 mM) was mixed with the solution of appropriate chelator in the molar ratio of 2:1, following by sample incubation at room temperature for 60 min. The chelates were formed in the solutions of pH 6.7–7.3. Under these conditions they appeared to be relatively stable.

### 2.5 Calibration curves

The calibration curves were obtained from the analyses of standard solutions at five different concentrations within

the range 20–150  $\mu\text{g/mL}$  and 1–150  $\mu\text{g/mL}$  for chelators and synthetic precursors, respectively. The standard solutions were prepared by diluting the stock solution with the mobile phase.

### 2.6 Precision and accuracy

Intra-day precision was determined as the RSD values calculated from the analyses of six injections at three different concentrations of each chelator (140, 90, 25  $\mu\text{g/mL}$ ) and corresponding synthetic precursors (140, 25, 2  $\mu\text{g/mL}$ ). The same experiment was repeated next day to determine inter-day precision. The accuracy was calculated as a percentage of recovery of these analyses.

## 3 Results and discussion

### 3.1 HPLC method development

In order to increase the water-solubility of PIH and SIH, current investigations employ water-soluble salts of these chelators [7]. Different chromatographic conditions had to be tested to achieve sufficient separation of each chelator from its synthetic precursors. The development of HPLC methods was initiated with analysis of PIH on a  $\text{C}_{18}$  analytical column (Merck, Germany) with Purospher RP-18e (5  $\mu\text{m}$ ) as stationary phase. Since this column gave asymmetric and tailing peaks, other types of chromatographic columns [Tessek-SGX  $\text{C}_{18}$  (7  $\mu\text{m}$ ), Biosfer SI CN (5  $\mu\text{m}$ ), 3.3  $\times$  150 mm) and Discovery-ZR Carbon  $\text{C}_{18}$  (3  $\mu\text{m}$ )] were tested. None of them provided desirable peak shape and separation. Finally, a Watrex  $\text{C}_{18}$  column with Nucleosil as a stationary phase was employed. Since this stationary phase gave satisfactory interaction with analytes, it has been chosen for further method optimization. At first, a 12.5 cm long column was employed for the analysis. Although this length was sufficient for the separation of SIH, isoniazid, and salicylaldehyde, for the effective separation of the other two chelators from their synthetic precursors, the longer column (25 cm) had to be employed.

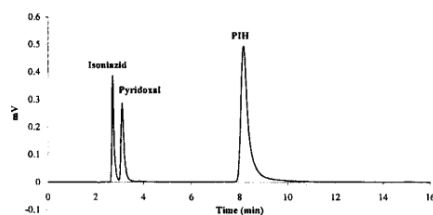
The effectiveness of Watrex  $\text{C}_{18}$  columns was evaluated using the equation:

$$N = 5.54 (t_R/W_{0.5})^2$$

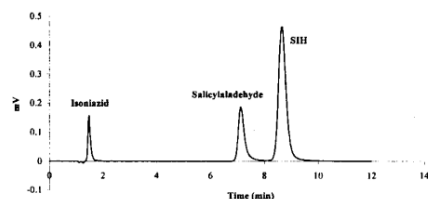
where  $N$  is the column plate number,  $t_R$  is the retention time, and  $W_{0.5}$  is the peak width at 50% above baseline [18]. The column efficiency was 5 510 for PIH, 6 019 for SIH, and 12 997 for o-108.

The mixtures of acetonitrile and water in different ratios were tested as initial composition of mobile phase. Whereas acetonitrile caused rather low retention, methanol led to stronger retention of all compounds on the chromatographic column. The pH value of mobile phase was changed from 3.0 to 7.5. It was observed that lower pH caused rather low retention of all compounds. Although the separation of isoniazid and pyridoxal in the

1506 Kovaříková, Mokry, Klimeš, Vávrová



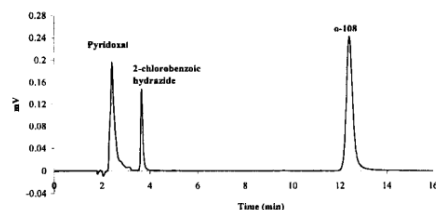
**Figure 2.** Typical chromatogram of separation of PIH from its synthetic precursors. 20  $\mu$ L of the mixture consisting of PIH, isoniazid, and pyridoxal at a concentration of 100  $\mu$ g/mL was injected onto a Watrex 250  $\times$  4 mm column (Nucleosil 120-5, C<sub>18</sub>). The mobile phase was composed of phosphate buffer (0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM 1-heptanesulfonic acid sodium salt, 2 mM EDTA; adjusted to pH 3.0) and methanol (55:45, v/v). Flow rate was 0.8 mL/min. The chromatogram was detected at 254 nm.



**Figure 3.** Typical chromatogram of separation of SIH from its synthetic precursors. 20  $\mu$ L of the mixture consisting of SIH, isoniazid, and salicylaldehyde at a concentration of 100  $\mu$ g/mL was injected onto a Watrex 125  $\times$  4 mm column (Nucleosil 120-5, C<sub>18</sub>). The mobile phase was composed of phosphate buffer (0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA; adjusted to pH 6.0) and methanol (60:40, v/v). Flow rate was 0.8 mL/min. The chromatogram was detected at 254 nm.

presence of PIH appeared to be relatively problematic (under an isocratic mode), addition of 1-heptanesulfonic acid as an ion pair agent led to satisfactory resolution. Nevertheless, the acid pH of the mobile phase was found to be necessary for good separation of pyridoxal and isoniazid.

As reported in the literature [19, 20], the possible difficulties in the analysis of chelating agent could arise from its ability to bind labile iron from the HPLC device. This problem could be avoided by the addition of another strong chelating agent in excess to the mobile phase [19, 20]. Therefore, to prevent the subsequent formation of chelates during chromatography, EDTA was added to the aqueous part of the mobile phase in the concentration range from 0.5 to 2 mM. Besides the prevention of analyte complex formation during chromatography, the addition of this substance improved the peak shape of all chelators. The most significant effect of EDTA on the peak shape



**Figure 4.** Typical chromatogram of separation of o-108 from its synthetic precursors. 20  $\mu$ L of the mixture consisting of o-108, pyridoxal, and 2-chlorobenzoic hydrazide at a concentration of 100  $\mu$ g/mL was injected onto a Watrex 250  $\times$  4 mm column (Nucleosil 120-5, C<sub>18</sub>). The mobile phase was composed of phosphate buffer [0.01 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA; adjusted to pH 7.0], methanol and acetonitrile (60:20:20, v/v/v). Flow rate was 0.8 mL/min. The chromatogram was detected at 254 nm.

was observed in the analysis of PIH. The addition of 2 mM EDTA sufficiently decreased the peak area of spontaneously formed complex below 0.1% of the peak area of the chelator. The dilution of samples with the mobile phase prior to injection apparently improved the peak shape as well. Due to the significantly lower absorption of the synthetic precursors at the maximum absorption of chelators, the UV detector was set at dual wavelengths. While the first channel of the detector was set at 254 nm, the second one was adjusted to the maximum absorption of each chelator. This principle assured maximal detection signal for each chelator with simultaneous satisfactory sensitivity for the detection of synthetic precursors. The appropriate chromatograms are displayed at **Figure 2**, **Figure 3**, and **Figure 4**.

### 3.2 Linearity, precision, and accuracy

The peak area values of each chelator and synthetic precursors were plotted against the corresponding analyte concentration in order to obtain calibration plots. The correlation coefficients  $R > 0.999$  proved good linearity of these plots. **Table 1** shows regression data for all chelators as well as the synthetic precursors. The intra and inter-day precisions (expressed as RSD) are displayed at **Table 2** and **Table 3**, together with the calculated percentages of recovery.

### 3.3 Separation of chelators from corresponding iron-chelates

Chromatographic conditions previously described for the separation of chelators from their synthetic precursors were partially modified to obtain desirable separation of each chelator from its iron chelate. Initially, EDTA was removed from the mobile phase. While methanol as an organic modifier led to simultaneous elution of the chela-

**Table 1.** Regression data of the calibration curves related to the analysis of each chelator and its synthetic precursors. The linearity of these dependences was proved in the ranges 20–150 µg/mL and 1–150 µg/mL for chelators and synthetic precursors, respectively.

Compound	Linear regression	Correlation coefficient, <i>R</i>	UV detection wavelength [nm]
PIH · 2HCl	$y = 78900x - 420000$	0.9995	297
Isoniazid	$y = 51980x - 80000$	0.9996	254
Pyridoxal	$y = 41100x - 70000$	0.9997	297
SIH · HCl	$y = 111500x - 33000$	0.9998	288
Isoniazid	$y = 48100x - 111000$	0.9990	254
Salicylaldehyde	$y = 132000x - 30000$	0.9991	254
o-108	$y = 69500x - 130000$	0.9990	288
Pyridoxal	$y = 25730x - 52000$	0.9995	288
o-Chlorobenzoyl hydrazide	$y = 12140x - 18000$	0.9992	254

**Table 2.** Intra-day precision calculated from the analysis of six injections at three concentrations of chelators and synthetic precursors.

	Concentration [µg/mL]		Recovery % ± SD; RSD
	added	found ± SD; RSD	
PIH · 2HCl	140.4	139.35 ± 2.07; 1.49	99.28 ± 1.47; 1.49
	92.4	91.12 ± 0.562; 0.62	100.80 ± 0.62; 0.62
	25.4	25.97 ± 0.27; 1.041	102.20 ± 1.06; 1.041
Isoniazid	140.5	142.86 ± 1.51; 1.06	101.13 ± 1.07; 1.06
	25.5	25.61 ± 0.09; 0.37	100.43 ± 0.37; 0.37
	2.1	2.02 ± 0.01; 0.90	96.33 ± 0.87; 0.90
Pyridoxal	140.2	140.51 ± 0.71; 0.50	100.22 ± 0.50; 0.50
	25.4	24.84 ± 0.32; 1.30	97.80 ± 1.27; 1.30
	2.0	1.96 ± 0.01; 0.70	98.33 ± 0.69; 0.70
SIH · HCl	140.5	141.10 ± 1.20; 0.85	100.42 ± 0.85; 0.85
	95.5	93.51 ± 0.49; 0.53	98.95 ± 0.52; 0.53
	22	21.67 ± 0.04; 0.21	98.52 ± 0.20; 0.21
Isoniazid	140.0	139.36 ± 0.66; 0.48	99.54 ± 0.47; 0.48
	25.5	25.42 ± 0.12; 0.43	99.68 ± 0.43; 0.43
	2.3	2.39 ± 0.01; 0.43	103.91 ± 0.45; 0.43
Salicylaldehyde	145.0	145.59 ± 0.70; 0.48	100.41 ± 0.48; 0.48
	25.3	24.98 ± 0.31; 1.26	98.75 ± 1.24; 1.26
	2.3	2.26 ± 0.05; 2.43	98.67 ± 2.40; 2.43
o-108	139.2	140.97 ± 0.75; 0.53	101.27 ± 0.54; 0.53
	90.5	92.29 ± 0.73; 0.79	101.98 ± 0.81; 0.79
	25.2	25.59 ± 0.09; 0.36	101.54 ± 0.36; 0.36
Pyridoxal	140.2	141.16 ± 1.01; 0.71	100.68 ± 0.72; 0.71
	25.5	24.36 ± 0.35; 1.42	95.53 ± 1.36; 1.42
	1.9	1.85 ± 0.02; 1.00	97.29 ± 0.97; 1.00
o-Chlorobenzoyl hydrazide	145.0	142.76 ± 1.51; 1.06	101.97 ± 1.08; 1.06
	24.0	24.73 ± 0.38; 1.55	103.06 ± 1.59; 1.55
	2.0	1.96 ± 0.01; 0.65	98.17 ± 0.64; 0.65

1508 Kovaříková, Mokry, Klimes, Vavrova

**Table 3.** Inter-day precision calculated from the analysis of six injections at three concentrations of chelators and synthetic precursors.

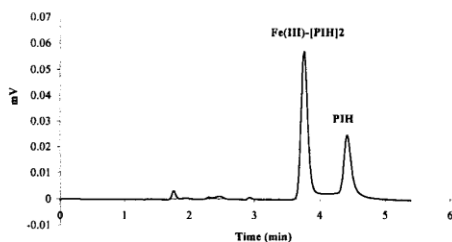
	Concentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]		Recovery % $\pm$ SD; RSD
	added	found $\pm$ SD; RSD	
PIH $\cdot$ 2HCl	138.5	134.50 $\pm$ 0.89; 0.66	97.11 $\pm$ 0.64; 0.66
	95.2	93.02 $\pm$ 1.28; 1.37	97.70 $\pm$ 1.34; 1.37
	20.4	19.94 $\pm$ 0.35; 1.76	97.74 $\pm$ 1.72; 1.76
Isoniazid	142.0	140.83 $\pm$ 0.101; 0.71	99.17 $\pm$ 0.70; 0.71
	22.0	22.20 $\pm$ 0.36; 1.62	100.86 $\pm$ 1.64; 1.62
	2.0	2.04 $\pm$ 0.01; 0.44	102.33 $\pm$ 0.45; 0.44
Pyridoxal	140.0	138.79 $\pm$ 1.01; 0.73	99.13 $\pm$ 0.72; 0.73
	24.8	24.13 $\pm$ 0.35; 1.47	97.30 $\pm$ 1.43; 1.47
	2.1	1.98 $\pm$ 0.01; 0.66	99.37 $\pm$ 0.65; 0.66
SIH $\cdot$ HCl	138.6	138.10 $\pm$ 2.56; 1.86	99.64 $\pm$ 1.85; 1.86
	96.0	93.66 $\pm$ 0.85 0.90	97.56 $\pm$ 0.88; 0.90
	21.8	21.64 $\pm$ 0.14; 0.66	99.25 $\pm$ 0.65; 0.66
Isoniazid	141.0	139.21 $\pm$ 0.76; 0.55	98.73 $\pm$ 0.54; 0.55
	25.5	25.05 $\pm$ 0.09; 0.37	102.20 $\pm$ 0.38; 0.37
	2.5	2.39 $\pm$ 0.02; 0.88	95.58 $\pm$ 0.84; 0.88
Salicylaldehyde	140.0	142.10 $\pm$ 1.17; 0.83	101.50 $\pm$ 0.84; 0.83
	24.1	23.46 $\pm$ 0.16; 0.70	97.36 $\pm$ 0.68; 0.70
	2.0	1.95 $\pm$ 0.04; 1.92	97.39 $\pm$ 1.87; 1.92
o-108	139.3	141.42 $\pm$ 0.21; 0.15	101.52 $\pm$ 0.15; 0.15
	91.5	94.46 $\pm$ 0.59; 0.63	103.24 $\pm$ 0.65; 0.63
	25.8	21.67 $\pm$ 0.06; 0.21	98.91 $\pm$ 0.21; 0.21
Pyridoxal	139.0	136.10 $\pm$ 2.47; 0.81	97.91 $\pm$ 1.77; 1.87
	24.5	23.84 $\pm$ 0.32; 1.32	97.31 $\pm$ 1.29; 1.32
	2.2	2.12 $\pm$ 0.05; 2.55	96.34 $\pm$ 2.46; 2.55
o-Chlorobenzoyl hydrazide	143.0	151.54 $\pm$ 0.50; 0.33	105.97 $\pm$ 0.35; 0.33
	25.2	25.84 $\pm$ 0.36; 1.38	102.54 $\pm$ 1.42; 1.38
	1.89	2.03 $\pm$ 0.03; 1.35	102.54 $\pm$ 1.39; 1.35

tor and the corresponding iron chelate, partial replacement with acetonitrile gave sufficient separation of these compounds. The best condition for chromatographic separation was obtained at pH 7. Although almost the same chromatographic conditions (with exception of EDTA as the mobile phase additive) could be employed for the effective separation of o-108, its synthetic precursors as well as Fe(III)-[o-108]<sub>2</sub> (Figure 7), in the case of both PIH and SIH the situation was more difficult. It was not possible to simultaneously separate chelator, the synthetic precursors, and the corresponding chelates (in the isocratic mode). This problem may be overcome using the gradient mode of chromatographic analysis. Hence, further investigation may be focused on method optimization to develop chromatographic conditions for the effective separation of each chelator, synthetic precursors, as well as its iron che-

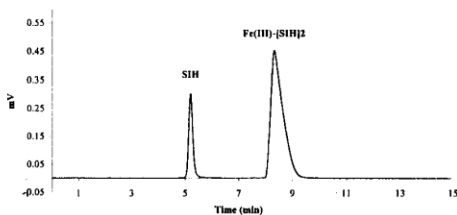
late. The representative chromatograms of separation of PIH and SIH, respectively from their iron-chelates are displayed in Figure 5 and Figure 6.

### 3.4 RP-TLC

In order to obtain fast and easy separation of all components (chelators, chelates, as well as the synthetic precursors) the RP-TLC method is presented. Standard solutions of all components were spotted on the TLC plate; the spots were dried and run in different solvent systems. The following solvent systems were used in different ratios: Water-methanol (50:50), water-acetonitrile (50:50), 0.01 M phosphate buffer (pH 3.5)-methanol (50:50), 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0)-methanol (50:50 and 60:40), and 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0)-acetonitrile



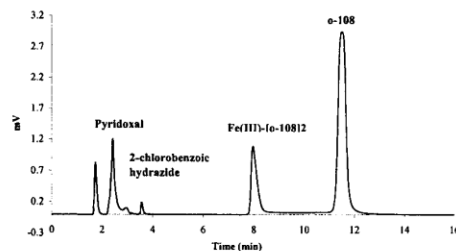
**Figure 5.** Typical chromatogram of separation of PIH from its iron complex. 20  $\mu$ L of the mixture consisting of PIH (100  $\mu$ g/mL) and corresponding iron complex was injected onto a Watrex 250  $\times$  4 mm column (Nucleosil 120-5, C<sub>18</sub>). The mobile phase was composed of phosphate buffer [0.01 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; adjusted to pH 7.0], methanol, and acetonitrile (60:20:20, v/v/v). Flow rate was 0.8 mL/min. The chromatogram was detected at 297 nm.



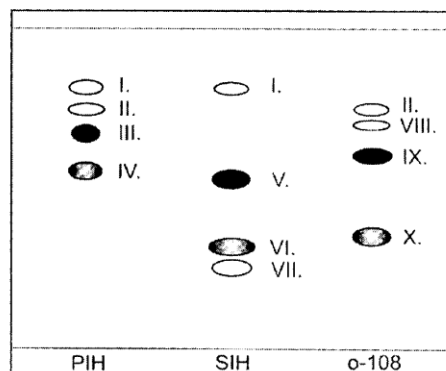
**Figure 6.** Typical chromatogram of separation of SIH from its iron complex. 20  $\mu$ L of the mixture consisting of SIH (100  $\mu$ g/mL) and corresponding iron chelate was injected onto a Watrex 125  $\times$  4 mm column (Nucleosil 120-5, C<sub>18</sub>). The mobile phase was composed of phosphate buffer [0.01 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; adjusted to pH 7.0], methanol and acetonitrile (55:25:15, v/v/v). Flow rate was 0.8 mL/min. The chromatogram was detected at 288 nm.

(50:50, 60:40, and 70:30). The last solvent system was selected as the best for separation of all compounds (**Figure 8**). **Table 4** shows the appropriate *R<sub>f</sub>* values.

While the silica based TLC described in the literature does not provide separation of the chelators and their chelates, the RP-TLC method enables a more efficient approach leading to convenient separation of all chelators, their synthetic precursors as well as corresponding iron chelates. Despite the indisputable limitations of this analytical approach (lower sensitivity, difficulties with simultaneous qualitative and quantitative analysis, etc.), TLC represents an easy and rapid way for routine monitoring of qualitative parameters of the drug substance or the stock solutions. Since it does not require any special instrumentation or an experienced operator, it could be a valuable contribution for those laboratories without an analytical background.



**Figure 7.** Typical chromatogram of separation of o-108 from its iron complex and synthetic precursors. 20  $\mu$ L of the mixture consisting of o-108, o-chlorobenzoic hydrazide, and pyridoxal (at the concentration of 100  $\mu$ g/mL) and corresponding iron chelate was injected onto a Watrex 250  $\times$  4 mm column (Nucleosil 120-5, C<sub>18</sub>). The mobile phase was composed of phosphate buffer [0.01 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; adjusted to pH 7.0], methanol, and acetonitrile (60:20:20, v/v/v). Flow rate was 0.8 mL/min. Detection at 288 nm.



**Figure 8.** RP-TLC chromatogram. 2  $\mu$ L of three mixtures (each composed of chelator, corresponding iron chelate, and synthetic precursors) containing 1  $\mu$ g of each component was spotted on the RP-TLC plates. The mixture of phosphate buffer [0.01 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; adjusted to pH 7.0] and acetonitrile (60:40, v/v) was used as a mobile phase. (I. – Isoniazid; II. – Pyridoxal; III. – Fe(III)-[PIH]<sub>2</sub>; IV. – PIH; V. – Fe(III)-[SIH]<sub>2</sub>; VI. – SIH; VII. – Salicylaldehyde; VIII. – 2-chlorobenzoic hydrazide; IX. – Fe(III)-[o-108]<sub>2</sub>; X. – o-108).

#### 4 Concluding remarks

For the first time, simple, accurate, and precise HPLC methods for the separation of promising drug candidates (PIH, SIH, o-108) from their synthetic precursors are presented. In order to get sufficient separation of each chelator from the appropriate Fe(III)-chelate the chromatographic conditions were partially modified. In addition, a RP-TLC method for simultaneous determination of chelators, chelates, and their synthetic precursors has been developed. Whereas RP-TLC enables routine, simple,

1510 Kovaříková, Mokřý, Klimeš, Vávrová

**Table 4.**  $R_f$  values obtained from RP-TLC for all chelators, synthetic precursors, and iron chelates.

Component	$R_f$ value
PIH	0.56
Fe(III)-[PIH] <sub>2</sub>	0.71
SIH	0.33
Fe(III)-[SIH] <sub>2</sub>	0.57
o-108	0.38
Fe(III)-[o-108] <sub>2</sub>	0.64
Pyridoxal	0.86
Isoniazid	0.80
Salicylaldehyde	0.29
o-Chlorobenzoyl hydrazide	0.60

and rapid monitoring of qualitative parameters of these compounds, HPLC represents a comprehensive approach for precise evaluation of both qualitative and quantitative parameters of these analytes. The methods described in this paper may find application in routine purity and stability evaluation. Furthermore, HPLC methods presented herein might represent a first step for determination of these promising drug candidates in biological fluids.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank to Prof. Vladimír Geršl for his fruitful cooperation. This study was supported by the research grant GAUK 395/2004/B-CH/FaF and the Research project from The Ministry of Education, Youth and Sport No.111600001.

#### References

- [1] T.H. Tam, R. Leung-Toung, Y. Wang, K. Karimian, M. Spino, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 983–995.
- [2] J.L. Buss, F.M. Torti, S.V. Torti, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1021–1034.
- [3] Z.I. Cabantchik, H. Glickstein, J. Golenser, M. Loyevsky, A. Tsafack, *Acta Haematol.* **1996**, *95*, 70–77.
- [4] D.R. Richardson, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2004**, *1012*, 326–341.
- [5] S.M. Swain, P. Vici, *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **2004**, *130*, 1–7.
- [6] P. Ponka, J. Borova, J. Neuwirt, O. Fuchs, *FEBS Lett.* **1979**, *97*, 317–321.
- [7] N. Lewis, V. Patel, J. Terpinski, R. Bliss, *US. Pat.* **5,834,492**, 1998.
- [8] D.R. Richardson, L.W. Vitolo, E. Baker, J. Webb, *Biol. Metals.* **1989**, *2*, 69–76.
- [9] J.L. Buss, P. Ponka, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **2003**, *1619*, 177–186.
- [10] J.L. Buss, M. Hermes-Lima, P. Ponka, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2002**, *509*, 205–229.
- [11] P. Ponka, D.R. Richardson, E. Baker, H.M. Schulman, J.T. Edward, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **1988**, *967*, 122–129.
- [12] J.L. Buss, E. Arduini, P. Ponka, *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 1689–1701.
- [13] M. Horackova, P. Ponka, Z. Byczko, *Cardiovasc. Res.* **2000**, *47*, 529–536.
- [14] J. Golenser, A. Domb, D. Teomim, A. Tsafack, O. Nisim, P. Ponka, W. Eling, Z.I. Cabantchik, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *281*, 1127–1135.
- [15] P. Ponka, D.R. Richardson, J.T. Edward, F.L. Chubb, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1994**, *72*, 659–666.
- [16] J.T. Edward, M. Gauthier, F.L. Chubb, P. Ponka, *J. Chem. Eng. Data.* **1988**, *33*, 538–540.
- [17] J.L. Buss, E. Arduini, C. Shephard, P. Ponka, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 349–360.
- [18] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, Wiley-Interscience, New York 1997, pp. 41–43.
- [19] M.C. Rouan, F. Marfil, P. Mangoni, R. Sechaud, H. Humbert, G. Mauer, *J. Chromatogr. B* **2001**, *755*, 203–213.
- [20] J. Novakovic, A. Tesoro, M. Spino, J. Thiessen, *J. Chromatogr. B* **2003**, *796*, 105–112.



## Komentář k článku

První práce tohoto tematického celku se zabývá **vývojem chromatografických metod** vhodných pro hodnocení **čistoty a stability tří nových aroylhydrazonových chelátorů železa** (pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu - PIH, pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu – o-108 a salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu - SIH) s hlavním zaměřením na metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

### Cílem této části bylo:

- 1/ Vyvinout a validovat HPLC metody umožňující separaci tří nových chelátorů železa (PIH, SIH, o-108) a jejich syntetických prekurzorů (rozkladných produktů).
- 2/ Vyvinuté chromatografické podmínky upravit tak, aby umožnily separaci chelátorů a jejich komplexů se železem ( $\text{Fe}^{3+}$ -[chelator]<sub>2</sub>).
- 3/ Vyvinout jednoduchou RP-TLC metodu, umožňující rychlou separaci všech tří chelátorů, syntetických prekurzorů a příslušných komplexů se železem ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

### Komentář a diskuze k výsledkům

Přestože uvedené látky vykazují zajímavé farmakologické vlastnosti, nebyly dosud dostatečně definovány analyticky. Vzhledem k tomu, že v literatuře nebyla dostupná žádná HPLC metoda pro analýzu těchto látek, ani látek strukturně blízkých, bylo nutné začít s vývojem analytické metody „od počátku“.

