

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení isoniazidu po štěpení
Polymerních konjugátů

Bc. Pavla Ribárová

Diplomová práce

2014

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavla Ribárová**
Osobní číslo: **C11730**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Stanovení izoniazidu po štěpení polymerních konjugátů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na stanovení steroidních léčiv (izoniazid) a jejich konjugátů, popište štěpení těchto konjugátů.
2. V experimentální části nalezněte vhodné podmínky pro stanovení izoniazidu po štěpení různých konjugátů (spojky, struktura PEG) chromatografickými technikami. Připravte metodu pro stanovení a vypracovanou metodu ověřte na reálných vzorcích.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte se současným stavem v oboru.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **1. října 2013**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2014**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2014

Prohlášení autora

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem ve své práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na mou práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Nesouhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2014

.....
Bc. Pavla Ribárová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mě diplomové práce panu Ing. Alešovi Eisnerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, pomoc v průběhu experimentu, při zpracování a vyhodnocování naměřených výsledků a v neposlední řadě za vstřícný přístup při konzultování této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat rodině a všem, kteří mě podporovali v době studia.

SOUHRN

Předkládaná diplomová práce se věnuje separaci předložených pH senzitivních konjugátů antituberkulotika isoniazidu s blokovým kopolymerem α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*poly(L-lysinem).

V literární rešerši popisuje význam isoniazidu a jeho stanovení v různých materiálech a dále význam poly(ethylenglykolu).

Dále byla navržena a optimalizována separace konjugátů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a stanovena jejich stabilita při různých pH.

Klíčová slova

Isoniazid, poly(ethylenglykol), kopolymer poly(ethylenglykol)-*b*poly(L-lysinem), HPLC

SUMMARY

This diploma thesis deals with the separation submitted pH-sensitive conjugates antituberculosics isoniazid with a block copolymer α -methoxy-poly (ethylene glycol)-*b*-poly (L-lysine).

The first part describes the importance of isoniazid and it's determination in various materials and the importance of poly(ethylene glycol).

Was also designed and optimized separation conjugates HPLC and determined their stability at various pHs.

Key words

Isoniazid, poly(ethylene glycol), copolymer polyethylene glycol)-poly(L-lysine), HPLC

1. ÚVOD.....	- 8 -
2 CÍL PRÁCE	- 9 -
3. TEORETICKÁ ČÁST	- 10 -
3.1 Antibakteriální látky.....	- 10 -
3.1.1 Mechanizmy účinku antibakteriálních látek	- 10 -
3.1.2 Farmakokinetika.....	- 10 -
3.1.3. Monitorování hladiny antibakteriálních látek	- 11 -
3.1.4 Léčiva proti tuberkulóze	- 11 -
3.2 Isoniazid	- 13 -
3.2.1 Příprava	- 13 -
3.2.2 Mechanismus účinku isoniazidu	- 13 -
3.2.3 Farmakokinetika isoniazidu	- 14 -
3.2.4 Stanovení isoniazidu	- 15 -
3.2.4.1 Stanovení isoniazidu kapilární elektroforézou.....	- 15 -
3.2.4.2 Stanovení isoniazidu metodou hydrofilní interakční kapalinové chromatografie-	15 -
3.2.4.3 Stanovení isoniazidu metodou lokalizované plazmonové rezonance zprostředkované	zlatými nanočásticemi
3.2.4.4. Stanovení isoniazidu v plazmě metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie	s obrácenými fázemi
3.2.4.5 Stanovení isoniazidu v kyslí plazmě vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.....
3.2.4.6 Jednoduché a citlivé spektroskopické stanovení isoniazidu a ritodrin hydrochloridu	v čisté formě nebo ve farmaceutických přípravcích
3.2.4.7 Současné stanovení rifampicinu, isoniazidu a pyrazinamidu vysokoúčinnou	chromatografií na tenké vrstvě.....
3.2.5. Nežádoucí účinky isoniazidu	- 24 -
3.3. Polymerní proléčivo	- 24 -
3.4 Polyethylenglykoly	- 25 -

3.4.1. Fyzikální a chemické vlastnosti	- 25 -
3.4.2 Stabilita a toxicita poly(ethylenglykolu)	- 26 -
3.4.3. Poly(ethylenglykol) jako nosič léčiv	- 27 -
3.4.4 Farmakokinetické vlastnosti poly(ethylenglykolu).....	- 27 -
3.4.5 Antimykobakteriální léčiva a poly(ethylenglykol)	- 28 -
3.4.6 Další využití	- 29 -
3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	- 29 -
3.5.1 Instrumentace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.....	- 29 -
3.5.1.1 Kolony pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii	- 30 -
3.5.1.2 Stacionární fáze ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.....	- 31 -
3.5.1.3 Mobilní fáze s obrácenými fázemi	- 31 -
3.5.1.4 Detektory	- 31 -
3.6 Detekce ve viditelném a ultrafialovém spektru	- 32 -
3.6.1 Instrumentace	- 33 -
3.6.1.1 Detektory pro ultrafialovou/viditelnou spektrometrii	- 33 -
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 35 -
4.1 Použité chemikálie.....	- 35 -
4.2 Použitý standard.....	- 35 -
4.3 Použité konjugáty	- 35 -
4.4 Použité přístroje	- 36 -
4.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s ultrafialovou detekcí.....	- 36 -
4.4.1.1 Podmínky pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii	- 36 -
4.4.2 Horkovzdušný sterilizátor	- 37 -
4.5 Kalibrační řada	- 37 -
4.6 Měření kinetické křivky	- 37 -

5. VÝSLEDKOVÁ ČÁST	- 39 -
5.1 Výběr experimentálních podmínek	- 39 -
5.2 Kalibrační řada	- 40 -
5.3 Sledování stability konjugátu.....	- 41 -
6. ZÁVĚR	- 52 -
7. LITERATURA	- 53 -
8. PŘÍLOHY.....	- 57 -
8.1. Seznam zkratek	- 57 -
8.2 Seznam vyobrazení.....	- 58 -
8.3 Seznam tabulek.....	- 58 -
8.4 Seznam grafů	- 59 -
8.5. Seznam rovnic.....	- 60 -

1. Úvod

Isoniazid, známý také jako isonikotinylhydrazin, se používá jako velmi významné léčivo k léčbě a prevenci tuberkulózy. Aby bylo léčivo co možná nejúčinnější, je nutné ho včas dopravit do místa účinku a zamezit jeho předčasné degradaci v organismu.

To je zabezpečeno navázáním isoniazidu na vhodný nosič, který není toxický a zároveň organismem snadno odbouratelný. Všechny tyto podmínky splňuje poly(ethylenglykol). Ten se může vyskytovat v různých strukturních formách, které zajistí potřebné farmakokinetické vlastnosti proléčiva.

Isoniazid je spojen s poly(ethylenglykolem) uhlíkovou spojkou. Toto spojení zajistí transport a distribuci proléčiva na konkrétní místo po určitou dobu. Samotné proléčivo je vyvázáno postupně, a to v závislosti na pH prostředí, v němž se nachází.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo provést literární rešerši významu antibiotických látek se zaměřením na isoniazid a jeho možnostmi stanovení z biologického materiálu i tablety. Druhá část rešerše se se měla zabývat cílenými konjugáty poly(ethylenglykolu) s antibakteriálními účinnými léčivy.

Dále bylo úkolem optimalizovat metodu separace syntetizovaného poly(ethylenglykolu) s navázaným isoniazidem a sledovat jeho stabilitu ve vodných roztocích s různým pH.

3. Teoretická část

3.1 Antibakteriální látky

Antibakteriální látky neboli antibiotika jsou látky, které zastavují růst bakterií, či jiných mikroorganismů, chlamydií, mykoplazmat, nebo je přímo ničí. Původně tyto látky byly produkovány plísněmi, ale dnes jsou většinou syntetizovány. Dělí se na skupiny podle chemického složení a účinku na bakterie (Vokurka a spol., 2005).

Jestliže farmakon inhibuje další množení původce, hovoří se o bakteriostatickém účinku. Usmrcuje-li původce, jde o účinek baktericidní. Látky, které ovlivňují buněčnou stěnu nebo buněčnou membránu, účinkují baktericidně. Naproti tomu antibiotika, která narušují proteosyntézu, zpravidla působí bakteriostaticky (Lüllmann H. a Mohr K, 2009).

3.1.1 Mechanizmy účinku antibakteriálních látek

Podle ovlivňovaných cílových struktur a podle mechanismu účinku lze chemoterapeutika a antibiotika rozdělit do různých skupin.