Při vývoji HPLC metod byly testovány chromatografické kolony s různou náplní. Jako optimální se jevila kolona s náplní Nucleosil 120-5 C18 (5  $\mu\text{m}$ ), firmy Watrex. Délka kolony 12,5 cm byla dostačující pro separaci SIH a syntetických prekurzorů (salicylaldehydu a isoniazidu), avšak v případě PIH a o-108 bylo nutno pro dosažení požadované separace použít kolonu delší (25 cm). Jako mobilní fáze byly testovány různé směsi organických rozpouštědel (methanol, acetonitril) a pufrů o různém pH. Malé množství EDTA, bylo přidáno do vodné složky mobilní fáze pro zamezení tvorby komplexů chelátorů s ionty železa, které by mohly být přítomny ve stopovém množství v chromatografickém systému. Přídavek tohoto aditiva zlepšoval tvar chromatografických píků všech analyzovaných chelátorů, přičemž největší vliv byl pozorován u píku PIH. Poněkud problematickou se zpočátku jevila separace

syntetických prekurzorů PIH (pyridoxalu a isoniazidu). Přídavek iontově-párového činidla (kyseliny heptansulfonové) však umožnil dosáhnout požadované separace i za izokratických podmínek. Pro detekci analytů byly nastaveny vždy dvě vlnové délky. První odpovídající maximum absorbance chelátoru (297 nebo 288 nm) a druhá umožňující dostatečnou citlivost detekce syntetických prekurzorů (254 nm). Vyvinuté HPLC metody byly validovány s ohledem na linearitu, přesnost a správnost stanovení chelátorů i jednotlivých syntetických prekurzorů.

Tyto chromatografické podmínky byly následně modifikovány tak, aby byla dosažena separace jednotlivých chelátorů a odpovídajících komplexů s železem. Kromě odstranění EDTA z mobilní fáze bylo v případě PIH a SIH ještě nutné dále modifikovat její složení, aby nedocházelo ke koeluci chelátoru a příslušného komplexu. Částečná náhrada methanolu za acetonitril a úprava pH mobilní fáze vedla k pozitivnímu ovlivnění selektivity separace a tím i k rozdělení píků chelátoru (PIH a SIH) a komplexu. V případě o-108 bylo možné použít stejné podmínky pro separaci chelátoru, syntetických prekurzorů i odpovídajícího komplexu s železem (kromě přítomnosti EDTA v mobilní fázi).

Závěrečná část této práce se zabývala vývojem RP-TLC metody určené především k rychlé a jednoduché analýze těchto látek, využitelné i v laboratořích, které nedisponují složitější analytickou instrumentací. Jako stacionární fáze byla zvolena TLC deska s reverzní fází C18. Jako fáze mobilní byla použita směs acetonitrilu a fosfátového pufru. Vyvinutá RP-TLC metoda umožňuje separaci všech chelátorů, jejich syntetických prekurzorů i příslušných komplexů se železem.

**Tato práce přináší validované HPLC metody umožňující hodnocení čistoty a stability tří aroylhydrazonových chelátorů železa a RP-TLC metodu vhodnou pro rychlou analýzu těchto látek.**

## **4.1.2. HPLC study on stability of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone**

**Petra Kovaříková, Milan Mokrý, Jiří Klimeš, Kateřina Vávrová**

J. Pharm. Biomed. Anal. 40 (2006) 105-112.



## HPLC study on stability of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone

P. Kovaříková<sup>a,\*</sup>, M. Mokrý<sup>a</sup>, J. Klimeš<sup>a</sup>, K. Vávrová<sup>b</sup><sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic<sup>b</sup> Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Received 4 January 2005; received in revised form 13 June 2005; accepted 14 June 2005

Available online 2 August 2005

## Abstract

Biocompatible iron chelators are currently under extensive investigation as promising drug candidates. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) is a lead compound of the aroylhydrazone group of novel iron chelating agents. In this study, the precise and accurate HPLC analytical methods were used for the stability evaluation of water-soluble PIH salt (PIH·2HCl) in aqueous media of different pH (2.0, 3.9, 7.0, 9.0 and 12.0) as well as in two selected pharmaceutical co-solvents at both laboratory and elevated (40 °C) temperatures. The susceptibility of PIH·2HCl to oxidative decomposition was studied in the solutions of hydrogen peroxide (3 and 30%). Furthermore, the solid substance of PIH·2HCl was exposed to UV, dry and wet heat. Our experiments revealed that PIH was considerably sensitive to hydrolytic decomposition in aqueous media, resulting in the splitting of the hydrazone bond. The elevated temperature significantly accelerated the hydrolytic reaction. The lowest rate of hydrolysis of PIH was observed in the phosphate buffer of pH 7.0 and in the pharmaceutical co-solvents (30% PEG-300 and 10% Cremophor EL). No special degradation products were detected in the samples exposed to either hydrogen peroxide or co-solvents. The solid substance of PIH·2HCl was stable when exposed to UV, dry or wet heat for 33 h.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone; PIH; Stability; HPLC; Iron chelator

## 1. Introduction

Biocompatible iron chelators are within the biological systems capable to selectively form stable complexes with free or loosely bound iron without significant interference with other important biometals. Iron chelation therapy is now routinely used in iron-overloaded patients to prevent severe organ damage, which would ultimately lead to death. Additionally, growing body of evidence suggests that iron, even in non-overloaded subjects, plays an important role in a number of human pathologies, and thus the concept of iron chelation represents a unique approach for the novel drug development [1].

Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH, Fig. 1) is a selective, biocompatible iron chelating agent developed by Ponka et al. [2].

\* Corresponding author.

E-mail address: [petra.kovarikova@faf.cuni.cz](mailto:petra.kovarikova@faf.cuni.cz) (P. Kovaříková).

Today, it is a lead compound of the large group of aroylhydrazone iron chelators. PIH is a tridentate ligand which can bind free or loosely bound Fe<sup>3+</sup> via its phenolate oxygen, imine nitrogen and carbonyl oxygen atoms in a 1:2 stoichiometry. This compound can be readily synthesized by Schiff-base condensation from commercially available substances (pyridoxal and isonazid) [3]. PIH is a crystalline substance, which can exist in the form of different hydrates and salts, colored from light yellow to orange. Unfortunately the free base of PIH is poorly soluble in aqueous media of neutral pH. Since this fact represents considerable limitation for its use as a pharmaceutical, the synthesis of water-soluble salt (PIH·2HCl) has been developed and patented [4].

PIH has been shown as an effective iron chelator both in vitro and in vivo [3]. In an addition to promotion of body iron excretion, some other promising pharmacodynamic effects (antioxidative, antiproliferative and retinoprotective) have been reported in the preclinical studies [3,5,6]. The toxicity and tolerability of single and repeated administration of

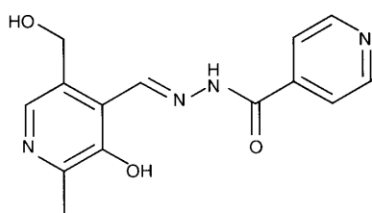


Fig. 1. The chemical structure of PIH.

PIH have been assessed in rats and rabbits [7,8]. Following the encouraging results from animal studies, phase I, clinical trial was performed. This study confirmed low toxicity and good tolerability of this chelator, although its efficacy in iron-overloaded patients was lower than in the animal studies [9]. These results might have been caused by an inappropriate pharmaceutical formulation leading to limited bioavailability [3]. This can be overcome using the water-soluble PIH salt (PIH·2HCl), which is now available.

The stability assessment of any promising drug candidate plays a vital role in the process of the novel drug development. Many environmental conditions, such as heat, light, moisture as well as the inherent chemical susceptibility of a substance to hydrolysis or oxidation can play an important role in pharmaceutical stability. These studies also provide essential information supporting pharmaceutical formulation development. Furthermore, they help to define storage and handling conditions. The exposition of the drug substance to extreme external conditions helps to revealing and identifying the likely degradation products [10]. Although some pilot data on the stability of PIH have already been reported [11,12], no systematic stress study on the drug has been performed. Since the water-soluble salt (PIH·2HCl) possessed favorable pharmaceutical properties, we focused on the stability of this salt.

The stability of this chelator was determined in the aqueous media of different pH (2.0, 3.9, 7.0, 9.0 and 12.0) and in selected pharmaceutical co-solvents (30% PEG-300 and 10% Cremophor EL) at both the laboratory (25 °C) and elevated (40 °C) temperature. The susceptibility of PIH·2HCl to oxidative decomposition was studied using the exposure to hydrogen peroxide (3 and 30%). In addition, other extreme external conditions (UV, dry and wet heat) were employed in order to describe degradation behavior of the said compound.

## 2. Experimental part

### 2.1. Material and instrumentation

#### 2.1.1. Chemicals

PIH·2HCl was synthesized according to Lewis et al. [4]. The structure and purity of this compound was confirmed by FTIR (Nicolet Impact 400 spectrophotometer, Thermo, Madison, USA),  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR (Varian Mercury-Vx BB 300 instrument, Palo Alto, USA, operating at 300 MHz

for  $^1\text{H}$ , 75 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) and HPLC method [13]. The melting point was measured using the Kofler apparatus (Boëtius, Nagma, Germany) and it is uncorrected. The melting point (255–260 °C, degradation) and the spectra were in accordance with those previously reported [4]. Isoniazid, pyridoxal, isonicotinic acid and 1-heptanesulfonic acid sodium salt were purchased from Sigma–Aldrich (Munich, Germany). Methanol, EDTA, phosphate buffers, hydrogen peroxide, phosphoric acid and sodium hydroxide were obtained from Lachema a.s. (Brno, Czech Republic). PEG-300 and Cremophor EL were purchased from Kulich (Hradec Králové, Czech Republic). The water was purified using reverse osmosis.

#### 2.1.2. Chromatographic systems and conditions

**2.1.2.1. Isocratic method (method I).** The chromatographic system (Thermo Separation Products Inc., Riviera Beach, USA), which consisted of an isocratic pump (Costametric 3500), an automatic injector (AS 1000) and a UV–vis detector (UV 3000 HR), was used for the stability evaluation. The HPLC data were processed with SpectraSystem Software-PC 1000 operated under the control of a OS/2 Warp operation system. The chromatographic conditions used in this study have been developed and discussed in our previous study [13]. The chromatographic analyses were achieved on 5  $\mu\text{m}$  particle size  $\text{C}_{18}$  Nucleosil (Watrex, Prague, Czech Republic) column (250 mm  $\times$  4 mm) kept at 25 °C. The mobile phase was composed of mixture of component A (methanol) and component B (0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , with 5 mM 1-heptanesulfonic acid sodium salt, adjusted to pH 3.0) in a ratio 49:51 (v/v). EDTA was added into the aqueous part of mobile phase (component B) in the concentration 2 mM. The flow rate was 0.9 ml/min and the detector was set up to the dual mode (297 and 254 nm). While the first channel was set at the absorption maximum of PIH (297 nm), the second channel enabled the more sensitive detection of the degradation products. The injection volume was 20  $\mu\text{l}$ .

**2.1.2.2. Gradient method (method II).** In order to reveal the possible co-elution of isoniazid and isonicotinic acid, the method was change from isocratic to gradient one. The gradient analyses were performed using chromatographic system series HP 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) which consisted of a HP 1100 series binary pump, a vacuum degasser, a thermostated column compartment, a variable wavelength detector and an autosampler. The chromatographic data were processed using HP Chemstation (Agilent technologies). The following gradient was used: 0–6 min 80–50% (component B); 6–18 min 50–0% (component B); 18–25 min 0–80% (component B). All other HPLC conditions were the same as described above (method I).

#### 2.1.3. Stability study instrumentation

The hydrolytic stability study was carried out using water bath U 7 (LMW, Medingen, Germany) equipped with thermostat controller. Photostability study was performed under

the UV lamp (Camag, Muttenz, Switzerland). The exposition to wet and dry heat was proceeded in oven (HS 61-A, Chirana, Prague, Czech Republic) set at 80 °C.

## 2.2. Stability study

### 2.2.1. Calibration curve, precision and accuracy—methods I and II

The stock solution of PIH (500 µg/ml) was prepared by dissolving an appropriate amount of PIH·2HCl in pure water. The calibration curve was made using standard solutions of six different concentrations of PIH (0.25, 0.5, 1, 2, 5 and 10 µg/ml). The standard solutions were prepared by diluting the stock solution with the mixture of methanol–phosphate buffer [0.1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0] in a ratio 1:1. The peak area ratios (detected at 297 nm) were plotted against the corresponding concentrations. The accuracy was evaluated as a percentage of recovery of the analyses of the spiked samples at three concentration levels. The precision was expressed as a R.S.D. of the analyses of these spiked samples.

### 2.2.2. Stability of PIH in aqueous solutions of different pH and in the pharmaceutical co-solvents

The hydrolytic stability of PIH (at the concentration of 20 µg/ml) was studied in the following media: phosphate buffers of pH 2.0, 7.0 and 9.0; 0.3% KOH (pH 12.0); pure water and solutions of pharmaceutical co-solvents, viz. 10% Cremophor EL; 30% PEG-300. The following buffers were used in these experiments: 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, adjusted using 10% phosphoric acid to pH 2.0; 0.1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, adjusted using 10% phosphoric acid to pH 7.0; 0.1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, adjusted using 1 M NaOH to pH 9.0. The solutions of co-solvents were prepared by dilution of appropriate amount of Cremophor EL and PEG-300 with the neutral phosphate buffer (pH 7.0). The tested solutions were prepared as follows: 0.4 ml of the standard solution were added into the 10 ml volumetric tubes and filled up with a buffer, 0.3% KOH, pure water, 10% Cremophor EL or 30% PEG-300. The tested solutions were maintained either at laboratory temperature (25 °C) or in water bath at 40 °C. At 0, 15, 60, 120, 180 and 240 min, 1 ml of each tested solution was mixed with 4 ml of the mixture of methanol–phosphate buffer (pH 7.0) in a ratio 1:1 and injected onto the column in triplicate. Each experiment was performed in duplicate and the results were expressed as means. Control samples consisting of 1 ml of the appropriate degradation medium and 4 ml of the mixture of methanol–phosphate buffer [0.1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0] in

a ratio of 1:1 were injected onto the column before every single analysis. All samples were analyzed employing isocratic method (method I). In order to determine the relative rate of hydrolytic decomposition of the chelator, the logarithm of remaining concentration (log C) was plotted versus time. The linearity of the dependence was investigated using the linear regression. The half-life values (*t*<sub>1/2</sub>) of the hydrolyses were calculated from the slope of the kinetic curves. The samples from the end of each study were also analyzed employing the gradient HPLC method (method II).

### 2.2.3. Oxidative stability

In order to reveal both the susceptibility of the chelator to oxidative decomposition and the possible oxidative degradation products, 0.4 ml of the standard solution of PIH were added into the volumetric tubes and filled up with either 3% (v/v) or 30% (v/v) hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide (3%) was prepared by dilution of the concentrated hydrogen peroxide with the phosphate buffer (pH 7.0). The tested solutions were maintained at laboratory temperature (25 °C) or in a water bath at 40 °C. After 4 h, 1 ml of each tested solution was mixed with the mixture of methanol–phosphate buffer (0.1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0) in a ratio 1:1 and injected onto the column. The samples were analyzed using methods I and II.

### 2.2.4. Photostability and thermal stability (dry and wet heat)

The solid substance of PIH·2HCl was outlaid uniformly under the UV lamp (set at 254 nm) in the laboratory (25 °C, 60% RH) or maintained as a thin film in the oven set at 80 °C. In order to simulate the wet heat conditions, the substance was moisturized with pure water (10% of the substance weight). At the time period of 3, 18, 26 and 33 h 10 mg of substance were dissolved in water, diluted with the mixture of methanol–phosphate buffer [0.1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0] in a ratio 1:1 and injected onto the column. The samples were analyzed employing method I.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Calibration curve, precision and accuracy—methods I and II

The correlation coefficients *r* = 0.9996 and 0.9989 indicated the linearity of the isocratic and the gradient method,

Table 1  
Intra- and inter-day accuracy and precision of the method isocratic method (method I)

Concentration added (µg/ml)	Intra-day ( <i>n</i> = 5)		Inter-day ( <i>n</i> = 3)	
	Concentration found (µg/ml) ± S.D.; R.S.D.	Recovery (%)	Concentration found (µg/ml) ± S.D.; R.S.D.	Recovery (%)
8.00	8.01 ± 0.10; 1.25	100.17	8.09 ± 0.11; 1.38	101.10
1.17	1.18 ± 0.01; 0.99	100.45	1.16 ± 0.01; 1.23	99.93
0.50	0.51 ± 0.17; 2.83	101.11	0.50 ± 0.01; 2.20	100.32

Table 2  
Intra- and inter-day accuracy and precision of the gradient method (method II)

Concentration added ( $\mu\text{g/ml}$ )	Intra-day ( $n=5$ )		Inter-day ( $n=3$ )	
	Concentration found ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ S.D.; R.S.D.	Recovery (%)	Concentration found ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ S.D.; R.S.D.	Recovery (%)
10.02	$10.60 \pm 0.18$ ; 1.66	103.97	$10.35 \pm 0.27$ ; 2.60	103.19
1.28	$1.27 \pm 0.01$ ; 1.11	99.90	$1.26 \pm 0.01$ ; 1.30	99.72
0.61	$0.61 \pm 0.01$ ; 1.01	99.07	$0.60 \pm 0.01$ ; 1.96	98.99

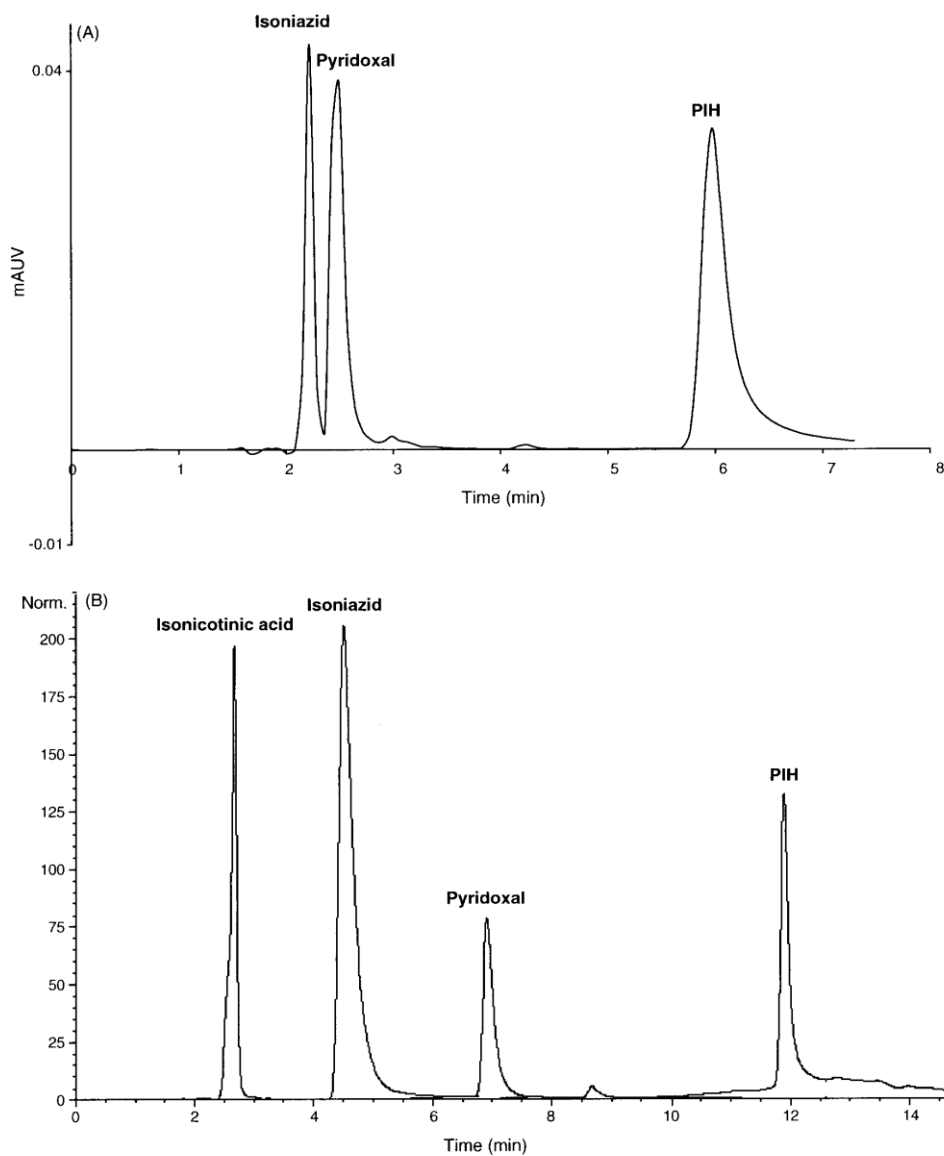


Fig. 2. Chromatograms of separations of PIH from pyridoxal and isoniazid using (A) the isocratic mode and (B) gradient mode of the analyses. The chromatograms were detected at 254 nm.

respectively. The results of the methods' accuracy and precision are shown in the Tables 1 and 2. Fig. 2 shows the chromatograms of the separation of PIH and its degradation products (pyridoxal and isoniazid) employing the isocratic and gradient chromatographic methods.

### 3.2. The stability of PIH in aqueous solutions of different pH and in the selected pharmaceutical co-solvents

Since hydrazone bond is known to be sensitive to both acid and alkaline hydrolysis, wide range of pH was chosen on purpose to cover acid, neutral as well as alkaline conditions and to allow the comparison among these conditions. The susceptibility of PIH to hydrolytic decomposition was determined as a decrease of the concentration of chelator during the time course of the experiment. Relatively fast degradation of PIH was observed in the acid medium (phosphate buffer, pH 2.0). At the laboratory temperature, 44% of the initial amount of PIH decomposed to isoniazid and pyridoxal within 4 h. The acid hydrolysis was markedly accelerated with the elevated temperature, where 89% of the initial amount of the chelator decomposed during the same time period. The decrease of the concentration of PIH was

accompanied with the increase of the peak areas of both degradation products (pyridoxal and isoniazid). In order to determine the rate of the hydrolytic reactions (at both laboratory temperature and 40 °C) the log *C* were plotted versus time. The linear behavior of these plots indicated the pseudo-first order reaction rates (correlation coefficients  $r=0.985$  and  $0.989$  for laboratory and elevated temperature, respectively; Fig. 3).

The degradation behavior was also observed in 20 µg/ml solution of PIH·2HCl in pure water. The pH of this solution was 3.9. Interestingly, the hydrolysis at the laboratory temperature did not follow the pseudo-first order rate. The concentration of PIH had reached 82% of initial concentration at 120th min of experiment and did not decrease further. On the contrary, the hydrolysis of PIH in the same solution at elevated temperature (40 °C) followed the pseudo-first order degradation ( $r=0.990$ ) (Fig. 3).

In neutral solution (phosphate buffer, pH 7.0) relatively slow hydrolysis of PIH was observed. At the laboratory temperature 10% of PIH decomposed during the time course of this study (240 min). The elevated temperature accelerated the hydrolytic reaction (26% of initial amount of the substance decomposed). Both the hydrolysis at the laboratory

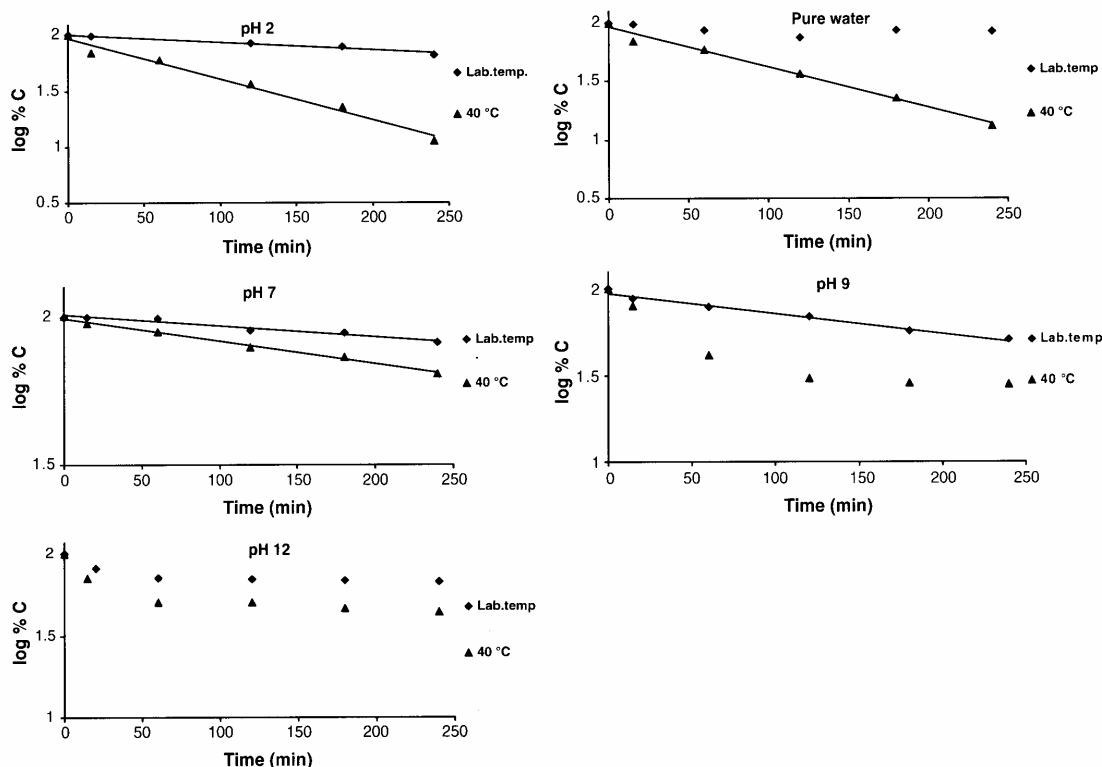


Fig. 3. The kinetic plots (log *C* vs. time) of the hydrolyses of PIH in aqueous solutions of different pH at laboratory (25 °C) and elevated (40 °C) temperatures.



and the elevated temperature followed the pseudo-first order rates (the correlation coefficients  $r = 0.974$  and  $0.990$ , respectively; Fig. 3).

At the laboratory temperature, hydrolysis of PIH in alkaline phosphate buffer (pH 9.0) followed the pseudo-first order reaction rate ( $r = 0.999$ ). On the contrary, a non-linear profile of the dependence  $\log C$  versus time was obtained in the experiment carried out at the elevated temperature. The initial rapid decrease of the concentration of PIH (obtained during the first 60 min of the experiment) was followed by the more gradual fall by the end of the study. Under the conditions of alkaline hydrolysis, 49 and 72% of the initial amount of PIH decomposed at the laboratory and elevated temperature, respectively.

The stability of PIH was also studied in the strong alkaline solution (pH 12.0). In this medium, hydrolysis of the chelator did not follow the pseudo-first rate either at laboratory temperature or at  $40^\circ\text{C}$ . The initial fast degradation rate (seen in first 60 min of hydrolysis) was followed by slower one by the end of experiment. 33 and 60% of the initial amount of PIH decomposed in KOH solution (pH 12) at laboratory and elevated temperature, respectively (Fig. 3).

Besides the hydrazone bond, PIH contains also another hydrolytically sensitive bond—hydrazide one. Considering the hydrolytic splitting of this bond, the presence of isonicotinic acid on chromatograms would be expectable. Since the isocratic mode of the analysis was unable to separate isonicotinic acid from isoniazid, the chromatographic mode was changed to gradient one. The most stressed samples were analyzed employing the gradient method developed for this purpose. Only minor amount of isonicotinic acid (less than 10% of the peak area of isoniazid) was detected. Thus, based on this observation, it was confirmed that pyridoxal and isoniazid should be considered as the main hydrolytic degradation products of PIH, whereas the isonicotinic acid is only the minor one. The results of this study indicate that PIH-2HCl is sensitive to hydrolytic decomposition in aqueous solutions. The reaction data are summarized in Table 3.

Since considerable rate of hydrolysis could be observed in all tested media already at the laboratory temperature, the degradation of PIH in aqueous solution should be taken

into account in further investigations employing this chelator. At the laboratory temperature, hydrolytic reaction proceeds faster in the alkaline solution than in the appropriate acidic one. This observation is in agreement with the outcomes of the study performed by Richardson et al. [11], although the hydrolytic conditions employed are not completely identical. Interestingly, the hydrolysis rate in the solution of pH 12 was determined to be lower than the decomposition in the phosphate buffer of pH 9 (at both laboratory and elevated temperature). However, the hydrolysis in pH 12 did not follow the pseudo-first order kinetic either at laboratory temperature or at  $40^\circ\text{C}$ . This observation could be likely explained by the possible backward reaction (condensation), which can take place in the alkaline solution. The significant condensation of pyridoxal and isoniazid in the solution of pH 12 (resulting into the formation of hydrazone) was also reported [11].

At laboratory temperature, the alkaline hydrolysis (pH 9) of PIH was faster than the acid ones (pH 2 and 3.9). Nevertheless, the elevated temperature affected the acid hydrolysis more significantly. At  $40^\circ\text{C}$ , the PIH concentrations in acid conditions were at the end of the experiment even lower than those obtained in alkaline ones. The less pronounced effect of temperature on alkaline hydrolysis might be associated with the acceleration of the backward reactions in these conditions.

Since acid hydrolysis of PIH (pH 2) followed pseudo-first order rate (at both temperatures), the backward reactions played a minimum role. By contrast, the hydrolysis in pure water (pH 3.9) followed the pseudo-first order rate only when performed at elevated temperature, which leads us to an assumption that at the laboratory temperature the backward reaction might take place as well.

The slowest, however still important, degradation was observed in the neutral phosphate buffer. The calculated half-life of neutral hydrolysis is different from that obtained in HEPES buffer (spectrophotometric study) [11]. Nevertheless the degradation rate at elevated temperature is comparable with degradation of PIH in phosphate buffer saline, pH 7.5 at  $37^\circ\text{C}$  [12]. Fig. 4 shows the representative chromatogram of analyses of stressed samples.

Table 3

The summary of kinetic characteristics of hydrolyses of PIH in aqueous media and two co-solvents

Medium	Laboratory temperature			Elevated temperature ( $40^\circ\text{C}$ )		
	Portion of decomposed PIH at the end of experiment (%)	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)	Portion of decomposed PIH at the end of experiment (%)	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
Phosphate buffer pH 2	44	0.001642	7.0	89	0.008890	1.30
Pure water pH 3.9	16	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	87	0.008613	1.34
Phosphate buffer pH 7	10	0.000387	29.8	26	0.001214	9.50
Phosphate buffer pH 9	49	0.00269	4.3	72	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>
0.3% KOH	33	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	60	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>
30% PEG-300	9	0.000307	37.6	18	0.000907	12.7
10% Cremophor EL	10	0.000389	29.8	15	0.000636	18.2

The rates of hydrolyses are expressed as both the percentage of PIH decomposed in the time of the experiments and the half-lives.

<sup>a</sup> Due to the non-linearity of the plot  $\log C$  vs. time, the  $k$  and  $t_{1/2}$  were not calculated.

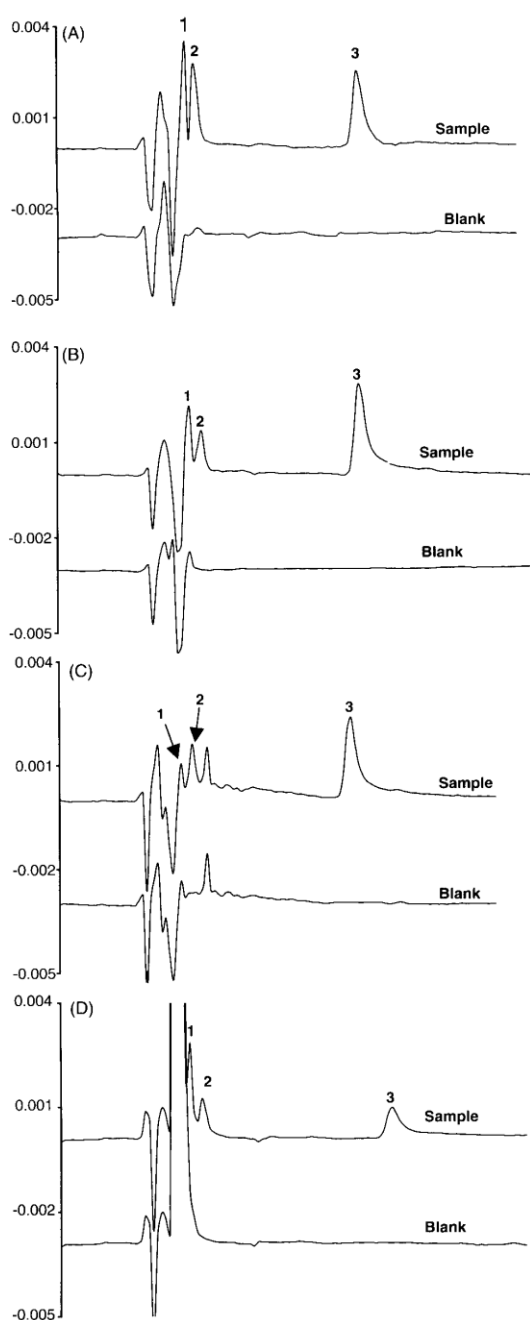


Fig. 4. The representative chromatograms of the samples stressed in the different media (40 °C) for 4 h. The samples were analyzed employing method I. (A) Phosphate buffer, (B) 10% Cremophor EL, (C) 30% PEG and (D) 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (1) Isoniazid; (2) pyridoxal; (3) PIH.

### 3.2.1. The stability of PIH in the pharmaceutical co-solvents

The stability of PIH was also defined in the selected pharmaceutical co-solvents (10% Cremophor EL and 30% PEG-300). Ten percent aqueous solution of Cremophor EL has been already employed as a vehicle for PIH in the preclinical studies [5,7,8]. PEG-300 was chosen as another suitable pharmaceutical co-solvent. The experiment revealed the similar pattern degradation of PIH in both co-solvents. 9 and 18% of the initial amount of the substance decomposed in 30% PEG-300 along the course of this experiment performed at the laboratory and elevated temperature, respectively. The correlation coefficients obtained from the plots  $\log C$  versus time ( $r = 0.995$  and  $0.977$ ) indicated the pseudo-first order reaction rate at both temperatures. In the case of 10% Cremophor EL, 10% of the initial amount of the substance was decomposed at the laboratory temperature and 15% at the elevated temperature. The correlation coefficients for the laboratory and higher temperature were calculated to be 0.968 and 0.987, respectively. Furthermore, the rates of degradation of PIH in both co-solvents were comparable with the degradation rate of hydrolysis in neutral phosphate buffer. Fig. 5 shows corresponding kinetic plots.

Therefore, it can be concluded, that the tested pharmaceutical co-solvents had no distinct effect on the stability of the chelator. No additional peak, which might indicate any different degradation product, could be detected. Fig. 4 shows the typical chromatograms of the analyses. Thus, the hydrolysis was the most important decomposition mechanism for both co-solvent solutions. Interestingly, a thiosemicarbazone iron chelator Triapine was reported to be stable in the infusion formulation (25 °C, pH 3–4) consisting of the co-solvents (PEG, ethanol) and saline more than 8 h. Based on our experiments, the aroylhydrazone chelator PIH seems to be less stable than Triapine [14].

### 3.3. Oxidative stability

In 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, only 10 and 23% of the initial amount of the chelator decomposed at laboratory and elevated temperature, respectively. The concentrated (30%) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used to accelerate the potential oxidative process. While 13% of the initial amount of PIH decomposed in the sample exposed to the 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 4 h at laboratory temperature (25 °C), 60% decomposed at the same solution maintained at 40 °C. The degradation of PIH in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (both temperatures) as well as in 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (laboratory temperature) resembles the results obtained in the experiments employing neutral phosphate buffer. Interestingly, elevated temperature substantially accelerated the degradation of the chelator especially in 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, no special peak of a putative oxidative degradation product was detected in either chromatogram. The results presented above suggest that PIH is more sensitive to hydrolysis than to oxidation. The representative chromatogram of analysis of sample exposed to hydrogen peroxide is shown in Fig. 4.

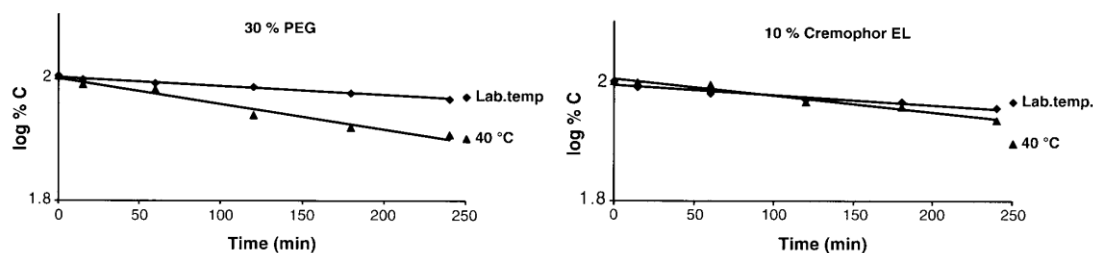


Fig. 5. The kinetic plots of hydrolyses of PIH in selected pharmaceutical co-solvents at laboratory (25 °C) and elevated (40 °C) temperature.

#### 3.4. Photolytic and thermal stability

The solid substance of PIH·2HCl was stable when exposed to UV and heat (wet and dry) for 33 h. However, the change of the color of the substance (from yellow to slightly orange) was observed at 3 h of exposition to wet heat. The change could be most likely attributed to the formation of a hydrate [4].

#### 4. Conclusion

In this study, for the first time, HPLC analytical technique was employed for the stability evaluation of water-soluble salt of PIH. The hydrolysis of this iron chelator was studied in the aqueous solutions of different pH (from 2.0 to 12.0) and in the selected pharmaceutical co-solvents (30% PEG-300 and 10% Cremophor EL) at both the laboratory (25 °C) and elevated temperature (40 °C). Furthermore, the susceptibility of PIH·2HCl to decomposition under the oxidative, photolytic, dry and wet heat conditions was studied. PIH was shown to be sensitive to the hydrolysis in the aqueous media and the observed degradation should be considered in further studies. Pyridoxal and isoniazid were identified as main degradation products, whereas isonicotinic acid is only a minor one. The degradation behavior of the chelator in hydrogen peroxide resembled that those seen in the neutral phosphate buffer (with exception of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 40 °C). No special oxidative product was detected. The solid substance of PIH·2HCl was stable under the influence of other external conditions (UV, heat). Information presented herein can be used for the definition of optimal handling and storage conditions and use of the pharmaceutical excipients.

#### Acknowledgement

This study was supported by the Research Project MSM 0021620822 from The Ministry of Education, Young and Sport.

#### References

- [1] T.H. Tam, R. Leung-Toung, Y. Wang, K. Karimian, M. Spino, *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 983–995.
- [2] P. Ponka, J. Borova, J. Neuwirt, O. Fuchs, *FEBS Lett.* 97 (1979) 317–321.
- [3] J.L. Buss, M. Hermes-Lima, P. Ponka, *Adv. Exp. Med. Biol.* 509 (2002) 205–229.
- [4] N. Lewis, V. Patel, J. Terpinski, R. Bliss, Water soluble orally effective iron chelator, United States Patent US005834492A (1998).
- [5] T. Simunek, I. Klimtova, J. Kaplanova, M. Sterba, Y. Mazurova, M. Adamcova, R. Hrdina, V. Gersl, P. Ponka, *Pharmacol. Res.* 51 (2005) 223–231.
- [6] M. Bhattacharya, P. Ponka, P. Hardy, N. Hanna, D.R. Varma, P. Lachapelle, S. Chemtob, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (1997) 11–26.
- [7] N. Sookvanichsilp, S. Nakornchai, W. Weerapradist, *Drug Chem. Toxicol.* 14 (1991) 395–403.
- [8] M. Adamcova, J. Machackova, V. Gersl, V. Pelouch, T. Simunek, I. Klimtova, R. Hrdina, P. Ponka, *Physiol. Res.* 51 (2002) 443–448.
- [9] G.M. Brittenham, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 612 (1990) 315–326.
- [10] K.M. Alsante, R.C. Friedmann, T.D. Hatajik, L.L. Lohr, T.P. Sharp, K.D. Snyder, E.J. Szczesny, in: S. Ahuja, S. Scypinski (Eds.), *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Academic press, San Diego, 2001, pp. 95–118.
- [11] D.R. Richardson, L.W. Vitolo, E. Baker, J. Webb, *Biol. Met.* 2 (1989) 69–76.
- [12] J.L. Buss, P. Ponka, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1619 (2003) 177–186.
- [13] P. Kovaříková, M. Mokry, J. Klimes, K. Vavrova, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1503–1510.
- [14] G. Krishna, J. Mao, B. Almassian, W. Lang, *Pharm. Dev. Technol.* 4 (1999) 71–80.

## Komentář k článku

Tato práce se zabývá **systematickým studiem vybraných aspektů stability „mateřské látky“ skupiny aroylhydrazoných chelátorů železa - pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu pomocí HPLC.**

### Cílem této části bylo:

- 1/ Definovat stabilitu PIH ve vodných prostředích o různém pH při laboratorní a zvýšené teplotě (40 °C).
- 2/ Studovat stabilitu PIH v prostředí vybraných farmaceutických pomocných látek - 30% polyethylenglykolu (PEG-300) a 10% Cremoforu EL - při laboratorní a zvýšené teplotě (40°C).
- 3/ Studovat citlivost PIH k rozkladu vlivem oxidačního činidla (3 a 30% peroxid vodíku)
- 4/ Určit vliv UV záření a tepla na stabilitu pevné substance (PIH·2HCl)

### Komentář a diskuze k výsledkům

Ačkoliv některé vybrané aspekty stability PIH (jako baze) byly studovány již dříve, vždy pouze s využitím spektrofotometrických metod. Tato práce si oproti tomu kladla za cíl detailně prostudovat stabilitu PIH·2HCl s využitím selektivní (chromatografické) metody. Ve vodě rozpustná sůl byla připravené podle USA patentu<sup>87</sup>.

Stabilita PIH v prostředích fosfátových pufrů o pH 2, 7 a 9, v 0,3 % roztoku KOH (pH 12) a ve vlastním vodném roztoku (pH 3,9) byla testována v koncentraci 20 µg/ml. Hodnocení bylo prováděno v časových intervalech 0, 15, 60, 120, 180 a 240 min, kdy bylo odebíráno definované množství zatíženého vzorku, patřičně naředěno a analyzováno pomocí HPLC. Stabilita PIH byla vyjádřena jako úbytek koncentrace chelátoru v závislosti na čase. Pro porovnání rychlosti rozkladu chelátoru v různých prostředích byla sestrojena závislost log c na čase. Linearita této závislosti byla ověřována použitím metody lineární regrese a v případě, že její průběh byl lineární, byl vypočítán poločas rozkladné reakce. Stejným způsobem byla testována i vyhodnocována stabilita PIH v prostředích 30% PEG-300 a 10%

Cremophoru EL (což odpovídá složení farmaceutické formulace užívané v preklinických experimentech).

Výsledky této studie ukazují, že PIH je poměrně citlivý k hydrolytickému rozkladu, který probíhá především v kyselých a alkalických vodných roztocích. Nezanedbatelný rozklad byl však pozorován i v neutrálním prostředí, při experimentech probíhajících při zvýšené teplotě (40 °C). Rychlost rozkladu chelátoru i rozkladné produkty detekované při zátěži v přítomnosti vybraných farmaceutických pomocných látek byly srovnatelné s rychlostí rozkladu a degradačními produkty detekovanými v neutrálním prostředí. Lze tedy předpokládat, že zkoumané pomocné látky, které byly užity jako součást farmaceutické formulace v preklinických farmakologických a toxikologických studiích, nemají zásadní vliv na stabilitu PIH.

Citlivost chelátoru k rozkladu vlivem oxidačního činidla byla testována za použití 3 a 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit citlivost látky k oxidačnímu rozkladu a odhalit případné dosud neznámé rozkladné produkty. Vzhledem k tomu, že v zatížených vzorcích nebyly detekovány kromě pyridoxalu a isoniazidu žádné další oxidační degradační produkty, dá se tedy předpokládat, že PIH je více citlivý hydrolyze než k oxidaci.

Protože molekula PIH obsahuje kromě hydrazonové vazby také další potenciálně hydrolyticky senzitivní vazbu hydrazidovou, pozornost byla věnována také možnosti štěpení molekuly PIH v tomto místě. Protože dříve vyvinutá HPLC metoda (metoda I) ani její modifikace neumožňovala separaci isoniazidu a kyseliny isonikotinové (potenciálního rozkladného produktu štěpení hydrazidové vazby), byly izokratické podmínky této HPLC analýzy změněny na podmínky gradientové. Gradientová metoda (metoda II) pak byla použita pro analýzu nejvíce zatížených vzorků. Výsledky těchto analýz však nepotvrdily přítomnost většího množství kyseliny isonikotinové v zatížených vzorcích. Lze tedy předpokládat, že hydrolytický rozklad PIH probíhá především štěpením hydrazonové vazby.

Vliv UV záření a tepla (suchého a vlhkého) na stabilitu pevné substance byl sledován po dobu 33 hodin. Substance byla v tenké vrstvě rozložena pod UV lampou nebo exponována suchým a vlhkým teplem (substance zvlhčená Aquou purificatou) při teplotě 80 °C. Stabilita chelátoru byla hodnocena analýzou zatížených vzorků pomocí HPLC metody (metoda I). Tyto experimenty prokázaly, že PIH·2HCl je stabilní vůči rozkladu UV zářením a teplem. V případě expozice vlhkým teplem,

byla pozorována pouze změna barvy substance. Je tedy pravděpodobné, že tak mohlo dojít ke vzniku zbarveného hydrátu.

**Výsledky těchto experimentů by mohly najít uplatnění v dalších fázích výzkumu aroylhydrazonů (např. při výběru pomocných látek, vývoji lékové formy nebo volbě vhodného aplikačního media nebo způsobu zacházení a skladování).**

**4.1.3. Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an in vivo study**

**Petra Kovaříková, Jiří Klimeš, Martin Štěrba, Olga Popelová, Milan**

**Mokrý, Vladimír Geršl, Přemysl Poňka**

**J. Sep. Sci. 28 (2005) 1300-1306**

Petra Kovaříková<sup>1</sup>  
 Jiří Klimeš<sup>1</sup>  
 Martin Štěrbá<sup>2</sup>  
 Olga Popelová<sup>2</sup>  
 Milan Mokrý<sup>1</sup>  
 Vladimír Gerší<sup>2</sup>  
 Přemysl Poňka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague; Hradec Králové, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic

<sup>3</sup>LadyDavis Institute for Medical Research, McGill University, Montreal, Canada

## Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an *in vivo* study

An analytical methodology appropriate for the determination of the novel drug candidate salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) in rabbit plasma has been developed and validated. Desirable chromatographic separation was achieved on a C<sub>18</sub> column employing a mixture of phosphate buffer (0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O with 2 mM EDTA, pH 6.0) and methanol (53:47; v/v) as the mobile phase. In order to develop a suitable sample preparation procedure, different methods have been tested (solid-phase extraction, liquid-liquid extraction, and protein precipitation). Protein precipitation using 0.1 M HClO<sub>4</sub> and acetonitrile allowed the highest recoveries of the analyte to be reproducibly attained. The analytical methodology developed in this study was validated with respect to linearity (0.26–30.0 µg/mL), accuracy, precision, selectivity, recovery, and stability. A concentration of 0.26 µg/mL was determined as the LLOQ. The chromatographic method was applied to a preliminary plasma pharmacokinetic study. This study has provided the first information about the concentrations of SIH in plasma of a living subject. These results could have a significant impact on further progress in the development of this promising compound.

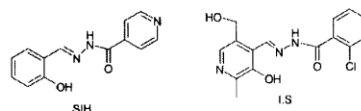
**Key Words:** Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone; SIH; Iron-chelator; Pharmacokinetics; HPLC

Received: February 15, 2005; revised: April 21, 2005; accepted: April 26, 2005

DOI 10.1002/jssc.200500077

### 1 Introduction

Iron chelation represents the only effective therapeutic approach for facilitating iron excretion and reducing the iron burden and toxicity in patients suffering from hereditary anaemia, such as β-thalassemia [1]. Moreover, iron chelation seems to be a promising principle for the development of novel therapeutics effective in a number of other important indications. To date, biocompatible iron chelators have been reported to demonstrate antioxidative, antiproliferative, antimicrobial, cardioprotective, and neuroprotective effects [2–6]. Despite these intriguing results, the number of selective biocompatible iron chelators is unfortunately quite low. Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH, Fig. 1) is a novel effective iron chelator belonging to the group of pyridoxal isonicotinoyl



**Figure 1.** Chemical structures of SIH and I.S. (pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone).

hydrazone (PIH) analogues [7]. Nowadays, SIH is one of the most intensively investigated iron chelators. It exhibits surprisingly powerful antioxidative, antimalarial, antitubercular, and antiproliferative effects on the *in vitro* level and the first *in vivo* studies have been already performed [8–11]. Furthermore, preliminary experiments indicated good tolerability and low toxicity of this chelator [12–13].

SIH is a crystalline substance (coloured from light to bright yellow) which can be readily synthesized by Schiff-base condensation from commercially available precursors – isoniazid and salicylaldehyde. Since SIH is poorly soluble in aqueous media of neutral pH, a water-soluble salt (SIH · HCl) has been prepared [14]. This study employs SIH · HCl as a form with a more favourable profile from the pharmaceutical point of view. SIH forms complexes with free or loosely-bound iron preferentially in stoichiometric

**Correspondence:** Dr. Petra Kovaříková, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.  
 Phone: +420 495067256 Fax: +420 495 512423.  
 E-mail: kovarikova@faf.cuni.cz.

**Abbreviations:** SIH, salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone; SIH·HCl, salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone hydrochloride; o-108, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt.



metry 2:1. The  $pK_a$  values (3.34; 8.29; and 9.8) of this chelator were determined using potentiometric titration [15].

The determination of a promising drug candidate in the biological material plays a very important role already in the early stages of a novel drug development. An accurate and well defined analytical methodology allows description of the disposition of the drug in the organism. Moreover, it is an essential tool for the determination of basic pharmacokinetic parameters, such as biological availability, half-life of elimination, clearance, etc. Although SIH is under intensive pharmacological investigation, to date no analytical method appropriate for the determination of either SIH or another PIH analogue in biological fluids is available. However, the development of a chromatographic method for the evaluation of SIH has been described in our previous study [14]. Plasma pharmacokinetics is considered to be the first and basic step for the determination of the fate of a drug in the organism.

The aim of this study was to develop and validate a chromatographic method for the determination of SIH in rabbit plasma and apply this assay to an *in vivo* study.

## 2 Experimental

### 2.1 Chemicals and materials

SIH·HCl was prepared according to the procedure described in our previous study [14]. The internal standard – pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108) – was synthesized by condensation of pyridoxal with 2-chlorobenzoyl hydrazone, as described previously [16]. The structure and purity of these compounds were confirmed by FTIR (Nicolet Impact 400 spectrophotometer),  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (Varian Mercury-Vx BB 300 instrument, operating at 300 MHz for  $^1\text{H}$ , 75 MHz for  $^{13}\text{C}$ ), and HPLC methods [14].

Methanol, acetonitrile, phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), EDTA, NaOH, and  $\text{HClO}_4$  were purchased from Lachema (Czech Republic). Water was purified using reverse osmosis.

Discovery SPE columns (DSC-18, DSC-18Lt, DSC-8, DSC-Ph, DSC-CN) and vacuum SPE manifold were purchased from Supelco (Germany). Chromabond® SPE (C4) columns were purchased from Macherey-Nagel (Germany). An LT-2 shaker and a Unimed centrifuge (Czech Republic) were used in this study. Standard drug-free rabbit plasma was obtained either from ZOO Service Dvůr Králové (Czech Republic) or from the Faculty of Medicine in Hradec Králové (Czech Republic).

### 2.2 Chromatographic instrumentation and conditions

A Spectra-Physics chromatographic system (Watrex, Czech Republic) equipped with an isocratic pump (Costa-

metric 3500), an automatic injector (AS 1000), and a UV/VIS detector (UV 3000HR) was used in these experiments. HPLC data were processed with the aid of SpectraSystem Software – PC 1000 version 3.0 (Thermo Separation Products, USA) working under the control of an OS/2 Warp operating system.

Desirable chromatographic separation was achieved on a chromatographic column ( $250 \times 4.6$  mm) with LiChrospher® RP-18, 5  $\mu\text{m}$  as the stationary phase (Merck, Germany) protected with a Purospher® RP-18, 5  $\mu\text{m}$  guard column (Merck, Germany). A mixture of methanol and phosphate buffer (0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH 6.0 adjusted with 1 M NaOH) in a ratio 47:53 (v/v) was used as the mobile phase. In order to prevent formation of complexes of the chelator with the loosely bound iron in the chromatographic system, EDTA was added to the aqueous part of the mobile phase at a concentration of 2 mM. The flow rate was 0.9 mL/min and the detector was set at 288 nm.