- a) Inhibice syntézy buněčné stěny, která podmiňuje baktericidní účinek.
Např. β -laktamová antibiotika.
- b) Porucha cytoplazmatické membrány patogenní buňky.
Léčivo se naváže na steroly v membráně bakterie a mění tak její povrchové napětí. Tím způsobí lýzu bakterie. Např. Amfotericin B.
- c) Inhibice tvorby bílkovin v ribozomu.
Inhibice nastává prostřednictvím vazby na 30S podjednotku ribozomu (tetracyklíny) nebo na 50S podjednotky (Chloramfenikol).
- d) Inhibice tvorby nukleových kyselin při replikaci DNA nebo transkripci.
Inhibice enzymů důležitých v replikačních nebo transkripčních procesech. Např. inhibice gyrázy chinonovými antibiotiky.
- e) Inhibice biotransformačních dějů nezbytných pro život mikrobiální buňky (Martínková J., 2007).

3.1.2 Farmakokinetika

Po podání farmaka účinek látky v určitém časovém průběhu nastupuje a později odeznívá. Tento průběh může, ale nemusí být podmíněn koncentrací farmaka v organismu.

Časový průběh účinku látky mohou určovat 3 klinické procesy: farmakokinetika, receptorová kinetika a kinetika transdukce signálu.

Farmakokinetika je pojem, který shrnuje pochody probíhající bezprostředně po podání léčiva a který určuje změny jeho koncentrace v biofázi. Jako biofázi označujeme prostor, ze kterého mohou farmaka přímo reagovat se svými vazebnými místy, např.: extracelulární složka prostoru (suxamentonium) nebo v cytosolu mikroorganismu (trimetoprim). Farmakokinetika se tedy zabývá změnami koncentrace farmaka v průběhu času.

Receptorová kinetika shrnuje závislosti interakce farmaka působícího z biofáze na vazebná místa. V závislosti na tom, o jaký typ vazebných míst jde, se určuje rychlost reakce interakce farmaka. Jedná se buď o specifická vazebná místa – receptory, anebo např. o místa nesespecifické adsorpce.

Po navázání farmaka na specifická nebo nesespecifická vazebná místa nastupují pochody přeměňující tento impulz na biologický efekt: transdukční kinetika. Transdukce může proběhnout rychle a zdánlivě neprodleně, často však vyžaduje celou řadu dílčích pochodů a může představovat velmi pomalý děj (Lüllmann H., Mohr K., 2009).

3.1.3. Monitorování hladiny antibakteriálních látek

Monitorování plazmatické koncentrace některých antibiotik je nezbytné pro individuální antimikrobiální terapii u zvláštních populací pacientů. Takovou populací mohou být například pacienti po bariatrických operacích (Colin P a De Bock L., 2013). Dalšími případy, které vyžadují individuální terapii a její monitorování jsou pacienti s AIDS.

Stanovení hladiny antibiotik má své uplatnění i ve veterinárním lékařství, potravinové analýze nebo v ekotoxikologii. Antibakteriální látky totiž mohou být součástí potravinového řetězce některých zvířat nebo se mohou objevovat ve vzorcích ze životního prostředí. Kromě toho mohou být dále metabolizovány a výsledné produkty mohou být nebezpečné, jak pro životní prostředí, tak pro člověka (Moreno-Bondi M. C. a Marayuela M.D., 2009).

3.1.4 Léčiva proti tuberkulóze

Význam onemocnění tuberkulózou v posledních letech stále vzrůstá. Tuberkulóza postihuje především pacienty, kteří jsou nuceni žít ve velmi špatných životních podmínkách. Navíc je terapie komplikována vzrůstající rezistencí tuberkulózních bakterií vůči rutinním

antibiotikům. Úspěšná terapie je dlouhodobá a předpokládá každodenní užívání léků. Vyžaduje také kvalitní medicínskou infrastrukturu, která v mnoha oblastech světa chybí.

Ve většině onemocnění tuberkulózou je léčení kombinovanou chemoterapií úspěšné. V prvních měsících onemocnění se terapie mnohonásobně kombinuje. Podávají se: isoniazid, rifampicin, pyrazinamid. Navíc též streptomycin nebo etambutol (Lüllmann H., Mohr K., 2009).

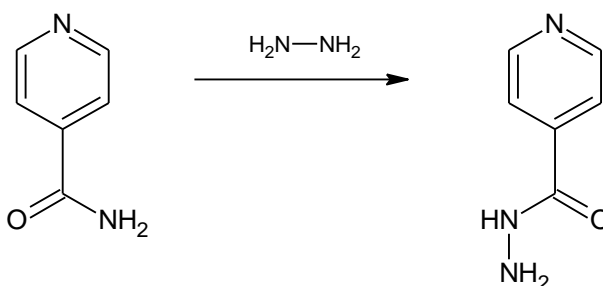
3.2 Isoniazid

Isoniazid, chemickým názvem isonikotinylhydrazid, je považován za základní a důležitou součást léčby tuberkulózy. Jedná se o baktericidní antibakteriální látku, která je účinná proti *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterim kansasii*, ale většina dalších atypických mykobakterií není isoniazidem inhibována.

Isoniazid se používá k léčbě tuberkulózy, lepry a dalších infekčních onemocnění, zvláště těch, které vyplývají z AIDS (Sabitha, P. a spol., 2010).

3.2.1 Příprava

Isoniazid lze syntetizovat mnoha různými způsoby. Nejběžnější a zároveň s nejvyšším výtěžkem je jednokroková syntéza isoniazidu konverzí z hydrazinu (Obrázek 3.1). Výtěžnost této reakce je vyšší než 95 % (w/w) a čistota produktu je více než 99 % (Subhash Ch. R. a spol., 2004)



Obrázek 3.1: Syntéza isoniazidu

Zdroj: [http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS%20Monographs/CPS-%20\(General%20Monographs-%20I\)/ISONIAZID.html](http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS%20Monographs/CPS-%20(General%20Monographs-%20I)/ISONIAZID.html)

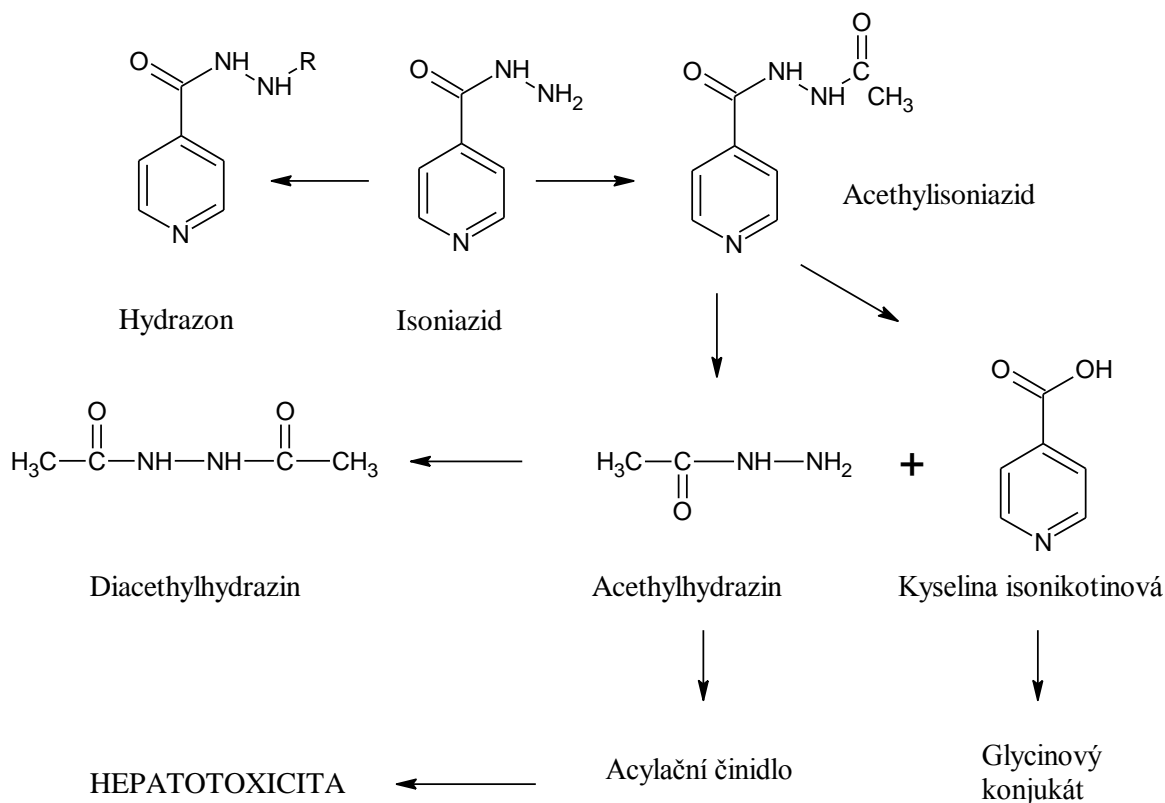
3.2.2 Mechanismus účinku isoniazidu

Na proliferující bakterie působí isoniazid baktericidně. Lehce prostupuje do buněk *Mycobacterium tuberculosis*, kde se oxiduje na kyselinu isonikotinovu za účasti enzymu katalázy a peroxidázy, obsažených v cytoplasmě bakterie. Kyselina isonikotinová pro svůj negativní náboj velmi obtížně opouští buňku, a proto se v ní kumuluje. Pravděpodobně zasahuje do metabolismu bakterie tím, že kompetuje s životně důležitou kyselinu nikotinovou, která je obsažena jako nikotinamid v NAD. To může vysvětlovat inhibici různých pochodů látkové přeměny v buňce např. syntézu kyseliny mykolové, která je specifickou součástí buněčné stěny mykobakterií (Lüllmann H., Mohr K., 2009).