### 2.3 Preparation of stock solutions, spiking solutions, calibration and quality control samples (QC)

Stock solutions of SIH and o-108 I.S. (4 mg/mL) were prepared by dissolving appropriate amounts of the substance in methanol. Spiking solutions of SIH (32–3600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and internal standard (1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were obtained by appropriate dilution of the stock solutions with a mixture of methanol/water (1:1, v/v). Calibration samples and QC samples were prepared by spiking the drug-free plasma with SIH spiking solutions to obtain final concentrations (0.26–30.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### 2.4 Sample preparation procedures tested in this study

The effectiveness of isolation (recovery) of SIH from plasma was evaluated using three different sample pretreatment techniques. For this purpose, the plasma samples were prepared as follows: 0.6 mL of drug-free plasma were spiked with 5  $\mu\text{L}$  of the SIH spiking solution to obtain concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ten  $\mu\text{L}$  of EDTA (10 mM) were added to the sample. Thereafter, the samples were treated employing the procedures described below. Each sample pretreatment procedure was performed at least in triplicate. The extraction recovery was determined by comparing the peak area of SIH obtained by the direct injection of appropriately diluted standard solution with that obtained by the extraction procedure.

#### 2.4.1 Solid-phase extraction (SPE)

SPE columns with different types of silica gel modified RP-sorbents (DSC-18, DSC-18Lt, DSC-8, Chromabond® C-4, DSC-Ph, DSC-CN) were tested. All columns were conditioned with 1 mL of methanol followed by 1 mL of

phosphate buffer (pH 7). The spiked plasma samples were applied to the columns and slowly passed through by applying vacuum. Interferences from plasma were removed using 1 mL of phosphate buffer (pH 7). Finally, 1–2 mL of methanol or acetonitrile was used to elute SIH from the columns. The effect of pH on the extraction was studied by adding phosphate buffer of different pH to the sample.

#### 2.4.2 Precipitation

The spiked plasma samples were precipitated using different volumes (0.6–1.8 mL) of methanol, acetonitrile, or their mixture in different ratios. The effect of pH on the precipitation was tested through the addition of a small volume (10  $\mu$ L) of acid (0.1 M HCl, 0.1 M HClO<sub>4</sub>) or base (0.1 M NaOH) either to the sample or to the precipitation medium. All samples were mechanically vortexed and centrifuged at 1500  $\times g$  for 5 min. The whole volume of supernatant was transferred to a laboratory tube and mixed with the appropriate volume of phosphate buffer pH 7 (0.3–1.5 mL).

#### 2.4.3 Liquid-liquid extraction (L-L extraction)

Six mL of either ether or chloroform was employed to extract SIH from plasma samples. The influence of different pH was tested by the addition of a small amount of phosphate buffer to the spiked plasma samples. The samples were vortexed for 10 min and centrifuged at 1500  $\times g$  (5 min). The organic layer was harvested and dried under a stream of nitrogen. Dry extract was reconstituted in 1 mL of mobile phase.

### 2.5 Validation procedure

#### 2.5.1 Sample clean up for validation purposes

According to the results of the plasma pretreatment study, the protein precipitation procedure (Section 2.4.2) employing 10  $\mu$ L of HClO<sub>4</sub> followed by 900  $\mu$ L of acetonitrile was selected for validation. After the addition of the precipitation agent, the samples were mechanically vortexed and centrifuged at 1500  $\times g$  for 5 min. The entire volume of supernatant was removed and diluted with 500  $\mu$ L of phosphate buffer (pH 7.0) before the HPLC analysis.

#### 2.5.2 Linearity and lower limit of quantification (LLOQ)

The linearity of the method was evaluated by analysis of the calibration samples prepared at six different concentrations of SIH (0.26–30.0  $\mu$ g/mL). The calibration curve was constructed by plotting the ratios of the peak areas (SIH/I.S.) against the corresponding concentration. The lower limit of quantification (LLOQ) was set as the concentration where the analyte response of a spiked sample

was five times higher than the response of a blank sample and where the analyte response had a precision of 20% and an accuracy of 80–120% [17].

#### 2.5.3 Precision and accuracy

Intra- and inter-day precisions as well as the accuracy of the method were tested by analyzing the QC samples at three different concentrations of SIH (1.5, 15, and 30  $\mu$ g/mL). The precision determined at each concentration level (except at LLOQ) should not exceed 15% of the coefficient of variation (CV). The mean value of accuracy should be within 15% of the actual concentration (except at LLOQ) [17].

#### 2.5.4 Recovery

The recovery of the plasma pretreatment procedure was studied at four different concentrations of QC samples (0.26, 0.5, 10, and 30  $\mu$ g/mL) and one concentration of I.S. (10  $\mu$ g/mL). At each concentration level, three QC samples were prepared and analyzed in triplicate.

#### 2.5.5 Selectivity

The selectivity of the method was studied using rabbit plasma obtained from 6 healthy animals (ZOO Service Dvůr Králové) and 4 drug-free plasma samples taken in the *in vivo* study. Taken together, the selectivity was assessed using plasma sampled from 10 healthy rabbits.

#### 2.5.6 Stability

The stability of the stock and spiking solutions stored at the laboratory temperature for 8 and 1 h, respectively, and the stability of the samples placed in an autosampler (set at 20°C) for 20 h was evaluated. These time intervals were selected with respect to the time period for which the solutions were allowed to stand under the conditions mentioned above. The stability of SIH in plasma in one freeze-thaw cycle was tested using QC samples of three different concentrations of SIH. The QC samples were frozen immediately after preparation and stored at –80°C for 8 h (the longest period for which the samples were kept frozen in the *in vivo* study). The samples were subsequently thawed and treated instantly as described earlier. The freeze-thaw stability was assessed as the ratio of SIH determined in the frozen-thawed QC samples and those samples analyzed immediately after preparation.

#### 2.2.7 In vivo study

Four Chinchilla male rabbits of an average weight of 4.0  $\pm$  0.2 kg were used in this preliminary *in vivo* study. The animals were housed under a 12-hour light cycle, constant temperature and humidity. The animals had free access to water and a standard laboratory pellet diet. Twelve hours before the study access to the diet was

restricted. The experiments were performed in accordance with the "Guide for the care and use of laboratory animals" (1996) and under the supervision of the Ethical Committee of the Medical Faculty in Hradec Králové.

The rabbits were anaesthetized with pentobarbital (Nembutal, 30 mg/kg, *i.v.*). The left carotid artery was prepared and a PE-cannula was introduced through the artery into the aorta to allow prompt sampling of blood. Due to the limited solubility of SIH · HCl, the solution for intravenous administration was designed using saline and pharmaceutically acceptable co-solvents PEG 300 and ethanol in a ratio of 2:4:1 (*v/v/v*). Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone was administered at a dose of 10 mg/kg (free base) by a slow (3 min) intravenous injection through a cannula (Neoflon) inserted into the marginal ear vein. Blood sampling (1 mL) was performed five minutes before drug administration (blank), during drug administration (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> minute), and subsequently in the selected range (4–180 min). The volume loss was compensated with sterile saline. The blood was harvested into heparinised tubes (Vacuette) and centrifuged as soon as possible (2000 × *g*, 5°C). Plasma was collected and frozen immediately (–80°C). All samples were analyzed within 8 h.

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Adaptation of chromatographic conditions

The chromatographic conditions developed previously for the evaluation of the purity and stability of SIH and related compounds were partially modified to be convenient for determination of SIH in plasma samples [14]. Due to the analogy in the chemical structure, chelating properties, closeness in chromatographic behaviour as well as expected similarity in precipitation recovery, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone was chosen as the optimal internal standard.

#### 3.2 Optimization of the sample preparation procedure

In order to develop the best sample preparation procedure, the methods of SPE, liquid-liquid extraction, and protein precipitation were tested. In non-overloaded individuals the amount of free iron in plasma is negligible. Nevertheless, despite the chelating selectivity of SIH, a certain (minor) amount of complexes with some biometals in plasma (*e.g.* Zn<sup>2+</sup>) might be formed and these may interfere with the reliability of the method. Therefore, EDTA was added into the samples in excess to prevent formation of these complexes.

##### 3.2.1 SPE

Because of the various advantages of SPE (*e.g.* simplicity, reproducibility, and ability to give relatively clean samples), this technique was evaluated initially. In com-

**Table 1.** The extraction recoveries of SIH at a concentration of 10 µg/mL determined with different types of silica gel modified SPE columns.

Type of RP sorbent	Mean recovery (%) ± SD ( <i>n</i> = 3)	CV (%)
C18 Lt	58.51 ± 0.71	1.21
C18	62.50 ± 1.41	2.34
C8	66.25 ± 2.57	3.88
C4	69.67 ± 3.06	4.39
CN	48.50 ± 0.70	1.46
Phenyl	40.00 ± 1.41	3.54

parison with methanol, acetonitrile ensured a more effective elution of SIH from all the columns. **Table 1** shows the percentages of analyte recovered employing SPE columns of different sorbents (2 mL of acetonitrile were used for the analyte elution). The highest, yet still insufficient, recovery was reached with the C4 column (69%). Further modification of the pH of the organic eluent or the plasma did not enhance the effectiveness of extraction. The rather low recovery of SPE might be caused by strong retention of the analyte on the SPE sorbent. Since SPE under the conditions tested in this study was not able to optimally recover SIH from plasma, other sample preparation procedures were tested.

##### 3.2.2 Protein precipitation

Plasma protein precipitation was investigated as another sample pretreatment technique. Due to the chemical characteristics of SIH (the sensitivity to degradation in water solutions of both high and low pH and the ability to form complexes with the multivalent ions), organic solvents (methanol, acetonitrile, or their mixture) were selected as a protein precipitation media of choice. The highest recovery (80%) was obtained using acetonitrile; however, the volume of this solvent had to exceed 3 times the volume of precipitated plasma. Attempts to modify this approach using a minor amount of an acid or a base (0.1 M HCl or 0.1 NaOH) did not improve the recovery of SIH. On the contrary, when 10 µL of HClO<sub>4</sub> (0.1 M) was added to the sample just before acetonitrile, the extraction recovery reached 85% even though the total volume of the precipitating agent was reduced to a half. **Table 2** summarizes the data on the protein precipitation study. Although optimal recovery of the analyte (95–100%) was not achieved, protein precipitation led to reproducible and consistent results with an acceptable recovery of SIH.

##### 3.2.3 L-L extraction

In comparison with SPE or protein precipitation, L-L extraction represents a less convenient sample preparation technique. Thus, this procedure was investigated

1304 Kovaříková, Klimeš, Štěrba, Popelová, Mokry, Geršl, Poňka

**Table 2.** Absolute recoveries of SIH (10 µg/mL) reached employing different organic solvents as the precipitation agents.

Precipitation agent (PA)	PA/plasma (v/v) ratio	Mean recovery [%] ± SD (n = 6)	CV [%]
Methanol	3	58.42 ± 2.72	4.63
Methanol/acetonitrile (1:1)	3	73.83 ± 3.38	4.58
Acetonitrile	3	80.30 ± 4.88	6.07
0.1 M HClO <sub>4</sub> /Acetonitrile	1.5	84.70 ± 1.53	1.80

**Table 3.** Assessment of LLOQ of SIH in rabbit plasma.

Concentration added [µg/mL]	Concentration found [µg/mL]	Accuracy [%]
0.2649	0.2905	109.67
	0.2978	112.34
	0.2712	102.38
Mean	0.2865	108.15
SD	0.0137	5.1834
CV [%]	4.79	4.79

only partially with the principal aim of ascertaining whether this approach could improve the recovery of SIH. Therefore, only ether and chloroform were employed as organic solvents with different pH values of the sample. Obtained recoveries did not reach the values attained with either SPE or precipitation (< 60%).

Due to the reproducible results and the highest recovery, protein precipitation employing 10 µL of HClO<sub>4</sub> and 900 µL of acetonitrile was selected as the optimal sample treatment technique prior to HPLC analysis. This analytical methodology was validated for application in the *in vivo* study.

### 3.3 Validation

#### 3.3.1 Linearity and LLOQ

The linearity of the calibration curve was determined in a range of 0.26–30.0 µg/mL. The following regression equation was obtained:  $y = 0.2898x + 0.0179$  ( $R^2 =$

0.9994). The limit of quantification was assessed to be 0.26 µg/mL (see **Table 3**).

#### 3.3.2 Accuracy, precision, selectivity, and absolute recovery

The intra- and inter-day precision and accuracy of the method reached acceptable values (**Table 4**) [17]. The selectivity of the method was assessed by the analysis of plasma sampled from 10 healthy animals. **Figure 2** compares the chromatogram of an analyzed sample from the *in vivo* study with the chromatogram of a blank plasma sample. It is obvious that there were no interferences at the retention time of either SIH or I.S.

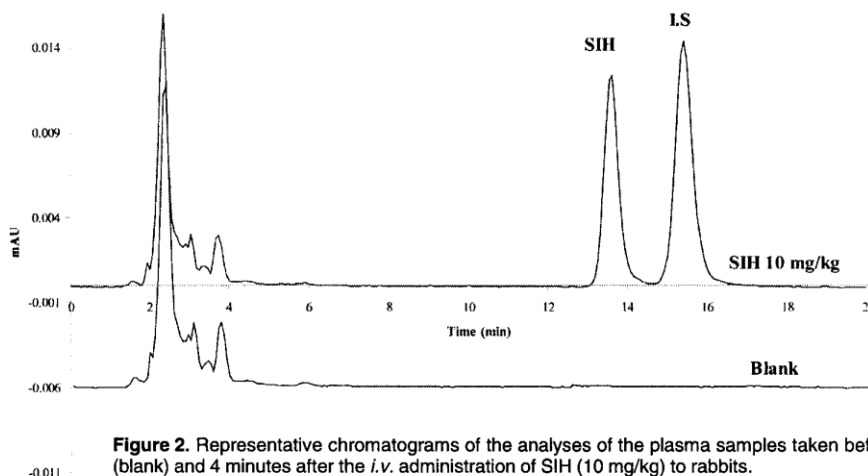
The mean absolute recoveries of SIH and I.S. (at the concentration of 10 µg/mL) ( $n = 6$ ) were calculated to be 84.70 ± 1.53% with CV = 1.80% and 89.33 ± 4.64% with CV = 5.2%, respectively. The mean recoveries of SIH at concentrations of 0.5 and 30 µg/mL ( $n = 3$ ) were assessed to be 82.0 ± 1.53% with CV = 1.87% and 83.45 ± 1.30% with CV = 1.56%, respectively. The mean recovery ( $n = 3$ ) at LLOQ was determined to be 83.75 ± 3.53% with CV = 4.22%.

#### 3.3.3 Stability

The stock and spiking solutions of SIH and I.S. were stable in the tested period (8 and 1 h). The samples maintained in the autosampler were stable during the time of observation (20 h). The experiment focused on the stability of SIH in plasma after freeze-thaw procedure revealed

**Table 4.** Intra- and inter-day precision and accuracy of the method.

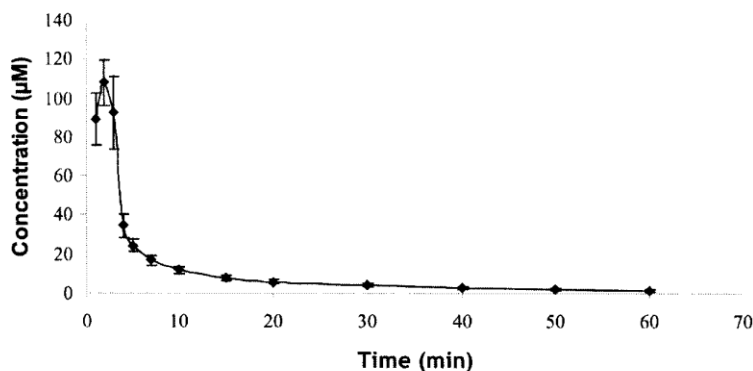
Intraday (n = 3)			
Concentration added [µg/mL]	Mean concentration found ± SD	Precision (CV%)	Accuracy [%]
30	32.04 ± 0.44	1.38	106.81
15	14.63 ± 0.59	4.03	97.53
1.5	1.44 ± 0.05	3.29	95.78
Intraday (n = 6)			
Concentration added [µg/mL]	Mean concentration found ± SD	Precision (CV%)	Accuracy [%]
30	28.63 ± 0.39	1.37	95.44
15	15.10 ± 0.86	5.70	100.45
1.5	1.53 ± 0.04	2.78	102.00



**Figure 2.** Representative chromatograms of the analyses of the plasma samples taken before (blank) and 4 minutes after the *i.v.* administration of SIH (10 mg/kg) to rabbits.

**Table 5.** Stability of SIH in plasma samples ( $n = 4$ ) after freeze-thaw procedure.

Mean concentration of SIH [ $\mu\text{g/mL}$ ] $\pm$ SD – instant analysis	Mean concentration of SIH [ $\mu\text{g/mL}$ ] $\pm$ SD after freeze-thaw procedure	Mean recovery [%] of SIH $\pm$ SD; CV [%] after freeze-thaw procedure
28.83 $\pm$ 1.35	24.96 $\pm$ 0.82	86.57 $\pm$ 2.84; 3.28
11.40 $\pm$ 0.22	10.54 $\pm$ 0.59	92.45 $\pm$ 5.15; 5.57
0.71 $\pm$ 0.03	0.69 $\pm$ 0.02	97.18 $\pm$ 2.75; 2.83



**Figure 3.** SIH plasma concentration-time profile (mean  $\pm$  SEM) after *i.v.* administration of the chelator to rabbits ( $n = 4$ ) at the dose of 10 mg/kg.

a drop of the concentration of the chelator. The concentrations of SIH determined in both QC samples treated instantly after preparation and QC samples treated after freeze-thaw procedure are shown in **Table 5**.

### 3.4 *In vivo* study

The analytical methodology developed in this study was successfully applied to a preliminary *in vivo* experiment. Representative chromatograms of the blank and sample from this study are shown in Fig. 2. Plasma concentration-

time profile of SIH after its *i.v.* administration (10 mg/kg) to rabbits ( $n = 4$ ) is shown in **Fig. 3**. A relatively quick distribution and elimination of the drug were observed. Therefore, the sensitivity of the analytical method allowed examination of plasma concentrations only up to 60 min after administration. Nevertheless, the method covers approximately two orders of magnitude decrease in plasma concentrations of the active compound. This study has provided for the first time the real plasma concentrations of SIH in the living organism. However, more sensitive detection might be desirable for the ultimate defi-

1306 Kovaříková, Klimeš, Štěrba, Popelová, Mokry, Geršl, Poňka

nition of the fate of this drug in the organism. For this purpose we have also tested the use of the fluorescence detection in the same setting. Unfortunately, due to poor natural fluorescence of SIH this approach did not distinctly improve the sensitivity of the method. The structure of SIH does not offer an ideal method of derivatization to obtain a product with significant fluorescence. From this point, MS or radio-detection appear to be convenient for a long-term follow up with concentrations below 1  $\mu\text{M}$ .

#### 4 Concluding remarks

In this study, for the first time precise and accurate analytical methodology appropriate for the determination of SIH in biological material is described. Moreover, the practical applicability of this method was confirmed in an *in vivo* experiment. An RP-HPLC method previously developed for the purity and stability evaluation of SIH was modified and employed in this study. Different sample preparation techniques were investigated (SPE, L-L extraction, and plasma protein precipitation) in order to develop the optimal procedure for the isolation of SIH from rabbit plasma. Since protein precipitation employing 0.1 M  $\text{HClO}_4$  and acetonitrile was identified as the optimal technique, it was used in the *in vivo* experiment. The whole analytical methodology was validated with respect to linearity, precision, accuracy, selectivity, recovery, and stability. This study has revealed the first information about the concentrations of SIH which could be expected in plasma after administration of the chelator to the living organism. Thus, it could be a considerable contribution to further progress in the development of this compound.

#### Acknowledgements

This study was supported by the Research Project MSM 0021620822 from the Ministry of Education, Youth and Sports and Research Grants GAUK 395/2004/BCH/FAF and GACR 305/03/1511.

#### References

- [1] J.P. Kushner, J.P. Porter, N.F. Olivieri, *Hematology (Am. Soc. Hematom. Educ. Program)* **2001**, 47–61.
- [2] E.E. Voest, G. Vreugdenhil, J.J.M. Marx, *Ann. Intern. Med.* **1994**, *120*, 490–499.
- [3] J.L. Buss, F.M. Torti, S.V. Torti, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1021–1034.
- [4] S.M. Swain, P. Vici, *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **2004**, *130*, 1–7.
- [5] Z.I. Cabantchik, H. Glickstein, J. Golenser, M. Loyevsky, A. Tsafack, *Acta Haematol.* **1996**, *95*, 70–77.
- [6] D.R. Richardson, *Ann. N Y Acad. Sci.* **2004**, *1012*, 326–341.
- [7] J.L. Buss, P. Poňka, *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **2003**, *1619*, 177–186.
- [8] T. Šimůnek, R.A. Bouwman, C. Boer, J.J. de Lange, R.J.P. Musters, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2004**, *36*, 759.
- [9] M.J. Hearn, International Patent Application WO 02/43668, 2001.
- [10] M. Horáčková, P. Poňka, Z. Byczko, *Cardiovasc. Res.* **2002**, *64*, 1689–1701.
- [11] J. Golenser, A. Domb, D. Teomim, A. Tsafack, O. Nisim, P. Poňka, W. Eling, Z.I. Cabantchik, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *281*, 1127–1135.
- [12] I. Klímová, T. Šimůnek, Y. Mazurová, J. Kaplanová, M. Štěrba, R. Hrdina, V. Geršl, M. Adamcová, P. Poňka, *Acta Medica* **2003**, *46*, 163–170.
- [13] M. Adamcová, M. Štěrba, I. Klímová, T. Šimůnek, R. Hrdina, V. Geršl, P. Poňka, *Acta Medica* **2003**, *46*, 171–174.
- [14] P. Kovaříková, M. Mokry, J. Klimeš, K. Vávrová, *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 1503–1510.
- [15] D.R. Richardson, M.L. Vitolo, G.T. Heffer, P.M. May, B.W. Clare, J. Webb, *Inorg. Chim. Acta* **1990**, *170*, 165–170.
- [16] P. Poňka, J. Borová, J. Neuwirt, O. Fuchs, *FEBS Lett.* **1979**, *97*, 317–321.
- [17] CDER and CVM, Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry, May 2001 <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>.

## Komentář k článku

Tato práce se zabývá **vývojem a validací HPLC metody, vhodné pro stanovení nového chelátorů železa, salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) v králičí plasmě**. Vyvinutá metodika je následně použita pro analýzu vzorků získaných z pilotního farmakokinetického experimentu.

### Cílem této části bylo:

- 1/ Vyvinout HPLC metodu vhodnou pro stanovení SIH v králičí plasmě
- 2/ Validovat vyvinutou metodiku pro účely farmakokinetického experimentu
- 3/ Aplikovat tuto metodiku do vlastního stanovení koncentrací SIH v plasmě odebrané pokusným zvířatům po i.v. aplikaci tohoto chelátoru

### Komentář a diskuze k výsledkům

Vzhledem k tomu, že v dostupné literatuře nebyla popsána žádná chromatografická metoda zabývající se analýzou některého z aroylhydrazonových chelátorů železa v biologickém materiálu, nemohly být dosud stanoveny základní farmakokinetické parametry těchto látek, jako důležité charakteristiky nových potenciálních léčiv. SIH byl vybrán jako první zástupce této skupiny, protože vykazoval významné protektivní působení proti oxidačnímu stresu v podmínkách *in vitro* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poškození H9c2 buněčné linie odvozené od potkaních kardiomyoblastů). V současné době probíhá hodnocení jeho kardioprotektivních účinků *in vivo*.

Při vývoji HPLC metody byly základem chromatografické podmínky vyvinuté v předchozí práci pro hodnocení čistoty a stability této látky. Podmínky separace byly upraveny tak, aby při analýze nedocházelo k interferenci píku chelátoru s balastními látkami z plasmy ani s potenciálními metabolity (isoniazidem a salicylaldehydem). Jako vnitřní standard pro stanovení byl vybrán strukturně podobný pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazon (o-108), který vykazoval kromě blízkého chromatografického chování také podobné výtěžnosti při izolaci z plasmy. Jako optimální metoda izolace SIH byla zvolena precipitace acetonitrem (s přidavkem malého množství kyseliny), která umožňovala dosáhnout nejvyšších hodnot výtěžností a poskytovala reprodukovatelné výsledky.

Na základě předběžného *in vivo* experimentu, bylo zjištěno rozmezí plasmatických koncentrací, které je možné předpokládat po aplikaci SIH králíkům. Na základě těchto výsledků byl určen koncentrační rozsah, ve kterém byla uvedená metoda validována. Validačními parametry byly: selektivita, linearita, přesnost, správnost, výtěžnost a stabilita vzorků.

Tato metoda byla následně použita pro analýzu vzorků plasmy získaných po i.v. aplikaci SIH·HCl králíkům (n=4) v dávce 10 mg/kg. Aplikace chelátoru laboratorním zvířatům a následný odběr a uchovávání vzorků probíhaly na Ústavu farmakologie, Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Vzhledem k tomu, že byl pozorován poměrně rychlý pokles plasmatických koncentrací, bylo možné monitorovat koncentrační profil SIH do 60 minuty po podání. Za tuto dobu však poklesly plasmatické koncentrace o dva řády a tak mohl být tento pokus využit pro výpočet základních farmakokinetických parametrů tohoto chelátoru pomocí Kinetica softwaru, verze 4 (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA) Tabulka č. 3.

Parametr	SIH 10 mg/kg i.v.
$c_{max}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	108,1 $\pm$ 11,8
$t_{max}$ (min)	2,25 $\pm$ 0,25
$V_z$ (l/kg)	1,48 $\pm$ 0,08
$Cl_{tot}$ (l/min.kg <sup>-1</sup> )	0,067 $\pm$ 0,013
AUC ( $\mu\text{mol/l.min}^{-1}$ )	705,5 $\pm$ 146,4
$t_{1/2}$ (min)	16,9 $\pm$ 2,8

Tabulka č.3. Základní farmakokinetické parametry SIH vypočítané pomocí nekompartmentové farmakokinetické analýzy

$c_{max}$  = maximální stanovená koncentrace,  $t_{max}$  = čas ve kterém byla n měřena  $c_{max}$ ,  $V_z$  = zdánlivý distribuční objem,  $Cl_{tot}$  = celková clearance, AUC = plocha pod křivkou,  $t_{1/2}$  = poločas eliminace.