3.2.3 Farmakokinetika isoniazidu

Isoniazid je snadno, rychle a téměř úplně vstřebáván. Maximální koncentrace léčiva v krvi je dosažena za 1 až 2 hodiny po perorálním podání. Biologická dostupnost je snížena antacidy a jinými látkami přítomnými v potravě, proto je podáván nalačno. Léčivo se rovnoměrně rozděluje do všech tělních tekutin, tkání, orgánů a výměšků včetně mozkomíšního moku, slin, sputa a výkalů. Léčivo také prostupuje placentou a koncentrace isoniazidu v mateřském mléce je srovnatelná s koncentracemi v jiných tělních tekutinách. Isoniazid je v méně jak 10% vázán na plazmatické bílkoviny.

Isoniazid je metabolizován v játrech a to především acylací N-acetyltransferázou na acetylisoniazid. Míra acetylace je stanovena geneticky. Acetylisoniazid je dále hydrolyzován na isonikotinovou kyselinu a acetylhydrazin. Oba tyto metabolity jsou vylučovány močí, přičemž 75% až 95% podané látky se vyloučí do 24 hodin. Malé množství je také vyloučeno slinami, hlenem a výkaly (internet 1.)



Obrázek 3.2. Metabolismus isoniazidu

R = α -ketoglutarát nebo pyruvát

Zdroj: [http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim288.htm#SectionTitle:6.4 Metabolism](http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim288.htm#SectionTitle:6.4%20Metabolism)

3.2.4 Stanovení isoniazidu

Vzhledem k tomu, že dlouhodobé podávání isoniazidu způsobuje závažné nežádoucí účinky, potřeba stanovení nízkých koncentrací z biologického materiálu roste. Terapeutická koncentrace isoniazidu v séru nebo plazmě by se měla pohybovat od 3 do 5 mg·l⁻¹ po 2 až 3 hodinách po perorálním podání. Nicméně bylo zjištěno, že většina pacientů, trpících tuberkulózou nereaguje na terapii v důsledku nízké sérové hladiny isoniazidu (<1,00 mg·l⁻¹). Tyto pacienty je třeba sledovat a jejich terapii včas upravovat specifickými dávkami, aby nedošlo k recidivě onemocnění, či rezistenci bakterií na antibiotikum. V důsledku toho je zapotřebí isoniazid stanovovat rychlou, jednoduchou a levnou metodou (Tsai I., Hsiang-Yin L., 2011).

Isoniazid lze stanovovat v krvi, v séru, v plazmě, v mozkomíšním moku a v moči. Isoniazid lze stanovovat i v mateřském mléce. Nejběžnější metodou stanovení je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí.

Podmínky separace se liší podle charakteru vzorku. Vzorek může být před samotnou separací upravován, např. vhodnou extrakcí nebo centrifugací. Volba kolony, průtoku a mobilní fáze je opět závislá na povaze vzorku a jeho množství (Lunn G, 2000)

3.2.4.1 Stanovení isoniazidu kapilární elektroforézou

Velmi účinné stanovení isoniazidu z lidského séra je možno provést kapilární elektroforézou. Toto stanovení je i velmi rychlé (uvádí se 2,5 minuty) a je zapotřebí jen malé množství vzorku. Nejcitlivější detekce je laserem indukovaná fluorescence. Separace se provádí ve fosfátovém pufru (4,00 mmol·l⁻¹ o pH 8,5) obsahující luminal (0,080 nmol·l⁻¹) a lze stanovit vzorek o koncentraci v nmol·l⁻¹.

Tato metoda byla navržena pro zjištění stopových množství isoniazidu v lidském séru. Vzhledem k vysokým nákladům laserem indukované detekce se používá UV detektor. Ten však má nízkou citlivost vzhledem k malému množství vzorku (Liu, Y., a spol, 2011).

3.2.4.2 Stanovení isoniazidu metodou hydrofilní interakční kapalinové chromatografie

Pro stanovení isoniazidu a acetylisoniazidu v lidské plazmě byla vyvinuta a validována metoda hydrofilní interakční kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Tato metoda je jednoduchá a rychlá, což je výhodné vzhledem k nízké stabilitě isoniazidu v lidské plazmě.

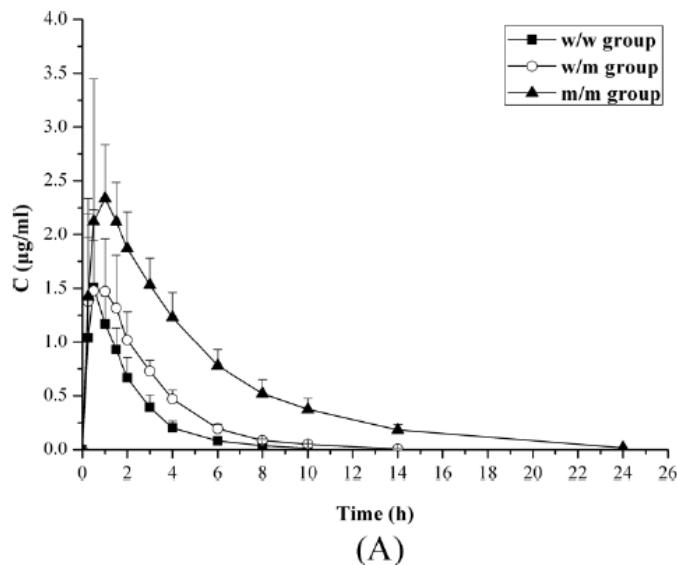
Příprava vzorku je snadná. Bílkoviny z plazmy byly odstraněny precipitací acetonitrem a následnou centrifugací (10 minut, 12000 g). Horní organická vrstva byla odebrána a odpařena a supernatant byl rekonstituován se 100 ml acetonitrilu. Výtěžnost tohoto kroku je větší než 70% jak pro isoniazid, tak pro acetylisoniazid (Obrázek 3.3).

Tabulka 3.1: Výtěžnosti separačního kroku pro isoniazid a acetylisoniazid (n=5)

Léčivo	Koncentrace [ng·ml ⁻¹]	Účinnost extrakce (%)	CV (%)
isoniazid	10	73,58 %	7,20 %
	500	84,91 %	4,73 %
	4000	83,81 %	3,62 %
acetylisoniazid	10	70,12 %	6,22 %
	500	74,75 %	7,26 %
	4000	80,03 %	6,47 %
vnitřní standard	200	80,71 %	8,59 %

Takto připravený vzorek byl dávkován přímo na kolonu (silikagel). Jako mobilní fáze byla použita voda s obsahem 0,05 % kyseliny mravenčí (0,9 %) a acetonitril (91 %) průtoková rychlost byla 0,28 ml za minutu a retenční čas 7 minut. Detekce byla provedena na API 4000 MS QtrapMS/MS systému vybaveným elektrosprejem. Linearita metody byla zajištěna v rozsahu koncentrací od 5 do 50 ng·l⁻¹, směrodatná odchylka byla menší než 15%.

Cílem této práce bylo stanovení koncentrace isoniazidu a acetylisoniazidu v závislosti na čase, po jednorázovém perorálním podání 100 mg isoniazidu 24 zdravým dobrovolníkům s homozygotními, heterozygotními a mutovanými alelami NAT2*4, a sledováním farmakokinetiky u těchto genových skupin (Obrázek 3.3) (Cao, X. a spol., 2012).



Obrázek 3.3: Průměrná plazmatická koncentrace isoniazidu po jednorázovém perorálním podání 100mg(w/w group – homozygot, w/m group – heterozygot, m/m group – mutace obou alel.)