**Tato práce přináší validovanou analytickou metodiku vhodnou pro hodnocení SIH v biologickém materiálu - plasmě. Výsledky této studie mají praktický význam pro další výzkum týkající se nových chelátorů železa, protože přináší první informace o plasmatických koncentracích a základních farmakokinetických parametrech aroylhydrazonového chelátoru železa.**



#### **4.1.4. HPLC determination of novelaroyl hydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study**

**Petra Kovaříková, Jiří Klimeš, Martin Štěrbá, Olga Popelová, Vladimír Geršl, Přemysl Poňka**

J. Chromatogr. B. –v tisku (přijato k publikaci 18.4 2006)

## **HPLC determination of a novel aroyl hydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study**

Petra Kovaříková\*<sup>1</sup>, Jiří Klimeš<sup>1</sup>, Martin Štěrba<sup>2</sup>, Olga Popelová<sup>2</sup>, Vladimír Geršl<sup>2</sup>, Přemysl Poňka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague; Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Šimkova 870, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>3</sup>Lady Davis Institute for Medicinal Research, McGill University Montreal, PQ H3A 2T5 Canada

\*Corresponding author:

Petra Kovaříková, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague; Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.

E-mail: [Petra.Kovarikova@faf.cuni.cz](mailto:Petra.Kovarikova@faf.cuni.cz)

Tel: +420 495 067 111

Fax: +420 49 55 124 23

## Abstract

A high performance liquid chromatographic method for the determination of a biocompatible iron chelator, pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108), in rabbit plasma was developed and validated. The separation was achieved on a C18 column with the mobile phase composed of a mixture of 0.01 M phosphate buffer (pH 6) with the addition of EDTA (2 mM), methanol and acetonitrile (42: 24: 14; v/v/v). The method was validated with respect to selectivity, linearity (0.8-150  $\mu\text{g/mL}$ ), intra- and inter-day variability and stability. This method was successfully applied to the analysis of the samples obtained from a pilot pharmacokinetic experiment, in which the chelator was administered intravenously to rabbits.

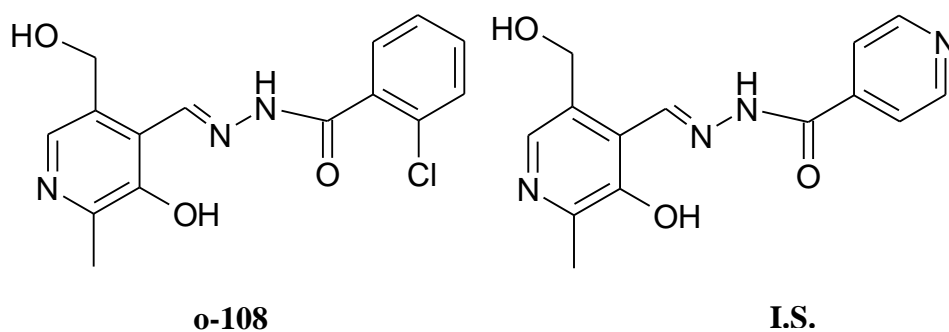
Keywords: pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone, o-108, iron chelator, HPLC, pharmacokinetics

## 1. Introduction

Iron chelation therapy represents the only effective principle of how to reduce iron burden in patients suffering from chronic iron overload [1]. Furthermore, recent information strongly suggests that free iron plays an important role in a number of human pathologies [2]. Thus, the principle of selective iron chelation represents a unique approach for a novel drug development. To date, iron chelators have been reported to demonstrate antioxidative, antiproliferative, antimicrobial, cardioprotective and neuroprotective effects [3-9].

Pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (Fig 1.) is a selective iron chelator belonging to the group of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) analogues. Ortho-108 is a yellowish, crystalline substance which can be readily prepared by Schiff-base condensation from pyridoxal and 2-chlorobenzoic hydrazide [10]. Since this chelator is more lipophilic than its lead compound (PIH), it can reach the intracellular targets more effectively. Furthermore, o-108 is more effective in the mobilization of iron from reticulocytes and K506 cells [11, 12]. Ortho-halogenated analogues of PIH were shown to be less toxic than the meta and para substituted ones [12]. A recent study has shown good tolerability and safety of o-108 after weekly repeated administration to rabbits [13]. Oral and intraperitoneal administration of o-

108 has induced significantly dose-dependent cumulative excretion of radiolabelled iron in a model of the iron-overloaded rat [14].



**Figure 1.** The chemical structures of o-108 and the internal standard (PIH).

Although o-108 seems to have promising pharmacodynamic properties, there is no precise and selective analytical method suitable for the determination of o-108 or another pyridoxal benzoyl hydrazone derivative in biological material. From that point, it is clear why bioavailability, half-life of elimination and other basic pharmacokinetic parameters of these compounds remain undetermined. While nearly hundreds of aroylhydrazones have been synthesized and successfully tested for biological activity, there is only our recent analytical contribution which reports about the development of a HPLC technique suitable for the determination of a structurally related agent - salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) in plasma [15]. However, chromatographic conditions for the analysis of purity and stability of o-108 have already been developed in our previously reported paper [16].

The aim of this study was to develop and validate a chromatographic method for the determination of o-108 in rabbit plasma and to employ this method in a pilot pharmacokinetic experiment.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108) and PIH were prepared according to the procedures described in our previous study [14]. The structure and purity of these compounds were confirmed by FTIR (a Nicolet Impact 400 spectrophotometer, Thermo, Madison, USA),  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR (a Varian Mercury-Vx BB 300

instrument, Palo Alto, USA, operating at 300 MHz for  $^1\text{H}$ , 75 MHz for  $^{13}\text{C}$ ) and HPLC methods [14]. Methanol, acetonitrile, phosphate buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), EDTA, and phosphoric acid were purchased from Lachema (Brno, Czech Republic). Water was purified employing reverse osmosis. SPE tubes - Discovery<sup>®</sup> DSC-C8 1 mL/100 mg and a vacuum SPE manifold were obtained from Sigma Aldrich (Munich, Germany). Drug-free rabbit plasma was obtained either from the ZOO Servis – (Dvur Kralove, Czech Republic) or from the Faculty of Medicine in Hradec Kralove (Hradec Kralove, Czech Republic).

## 2.2. Chromatographic system and conditions

The chromatographic system LC 20A (Shimadzu, Duisburg, Germany) consisted of a DGU-20A3 degasser, LC-20 AD pumps, a SIL-20 AC autosampler, a CTO-20AC column oven, a SPD-20AC UV/VIS detector, and a CBM-20AC communication module was used in this study. The separation was achieved on a analytical chromatographic column 250 x 4.6 (LiChrospher 100, RP-18, 5  $\mu\text{m}$ ) protected with a guard column (Purospher RP-18, 5  $\mu\text{m}$ ) purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The column oven was set at 25 °C. The mixture of a phosphate buffer (0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  with addition of EDTA in a concentration of 2 mM, pH 6.0 - adjusted with the use of phosphoric acid), methanol and acetonitrile in a ratio 42:24:14 (v/v/v) was employed as a mobile phase. The flow rate 1.0 mL/min was used for the analyses. The detection was performed at 288 nm, the injection volume was 100  $\mu\text{l}$  and the samples in the autosampler were kept at 15 °C. The chromatographic data were processed employing the LC-solution software, version 2.21 SP1 (Schimadzu, Duisburg, Germany).

## 2.3 Preparation of the stock and spiking solutions

The stock solutions of o-108 and I.S. (9 mg/mL and 4 mg/mL, respectively) were prepared by dissolving an appropriate amount of the substance in methanol. The spiking solutions of o-108 (9.0-0.048 mg/mL) and I.S. (2.5 mg/mL) were obtained by appropriate dilution of the stock solution with methanol. These solutions were used to prepare the calibration and QC samples. The stock and spiking solutions were stored at 4 °C for 3 days.

## 2.4. Calibration and QC samples preparation

The calibration samples were prepared by addition of 10  $\mu\text{L}$  of appropriate spiking solutions to 600  $\mu\text{L}$  of drug-free plasma to get nine different samples. Each sample contained o-108 in a defined concentration (150-0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and I.S. in a concentration of 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Before SPE extraction, 10  $\mu\text{L}$  of 10 mM EDTA were added into each sample. The same procedure was used to obtain QC samples. These samples were used for the validation procedure and stability testing proposes.

## 2.5. Sample preparation and solid-phase extraction procedure

The SPE tubes (C8) were conditioned using 1 mL of methanol, followed by 1 mL of phosphate buffer (pH 7). The plasma samples (calibration, QC and *in vivo* study samples) were added into the SPE tube and passed through using vacuum with suction of 5 mmHg. The column was further washed using 1 mL of phosphate buffer (0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  with addition of EDTA in a concentration of 2 mM, pH 6.0). Finally, the analytes were eluted using 0.7 mL of methanol. Before HPLC analysis, the samples were diluted using 0.7 mL of phosphate buffer (0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  with 2 mM EDTA, pH 6.0).

## 2.6 Method validation

### 2.6.1. Selectivity

Selectivity of the method was assessed by analyses of blank plasma samples obtained from eight rabbits.

### 2.6.2. Linearity

The linearity of the method was evaluated using calibration samples of nine different concentrations of o-108 (150, 105, 83, 40, 33, 17, 4, 1 and 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and one concentration of I.S. (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The calibration curves were constructed by plotting the peak area ratios (o-108/I.S.) to the corresponding concentrations of o-108. The accuracy of the calibration curves was tested by a comparison of the back-calculated concentrations and the nominal concentrations for all calibration levels.

### 2.6.3. Precision, accuracy and the lower limit of quantification (LLOQ)

The QC samples of five different concentrations (150, 83, 29, 1.2 and 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were prepared and analyzed according to the procedures described in sections 2.4

and 2.5. The precision (R.S.D.) and accuracy (percentage of recovery) of these analyses were calculated to obtained intra-day variation. The inter-day variation was calculated from the results of the analyses of the QC samples performed at three different days. LLOQ was determined as the concentration which can be evaluated with the precision and accuracy of at least 20 % and 80-120 %, respectively. Furthermore, the analyte response at this level should be at least five-times higher than the response of the blank sample [17].

#### **2.6.4. Recovery of the extraction procedure**

The recovery of the extraction procedure was evaluated using the QC samples at three different concentrations of o-108 (150, 40 and 0.8  $\mu\text{g/mL}$ ) and one concentration of I.S. (40  $\mu\text{g/mL}$ ). The recovery was calculated by comparing the peak areas of extracted samples and peak areas of unextracted standards.

#### **2.6.5. Stability**

The stability of the stock and spiking solutions stored at 4 °C for 3 days was tested. The stability of the samples kept in the autosampler (15 °C) for 24 hours was assessed as well. The stability of the chelator in plasma (both freeze-thaw stability and the long-term stability) was tested using the QC samples (n = 30) of three different concentrations of o-108 (150, 40 and 1  $\mu\text{g/mL}$ ). These QC samples were prepared (section 2.4.) and frozen immediately (-80 °C). After 1 hour, a half of these samples (five per each concentration) were thawed at room temperature and treated immediately. The rest of the samples were stored at -80 °C for 30 days. After this time period, the samples were thawed at room temperature and analyzed instantly. The stability of the chelator in plasma was expressed as the difference between the concentrations of o-108 determined in the QC samples analyzed immediately after preparation and the QC samples analyzed after the stability procedure. The conditions used in the stability study have reflected the situations encountered during the real samples handling, storage, and preparation.

#### **2.7. Pharmacokinetic experiment**

The Chinchilla male rabbits (n=5) weighing 3.5-4.5 kg were used in this pilot pharmacokinetic study. The animals were housed under a 12-h light cycle, constant temperature and humidity. The animals had free access to water and a standard

laboratory pellet diet. The animals were fasted overnight before entering the pharmacokinetic study. The experiments were performed in accordance with the “Guide for the care and use of laboratory animals“ (1996) and were approved by The Ethical Committee of the Medical Faculty in Hradec Králové.

The rabbits were anaesthetized with pentobarbital (Nembutal, 30 mg/kg, *i.v.*). The left carotid artery was prepared and a PE-cannula was introduced through the artery to the aorta to allow prompt sampling of blood. Due to the limited solubility o-108, the solution for intravenous administration was designed using saline and pharmaceutically acceptable co-solvents PEG 300 and ethanol in a ratio of 5:4:1 (v/v/v). The chelator o-108 was administered at a dose of 10 mg/kg by a slow (3 min) intravenous injection through a cannula (Neoflon) inserted into the marginal ear vein. Blood sampling (1.5 mL) was performed five minutes before drug administration (blank), during drug administration (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> minute), and subsequently in the selected intervals (through a range of 4-210 minutes). The volume loss was compensated with sterile saline. The blood was harvested into heparinised tubes (Vacuette) and centrifuged as soon as possible (2000 × g). Plasma has been collected and frozen immediately (-80°C). The non-compartmental pharmacokinetic analysis was performed using Kinetica software, version 4 (Thermo Electron Corporation, Waltham, USA).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Method development

The chromatographic separation previously developed for the determination of purity of o-108 was modified to be suitable for analyses of this chelator in plasma. Due to the similarity in the chemical structure and anticipated closeness in the extraction recovery, PIH was chosen as the internal standard. The composition of the mobile phase was changed in order to reach a sufficient separation of o-108 and I.S. in an acceptable run-time and without interferences with possible metabolites of the chelator (pyridoxal and 2-chlorobenzoyl hydrazone).

Different SPE conditions were tested to reach an acceptable and reproducible recovery of both o-108 and I.S. At the beginning of the experiment, the effectiveness of the isolation procedure on different SPE columns (C18, C8 and Phenyl) was investigated. Since the highest recovery was reached on a C8 column, this sorbent



was chosen for further sample clean up procedure optimization. The addition of a small amount of EDTA into the phosphate buffer (used to wash the SPE column) improved the recovery of both o-108 and I.S. Two different organic solvents (methanol, acetonitrile or their mixture) were tested to remove the analytes from the SPE columns. In comparison with acetonitrile, methanol gave higher recoveries of both compounds.

### 3.2 Method validation

#### 3.2.1. Selectivity

The chromatogram of the blank plasma sample is shown in Figure 2. No interferences were detected at the retention times of either o-108 or I.S.

#### 3.2.2. Linearity

The relationship between the peak area ratios (o-108/I.S.) and appropriate concentrations was linear over the tested range (0.8-150  $\mu\text{g/mL}$ ). The typical equation of the calibration curve ( $n = 3$ ) was:  $y = 0.0362x + 0.007$ . The correlation coefficient ( $r^2$ ) of all calibration curves was  $\geq 0.999$ . The back calculated concentrations for all concentration levels are shown in the Table 1. The representative chromatogram of the sample spiked with o-108 and I.S. is shown in Figure 2.

<b>Theoretical concentration (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	150.0	105.0	83.3	40.0	33.3	17.0	4.17	1.0	0.8
<b>Back-calculated concentration (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	146.40	107.56	82.22	39.64	32.78	16.58	3.96	0.90	0.72
<b>Back-calculated concentration %</b>	97.60	97.62	98.70	99.10	98.45	97.51	94.90	90.13	90.45

*Table 1. Summary of the back-calculated concentrations of the calibration curves for o-108.*

### 3.2.3. Precision, accuracy and the lower limit of quantification, extraction recovery

The intra- and inter-day precision and accuracy through the concentration range of the QC samples are shown in Tables 2 and 3. The lower limit of quantification was determined to be 0.8 µg/mL. The precision and accuracy of the assay at LLQO are presented in Tables 2 and 3. The results of the validation procedure indicated a satisfying intra- and inter-day variation of the assay according to the given recommendation [17]. The recovery of the SPE procedure is shown in Table 4. Although the extraction recovery was not totally complete, it was consistent, precise and reproducible, which is in line with the FDA Guideline [16].

<b>Intra-day</b>				
Concentration added (µg/mL)	Concentration found (µg/mL) ± S.D.	Precision (R.S.D.%)	Accuracy (%)	n
150.0	152.05 ± 1.90	1.25	101.37	5
83.3	80.63 ± 1.51	1.87	96.79	5
29.0	28.30 ± 0.17	0.60	98.59	5
1.2	1.275 ± 0.56	4.39	106.31	5
0.8064	0.8924 ± 0.0174	1.95	110.67	5

**Table 2.** *The intra-day precision and accuracy of the assay.*

<b>Inter-day</b>				
Concentration added (µg/mL)	Concentration found (µg/mL) ± S.D.	Precision (R.S.D.%)	Accuracy (%)	n
150.0	150.56 ± 2.76	1.84	100.38	15
83.3	81.86 ± 4.38	5.36	98.28	15
29.0	28.35 ± 0.457	1.61	98.31	15
1.2	1.2618 ± 0.056	4.43	105.15	15
0.8064	0.8969 ± 0.078	8.71	113.74	15

**Table 3.** *Inter-day precision and accuracy of the assay.*

<b>Extraction recovery</b>				
Analyte	Concentration added ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery(%) $\pm$ S.D.	RSD(%)	n
o-108	150.0	86.30 $\pm$ 3.18	3.68	3
	29.0	83.89 $\pm$ 1.35	1.61	3
	0.8064	83.19 $\pm$ 2.45	2.95	3
I.S.	40	78.80 $\pm$ 2.46	3.13	6

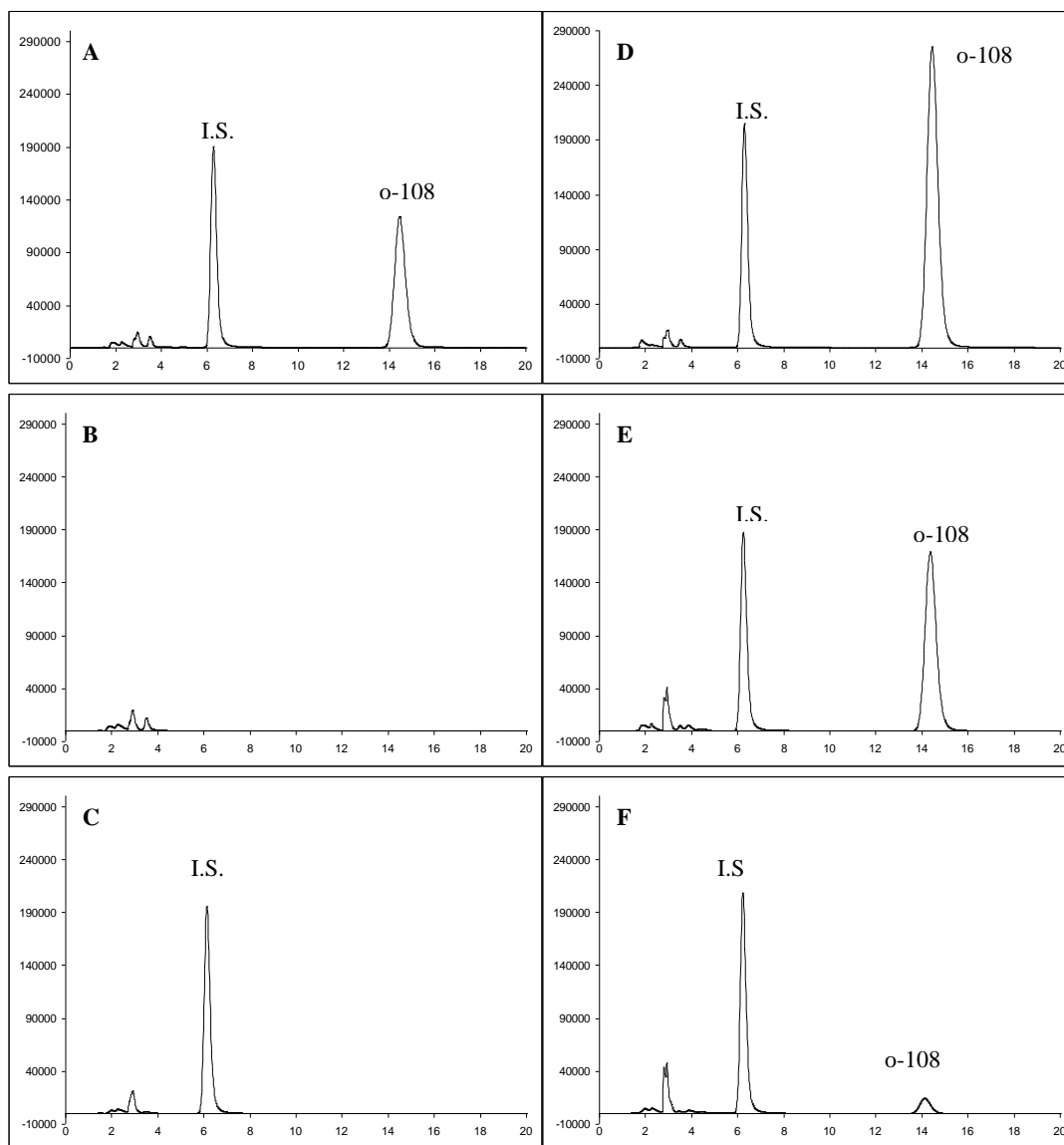
**Table 4.** *The effectiveness of the SPE procedure for isolation of o-108 from rabbit plasma.*

### 3.2.4. Stability

The stock and spiking solutions were stable under the stored conditions. The samples maintained in the autosampler at 15 °C were stable during the time of the study (24 h). The results of the freeze-thaw and long term stability study are shown in Table 5. These results indicated that the stability of the chelator was within an acceptable range ( $\pm$  15 % deviation from the nominal concentration of the analyte) [17].

<b>Stability after freeze-thaw procedure</b>				
Concentration added ( $\mu\text{g/mL}$ )	Percentage remaining	R.S.D.(%)	n	
150.0	98.28	4.49	3	
40.0	94.63	1.15	3	
1.0	96.16	8.56	3	
<b>Long-term stability</b>				
Concentration added ( $\mu\text{g/mL}$ )	Percentage remaining	R.S.D.(%)	n	
150.0	91.08	0.72	3	
40.0	94.90	0.71	3	
1.0	94.94	5.30	3	

**Table 5.** *The stability of o-108 in plasma after one freeze-thaw cycle and after storage at -80 °C for 30 days. The results are expressed as % of the concentration remaining at the end of the stability study.*



**Figure 2.** The chromatograms of extracted plasma samples.

A - Spiked samples (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  both o-108 and I.S.). B - Blank sample C - Spiked sample (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of I.S.) D - Sample taken in the 3<sup>th</sup> min of the pharmacokinetic experiment (C max= 101  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). E- Sample taken in the 5<sup>th</sup> min of the pharmacokinetic experiment (45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). F- Sample taken in the 60<sup>th</sup> min of the *in vivo* experiment (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

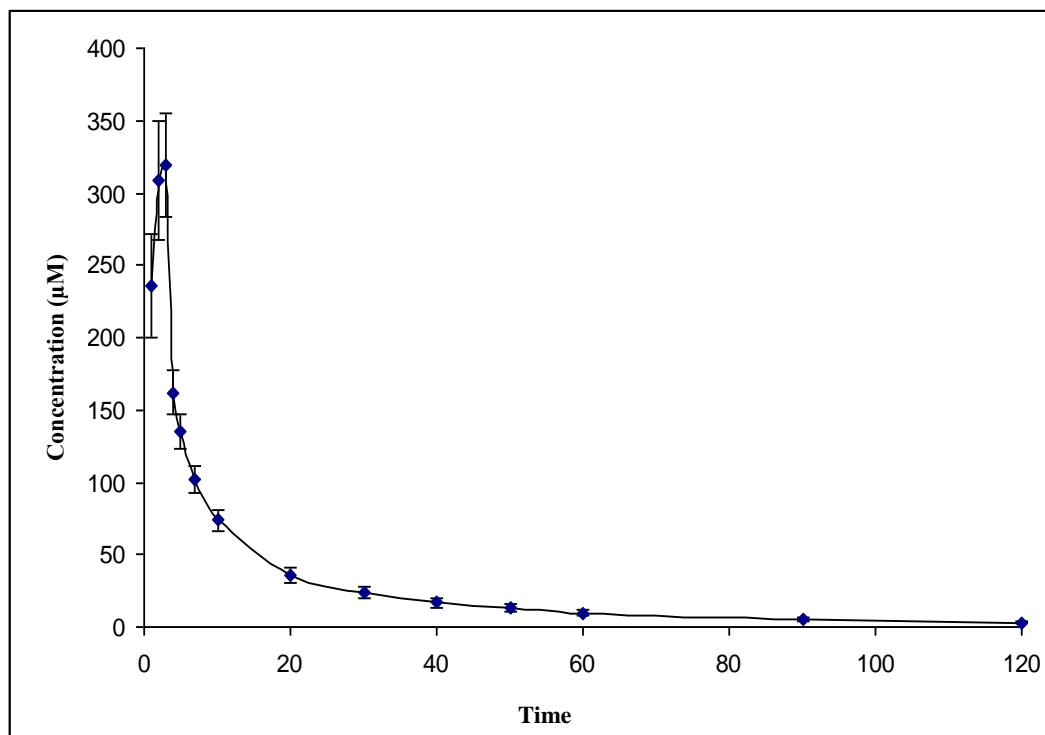
### 3.2.5. Pharmacokinetic experiment

In a pilot pharmacokinetic experiment, the plasma concentration-time profile of the novel iron chelator o-108 after intravenous administration was determined. After injection of the chelator in a dose of 10 mg/kg bw, the following concentration-time profile was obtained (Fig. 3). Relatively fast distribution and elimination were observed. The maximal plasma concentrations of o-108 on the molar base were surprisingly higher than those previously obtained for its analogue SIH [16]. The basic pharmacokinetic parameters of o-108 obtained through the non-compartmental pharmacokinetic analysis are shown in Table 6. The representative chromatograms of the plasma samples taken in the different time period of the pharmacokinetic experiment are shown in the Figure 2.

Parameter	o-108 10 mg/kg i.v.
$c_{\max}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$236.2 \pm 35.8$
$t_{\max}$ (min)	$2.4 \pm 0.4$
$V_z$ (L/kg)	$0.352 \pm 0.028$
$Cl_{\text{tot}}$ ( $\text{L}/\text{min}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	$0.0092 \pm 0.0009$
AUC ( $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$3598 \pm 454.3$
$t_{1/2}$ (min)	$27.7 \pm 2.98$

**Table 6.** The basic pharmacokinetic parameters of o-108 after i.v. administration to rabbits ( $n = 5$ ), obtained through non-compartmental pharmacokinetic analysis.

$c_{\max}$  = maximal concentration determined in the study,  $t_{\max}$  = time in which  $C_{\max}$  was determined,  $V_z$  = apparent volume of distribution,  $Cl_{\text{tot}}$  = total clearance, AUC = area under curve of concentration-time profile,  $t_{1/2}$  = elimination half-life.



**Figure 3.** The plasma concentration-time profile (mean  $\pm$  SEM) after *i.v.* administration of the chelator (o-108, 10 mg/kg.) to rabbits ( $n = 5$ ).

#### 4. Conclusion

In this study, for the first time a simple, precise and accurate HPLC method suitable for the determination of o-108 in plasma was developed. Prior to HPLC analysis, the SPE procedure was used to effectively isolate the chelator from rabbit plasma. The developed analytical methodology was validated with respect to selectivity, linearity, precision, accuracy, and stability. All validation parameters were within acceptable limits and in line with the guidelines. The applicability of the method was confirmed by the analysis of the plasma sample obtained from a pharmacokinetic experiment. LLOQ of the method allowed to follow a concentration-time profile up to the 120th min after *i.v.* administration of the chelator to rabbits. This study provides the first information about the plasma concentration-time profile and basic pharmacokinetic parameters of the novel aroylhydrazone chelator o-108.

### Acknowledgment

This study was supported by the Research Projects MSM0021620822 and MSM0021620820

### References

- [1] D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, *Pharmacol. Rev.* 57 (2005) 547-583.
- [2] T.F. Tham, R. Lejny-Toung, W. Li, Y. Wang, K. Karimian, M. Spino, *Curr. Med.Chem.* 10 (2003) 983-995.
- [3] T. Simunek, C. Boer, R.A. Bouwman, R. Vlasblom, A.M. A.M. Versteilen, M. Sterba, V. Gersl, R. Hrdina, P. Ponka, J.J. de Lange, W.J. Paulus, R.J. Musters., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (2005) 345-354.
- [4] T.B. Chaston, R.N.Watts, J.Yuan, D.R. Richardson, *Clin. Cancer. Res.* 10 (2004) 7365-7374.
- [5] E.E. Voest, G. Vreugdenhil, J.J.M. Marx, *Ann. Intern. Med.* 120 (1994) 490-499.
- [6] J.L. Buss, F.M. Torti, S.V. Torti, *Curr. Med.Chem.* 10 (2003) 1021-1034.
- [7] S.M. Swain, P. Vici, *J.Cancer. Res. Clin. Oncol.* 130 (2004) 1-7.
- [8] Z.I. Cabantchik, H. Glickstein, J. Golenser, M. Loyevsky, A. Tsafack, *Acta Haematol.* 95 (1996) 70-77.
- [9] D.R. Richardson, *Ann. N Y Acad. Sci.* 1012 (2004) 326-341.
- [10] J.L. Buss, M. Hermes-Lima, P. Ponka, *Adv. Exp. Med. Biol.* 509 (2002) 205-229.
- [11] J.L. Buss, E. Arduini, P.Ponka, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1689-16701.
- [12] J.L. Buss, E. Arduini, K.C. Shepard, P. Ponka, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 349-360.
- [13] M. Sterba, T. Simunek, Y. Mazurova, O. Popelova, J. Kaplanova, P. Ponka, V. Gersl, *Hum. Exp. Toxicol.* 24 (2005) 1-9.
- [14] G. Link, P. Ponka, A.M. Konin, W. Breuer, Z.I. Cabantchik, C. Hersko, *Blood.* 101.(2003) 4172-4179.
- [15] P. Kovarikova, M. Mokry, J. Klimes, K. Vavrova, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1503-1510.

[16] P. Kovarikova, J. Klimes, M. Sterba, O. Popelova, M. Mokry, V. Gersl, P. Ponka, J. Sep.Sci. 28 (2005) 1300-1306.

[17] CDER and CVM, Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry, May 2001, (<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>)

.



## Komentář k článku

Toto práce je zaměřena na **vývoj a validaci HPLC metody vhodné pro stanovení aroylhydrazonového chelátoru železa - pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108) v králičí plasmě**. Metoda byla následně využita v pilotním farmakokinetickém experimentu.

### Cílem této části bylo:

- 1/ Vyvinout HPLC metodu vhodnou pro stanovení o-108 v králičí plasmě
- 2/ Validovat vyvinutou metodiku podle platných doporučení pro bioanalytické studie
- 3/ Aplikovat metodu do analýzy vzorků získaných pilotním farmakokinetickým experimentem

### Komentář a diskuze k výsledkům

Při vývoji chromatografických podmínek pro analýzu o-108 v králičí plasmě byla upravena HPLC metoda dříve vyvinuta pro hodnocení čistoty a stability této látky. Podmínky separace byly upraveny tak, aby pík o-108 ani vnitřního standardu neinterferoval s balastními látkami z plasmy ani s píky potenciálních metabolitů (pyridoxalu a 2-chlorbenzoyl hydrazidu). Pro svoji strukturní podobnost k analytu byl jako vnitřní standard pro stanovení vybrán pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH). Pro izolaci chelátoru z plasmy byla vyvinuta metoda SPE s použitím C8 extrakčních kolonek. Vzhledem k tomu, že nebyly známy žádné informace o plasmatických koncentracích, které mohou být dosaženy po aplikaci tohoto chelátoru zvířatům, bylo nejprve nutné provést orientační *in vivo* experiment, který umožnil odhadnout rozsah plasmatických koncentrací očekávatelný v farmakokinetické studii. Na základě jeho výsledků pak byla provedena finální validace metody v koncentračním rozmezí potřebném pro provedení farmakokinetického studie. Jako validační parametry byly testovány selektivita, linearita, přesnost, správnost, výtěžnost a stabilita vzorků.

Farmakokinetický experiment byl proveden na Ústavu farmakologie, Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Uvedený chelátor byl ve formě pomalé (3 minutové) i.v. injekce aplikován králíkům (n=5) v dávce 10 mg/kg. V různých časových

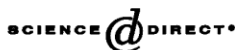
intervalech byly odebírány vzorky krve, zpracovávány na plasmu a analyzovány pomocí vyvinuté HPLC metody. Kvantitativní limit této metody umožňoval monitorovat plasmatické koncentrace do 120 minuty po podání chelátoru do organismu. Během této doby došlo k poklesu plasmatických koncentrací o více jak dva řády. Farmakokinetické parametry o-108 vypočteny pomocí nekompartmentové analýzy jsou uvedeny v příložené publikaci.

**Výsledkem této studie je validovaná HPLC metoda, vhodná pro stanovení plasmatických koncentrací o-108. Tato práce též přináší první informace o profilu plasmatických koncentrací a základních farmakokinetických parametrech nového chelátoru železa využitelné v dalším výzkumu týkajícím se aroyldrazonových chelátorů železa jako potenciálních léčiv.**

## ***4.2. HODNOCENÍ STABILITY VYBRANÝCH LÉČIV***

### **4.2.1. HPLC study on glimepiride under hydrolytic stress conditions**

**Petra Kovaříková, Jiří Klimeš, Jiří Dohnal, Lucie Tisovská**  
J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 205-209.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 36 (2004) 205–209

JOURNAL OF  
PHARMACEUTICAL  
AND BIOMEDICAL  
ANALYSIS[www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)

Short communication

## HPLC study of glimepiride under hydrolytic stress conditions

Petra Kovaříková<sup>a,\*</sup>, Jiří Klimeš<sup>a</sup>, Jiří Dohnal<sup>b,c</sup>, Lucie Tisovská<sup>b,c</sup><sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Kralove, Czech Republic<sup>b</sup> Zentiva a.s., Leciva a.s., U Kabelovny, 10237 Praha 10, Dolni Mecholupy 130, Czech Republic<sup>c</sup> Research Institute for Pharmacy and Biochemistry, U Kabeovny 130, 10237 Praha 10, Dolni Mecholupy, Czech Republic

Received 2 February 2004; received in revised form 13 May 2004; accepted 18 May 2004

Available online 27 July 2004

## Abstract

Glimepiride is a modern hypoglycaemic agent, which belongs to the group of sulfonylurea derivatives. In this paper, simple, specific and accurate RP-HPLC method was developed in order to study decomposition of glimepiride under the hydrolytic stress conditions (acid, neutral, alkaline and oxidative). The best separation of glimepiride and its degradation products was achieved on reverse phase C<sub>18</sub> column. The mobile phase was composed of acetonitrile–phosphate buffer (pH 3.5, 0.03 M) (48:52, v/v). Employing RP-HPLC method, five main degradation products were detected in the exposed samples. It was found that the susceptibility of glimepiride to hydrolytic decomposition increased in following manner: neutral condition < alkaline condition < acid condition < oxidative condition.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Glimepiride; HPLC; Hydrolysis; Stability

## 1. Introduction

Glimepiride (1-[[p-[2-(3-ethyl-4-methyl-2-oxo-3-pyrroline-1-carboxamido) ethyl] phenyl] sulfonyl]-3-(trans-4-methylcyclohexyl) urea (Fig. 1) is a modern oral hypoglycaemic agent, which belongs to the group of sulfonylurea derivatives.

These drugs are used for the treatment of non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) in order to achieve appropriate control of blood glucose level. Although glimepiride shares the principal mechanism of action with other drugs of this class (the stimulation of insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells), it has several clinical benefits [1,2].

In order to achieve high level of safety and effectiveness of pharmacotherapy, the regulatory authorities escalate the requirements on quality of pharmaceutical products. The investigation of stability of drugs represents an important issue in drug quality evaluation. Many environmental conditions such as heat, light, moisture as well as the chemical sus-

ceptibility of substances to hydrolysis or oxidation can play extremely serious role in pharmaceutical stability [3,4].

A stress testing of drug substance can help to identify the likely degradation products and to provide important information on drug's inherent stability. Consecutively, it can be a fundamental contribution to development and validation of stability indicating analytical method used in monitoring of quality of pharmaceutical products. [5]. Independent of the final dosage form, forced drug degradation by exposure of drug solution to acid, alkaline or oxidative conditions is useful to predict the potential hydrolytic degradation products. Hydrolysis (during wide range of pH) is one of the most common degradation chemical reactions. Since water, either as a solvent or in the form of the potential moisture in the air, contacts most pharmaceutical dosage forms to some degree; the potential for this degradation pathway exists for most drugs and excipients [6].

Several analytical methods for determination of glimepiride have been reported in literature: determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry [7], HPLC analysis of glimepiride in human serum and urine after pre-column derivatization [8], liquid chromatography–mass

\* Corresponding author. Tel.: +420 4 9506 7236;

fax: +420 4 9551 2423.

E-mail address: [kovarikova@faf.cuni.cz](mailto:kovarikova@faf.cuni.cz) (P. Kovaříková).

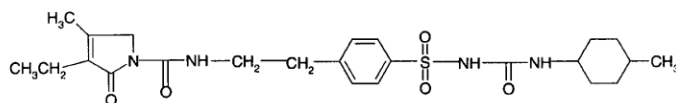


Fig. 1. Chemical structure of glimepiride.

spectrometry analysis in human plasma [9] and UV analysis of glimepiride in pharmaceutical preparation [10]. No HPLC stability indicating analytical method has been described in literature to the date. Any systematic study about the behaviour of glimepiride under the stress conditions, e.g. hydrolytic, is not available. Only short note about the influence of acid and alkali on glimepiride was published in addition to the UV analysis of this substance [10]. No data about the degradation kinetics as well as the chemical structures of potential degradation products have been found yet.

The aim of this paper was to study hydrolytic stability of glimepiride and to develop RP-HPLC analytical method for determination of glimepiride in the presence of its hydrolytic degradation products. The novelty of this work is based on the description of new analytical method, which is suitable for monitoring the purity of drug substance. Moreover, the conclusions can be helpful in effort to assure the quality, safety and effectiveness of pharmacotherapy.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and reagents

Glimepiride was kindly provided by The Research Institute for Pharmacy and Biochemistry (Czech Republic). Acetonitrile and methanol (both HPLC-grade) were obtained from Merck (Germany). Ammonium formate, formic acid, hydrogen peroxide, hydrochloric acid, sodium hydroxide, sodium phosphate dibasic, phosphoric acid were provided by Fluka Chemica (Switzerland). Ultra-pure water was obtained from Milli-Q system.

### 2.2. Instruments and chromatographic conditions

Pierce Reacting-thermo Stirring/Heating module constant temperature bath (Germany) was used for the stress testing. The HPLC chromatographic system Spectra-Physics (Germany), which consisted of a gradient pump (P 400), vacuum membrane degasser, automatic injector (AS 3000) and UV/VIS detector (SN 4000), was used for the analysis. The HPLC data were processed with PC 1000 Software. An appropriate separation was achieved on a LiChroCART column (250 × 4.6 mm i.d.) with Purospher (RP-18e, 5 μm) as a stationary phase (Merck, Germany). Detection was performed at 228 nm. The mobile phase was composed of acetonitrile–phosphate buffer (pH 3.5; 0.03 M) (48:52, v/v). The flow rate was 1 ml/min.

### 2.3. Stability study

#### 2.3.1. Standard curve

The stock solution (500 μg/ml) was prepared by dissolving an appropriate amount of solid substance of glimepiride in methanol. The calibration curve was made using five standard solutions of different concentrations (20, 50, 100, 200 and 300 μg/ml). The standard solutions were prepared by diluting an appropriate volume of stock solution with methanol. Each solution was analysed in triplicate. The peak area values were plotted against the corresponding analyte concentrations to obtain the linear calibration.

#### 2.3.2. Precision and accuracy

Six injections of one concentration of glimepiride (200 μg/ml) were analysed on the same day. The value of relative standard deviation of this assay was calculated to determine intra-day precision. This analysis was also repeated next day in order to evaluate inter-day precision. Accuracy was evaluated as a percentage of recovery obtained from analysis of samples spiked with known amount of glimepiride (30, 80 and 120 μg/ml).

#### 2.3.3. Determination of stability

The forced degradation of glimepiride was carried out under the condition of acid, neutral, alkaline and oxidative hydrolysis. Appropriate amount of glimepiride was dissolved in methanol to prepare glimepiride stock solution concentration of 400 μg/ml.

One millilitre of glimepiride stock solution was transferred into each of four glass vials. One millilitre of HCl (0.2 M) was added into first vial, 1 ml of NaOH (0.2 M) into the second vial, 1 ml of water into third vial, and finally 1 ml of the solution of 4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into the fifth vial. All vials were tightly closed and maintained at the constant temperature (90 °C) in a heating block with simultaneous stirring. After the periods of 0, 30, 60, 180 and 360 min, 20 μl of each sample was analyzed employing HPLC. The blanks consisting of 1 ml of methanol and 1 ml of degradation medium were injected on to the column before every single analysis.

In order to determine relative rate of hydrolytic decomposition of drug, the logarithm of remaining concentration of glimepiride was plotted versus time. The linearity of this dependence was investigated employing linear regression. The presence of outliers was checked using Grubbs test. [11] The rate constants were calculated from the slope of the kinetic curves.

### 3. Results and discussion

A simple, accurate and precise HPLC method was developed for determination of glimepiride in the presence of its degradation products. Consecutively, this stability indicating analytical method was employed to gain basic information about the susceptibility of glimepiride to hydrolytic decomposition.

Table 1  
Accuracy of this method

Concentration added ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentration calculated $\pm$ S.D. ( $\mu\text{g/ml}$ ); R.S.D%	Recovery (%)
230	236.160 $\pm$ 0.703; 0.297	102.678
100	98.137 $\pm$ 0.263; 0.268	98.1378
40	40.412 $\pm$ 0.021; 0.053	101.032

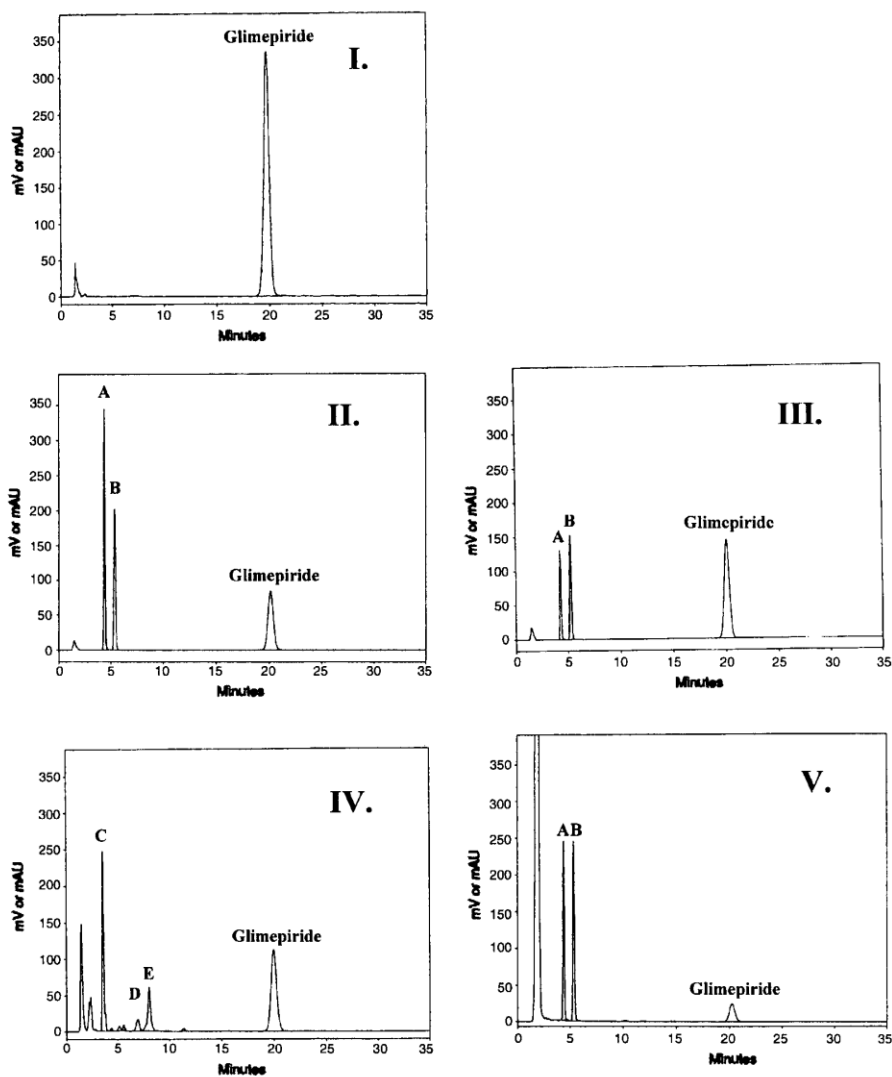


Fig. 2. Chromatograms showing decomposition of glimepiride: Keys: (I) Sample in the time of 0 min; (II) acid hydrolysis (360 min of decomposition); (III) neutral hydrolysis (360 min of decomposition); (IV) alkaline hydrolysis (360 min of decomposition); and (V) oxidative hydrolysis (360 min of decomposition).

### 3.1. Method validation

The linearity of this method was proved using linear correlation of the peak area values and appropriate concentrations of glimepiride in a range of 20–300 µg/ml. The correlation coefficient of this dependence was calculated to be 0.999. The intra- and inter-day precisions of method were determined to be 0.358 and 0.655, respectively. The results of method accuracy are presented in the Table 1.

### 3.2. Stability study

HPLC study of glimepiride hydrolytic decomposition suggested following degradation behaviour. After acid hydrolysis employing HPLC, two degradation products (labelled A and B) were detected at the retention times of 4.2 and 5.2 min. It was observed that the area values of both peaks were growing in time and this observation was accompanied with decreasing of concentration of glimepiride Fig. 2. The stability of glimepiride was also studied using water as a medium for degradation. Although both degradation products were detected on chromatogram, the ratio between the areas of peaks A and B was different in comparison with previous experiment (acid hydrolysis).

In contrast to acid hydrolysis, alkaline conditions led to decomposition of glimepiride in to three main degradation products (labelled C–E). Employing HPLC, their presence was detected at the retention times of 3.5 min (degradation product C), 6.6 min (degradation product D) and 8.0 min (degradation product E). As it is evident from Fig. 2, the peak area values of all main degradation products were growing in time. Besides the peaks of these degradation products, other small peaks were also found in the exposed samples, but none of them had the area value greater than 1% of concentration of glimepiride. Furthermore, the amount of these degradation products did not grow markedly during the time of the experiment.

The degradation of glimepiride in the solution of 2% hydrogen peroxide resulted into the formation of two major peaks. The retention times indicated the agreement of oxidative degradation products with acid ones; but however,

the decline of concentration of glimepiride was much higher than concentration fall in acid hydrolysis (Fig. 2). The absence of distinct oxidative degradation product shows that the chemical structure of glimepiride is not sensitive to oxidation resulting from exposition to diluted hydrogen peroxide. Thus, in standard conditions (laboratory temperature, absence of oxidative agents etc.), the formation of oxidative impurities seems unlikely. As evident, acid, neutral and oxidative hydrolysis led to the formation of the same degradation products A and B. The possible explanation of this point can be derived from the fact, that the acid-catalyzed hydrolytic reaction could take place in all the above mentioned conditions. The Milli-Q water used in this experiment, made the medium for neutral conditions slightly acid. Diluted hydrogen peroxide solution is known to have slightly acid character.

### 3.3. Degradation behaviour

The susceptibility of glimepiride to hydrolytic decomposition was determined as a fall of concentration of drug during the time of the experiment. The kinetic slopes are shown in Fig. 3.

The straight-line behaviour was obtained for neutral, alkaline and oxidative conditions with correlation coefficients  $R = 0.99977$ ,  $R = 0.9986$  and  $R = 0.9956$ , respectively. This fact implies that the hydrolytic degradation followed pseudo-first-order kinetic behaviour. The correlation coefficient for acid hydrolysis was calculated to be  $R = 0.927$ . The rate constants were determined from the slope of kinetic curves and their values are:  $3.91 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  (acid condition),  $2.30 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  (neutral condition),  $3.22 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  (alkaline condition) and  $9.44 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  (oxidative condition). The values of rate constants determined that the susceptibility of glimepiride to hydrolytic decomposition is increasing in the following manner: neutral condition < alkaline condition < acid condition < oxidative condition.

Although no special oxidative degradation product of the drug was formed in experiment with 2% hydrogen peroxide, the fastest decomposition was observed in this

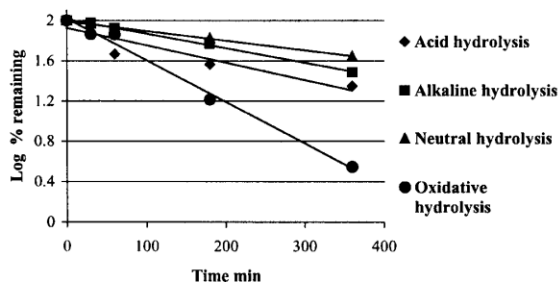


Fig. 3. Kinetic curves of glimepiride decomposition.



solution. Thus, hydrogen peroxide could probably facilitate the acid-catalyzed hydrolytic reaction. Although the glimepiride decomposition in water was determined to be the slowest one, the fall in the concentration of the drug was considerably significant. In this medium, only 44% of initial amount of glimepiride was determined at the end of our experiment (6 h). Therefore, the structure of glimepiride appears to be rather sensitive to hydrolytic decomposition. The addition of diluted acid made this degradation process only 1.7 times faster, but however, this acceleration of the reaction was quite distinct.

#### 4. Conclusion

In this paper, the simple, accurate and well-defined HPLC analytical method for determination of glimepiride in the presence of its degradation products was described for the first time. The behaviour of glimepiride under the hydrolytic stress conditions in acid, neutral, alkaline and oxidative media was studied. However, further study needs to be done to determine the most likely structures of degradation products and to apply these results into advanced stability testing. The information presented herein could be very useful for quality monitoring of bulk substance as well as the pharmaceutical preparation containing this modern sulfonylurea derivate.

#### Acknowledgements

We would like to thank V. Kubelka, M. Drtinova, E. Svoboda and A. Schonfeldova for providing assistance and advice. This study has been realized in the cooperation of Zentiva a.s. and it was supported by a research grant No.11160001 from The ministry of Education, Youth and Sport.

#### References

- [1] E. Drager, *Diab. Res. Clin. Pract.* 28 (1995) 139–146.
- [2] R. Robkamp, K. Wernicke-Panten, E. Dragaer, *Diab. Res. Clin. Pract.* 31 (1996) 33–42.
- [3] ICH, *Stability Testing of New Drugs Substances and Products: Proceeding of the International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2000.*
- [4] B. Kommanaboyina, C.T. Rhodes, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 857–868.
- [5] M. Baksi, S. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 1011–1040.
- [6] K.C. Waterman, C.R. Adami, K.M. Alsante, A.S. Antipas, D.R. Arenson, R. Carrier, J. Hong, M.S. Landis, F. Lombardo, J.C. Shah, E. Shalaev, S.W. Smith, H. Wang, *Pharm. Dev. Technol.* 7 (2002) 113–146.
- [7] I.I. Salem, J. Idrees, J.I. Al Tamini, *J. Chromatogr. B.* 779 (2004) 103–109.
- [8] K.H. Lehr, P. Damm, *J. Chromatogr. B.* 526 (1990) 497–505.
- [9] H.M. Maurer, C. Kratzsh, T. Kraemer, F.T. Peters, A.A. Weber, *J. Chromatogr. B.* 773 (2002) 63–73.
- [10] S. Altinöz, D. Tekeli, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 507–515.
- [11] F. Grubbs, *Technometrics* 11 (1997) 1–21.

## Komentář k článku

Tato práce se zabývá **studiem hydrolytické stability moderního antidiabetika –glimepiridu**. Daná problematika byla řešena ve spolupráci s Oddělením vývoje analytických metod VÚFB (Zentiva a.s. Praha).

### Cílem této části bylo:

- 1/ Vyvinout stabilitu hodnotící HPLC metodu vhodnou pro analýzu glimepiridu v přítomnosti rozkladných produktů
- 2/ Studovat hydrolytickou stabilitu glimepiridu za vybraných podmínek stresových testů

### Komentář a diskuze k výsledkům

V době vypracování této práce nebyl glimepirid ještě zařazen do žádné oficiální lékopisné monografie. V literatuře nebyla dostupná žádná stabilitu hodnotící HPLC metoda ani nebylo popsáno chování této látky za podmínek stresových stabilních testů.