Zdroj: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=10&sid=9bbbc49d-4360-4e39-9eff-288441b7c36b%40sessionmgr198&hid=127>

3.2.4.3 Stanovení isoniazidu metodou lokalizované plazmonové rezonance zprostředkované zlatými nanočásticemi

Povrchová plazmonová rezonance (LSPR) je děj, při kterém dochází ke změně rezonančního úhlu odrazu monochromatického záření od povrchu zlata, stříbra a dalších prvků, resp. ke změně rezonanční frekvence (vlnočtu) při fixním úhlu odrazu. Tento jev je důsledkem vzniku rezonance mezi zářením a povrchovými elektrony kovu (vznik tzv. povrchových plazmonů na rozhraní kov/dielektrikum). Měření se nejčastěji provádí sledováním závislosti intenzity odraženého monochromatického záření na úhlu odrazu nebo sledováním závislosti intenzity odraženého polychromatického záření v konstantním úhlu v závislosti na vlnové délce (resp. vlnočtu) (internet 2).

Speciálním případem povrchových plazmonů jsou lokalizované povrchové plazmony. Jsou to vlastně excitace vodivostních elektronů v kovových nanostrukturách konečných rozměrů spřažené s elektromagnetickým polem. Proto jim říkáme, lokalizované, neboť pohyb elektronů je omezen velikostí a tvarem nanočástic (Maier S. A., 2007).

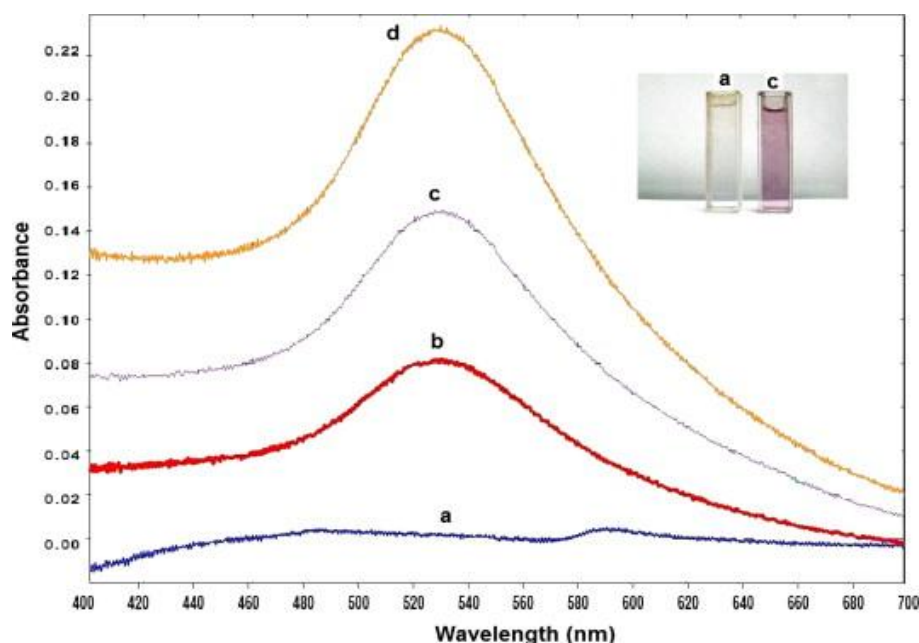
Nanočástice (nanomateriály s průměrem menším než 100 nm) mají jedinečné optické, magnetické, elektrochemické a katalytické účinky. Mezi nimi jsou nejvíce studovány

nanočástice zlata pro jejich jedinečné optické vlastnosti, které jsou známé jako povrchová plazmová rezonance.

Pokud jsou nanočástice zlata rozptýleny v kapalných roztocích, mají tyto roztoky specifickou barvu, která je ve viditelné oblasti spektra. Tato barva je závislá na tvaru a velikosti částic, jejich složení a rozteči mezi částicemi.

Pokud jsou zlaté nanočástice vystaveny elektromagnetickému záření, barva roztoku mění barvu z červené na žlutou. Tato změna může být sledována UV/VIS spektrofotometrem a lze takto detekovat množství některých chemických látek. Stanovení isoniazidu pomocí LSPR je levné a bezpečné. Tato metoda je vhodná pro stanovení koncentrace isoniazidu v léčivech.

Isoniazid ($1 \text{ ml}, 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), fosfátový pufr ($\text{pH } 8, 0,5 \text{ ml}$), SDS pufr ($0,5 \text{ ml}, 1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) a roztok zlata ($2 \text{ ml}, 100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byly převedeny do 10 ml odměrné baňky a doplněny destilovanou vodou. Do 5 až 6 minut se část směsi převede do kyvety pro spektrofotometrický záznam absorbance (530 nm). UV/VIS spektra, která vyplývají z barevných změn směsi v přítomnosti různých koncentrací isoniazidu, jsou uvedena na Obrázku 3.4 (Zargar B a Hatamie A, 2013)



Obrázek 3.4: UV/VIS absorpční spektrum zlatých nanočástic v roztoku o různých koncentracích isoniazidu (roztok (a) blank, (b) $3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, (c) $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a (d) $8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ isoniazidu)

Zdroj: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142513000292>

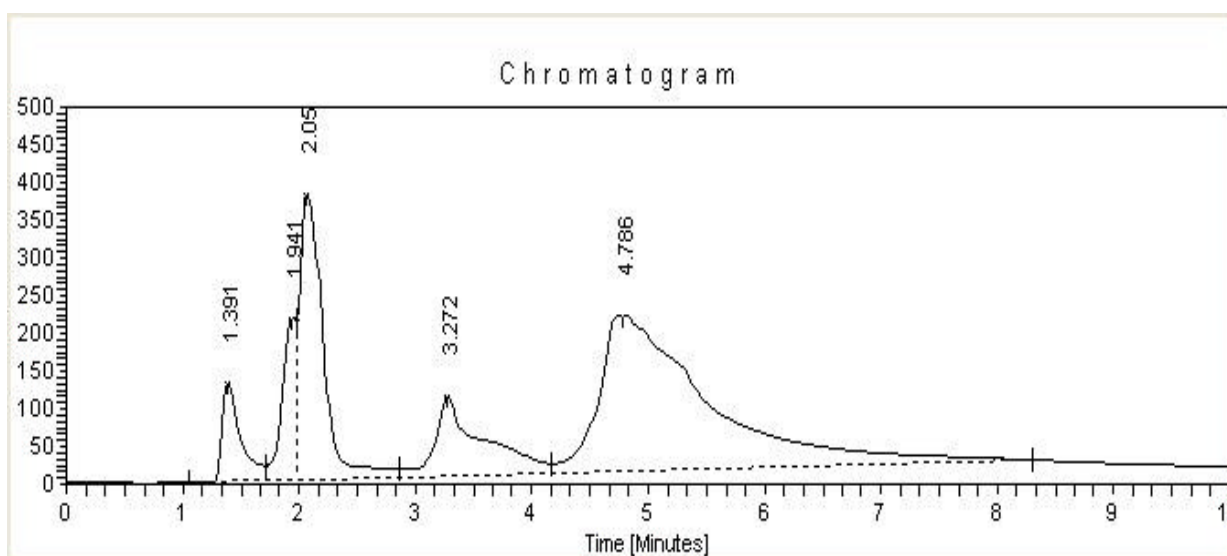
3.2.4.4. Stanovení isoniazidu v plazmě metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi

Stanovení isoniazidu v plazmě metodou RP - HPLC je jednoduchá, citlivá metoda, vhodná pro farmakokinetické studie.

Separace probíhala na koloně s reverzní fází (C18) se složením mobilní fáze tvořenou fosfátový pufr (pH 7,4) a methanolem v poměru 98:2. Detekce probíhala při vlnové délce 261 nm, retenční čas isoniazidu byl 5,96 min.