Citlivost molekuly léčiva k rozkladu vlivem extrémních vnějších podmínek byla hodnocena za použití nové HPLC metody. Linearita, přesnost a správnost stanovení byly ověřeny analýzou standardních vzorků. Stabilita uvedeného léčiva byla hodnocena v prostředích ředěné kyseliny (0,1 M HCl) a baze (0,1 M NaOH), ve vodě a v roztoku peroxidu vodíku (2 %) při teplotě 90 °C. V několika časových intervalech bylo odebíráno definované množství vzorků a analyzováno pomocí HPLC. Stabilita glimepiridu byla vyjádřena jako úbytek koncentrace léčiva ve vzorku v čase. Linearita závislosti  $\log c$  na čase byla ověřována pomocí metody lineární regrese. Poločas rozkladu glimepiridu v jednotlivých prostředích byl vypočítán ze sklonu příslušných kinetických křivek. Výsledky této studie ukazují, že citlivost glimepiridu k rozkladu v různých vodných prostředích klesá v pořadí: roztok peroxidu vodíku > kyselé prostředí > alkalické prostředí > voda. V podmínkách kyselé hydrolyzy a ve vodě byly detekovány dva hydrolytické rozkladné produkty (A a B), zatím co ve vzorcích získaných z alkalické zátěže byly detekovány rozkladné produkty tři (C, D, E). V přítomnosti peroxidu vodíku se glimepirid rozkládal na dva

rozkladné produkty, jejichž retenční časy se shodovaly s retenčními časy rozkladných produktů A a B. Žádné další píky, které by patřily dalším oxidačním rozkladným produktům nebyly během této studie detekovány. Z uvedených experimentálních údajů lze usuzovat, že glimepirid je více citlivý k hydrolyze než k oxidaci.

Zatížené vzorky byly následně použity také pro HPLC-MS analýzy (prováděné Dr. Kubelkou na VÚFB) s cílem identifikovat rozkladné produkty. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo jednoznačně identifikovat většinu rozkladných produktů nebyly tyto informace do publikace zařazeny.

**Tato práce přináší novou HPLC metodu vhodnou pro rutinní hodnocení čistoty a stability moderního antidiabetika – glimepiridu. Informace o stabilitě glimepiridu mohou být dále využity při kontrole kvality uvedené účinné látky nebo léčivých přípravků, které tuto účinnou látku obsahují.**

V roce 2005 byla publikována práce obsahující, kromě jiného, také informace o stabilitě glimepiridu za vybraných stresových podmínek (zátěž za použití HCl, NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vyšší teploty a vyšší vlhkosti)<sup>141</sup>. Tyto publikované údaje jsou ve shodě s výsledky našich experimentů, avšak liší se mírou rozkladu léčiva. Tento rozdíl by však mohl být způsoben poněkud odlišnými podmínkami za kterých byly uvedené experimenty prováděny.

## **4.2.2. Photochemical stability of nimesulide**

**Petra Kovaříková, Milan Mokrý, Jiří Klimeš**  
J. Pharm. Biomed. Anal. 31 (2003) 827-832.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis  
31 (2003) 827–832JOURNAL OF  
PHARMACEUTICAL  
AND BIOMEDICAL  
ANALYSIS[www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)

Short communication

## Photochemical stability of nimesulide

Petra Kovaříková\*, Milan Mokrý, Jiří Klimeš

*Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague,  
50005 Hradec Kralove, Czech Republic*

Received 26 April 2002; received in revised form 5 August 2002; accepted 23 October 2002

**Abstract**

HPLC and TLC methods for monitoring of the photochemical stability of nimesulide are presented. Solution of nimesulide sodium salt was exposed to the light of wavelengths 254 nm. The presence of degradation products (2-phenoxy-4-nitroaniline and methanesulfonic acid) was observed. In the exposed sample, 2-phenoxy-4-nitroaniline was detected by HPLC analysis and sulfonic acid was detected by TLC analysis. An isocratic HPLC chromatographic condition was described for determination of nimesulide in a presence of its degradation product. The sample was analysed on Separon SGX, C<sub>18</sub>, 250 × 4.6 i.d. 7 μm analytical column. The mobile phase was consisted of a mixture of acetonitrile and ammonium phosphate (pH 7.9; 0.02 M) (35:65 v/v). UV detector was performed at 245 nm. Propylparaben was employed as an internal standard. Standard area response was linear respect to concentration of nimesulide over range 150–500 μg/ml. As a validation of the method, the accuracy and between-day precision were done. The detection limit of 2-phenoxy-4-nitroaniline was 0.12 μg/ml. The solvent system for TLC analysis was consisted of ethylacetate and cyclohexane (45:55), the samples were plotted on silica gel UV-254 nm. UV lamp (254 nm) and the chemical detection were used.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Nimesulide; HPLC; TLC; Photochemical stability**1. Introduction**

Nimesulide (4-nitro-2-phenoxy-methanesulfonamide) is a modern anti-inflammatory drug belonging to the general class of NSAID (nonsteroidal anti-inflammatory drugs). This com-

pound differs to the others NSAID by the chemical structure and selective inhibition of cyclooxygenase 2. Thank to this effect, nimesulide seems to cause less several gastrointestinal side effects. Nimesulide is widely used for the treatment of rheumatoid arthritis and another antipyretic properties [1]. Nimesulide is a light yellow crystalline powder, which is practically odourless. The various pK<sub>a</sub> values (from 5.9 to 6.56) were printed in Ref. [2]. The value of pK<sub>a</sub> clearly indicates the acid natural of the drug. Nimesulide is soluble

\* Corresponding author. Tel.: +420-49-5067230; fax: +420-49-55122423.

E-mail address: [kovarikova@faf.cuni.cz](mailto:kovarikova@faf.cuni.cz) (P. Kovaříková).

in organic polar solvents; the solubility is diminished in solvents of high polarity such as methanol. The solubility in water is reported to be 0.01mg/ml but the solubility depend on the pH of the aqueous solution [2].

Information about the stability of the drug substance is an integral part of the systematic approach on the stability evaluation. Investigation of influence of light on the stability of drugs has gained more and more importance in recent years. Characterization of the photochemical degradation of drugs using accurate, specific and well-characterized methods is of interest regarding safety, quality and effectiveness of drug formulation. Light exposure (during production, storage and use) can change the stability of drug and toxic decomposition products may be formed. Information about photo stability of drugs can help to determine the storage conditions in order to achieve high quality of pharmaceutical products. As regards the structural similarity to sulfonamides, nimesulide was considered to be photo unstable compound. [3]. Although certain information about the photo stability of some NSAID's has been reported [4,5], no reports about the photo stability of nimesulide as a modern agent with different structure are available. Only one report has been presented in literature about the stability of nimesulide and its main metabolite (hydroxy-nimesulide) in plasma. [2]. The chromatographic methods of analysis for nimesulide include, HPLC [6–14] and HPTLC [15,16].

The aim of this paper was to study the photochemical stability of nimesulide and to describe the development of a sensitive analytical method using HPLC and TLC for determination nimesulide in the presence of its degradation products. The conclusions of this paper could spread unpublished information about the stability profile of nimesulide, which could be helpful in effort to ensure quality, safety and effectiveness of drugs. So that the novelty of this work is based on presentation of two stability indicating analytical methods (HPLC and TLC), which could be used for determination of purity of this substance.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemical and reagents

Standards of nimesulide and methanesulfonic acid were obtained from Sigma–Aldrich (GmbH, Germany). HPLC-grade cyclohexane, ethylacetate, methanol and reagent-grade phosphoric acid, sodium hydroxide, ammonium phosphate monobasic, potassium iodide, argentum nitrate, sodium nitrite, potassium hydroxide were provided by Lachema (Brno, Czech Republic). HPLC-grade acetonitrile was Balex (Pardubice, Czech Republic) product.

### 2.2. Instrumentation and chromatographic conditions

#### 2.2.1. HPLC

All HPLC instruments were obtained from Ecom s.r.o. Czech Republic. System consisted of a pump, a spectrophotometric detector (LCD 2084) and a data station with cw software, version 1.7. The separation was performed on a Separon SGX, C18, 250 × 4.6, i.d. 7 µm analytical column (Tessek, Prague, Czech Republic).

The mobile phase consisted of acetonitrile and ammonium phosphate (pH 7.9; 0.02 M) (35:65 v/v). The pump was operated in an isocratic mode with a flow-rate of 0.6 ml/min. The UV-detection was performed at 245 nm. Injections were carried out using a 20-µl loop.

#### 2.2.2. TLC

As the stationary phase for TLC analysis was used silica gel plates UV-254 (Kavalier, Czech Republic). The solvent system consisted of ethylacetate and cyclohexane (45:55). The saturation time was 15 min. The samples were applied to the plate using a 5-µl pipette.

The length of chromatogram run was 12 cm. Nimesulide and 2-phenoxy-4-nitroaniline were detected using the spray solution consisted of the copulation reagents (1% solution of NaNO<sub>2</sub> in 1 M HCl) and the diazotation reagents (0.2% solution of 1-naphtol in 1 M KOH). Methane sulphonic acid was found using solution of fluorescein in methanol (1:5).

### 2.3. Nimesulide decomposition

UV lamp (Camag, Switzerland) was used as a source of UV radiation; radiation intensity 1200  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  the wavelength at 254 nm.

A solution of nimesulide sodium salt (3 mg/ml) was exposed to continuous light of wavelengths 254 nm for 80 h. The UV lamp was located 40 cm far from this solution. After the exposition the sample was evaporated to dryness, dissolved in methanol and analysed employing HPLC and TLC. The other solution of nimesulide sodium salt was prepared using the same way and it was stored in the cooler. After 80 h it was analysed to compare degradation with and without UV exposition.

### 2.4. Preparation of degradation product

The degradation product was obtained by warming of a solution of nimesulide in the sodium hydroxide solution (10 mg/ml) on water bath for 40 h up. Crystals, which were gained in this process, were recrystallized in methanol. Identification was made using NMR analysis.

### 2.5. Preparation of standard solutions

The stock solution of nimesulide with a concentration of 1 mg/ml was prepared by dissolving 100 mg of nimesulide in methanol. The internal standard stock solution of propylparaben (1 mg/ml) was prepared in methanol.

### 2.6. Calibration curves

The calibration curves were prepared using concentration of 150, 200, 300, 450 and 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for nimesulide and the concentration of 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for propylparaben (internal standard). Diluting of the stock solution with the appropriate volumes of methanol made the standard solutions for the calibration curves. The standard solutions of nimesulide in methanol containing propylparaben were injected in triplicate into chromatograph. The peak area ratios (nimesulide to internal standard) were plotted against the corresponding analyte concentration.

### 2.7. The limit of detection

The limit of detection was calculated to be three times the standard deviation of noise ratio from the analysis of 2-phenoxy4-nitroanilide (80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 2.8. Accuracy

Accuracy of the method is calculated as a percentage of recovery by the assay of the known added amount of analyte in the sample [17]. The samples were gained by further dilutions of the standard stock solution to obtain concentration of 170, 250, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of nimesulide. All samples were analysed in triplicate.

### 2.9. Precision

The precision of a method is determined by assaying a sufficient of aliquots of a homogenous sample to be able to calculate statistically valid estimates of standard deviation or relative standard deviation [17]. The precision of the method was tested as between-day reproducibility of the assay. The independent samples of nimesulide (170, 250, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were tested in 2 days to determine inter-day reproducibility.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimization of chromatographic conditions

The preliminary objective of the work was to develop optimal chromatographic conditions for assessment 2-phenoxy4-nitroaniline (notional degradation product) in the sample of nimesulide. Available analytical RP-HPLC methods reported for the determination of nimesulide employ acid mobile phases (pH 3.5–5). According to the previously reported chromatographic conditions and  $\text{p}K_{\text{a}}$  of the substance, nimesulide was at first analysed using a mixed acid buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.01 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01 M,  $\text{NaCOOH}$  0.1 M,  $\text{NH}_4\text{HPO}_4$  0.02 M) and organic solvents (methanol, acetonitrile) in a different ratios. The initial experiments with the acid mobile phases did not provide adequate separation of nimesulide and its degra-

ation product, so that the alkaline buffer ( $\text{NH}_4\text{HPO}_4$  0.02 M, pH 7.9) was employed later. The ratio between aqueous and the organic phases was optimised too. The analytical columns with modified silica gel ( $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_{18}$ , CN) as the stationary phases were tried. Finally the Tessek  $\text{C}_{18}$  chromatographic column was provided in order to increase number of theoretical plates. The capacity factors ( $K$ ) were 1.418 for nimesulide and 1.958 for degradation product Fig. 1.

The ultraviolet spectra of nimesulide and 2-phenoxy4-nitroaniline were recorded using a UV-Shimadzu 2401PC spectrophotometer. The spectrum of nimesulide exhibits maxima at 323, 298 and 201 nm. The absorption spectrum of 2-phenoxy4-nitroaniline was almost the same as the spectrum of nimesulide. According to the absorption maximum of nimesulide and its degradation product the detector was employed at 245 nm.

### 3.2. Assay of nimesulide

Assay of nimesulide was performed employing propylparaben as the internal standard. Propylparaben was acceptable as the internal standard because it exhibits similar chromatographic properties to nimesulide and 2-phenoxy4-nitroaniline. Under the chromatographic conditions used, nimesulide and propylparaben have retention times of 8.10 and 17.01 min. The calibration curve was linear in the studied range. The mean equation (curve coefficient  $\pm$  standard deviation) of the calibration curve ( $n=5$ ) obtained for five points was  $y = (1.139 \pm 0.064)x + (0.016 \pm 0.022)$  with correlation coefficient  $r = 0.9969$ . The value of  $y$  represents the concentration of nimesulide  $\mu\text{g/ml}$  and the value of  $x$  represents the peak area ratio between analyte and internal standard. The solution of nimesulide was stable during this chromatographic analysis.

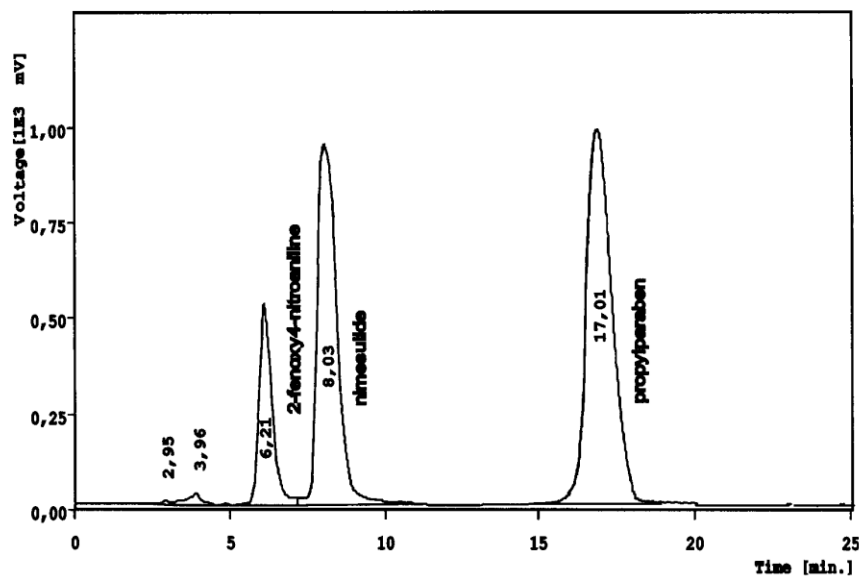


Fig. 1. Chromatogram shows separation of 2-phenoxy4-nitroaniline, nimesulide and internal standard-propylparaben. Chromatographic conditions were described in Section 2.2.1.



### 3.3. Accuracy and inter-day precision

Obtained accuracy values were within an acceptable limit Table 1. The results for inter-day precision are presented in Table 2.

### 3.4. The limit of detection

The limit of detection was calculated to be 0.12 µg/ml of 2-phenoxy4-nitroanilide.

### 3.5. Stability study

At first the solution of nimesulide sodium salt was exposed to UV radiation of the maximum at 350 nm. (UV lamp with wavelength range from 300 to 400 nm). After 100 h of exposition to this radiation the solution was stable. So that's why we decided to use another UV lamp (Camag UV lamp; maximum at 254 nm). Employing HPLC method the presence of 2-phenoxy4-nitroanilide in the solution was detected after 80 h of UV irradiation. The presence of 2-phenoxy4-nitroanilide in the exposed sample of nimesulide was confirmed by agreement of  $t_R$  value of the standard solution of 2-phenoxy4-nitroanilide and  $t_R$  value of the solution of nimesulide after exposition to radiation. This agreement was also proved by application of additional amount of standard solution (2-phenoxy4-nitroanilide) to the sample and the significant growth of the peak area was determined. Fig. 2 shows the chromatogram of the sample after 80 h of exposition to UV radiation. In addition, the presence of the other unknown degradation product was discovered on this chromatogram.

Table 1  
Accuracy of assay-analysis of known amount of nimesulide

Concentration added (µg/ml)	Concentration found (µg/ml) ± S.D.	Recovery %
170	169.5 ± 0.49	99.70
250	249.0 ± 0.57	99.60
400	397.4 ± 1.67	99.35

Table 2  
Between-day precision of assay of nimesulide

Concentration added (µg/ml)	Concentration found (µg/ml) ± S.D.	RSD %
170	169.3 ± 0.37	0.22
250	248.8 ± 0.71	0.28
450	397.5 ± 1.71	0.43

### 3.6. TLC

As regard that nimesulide had been degraded into 2-phenoxy4-nitroanilide, the presence of the other degradation product (methane sulphonic acid) was supposed. Because of the fact that methane sulphonic acid cannot be indicated by HPLC analysis, a TLC method was developed. The standard solution of nimesulide, 2-phenoxy4-nitroanilide and methane sulphonic acid was spotted on TLC plates and run in different solvent systems. The following solvent system were tried in different portions:

Ethylacetate–methanol–25% ammonium  
Hexane–acetone  
Chloroform–methanol  
Ethylacetate–cyclohexane.

The solvent system consisted of ethylacetate and cyclohexane (45:55 v/v) gave a compact spots of all components (nimesulide and its degradation products) with a significant Rf values. Nimesulide had Rf value of 0.29 2-phenoxy4-nitroanilide had Rf value of 0.43.

## 4. Conclusions

The propose stability study shows nimesulide to be relative photostable compound. Nimesulide must be exposed to UV radiation for a relative long time to obtain its decomposition products. As the main photochemical decomposition product 2-phenoxy4-nitroanilide was found. The chromatogram of the exposed sample of nimesulide shows that the presence of the other unknown decomposition product is expected. Further study has to be done for identification of unknown decomposi-

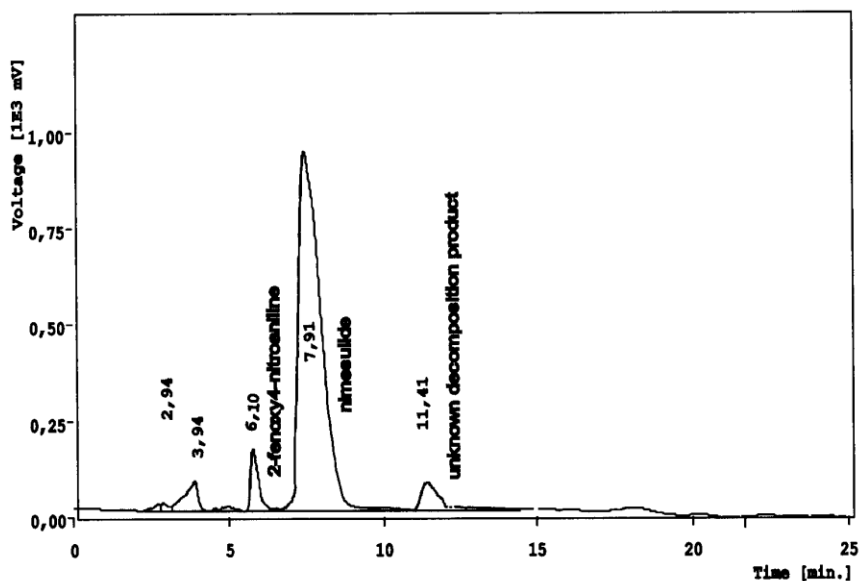


Fig. 2. Chromatogram of degradation of nimesulide after 80 h exposition to UV radiation. Chromatographic conditions were described in Section 2.2.1.

tion product of nimesulide. This analytical method allows determining the amount of nimesulide in the presence of its decomposition products.

#### Acknowledgements

This study was supported by a research grant No. 111600001 from The Ministry of Education, Youth and Sports.

#### References

- [1] J.E.F. Reynolds (Ed.), Martindale: The extra Pharmacopoeia, twenty ninth ed., Pharm. Press, London, 1989, p. 31.
- [2] A. Singh, P. Singh, V.K. Kapoor, in: A. Singh, P. Singh, V.K. Kapoor (Eds.), Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, 28, part Nimesulide, Academic Press, New Jersey, 2001, pp. 198–249.
- [3] A.F. Asker, M. Larose, *Drug Dev. Ind. Pharma.* 13 (1987) 2239–2248.
- [4] S.P. Puthi, P.R. Varia, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 672–677.
- [5] H. Bartsh, A. Epier, H. Kopelent-Frank, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 531–541.
- [6] A. Nonzioli, L.G. Fernandez, *J. High Resolut. Chromatogr.* 12 (1989) 413–416.
- [7] D. Castoldi, V. Monzani, O. Toffaneti, *J. Chromatogr.* 425 (1988) 413–418.
- [8] Z. Zeng, H. Zhang, *Zhongguo Yaoxue Zazhi* 31 (1996) 610–612.
- [9] X. Wang, S. Li, X. Zhang, H. Liu, *Zhongguo Yaoxue Zazhi* 33 (1998) 295–297.
- [10] G. Giachetti, A. Tenconi, *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 50–56.
- [11] D.J. Jarowowitz, M.T. Filipowski, K.M. Boje, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 723 (1999) 293–299.
- [12] M. Carini, G. Aldi, R. Stefani, C. Marinello, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 201–211.
- [13] G. Khaksa, N. Udupa, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 727 (1999) 241.
- [14] P. Ptacek, J. Maccek, J. Klima, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 758 (2001) 183–188.
- [15] K.K. Pandya, M.C. Satia, R. Modi, B.K. Chakravarthy, T.P. Gandhi, *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997) 773–776.
- [16] V.B. Patravale, S. D'Souza, Y. Narakar, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 685–688.
- [17] USP The United States Pharmacopoeia USP, United States Pharmacopoeial convention incorporates, Rockville, MD 24 (2000) 2149–2152.

## Komentář k článku

**Tato práce je zaměřena na vývoj chromatografických metod (HPLC a TLC) umožňujících separaci nimesulidu a jeho potenciálních rozkladných produktů (2-fenoxy-4-nitroanilinu a kyseliny methansulfonové) a následné využití těchto metod ve studiu fotostability tohoto léčiva.**

### Cílem této části bylo:

- 1/ Vyvinout HPLC a TLC metody vhodné pro separaci nimesulidu a potenciálních rozkladných produktů – 2-fenoly-4-nitroanilinu a kyseliny methansulfonové.
- 2/ Použít vyvinuté metodiky k studiu fotostability nimesulidu.

### Komentář k výsledkům:

V době vypracování experimentální práce nebyl nimesulid zařazen do žádné oficiální lékopisné monografie a v literatuře nebyly dostupné informace o fotostabilitě této látky. Vzhledem k tomu, že UV záření je jedním z hlavních vnějších faktorů, ovlivňujících stabilitu léčiv a léčivých přípravků, byla u uvedeného léčiva studována právě fotostabilita. Protože nimesulid obsahuje v molekule sulfonamidovou vazbu, která je za určitých okolností poměrně citlivá k rozkladu, je možné očekávat že 2-fenoxy-4-nitroanilin a kyselina methansulfonová (produkty štěpení této vazby) budou potenciálními rozkladnými produkty léčiva.

Při vývoji HPLC metody vhodné pro separaci nimesulidu a 2-fenoxy-4-nitroanilinu, byly testovány různé chromatografické podmínky. Separace píků těchto látek byla dosažena na koloně s náplní C18 a mobilní fází složenou ze směsi acetonitrilu a fosfátového pufru. Jako vnitřní standard byl vybrán propylparaben. Linearita, přesnost a správnost byly zvoleny jako základní validační parametry této metody.

Na rozdíl od 2-fenoly-4-nitroanilinu, neabsorbuje kyselina methansulfonová záření v UV oblasti, a proto nemůže být detekována za použití HPLC-UV metody. Pro rychlou a jednoduchou analýzu nimesulidu a obou potenciálních rozkladných produktů byla proto vyvinuta TLC metoda využívající k detekci postřík chemickými činidly.

Nimesulid a 2-fenoxy-4-nitroanilid byly na TLC desce detekovány postříkáním využívající diazotace; skvrna kyseliny methansulfonové byla detekována postříkáním za pomoci roztoku fluoresceinu.

Stabilita nimesulidu byla hodnocena po expozici roztoku léčiva UV zářením. Vzorek byl nejprve vystaven záření o průměrné vlnové délce 350 nm a poté, pro urychlení rozkladné reakce byl vzorek exponován zářením o vlnové délce 254 nm. Během těchto experimentů se ukázalo, že nimesulid je poměrně odolný vůči účinkům UV záření. Vzorek musel být vystaven UV záření poměrně dlouhou dobu (100 a 80 hodin byl roztok vystaven UV záření o vlnové délce 350 a 254 nm, respektive), aby v něm bylo možno detekovat rozkladné produkty. Kromě 2-fenoxy-4-nitroanilinu byl na chromatogramu (HPLC) zatíženého vzorku detekován ještě další pík dalšího neznámého rozkladného produktu.

**Výsledkem této práce jsou chromatografické metody (HPLC a TLC) vhodné pro rutinní hodnocení stability nimesulidu. Informace o stabilitě této látky mohou být využity při vývoji nových lékových forem s obsahem tohoto léčiva.**

V současné době je nimesulid zařazen do Ph. Eur. 5 a námi identifikovaný rozkladný produkt (2-fenol-4-nitroanilin) je zde popsán jako nečistota D<sup>129</sup>.

## **5. SOUHRN/ SUMMARY**

**Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v oblasti analýzy léčiv jednou z nejčastěji užívaných analytických technik.** Metody HPLC jsou běžně využívány ve všech oblastech moderní farmaceutické analýzy - ve výzkumu a vývoji nových léčiv a léčivých přípravků, v oblasti kontroly a jistění jakosti léčiv, v oblastech zahrnujících analýzu léčiv a metabolitů v biologickém materiálu (např. terapeutické monitorování léčiv, studie bioekvivalence). Teoretická část disertační práce se zabývá hlavními aspekty a specifiky HPLC analýzy léčiv. Experimentální část práce je zpracována jako soubor komentovaných prací rozdělaných do dvou tematických celků (Analýza potenciálních léčiv ze skupiny aroylhydrazonových chelátorů železa, Hodnocení stability vybraných léčiv).

**První tematický celek** se zabýval vývojem, validací a následnou aplikací chromatografických metod (především HPLC) v analýze potenciálních léčiv ze skupiny aroylhydrazonových chelátorů železa – pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu (PIH) a jeho dalších dvou analogů, salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) a pyridoxal 2-chlorbenzoyl hydrazonu (o-108).