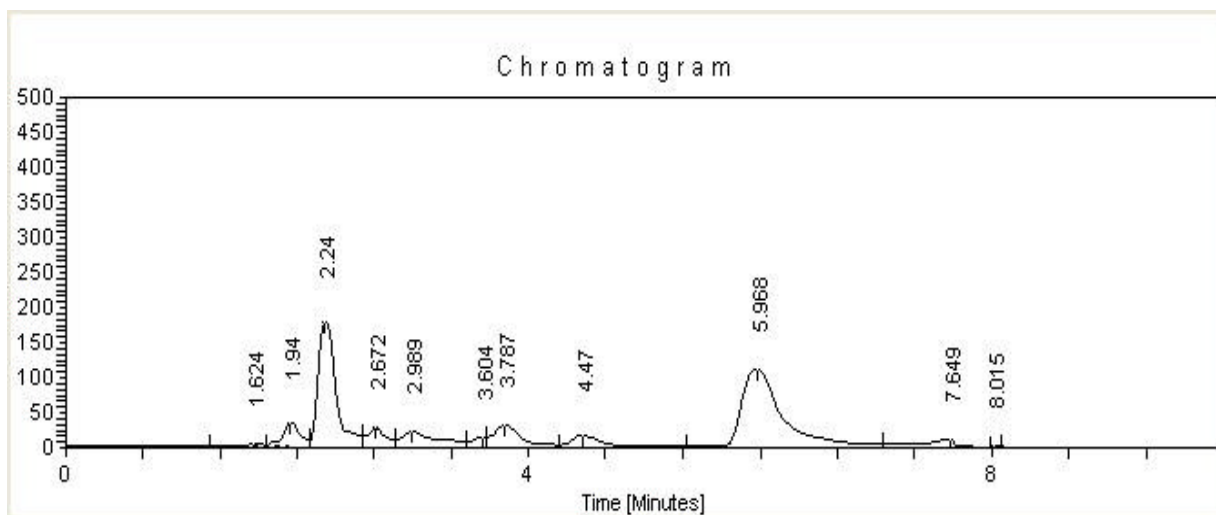
Plazma s různými koncentracemi isoniazidu ($0,05 - 20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) byla nejprve deproteinována přidáním 50 μl kyseliny trichloroctové (10 %) v acetonitrilu, 5 minut vortexována a centrifugována při 3000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Z plazmy bylo odebráno 50 μl supernatantu, který byl neutralizován octanem amonným (0,5 M, pH 8,4) a nadávkován přímo na kolonu.

Detekční limit by určen na základě stanovení koncentrace isoniazidu ve třech kalibračních standardech, které mají reprodukovatelnost s variačním koeficientem méně než 20 %. Nejnižší možná měřitelná koncentrace byla $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ s variačním koeficientem (CV) 18 %. Přesnost metody se pohybovala od 98,40 ($\pm 1,21$) do 99,21 ($\pm 0,79$); (\pm relativní směrodatná odchylka RSD) % (Sabitha, P. a spol., 2010).



Obrázek 3.5: Chromatogram plazmy

Zdroj: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=5&sid=0ad728dd-5048-4d42-907d-7f33291da873%40sessionmgr198&hid=125>



Obrázek 3.6: Chromatogram isoniazidu v plazmě, retenční čas isoniazidu je 5,968 minut

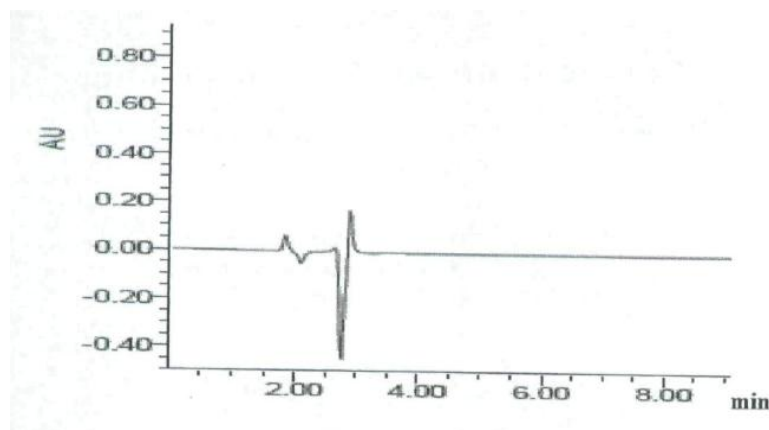
Zdroj: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=5&sid=0ad728dd-5048-4d42-907d-7f33291da873%40sessionmgr198&hid=125>

3.2.4.5 Stanovení isoniazidu v krysí plazmě vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Pro stanovení isoniazidu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detekcí byla použita chromatografická kolona C18 (250 x 4,6 mm). Mobilní fází byl methanol a octanový pufr (pH 5,0) v poměru 20:80, průtoková rychlost byla 1 ml za minutu. Detekce probíhala při 270 nm.

Dávky isoniazidu byly stanoveny v závislosti na linearitě farmakokinetických parametrů u potkanů. Na zvíře o hmotnosti 200 g tak připadá dávka 1 mg isoniazidu. Vzorky krve byly deproteinovány acetonitrilem (0,5 ml) a centrifugovány (10 min, 4000 otáček).

Metoda se ukázala být lineární v rozmezí koncentrací 0,020 – 10,000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ isoniazidu. Získaná kalibrační křivka má korelační koeficient $R^2 = 0,9997$ (Garbulet D. a Dorneanu V, 2009).



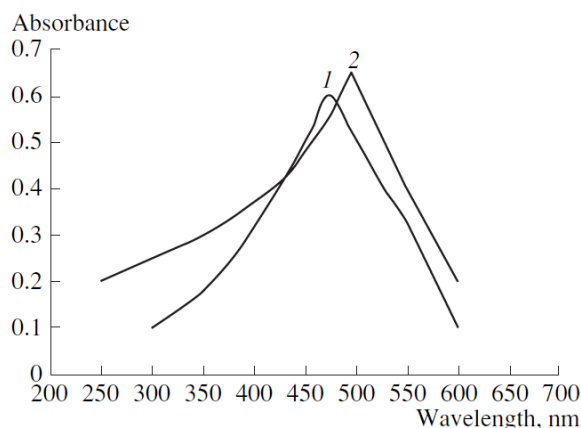
Obrázek 3.7: Chromatografický záznam standardního roztoku isoniazidu

Zdroj: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=6&sid=0ad728dd-5048-4d42-907d-7f33291da873%40sessionmgr198&hid=118>

3.2.4.6 Jednoduché a citlivé spektroskopické stanovení isoniazidu a ritodrin hydrochloridu v čisté formě nebo ve farmaceutických přípravcích

Ritodrin hydrochlorid, chemicky známý jako 1-(4-hydroxyfenyl)-2-[2-(4-hydroxyfenyl) ethylamino] propanol, je silné tokolytické léčivo, které se podává ke zvrácení předčasného porodu vinou nadměrné aktivity dělohy.

Metoda ke stanovení isoniazidu i ritodrin hydrochloridu je založena na diazotaci 4,4'-metylenbis(3-nitroanilinu) (0,2%) a následné kopulační reakci s isoniazidem nebo ritodrinem v kyselém prostředí. Při tomto stanovení nebylo zapotřebí žádného oxidačního činidla a barevná změna byla okamžitá. V případě isoniazidu vzniklo fialové zbarvení, ritodrin hydrochlorid byl zbarven červeně. Absorbance byla měřena při 495 nm a 473 nm v tomto pořadí pro obě látky (Obrázek 9). Pro isoniazid byla stanovena mez detekce $0,3182 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, korelační koeficient kalibrační křivky $R^2=0,9950$ a směrodatná odchylka ($n=10$) 0,32. Pro ritodrin hydrochlorid byla stanovena mez detekce $0,2032 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, korelační koeficient kalibrační křivky $R^2 = 0,9999$ ($n=10$) (Krishnamurthy N. a G., Suvadhan K. G, 2005).



Obrázek 8: Spektroskopické záznamy isoniazidu (1) a ritodrinu s methylenbis(3-nitroanilinem), (n = 10)

Zdroj: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=7&sid=0ad728dd-5048-4d42-907d-7f33291da873%40sessionmgr198&hid=117>

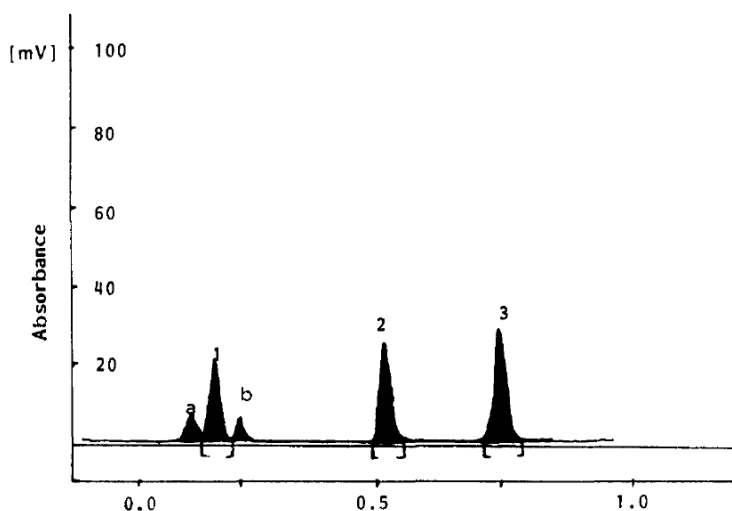
3.2.4.7 Současné stanovení rifampicinu, isoniazidu a pyrazinamidu vysokoučinnou chromatografií na tenké vrstvě

Kombinace rifampicinu, isoniazidu a pyrazinamidu při léčbě tuberkulózy je běžná, ale efektivní metoda pro jejich současné stanovení stále chybí. Sice byla navržena metoda RP – HPLC, ale nutnost použití kyseliny fosforečné (pH 3,0) během analýzy významně zkracovala životnost kolony. Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC) je pro toto současné stanovení účinnou alternativou.

Bylo naváženo 50 mg všech standardních látek, které byly převedeny do 50 ml odměrné baňky a rozpuštěny směsí chloroformu a methanolu (v poměru 60:40). Z tohoto roztoku byly odebrány 2 ml do další 50 ml odměrné baňky a opět zředěny směsí chloroformu a methanolu. Tímto způsobem byl připraven standardní roztok.

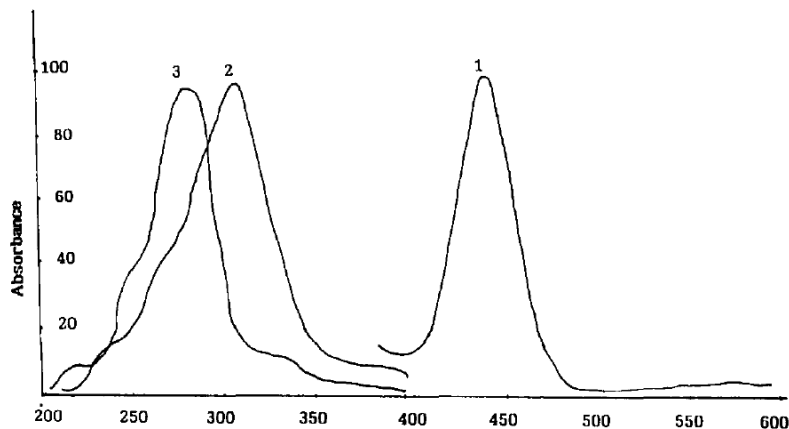
Připravený standardní roztok (3 μ l) byl nanesen na tenkou vrstvu (Merck 60 F 254 HPTLC skleněná deska po promytí 0,01 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dihydrogenfosforečnanu draselného fosfátového pufru pH 5,0 a sušení při 100 °C). Destička byla nasycena po dobu 20 minut, jako mobilní fáze byla použita směs ethyl-acetátu, amoniaku (6,75 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), ethylalkoholu a cyklohexanu (v poměru 20:9:4,5:5). Koncentrace látek byla detekována denzitometricky s UV detekcí v rozdílných vlnových délkách: 440 nm pro rifampicin a 275 nm pro isoniazid a pyrazin amid.

Vzorky léčiv byly zpracovány a proměřovány stejně, jako standardní roztok a jejich koncentrace byla vypočítána pomocí externího standardu kvantifikace. Získané výsledky byly porovnány s výsledky pořízenými metodou HPLC.



Obrázek 3.9: Denzitogram. (1) rifampicilin: (a) 25-desacetyl rifampicin, (b) rifampicin chinon; (2) isoniazid; (3) pyrazinamid

Zdroj: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708596017876>.



Obrázek 3.10: UV/VIS spektrum (1) rifampicilin; (2) isoniazid; (3) pyrazinamid

Zdroj: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708596017876>

Metodou HPTLC bylo zjištěno množství rifampicinu, isoniazidu a pyrazinamidu v jedné tabletě: 122,89 mg (RSD 1,73%), 80,36 mg (RSD 1,58 %) a 252,02 mg (RSD 1,58%). Výsledky získané metodou HPLC pro rifampicilin, isoniazid a pyrazinamid v jedné tabletě: 121,80 mg (RSD 1,23%), 80,56 mg (RSD 1,84%) a 251,56 mg (RSD 0,32%). Obě tyto metody jsou tedy srovnatelné (Argekar A.P., 1996).

3.2.5. Nežádoucí účinky isoniazidu

Isoniazid se v rámci terapie podává s dalším antibiotikem – rifampicinem. Tato kombinace léků je velmi účinná, ale způsobuje poškození nebo selhání jater. Jakmile se toto poškození projeví, léčebný režim musí být změněn, nebo zrušen, což může vést k relapsu onemocnění, k rezistenci mykobakterií vůči antibiotiku a následně ke smrti pacienta (Feng L. a spol. 2013).

Selhání jater bylo diagnostikováno při zvýšení sérové hladiny ALP nebo AST, kdy naměřená koncentrace těchto enzymů až trojnásobně překročila fyziologickou mez. U celkového bilirubinu bylo toto překročení dvojnásobné.

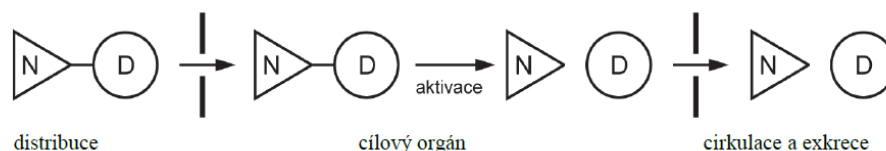
Dalšími pozorovanými nežádoucími účinky jsou kožní vyrážka, svědění, cytopénie, oční toxicita, celková slabost a gastrointerstinální problémy včetně nevolnosti, zvracení a anorexie (Kim S.Y. a spol. 2013).

3.3. Polymerní proléčivo

Polymerní proléčivo je forma léčivé látky, která zůstává neaktivní, dokud není doručena na místo účinku, kde je aktivována pro dané místo specifickými podmínkami (Khandare, J. a Minko T., 2006), lze jej tedy chápat jako neaktivní prekurzor léčiva. K uvolnění vazby mezi polymerem a vlastní léčivou látkou je využito specifických buněčných enzymů, které jsou součástí běžných metabolických procesů. Cílem těchto proléčiv je odstranění nebo potlačení některých nežádoucích vlastností léčiv. Bývá to např. nízká nebo naopak vysoká rozpustnost v tělních tekutinách a s tím spojená nedostatečná dostupnost léčiva do místa účinku. Proléčiva řeší i další nevhodné vlastnosti jako jsou stabilita, zápach nebo nepříjemná chuť (HAMPL, F. a spol., 2006).

Mezi nejpoužívanější polymerními nosiče jsou nosiče na bázi poly(ethylenglykolu). Dále také přírodního polysacharidu dextransu, syntetických poly(α -aminokyselin) apod (Kopeček, J. a Kopečková, P, 2010).

Princip uvolňování léčivé látky z polymerního proléčiva je znázorněn na Obrázku 3.11. Účinná látka navázaná v polymerním proléčivu je inaktivní, ale jakmile je enzymaticky uvolněno, stává se opět aktivním (Khan, M. O. F. a spol., 2005)



**Obrázek 3.11: Princip uvolňování léčivé látky z polymeru
N – polymerní nosič, D – léčivá látka, | - bariéra**

Zdroj: http://dspace.upce.cz/bitstream/10195/45800/3/GrusovaL_Synteza%20%5BmPEG-b-PLL%5D-INH_AI_2012.pdf

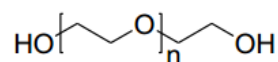
V současnosti jsou nejvíce využívány tři modely polymerních proléčiv. Proléčiva prvního typu uvolňují léčivou látku přímo uvnitř buňky. Druhý typ obsahuje ve své struktuře více komponent, které spolu za specifických podmínek reagují a vytvoří léčivou látku, která je pak uvolněna. Třetí typ obsahuje tři složky: léčivou látku, polymerní nosič a jednotku, která zacílí konjugát na místo účinku (Khandare, J. a Minko, T., 2006)

3.4 Polyethylenglykoly

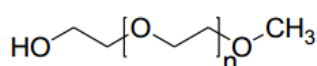
3.4.1. Fyzikální a chemické vlastnosti

Poly(ethylenglykol) (PEG) je polymer s obecným vzorcem $H(OCH_2CH_2)_nOH$, kde n je číslo větší nebo rovno 4. Molekulová hmotnost se pohybuje obvykle v rozmezí od 200 do 40 000 $g \cdot mol^{-1}$ a je závislá na n . PEGy o molekulové hmotnosti 200 – 600 $g \cdot mol^{-1}$ jsou čiré hygroscopické viskózní kapaliny, nad 1000 $g \cdot mol^{-1}$ jsou to vosky a od 5000 $g \cdot mol^{-1}$ jde o bílý prášek. Nad 1 000 $g \cdot mol^{-1}$ vosky a od 5 000 $g \cdot mol^{-1}$ jsou práškové, ve formě destiček, vloček, chipsů nebo i v krystalické formě, protože díky šroubovicové struktuře dobře krystalizují z některých rozpouštědel. PEG s molární hmotností nad 20 000 $g \cdot mol^{-1}$ je obvykle označován jako poly(ethylenoxid) (PEO), poly(oxyethylen) (POE), nebo polyoxiran (PO). (Budavari, S, 1996, Vokurka, M. a Hugo, J., 2009)

Nečastěji používanými lineárními poly(ethylenglykoly) jsou bifunkční poly(ethylenglykol) a monofunkční α -methoxy-poly(ethylenglykol) (mPEG) (Obrázek 3.12)



poly(ethylenglykol)



α -methoxy-poly(ethylenglykol)

Obrázek 3.12: Základní typy poly(ethylenglykoly)

Zdroj: http://dspace.upce.cz/bitstream/10195/45800/3/GrusovaL_Synteza%20%5BmPEG-b-PLL%5D-INH_AI_2012.pdf

PEG jsou dobře definované, snadno syntetizovatelné polymery s jedinečnými vlastnostmi, které umožňují jejich použití v širokém spektru aplikací jak v základním výzkumu, tak pro speciální účely. PEG a jejich deriváty jsou rychle se rozvíjející oblastí v chemických, biomedicínálních a biotechnologických aplikacích, nejen díky jejich nízké ceně, ale i mnoha výhodným vlastnostem.