**Aroylhydrazonové chelátory železa** (PIH, SIH, o-108) jsou v dnešní době jako potenciální léčiva předmětem poměrně **intenzivního výzkumu**. Ačkoliv mají tyto látky zajímavé farmakologické účinky, nebyly dosud dostatečně definovány analyticky. Absence vhodných analytických metod dosud neumožňovala přesně definovat čistotu, stabilitu ani základní farmakokinetické parametry těchto potenciálních léčiv. V této disertační práci byly nejprve **vyvinuty a validovány chromatografické metody umožňující hodnocení čistoty a stability těchto chelátorů**. Za použití vyvinutých metod pak byly poměrně detailně studovány **vybrané aspekty stability** ve vodě rozpustné soli „mateřské“ látky - **PIH·2HCl** - (stabilita ve vodných prostředích o různém pH a farmaceutických pomocných látkách, fotostabilita a termální stabilita). Tyto experimenty ukázaly, že PIH je ve vodných roztocích poměrně citlivý k hydrolytickému štěpení hydrazonové vazby, avšak v pevném stavu je tato látka poměrně stabilní (studie fotostability a termální stability). Výsledky těchto experimentů přináší praktické informace, které mohou být v budoucnu využity při volbě způsobu skladování, výběru vhodného aplikačního média nebo pomocných látek.

Další část tohoto tematického celku byla věnována **vývoji a validaci HPLC metodik vhodných pro stanovení SIH a o-108 v králičí plasmě**. Pro izolaci SIH z plasmy se jako optimální jevila metoda precipitace vzorku acetonitrem (s malým

přídavkem kyseliny). V případě o-108 byla použita extrakce na pevných fázích za použití C8 extrakčních kolonek. HPLC analýzy probíhaly na kolonách s reverzní fází C18 za použití dvou mobilních fází o různém složení. Vyvinuté metody byly následně použity pro **stanovení plasmatického profilu a základních farmakokinetických parametrů** dosažených po i.v. aplikaci těchto chelátorů laboratorním zvířatům. I když byl u těchto látek pozorován poměrně rychlý pokles plasmatických koncentrací, čemuž odpovídá i relativně krátký biologický poločas, výsledky této studie mohou mít významný vliv na průběh dalšího výzkumu zaměřeného na aroylhydrazonové chelátory železa jako potenciální léčiva.

**Druhý tematický celek** byl zaměřen na **vývoj** a následné **využití HPLC** metod ke **studiu vybraných aspektů stability** dvou léčiv za podmínek stresových zkoušek. Studium stability léčiv je jedním ze specifických odvětví farmaceutické analýzy. Cílem zátěžových testů je definovat vnitřní stabilitu molekuly léčiva, zjistit cesty degradace a získat informace o rozkladných produktech potřebné pro vývoj a validaci stability hodnotících analytických metod. Prvním léčivem jehož stabilita byla testována bylo moderní antidiabetikum - **glimepirid**. Stabilita glimepiridu byla hodnocena **v různých vodných roztocích** (0,1 M HCl; 0,1 M NaOH, ve vodě a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) za podmínek stresových zkoušek. Stabilita tohoto léčiva byly vyjádřena jako úbytek koncentrace ve vzorcích v čase. Bylo zjištěno že rychlost rozkladu glimepiridu klesá v pořadí roztok peroxidu vodíku > kyselé prostředí > alkalické prostředí > voda. V zatížených vzorcích bylo detekováno **5 různých rozkladných produktů**.

V další části disertační práce byla sledována citlivost nesteroidního protizánětlivého léčiva - **nimesulidu** k rozkladu vlivem UV záření. **Chromatografické metody** (HPLC a TLC) umožňující separaci nimesulidu a dvou potenciálních rozkladných produktů (2-fenoxy-4-nitroanilinu a kyseliny methansulfonové) **byly vyvinuty** a následně **použity ke studiu fotostability** tohoto léčiva. Výsledky těchto experimentů ukazují, že nimesulid je poměrně odolný vůči působení UV záření. Testovaný vzorek musel být vystaven působení tohoto záření poměrně dlouhou dobu, aby bylo možné detekovat uvedené rozkladné produkty

Tento tematický celek přináší nové chromatografické metody vhodné pro monitorování stability glimepiridu a nimesulidu. Dále pak přináší informace o vlastní stabilitě těchto chemických léčiv, které mohou být dále využity v procesech jištění

kvality léčivých látek a léčivých přípravků nebo při vývoji nových lékových forem obsahujících uvedené léčiva.



**High performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most frequently used analytical techniques for the analysis of drugs.** HPLC methods are widely employed in all fields of the modern pharmaceutical analysis - new drugs development, quality control and assurance, the analysis of drugs and metabolites in a biological material (e.g. therapeutic drug monitoring, bioequivalence). The theoretical part of this thesis deals with the main specifics and aspects associated with HPLC analysis of drugs. The experimental part is consisted of six original research papers with appropriate comments divided in to two sections (The analysis of the drug candidates from the group of aroylhydrazone iron chelators and The stability study on selected drugs).

**The first section** concerns with development, validation and application of new HPLC methods in the analysis of drug candidates from the group of iron chelators – pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH), salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) and pyridoxal 2-chlorobenzoyl hydrazone (o-108).

**Aroylhydrazone iron chelators** are under the investigation **as promising drug candidates**. Despite these chelators have demonstrated number of interesting pharmacological effects, in fact there were no modern analytical techniques suitable for the analysis of these drug candidates. The lack of the analytical methodology has not allowed to determine the basic pharmacokinetic parameters of these drug candidates. At the beginning of the experiments, **the chromatographic methods** suitable for **purity** and **stability evaluation** of these chelators were developed and validated. The stability-indicating method was thereafter employed for the **evaluation** of the **selected aspects of the stability** of a water soluble salt - **PIH·2HCl** (The stability of the chelator in water media of different pH and two common pharmaceutical excipients was investigated, photostability and thermal stability studies on the solid substance were performed as well). These experiments have demonstrated that PIH is relatively sensitive to hydrolytic splitting of the hydrazone bound in aqueous solutions; however the solid substance is stable under the tested conditions (photo and thermal stability). These experiments provided the practical information which could be useful in further investigations of this chelator as a drug candidate (e.g. for the selection of storage conditions, an application media and pharmaceutical excipients).

**The development and validation of HPLC methods** appropriate for the **analysis of SIH and o-108 in rabbit plasma** was described in the second part of

this section. Precipitation using acetonitrile with an addition of small amount of acid was employed for the isolation SIH. In the case of o-108, the method of solid phase extraction employing C8 columns was used. The desirable separations were achieved on C18 columns using mobile phases of different compositions. These methods were employed for the **determination of plasma concentration-time profile and the basic pharmacokinetic parameters** followed i.v. application of these chelators to rabbits. Rather short half-lives of elimination were observed these studies. The results of these experiments could be important for further investigation in this field.

The **second part** of the dissertation thesis concerns **with the development of stability indicating analytical methods** and **the applications** of these procedures in **the stability evaluation** of two modern drugs.

Investigation of the stability of drugs is one of a specific part of the pharmaceutical analysis. The stress testing can help to identify the likely degradation products which can in turn help to establish the degradation pathways and intrinsic stability of the drug molecule and to validate the stability indication power of the analytical methodology. The modern hypoglycemic agent - **glimepiride** was chosen for the stability investigation. **The stability of glimepiride in the different aqueous media** (0.1 M HCl, 0.1 M NaOH, water, 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) under the selected stress conditions was tested and expressed as a fall of the concentration of drug in the time course of the experiments. It was observed, that the susceptibility of glimepiride to degradation is decreasing in following manner: 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > acid condition > alkaline condition > water. The five main degradation products were detected in the exposed samples.

The last topic of this dissertation thesis was to determine the photochemical stability of modern anti-inflammatory drug – **nimesulide**. The chromatographic methods (HPLC and TLC) suitable for the separation of nimesulide and its two potential degradation products have been developed and employed in the **photostability evaluation** on this drug. These experiments indicated that nimesulide is relatively resistant against the influence of UV light. The sample solution had to be exposed to UV light for relatively long time period to detect the degradation products.

This part of the thesis provides new analytical methods suitable for the stability evaluation of glimepiride and nimesulide. Information presented herein could be useful for quality control and assurance of these two clinically used drugs.

## 6. LITERATURA

- <sup>1</sup> Ahuja S., Scypinski S., Handbook of modern pharmaceutical analysis, Academic press, London, 2001.
- <sup>2</sup> Koh H.L., Yau W. P., Ong P.S., Hegde A. Drug. Discov. Today. 8 (2003) 889-897.
- <sup>3</sup> Poole C. F., Poole S.K., Chromatography Today, Elsevier Science, Amsterdam, 1991.
- <sup>4</sup> Tesařová E., Sborník - Odborná konference VÚFB, Praha 13-14.11 2002.
- <sup>5</sup> Szepesi G., How to use HPLC, VCH Publisher, New York, 1992.
- <sup>6</sup> Hyötyläinen T., Riekkola M.L., J. Chromatogr. B. 817 (2005) 13-21.
- <sup>7</sup> Guttman A., Varoglu M., Khandurina J., Drug. Discov. Today 9 (2004) 136-144.
- <sup>8</sup> Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L., Practical HPLC method development 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc., New York 1997.
- <sup>9</sup> Klimeš a kol. Kontrola chemických léčiv II., Karolinum, Praha, 2004.
- <sup>10</sup> Český lékopis 2002 1. díl, Grada, Praha 2002, str. 181-191.
- <sup>11</sup> Ackermann B. L., Berna M. J., Murény A.T., Curr. Top. Med. Chem. 2 (2002) 53-66.
- <sup>12</sup> CDER and CVM, Guidance for Industry, Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products-General Considerations, <http://www.fda.gov/cder/guidance/5356f1.pdf>.-01/2006
- <sup>13</sup> Babjuk J., Perlík F., Šídlo Z., Bioanalytika léků, Avicenum, Praha, 1990.
- <sup>14</sup> Rees S.A., J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996) 1185-1190.
- <sup>15</sup> Korfmacher W.A., Drug. Discov. Today 10 (2005)1357-1367.
- <sup>16</sup> Churáček J. a kol., Nové trendy v teorii a instrumentaci analytických vybraných analytických metod, Academia, Praha, 1993.
- <sup>17</sup> [http://www.hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC\\_Book/](http://www.hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/) - 09/2000.
- <sup>18</sup> <http://www.chromatography-online.org/>-01/2006
- <sup>19</sup> Klimeš a kol., Kontrola chemických léčiv I., Karolinum, Praha, 2002.
- <sup>20</sup> Holčapek a kol., Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, Sborník přednášek, Pardubice 5.-7. 11. 2001.
- <sup>21</sup> Holčapek a kol., 3. ročník školy HPLC/MS, Sborník přednášek, Doubice 29.8.-1.9.2005.

- <sup>22</sup> Tahala N., Kobayashi H., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Hosoya K., Omegami T., *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 35–49.
- <sup>23</sup> Claessens H. A, van Straten M.A., *J. Chromatogr. A.* 1060 (2004) 23-41.
- <sup>24</sup> Nawrocki J., Dunlap C., Mc Cormick A., Carr P.W., *J. Chromatogr. A.* 1028 (2004) 1-30.
- <sup>25</sup> European Pharmacopoeia, 5<sup>th</sup> Edition, Volume 1, European Directorate for the Quality Medicines, Strasbourg, 2004.
- <sup>26</sup> Boulanger B., Chiap P., Dewe W., Crommen J., Hubert P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 753-765.
- <sup>27</sup> Grdinic V., Vukovic J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 489-512.
- <sup>28</sup> Beňo P., Truplová E., Ostrovská V., Stankovičová M., *Stabilita liečiv a liekov*, Veda, Bratislava, 2003.
- <sup>29</sup> Ermer J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 755-767.
- <sup>30</sup> Ermer J., Ploss H.J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 859-870.
- <sup>31</sup> ICH guideline Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology
- <sup>32</sup> CDER and CVM, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001, <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm.-01/2006>
- <sup>33</sup> Šabartová J., *Kontrolní metody, Validace analytických metod v kontrole léčiv*, SÚKL, 1992.
- <sup>34</sup> Shabir G., *J. Chromatogr. A.* 987 (2003) 57-66.
- <sup>35</sup> Shah V.P., Midha K.K., Findlay J. W. A., Hill H. M., Hulse J.D., Mc. Gilveray I., *J. Pharm. Res.* 17 (2002) 1551-1557.
- <sup>36</sup> Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D.L., Mc Dowall R.D., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 193-218.
- <sup>37</sup> Dadgar D., Burnett P. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1995) 23-31.
- <sup>38</sup> Ryska M., *Sborník přednášek kurzu Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*, Pardubice 5.-7. 11. 2001.
- <sup>39</sup> Causon R., *J. Chromatogr. B.* 689 (1997) 175-180.
- <sup>40</sup> Smith R.M., *J. Chromatogr. A.* 1000 (2003) 3-27.
- <sup>41</sup> Kataoka H., *Trac-Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 232-244.
- <sup>42</sup> Klíma J., Grafnetterová J., in: *Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii*, Avicenum, Praha, 1987.

- <sup>43</sup> Klimeš J., Sochor J., Križ J., *Farmaco.* 57 (2002) 117-122.
- <sup>44</sup> Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K.E., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 817 (2005) 3-12.
- <sup>45</sup> McDowall R.D., *J. Chromatogr.* 492 (1989) 3-58.
- <sup>46</sup> Blanchard J., *J. Chromatogr.* 1226 (1981) 455-460.
- <sup>47</sup> Tsai T.H., *J. Chromatogr. B,* 797 (2003) 161-173.
- <sup>48</sup> <http://www.millipore.com/publications.nsf/docs/pf002en00>, 01-2006.
- <sup>49</sup> Musson D.G., Birk K.L., Kitchen C.J., Zhang J., Hsieh J.Y., Fang W., Majumdar, A.K., Rogers J.D., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 783 (2003) 1-9.
- <sup>50</sup> Ueyama J., Kitaichi K., Iwase M., Takagi K., Takagi K., Hasegawa T., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 798 (2003) 35-41.
- <sup>51</sup> Eadie M.J., *Br. J. Clin. Pharmacol.* 46 (1998) 185-193.
- <sup>52</sup> Bardin S., Ottinger J.C., Breau A.P., O'Shea T.J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 573-579.
- <sup>53</sup> Thurman E.M., Mills M.S., *Solid-Phase extraction, principles and practice*, John Wiley & Sons, Inc., New York 1998.
- <sup>54</sup> Haginaka J., *Trac-Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 407-415.
- <sup>55</sup> Caro E., Marce R.M., Borrull F., Cormack P.A. G., Sherrington D.C., *Trac-Trends Anal. Chem.* doi:10.1016/j.trac.2005.05.008
- <sup>56</sup> Theodoridis G., Koster E. H. M., de Jong G. J., *J. Chromatogr. B.* 745 (2000) 49-82.
- <sup>57</sup> Ulrich S., *J. Chromatogr. A,* 902 (2002) 167-194.
- <sup>58</sup> Veuthey J.L., Souverain S., Rudaz S., *Ther. Drug Monit.* 26 (2004) 161-166.
- <sup>59</sup> <http://www.sukl.cz/cs08pokynform/cs08regpok.htm>, Reg-83- Požadavky na stabilitní studie v registrační dokumentaci, 1.9 2005.
- <sup>60</sup> Kommanaboyina B., Rhodes C.T., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 857-868.
- <sup>61</sup> Bakshi M., Singh S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 1011-1040.
- <sup>62</sup> Waterman K.C., Adami R.C., Alsante K.M., Antipast A. S., Arenson D. R., Carrier R., Hong J., et al. *Pharm. Dev. Technik.* 7 (2002) 113-146.
- <sup>63</sup> ICH, Q1A (R) Testing: Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2002.

- <sup>64</sup> CPMP/ QWP/122/03, Stability testing of Existing Active Substance and Related Finished Products 2003.
- <sup>65</sup> ICH, Q1B Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, 1996.
- <sup>66</sup> Moore D. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 5 (1987) 441-453.
- <sup>67</sup> Kommanaboyina B., Rhodes C. T., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 1301-1306.
- <sup>68</sup> Gil-Alegre M. E., Bernabeu J. A., Camacho M. A., Torres-Suarez A.I., *Farmaco.* 56 (2001) 877-883.
- <sup>69</sup> ICH: Q1E: Evaluation of Stability Data, 2003.
- <sup>70</sup> ICH: Q1D: Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of Drug Substances and Drug Products, 2002.
- <sup>71</sup> CPMP/QWP/2934/99, In-use stability testing of human medicinal products, 2001.
- <sup>72</sup> Tam T. F., Leung-Toung R., Li W., Wang Y., Karimian K., Spino M., *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 983-95.
- <sup>73</sup> Cunningham M. J., Nathan D. G., *Curr. Opin. Hematol.* 12 (2005) 129-34.
- <sup>74</sup> Franchini M., Veneri D., *J. Hematol.*, 5 (2004) 287-292.
- <sup>75</sup> Kontoghiorghes G.J, Pattichis K., Neocleous K., Kolnagou A., *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 2161-2183.
- <sup>76</sup> Hoffbrand V. A., *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 18 (2005) 299-317.
- <sup>77</sup> Cappellini M. D., *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 18 (2005) 289-298.
- <sup>78</sup> Buss J.L., Greene B.T., Turner J., Torti F. M., Torti S.V., *Curr. Top. Med. Chem.* 4 (2004) 1623-1635.
- <sup>79</sup> Marx J. J., *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 15 (2002) 411-426.
- <sup>80</sup> Levenson C.W., *Nutr. Rev.* 61 (2003) 311-313.
- <sup>81</sup> Kwok J.C., Richardson D. R., *Redox Rep.* 5 (2000) 317-324.
- <sup>82</sup> Murren J., Modiano M., Clairmont C., Lambert P., Savaraj N., Doyle T., Sznol M., *Clin. Cancer. Res.* 15 (2003) 4092-4100.
- <sup>83</sup> Yuan J., Lovejoy D.B., Richardson D.R., *Blood* 104 (2004) 1450-1458.
- <sup>84</sup> Ponka P., Borova J., Neuwirt J., Fuchs O., *FEBS Lett.* 97 (1979) 317-321.
- <sup>85</sup> Avramovici-Grisaru S., Sarel S., Link S., Hersko C., *J. Med. Chem.* 226 (1983) 298-302.
- <sup>86</sup> Buss J.L., Hermes-Lima M., Ponka P., *Adv. Exp. Med. Biol.* 509 (2002) 205-229.

- <sup>87</sup> Lewis N., Patel V., Terpinski J., Bliss R., Water soluble orally effective iron chelator, United State Patent US0058344924A (1998).
- <sup>88</sup> Brittenham G. M., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 612 (1990) 315-26.
- <sup>89</sup> Richardson D., Vitolo L. M., Hefter G. T., May P. M, Clare B.W., J. Webb. *Inorg. Chim. Acta* 170(1990) 165-170.
- <sup>90</sup> Richardson D., Vitolo L.W., Baker E., Webb J., *Biometals* 2 (1989) 69-76.
- <sup>91</sup> Buss J.L., Ponka P., *Biochim. Biophys. Acta* 1619 (2003) 177-186.
- <sup>92</sup> Richardson D. R., Ponka P., *J. Lab. Clin. Med.* 131 (1998) 306-315.
- <sup>93</sup> Hermes-Lima M., Ponka P., Schulman H. M., *Biochim. Biophys. Acta.* 1523 (2000) 154-160.
- <sup>94</sup> Hermes-Lima M., Santos N. C., Yan J., Andrews M., Schulman H. M., Ponka P., *Biochim. Biophys. Acta.* 1426 (1999) 475-482.
- <sup>95</sup> Bhattacharya M., Ponka P., Hardy P., Hanna N., Varma D. R., Lachapelle P., Chemtob S., *Free Radic. Biol. Med.* 22 (1997) 11-16.
- <sup>96</sup> Buss J. L., Arduini E., Ponka P., *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002)1689-1701.
- <sup>97</sup> Zanninelli G., Glickstein H., Breuer W., Milgram P., Brissot P., Hider R.C., Konijn A. M., Libman J., Shanzer A., Cabantchik Z. I., *Mol. Pharmacol.* 51 (1997) 842-852.
- <sup>98</sup> Horackova M., Ponka P., Byczko Z., *Cardiovasc. Res.* 47 (2000) 529-536.
- <sup>99</sup> Simunek T., Boer C., Bouwman R. A., Vlasblom R., Versteilen A. M., Sterba M., Gersl V., Hrdina R., Ponka P., de Lange J. J., Paulus W. J., Musters. R.J., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39 (2005) 345-354.
- <sup>100</sup> Buss J. L., Neuzil J., Gellert N., Weber C., Ponka P., *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 161-172.
- <sup>101</sup> Walcourt A., Loyevsky M., Lovejoy D. B., Gordeuk V. R., Richardson D. R., *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36 (2004) 401-407.
- <sup>102</sup> Edwards J. T., Chubb F. L., Gangster J., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75 (1997)1362-1368.
- <sup>103</sup> Krishna G., Mao J., Almassian B., Lang W., *Pharm. Dev. Technik.* 4 (1999) 71-80.
- <sup>104</sup> Feun L., Modiano M., Lee K., Mao J., Marini A., Savaraj N., Plezia P., Almassian B., Colacino E., Fischer J., MacDonald S., *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 50 (2002) 223-229.

- <sup>105</sup> Rouan M. C., Marfil F., Mangoni R., Humbert H., Maurer G., *J. Chromatog. B.* 755 (2001) 203-213.
- <sup>106</sup> Rouan M. C., Buffet C., Marfil F., Humbert H., Maurer G., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 995-1000.
- <sup>107</sup> Kalendarev T., Zupkovitz G., Ioffe V., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 967-975.
- <sup>108</sup> Guo F., Thiessen J. J., Tesoro A., Spino M., *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 754 (2001) 107-115.
- <sup>109</sup> Novakovic J., Tesoro A., Spino M., Thiessen J., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 796 (2003) 105-112.
- <sup>110</sup> Draeger E., *Diab. Res. Clin. Pract.* 31 (1996) 33-42.
- <sup>111</sup> Draeger K. E., Wernicke-Panten K., Lomp H. J., Schuler E., Roskamp R., *Horm. Metab. Res.* 28 (1996) 419-425.
- <sup>112</sup> Frick A., Moller H., Wirbitzki E., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46 (1998) 305-311.
- <sup>113</sup> United State pharmacopoeia 28, 1. Supplement, United State Pharmacopoeial Convention Inc., 2005, 3239-3240.
- <sup>114</sup> PHARMAEUROPA vol.16, European Directorate for the Quality of Medicine, 2004, 435-436.
- <sup>115</sup> Gurjar M.K., Josuu R.A., Chaudhuri S.R., Josuu S.V., Barde A.R., Gediya L.K., Ranade P.V., Kadam S.M., Naik S.J., *Tetrahedron Lett.* 44 (2003) 4853-4855.
- <sup>116</sup> Lehr K. H, Damm P., *J. Chromatogr.* 526 (1990) 497-505.
- <sup>117</sup> Susanto F., Reinauer H., Fresenius. J., *Anal. Chem.* 357 (1997) 1202-1205.
- <sup>118</sup> Maurer H. H., Kratzsch C., Kraemer T., Peters F. T., Weber A. A., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 773 (2002) 63-73.
- <sup>119</sup> Kim H., Kyu Y. C., Chány H. P., Moon S. J., Lee J. A., Hee J. L., Kyung R. L., *Chromatographia* 60 (2004) 93-98.
- <sup>120</sup> Song Y. K., Maeng J. E., Hwang H. R., Park J. S., Kim B. C., Kim J. K., Kim C. K., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 810 (2004) 143-149.
- <sup>121</sup> Salem I. I., Idrees J., Al Tamimi J. I., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 799 (2004) 103-109.
- <sup>122</sup> Pistos C., Koutsopoulou M., Panderi I., *Biomed. Chromatogr.* 19 (2005) 394-401.
- <sup>123</sup> Altinoz S., Tekeli D., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 507-515.



- <sup>124</sup> Bennett A., Villa G., *Expert Opin. Pharmacother.* 1(2000) 277-286.
- <sup>125</sup> Singla A.K., Chawla M., Singh A., *J. Pharm. Pharmacol.* 52(2000) 467-486.
- <sup>126</sup> www.sukl.cz, Nimesulid: Informace o závěrech celoevropského hodnocení přínosu a rizika, září 2004.
- <sup>127</sup> Bernareggi A., *Clin. Pharmacokinet.* 35 (1998) 247-274.
- <sup>128</sup> Singh A., Singh P., Kapoor V. K., *Analytical Profiles of Drug Substance and Excipients 28, part Nimesulide*, Academic Press, New Jersey 2001, 198-249.
- <sup>129</sup> *European Pharmacopoeia, 5<sup>st</sup> Edition, Volume 2.*, European Directorate for the Quality Medicines, Strasbourg, 2004.
- <sup>130</sup> *British Pharmacopoeia 1*, Health Ministry, Stationary Office, London, 2001, 1146-1165.
- <sup>131</sup> Barrientos-Astigarraga R. E., Vannuchi Y. B., Sucupira M., Moreno R. A., Muscara M.N., De Nucci G., *J. Mass. Spectrom.* 36 (2001) 1281-1286.
- <sup>132</sup> Ptacek P., Macek J., Klima J., *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 758 (2001) 183-188.
- <sup>133</sup> Ferrario P., Bianchi M., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 785 (2003) 227-236.
- <sup>134</sup> Maltese A., Maugeri F., Bucolo C., *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 804 (2004) 441-443.
- <sup>135</sup> Kucukguzel S.G., Kucukguzel I., Oral B., Sezen S., Rollas S., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 30 (2005) 127-134.
- <sup>136</sup> Pavan Kumar V.V., Vinu M.C., Ramani A.V., Mullangi R., Srinivas N.R., *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 125-132.
- <sup>137</sup> Patravale V. B., D'Souza S., Narkar Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 685-688.
- <sup>138</sup> Alvarez-Leuje A., Vasquez P., Nunez-Vergare L. J., Squella J. A., *Anal. Lett.* 31 (1998) 1173-1184.
- <sup>139</sup> Chandran S., Saggarr S., Priya K.P., Saha R.N., *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 26 (2000) 229-234.
- <sup>140</sup> Nageswara R. R., Meena S., Raghuram R.A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 349-363.
- <sup>141</sup> Khan M. A., Sinha S., Vartak S., Bhartiya A., Kumar S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 928-943.