Nízkomolekulární PEG je využíván jako rozpouštědlo nebo jako levná náhrada crown etherů. Vysokomolekulární je díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem čím dál více využíván ve farmacii jako nosič léčiv, emulgátor v potravinářství či kosmetice a bývá obsažen v zubních pastách. Užívá se v přípravě na kolonoskopii (čištění střeva), event. i jako laxativum. Povrchy některých lékařských nástrojů přicházející do styku s krví bývají pokryty polyethylenglykolovou vrstvou. U pokusných zvířat je vysokomolekulární PEG 8000 perorálně účinný v prevenci karcinomů tlustého střeva a PEG 2000 vykazuje urychlení reparace po úrazech míchy (Vokurka, M. a Hugo, J., 2009).

3.4.2 Stabilita a toxicita poly(ethylenglykolu)

PEG jsou schopné tvorby komplexů s širokou paletou kovů. Jsou biologicky dobře snášenlivé a snadno chemicky modifikovatelné nejrůznějšími reaktivními skupinami pomocí rutinních chemických postupů (Sedlák, M., 2005).

Ochotně se rozpouští v roztocích aromatických uhlovodíků, např. benzenu, pouze nepatrně se rozpouští v diethyletheru (Richardson, M. L. a Gangolli, 1994, Budavari, S., 1996). Jsou bez zápachu, tepelně stabilní a inertní vůči mnoha organickým látkám. Mají nízký tlak par a jsou hořlavé (Lewis, R. J., 2007). Lineární PEG vykazují vysokou schopnost eliminace látky z organismu, farmakology vyjádřenou pomocí veličiny nazývané clearance. Fyzikální význam clearance je objem, obvykle krevní plazmy, „očištěný“ od sledované látky za jednotku času (Hampl, F. a spol., 2007)

Organizací FDA (U.S. Food and Drug Administration) byly PEGy schváleny pro širokou škálu biomedicínálních aplikací. Hydrofilní charakter zajišťuje dobrou rozpustnost na něj vázaným hydrofobním molekulám

Toxicita poly(ethylenglykolu) je velmi nízká. Nezpůsobuje akutní dermální, či orální intoxikaci.

3.4.3. Poly(ethylenglykol) jako nosič léčiv

Většina léků za účelem jejich farmakologického účinku musí překonat velké množství překážek před dosažením požadovaného místa účinku. Např. stěvní bariéra, mozkomíšní bariéra, metabolické reakce. Aby se léčivo necíleně a pozvolna distribuovalo po celém těle, je nutné ho navázat na vhodný nosič, díky kterému léčivo rychle a efektivně dosáhne místo účinku bez předchozí systémové distribuce (Wang, B. a spol., 2005).

Jako hlavní funkce modifikace PEG je efektivní zvyšování životnosti proteinů a tím pádem jejich hladiny v krvi. K dalším důležitým funkcím patří selektivní distribuce a transport léku do cílového místa účinku.

PEG s vlastnostmi vysoce hydrofilního polymeru s velmi nízkou toxicitou je široce používán jako nosič léčiv, dále přispívá ke zlepšení jejich stability a farmakokinetiky (Yoshino, K., 2012). Modifikace PEG, respektive připojení poly(ethylenglykolových) polymerů k léčivé složce, je jednou z nejlepších metod vedoucích ke zlepšení účinku léčiva (Li, W. a spol., 2013).

PEG je nad molekulovou hmotnost $M = 400$ netoxický, neantigenní a resistantní k rozpoznávání imunitním systémem v organismu. Základní kostra PEG s mnohonásobně vyšší molekulovou hmotností, než je léčivo na něj vázané, obecně předurčuje vlastnosti celého konjugátu. Původně špatně rozpustné aktivní látky jsou převedeny na látky rozpustné v mnoha rozpouštědlech, včetně vody. Následné reakce tak mohou být prováděny v homogenních systémech, což vede ke zkrácení reakční doby, zvýšení konverze a výtěžku.

Jedním z důležitých důvodů pro aplikaci PEG jako modifikátoru biologicky aktivních látek je jeho strukturní jednoduchost. PEG má chemicky inertní páteř a dvě, nebo v případě mPEG jednu funkční reaktivní koncovou skupinu. Strukturou je limitován počet míst pro vazbu reaktivních molekul. Tato slabá místa byla překonána tvorbou blokových kopolymerů alternujících segmentů PEG a různých aminokyselin (Lys, Asp, Glu a další) (Grusová L., 2012).

3.4.4 Farmakokinetické vlastnosti poly(ethylenglykolu)

Poly(ethyleneglykol) je hojně využívaný díky své velmi dobré rozpustnosti ve vodě, což má za následek zvýšení jeho hydrodynamického poloměru. Tento nárůst hydrodynamického poloměru může vést k rapidnímu snížení renální clearance a tím se

podstatně zvýší expozice léčiva v organismu. Takto zvýšená expozice mění farmakokinetické, absorpční a metabolické vlastnosti léčiva (Longley C. B. a spol., 2013)

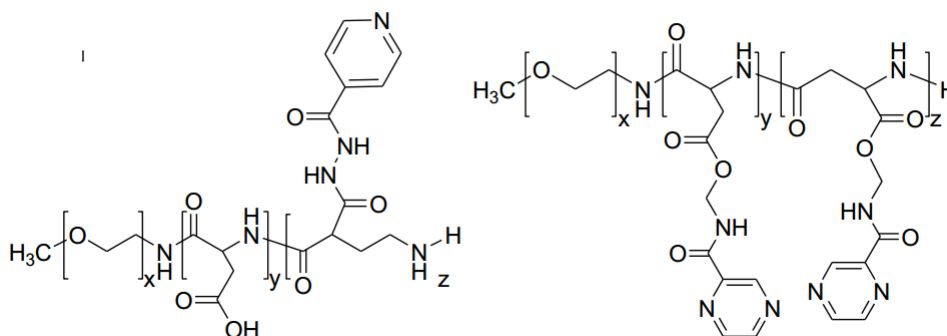
Samotná molekula proléčiva (léčivo – PEG) je farmakologicky neaktivní a je tedy pro jejich aktivaci je nutné chemické nebo enzymatické štěpení (Greenwald, R. B., 2001, Stella V. a spol., 1985).

Tradičně je proléčivo navrženo dvojitým způsobem. Buď dochází k rychlému uvolňování léčiva z vazby na PEG, aby bylo distribuováno dále, nebo k postupnému uvolňování, které má za následek konstantní hladinu léčiva v krevním oběhu (Stella V. a spol., 1985)

3.4.5 Antimykobakteriální léčiva a poly(ethylenglykol)

PEG s antimykobakteriálními léčivy, konkrétně isoniazidem a pyrazinamidem tvoří hydrofilní micelární struktury, čímž zvyšuje rozpustnost léčiva ve vodě, zvyšuje stabilitu léčiva a zároveň umožňuje transport přes biologické membrány. Pro transport přes biologické membrány je rozhodující velikost micel, která se dá řídit délkou řetězce polymeru. Byl připraven ROP blokový kopolymer α -methoxy-poly(ethylenglykol)-*b*-poly (asparagová kyselina) (mPEG-*b*-PAsp) a posléze byl na volné karboxylové skupiny jednotek kyseliny asparagové navázán isoniazid reakcí za přítomnosti EDC.

Obdobně byl připraven také konjugát kopolymeru mPEG-*b*-PAsp s pyrazinamidem. Oba popisované konjugáty jsou uvedeny na Obrázku 4.13 (Silva, M. a spol., 2001, Silva, M. a spol., 2006).



Obrázek 4.13: Molekula konjugátu isoniazidu s mPEG-*b*-PAsp a pyrazinamidem

Zdroj: http://dspace.upce.cz/bitstream/10195/45800/3/GrusovaL_Synteza%20%5BmPEG-b-PLL%5D-INH_AI_2012.pdf

3.4.6 Další využití

Další farmaceutickou vlastností PEG je schopnost snižovat biologickou imunogenitu antigenních epitopů, takže je vhodný pro konjugaci proteinů. Studie *in vitro* ukázaly, že polyethylenglykované látky se hromadí v nádorových buňkách a snižují tak odvodnění lymfou (Longley C. a spol., 2013).

Kromě farmaceutického využití mají PEGy uplatnění také jako textilní vlákna, ve vodě rozpustná mazadla, obaly na potraviny, leštidla, látky pro výrobu vlasových a kosmetických přípravků, detergenty, antistatická činidla, katalyzátory, elektrolyty, rozpouštědla či v keramickém průmyslu (Greenwald, R. B., 2001, Stella V. a spol., 1985).

3.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

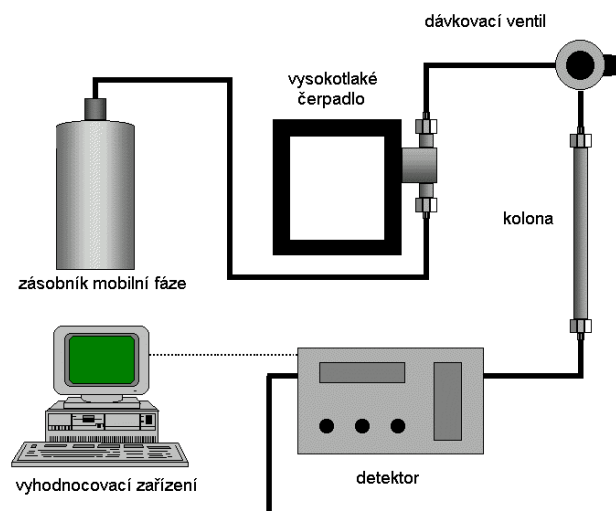
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) je fyzikálně-chemická separační metoda, založená na distribuci složek vzorku mezi dvě různé, navzájem nemísitelné, fáze. Jedna fáze je mobilní (pohyblivá), druhá stacionární (nepohyblivá) fáze (internet 3).

Separace probíhá v koloně, kde se jako stacionární fáze využívá sorbent v pevném skupenství a jako mobilní fáze je zde kapalina. Separace probíhá za zvýšeného tlaku. Rozdílné látky ve směsi se váží s rozdílnou afinitou ke stacionární fázi. Tím dochází k rozdělování složek směsi mezi stacionární a mobilní fázi.

Různé sorbenty zadržují složky stanovované látky na základě různých interakcí: hydrofobní interakce (van der Waalsovy síly), interakce dipól-dipól, vodíkové vazby, či elektrostatická interakce (Churáček, J. 1990). Při postupu kolonou se složky zadržují na sorbentu a k detektoru dojdou v různých retenčních časech.

3.5.1 Instrumentace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Každý HPLC přístroj se skládá z čerpadla pro dávkování mobilní fáze, dávkovacího zařízení, kolony pro samotnou separaci, detektoru pro vizualizaci separovaných složek a počítače pro zpracování dat (Obrázek 3.14). Součástí je i regulátor konstantní teploty kolony, který je důležitý pro úspěšnou reprodukovatelnost. Moderní přístroje jsou schopny mísit více rozpouštědel pro mobilní fázi a jejich poměr upravovat v průběhu analýzy. Dále je možno použít doplňkových filtrů či předkolon případně zařízení pro odplyňování mobilní fáze (Lewis, R. J., 2007).



Obrázek 3.14: Základní schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Zdroj: <http://www.lcresources.com/resources/getstart/generic%20HPLC.gif>

3.5.1.1 Kolony pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii

Chromatografické kolony v HPLC (Obrázek 3.15) jsou trubky nebo kapiláry, naplněné nebo pokryté stacionární fází, která poskytuje prostředky pro oddělování směsi látek. Tato kolona by měla být chemicky inertní, odolná vůči vysokému tlaku a její vnitřní povrch by měl být dostatečně hladký.

Nejběžnějším materiálem pro výrobu kolony je nerezová ocel, plasty nebo sklo. Rozměry kolon závisí na účelu, ke kterému mají být použity. Vnitřní průměr kolony bývá nejčastěji 2 – 4 mm a délka kolony 50 – 300 mm (Lewis, R. J., 2001, internet 4).



Obrázek 3.15: Ukázka chromatografických kolon

Zdroj: <http://www.directindustry.com/prod/cvc-micro-tech/hplc-columns-62614-401962.html>

Kolony jsou naplněny stacionární fází, porézními sférickými mikročásticemi s průměrem 3 – 10 μm . Na velikosti částic závisí účinnost kolony. S klesajícím průměrem částic se účinnost zvyšuje. Kolony jsou nejčastěji plněny oxidem křemičitým, který je modifikován navázáním vhodných funkčních skupin. Podle polaritý stacionární fáze, rozeznáváme normální HPLC (NP-HPLC) a reverzní HPLC (RP-HPLC). U NP-HPLC je použita stacionární fáze polárnější než mobilní fáze a u RP-HPLC je tomu naopak. Stacionární fází může být i granulovaný iontoměnič. V takovém případě se jedná o iontově výměnnou chromatografii (IEC – Ion Exchange Chromatography). Použitím mikroporézních sorbentů lze získat gelovou permeační chromatografii (Opekar, F., 2002).

3.5.1.2 Stacionární fáze ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu (3-10 μm), na kterých bývá navázána vlastní stacionární fáze. Ta může být tvořena nepolárními uhlovodíky (C8 – oktan, C18 – oktadekan) nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou (např. -CN apod.) (internet 5).

3.5.1.3 Mobilní fáze s obrácenými fázemi

Mobilními fázemi v HPLC s opačnými fázemi mohou být voda, acetonitril nebo metanol a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrý a další. Zásobníků mobilní fáze může být více a lze je vzájemně mísit v různém poměru, který se může v průběhu analýzy změnit (internet 5).

3.5.1.4 Detektory

Dalším důležitým prvkem chromatografického přístroje je detektor, který generuje záznam o přítomnosti a množství složek vzorku po eluci z kolony (Sun, Da-Wen, 2008).

Nejpoužívanějším detektorem je spektrofotometrický detektor pro UV/VIS, který pracuje v rozmezí vlnových délek 200 – 800 nm. Dále je možno využít fluorimetrický detektor, refraktometrický detektor (Churáček, J., 1990) či elektrochemické detektory, mezi něž patří vodivostní detektor a amperometrický detektor (Opekar, F., 2002).

Asi nejvýznamnějším detektorem je dnes hmotnostní spektrometr, který umožňuje přímou identifikaci separovaných látek na základě získaných hmotnostních spekter. Základem je převedení vzorku na kladné či záporné ionty (ionizace), které jsou následně převedeny do plynného skupenství a děleny v elektrickém a magnetickém poli podle svých efektivních

hmotností m/z (poměr hmotnosti fragmentu ku jeho náboji). Ionty jsou detekovány elektronovými násobiči, novější přístroje mají fotonásobiče či mnohokanálové CCD detektory.

3.6 Detekce ve viditelném a ultrafialovém spektru

Spektrometrie v UV oblasti měří absorpční spektra molekul v blízké UV (Ultra Violet) části spektra o vlnových délkách 200 – 400 nm. Viditelné záření je zaznamenáváno v oblasti vlnových délek 400–800nm (internet 3).

Elektromagnetické záření má takovou energii, že při průchodu vzorkem je schopno vyvolat přechod valenčních elektronů do energeticky vyšší hladiny za současné změny vibračních a rotačních stavů molekuly (Anderson, R. a spol. 2004).

UV/VIS detektory mohou být použity v rozsahu vlnových délek 200-900 nm za předpokladu, že má stanovovaná látka chromofory, které absorbují v ultrafialové, či viditelné oblasti spektra. Tyto chromofory mohou obsahovat nenasycené dvojně vazby (včetně aromatických kruhů), dále pak brom, jod, nebo karbonylové zbytky (Higson, S., 2004).

Při kvantitativním stanovení se nejčastěji využívá metody kalibrační křivky, méně často metoda standardního přídávku. Nejvhodnější je použít lineární část kalibrační křivky. K výpočtu koncentrace látky ve vzorku se využívá Lambert-Beerova zákona (Rovnice 1):

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

Rovnice 1: Lambert-Beerův zákon

kde A je absorbance, l je tloušťka absorbující vrstvy [cm], c je koncentrace absorbující složky [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] a ε je molární absorpční koeficient [$\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]. Spektrum se většinou vyjadřuje jako závislost absorbance na vlnové délce λ (internet 3)

V kvalitativní analýze není UV/VIS spektrometrie příliš významnou metodou. K identifikaci látek lze využít knihovny spekter ve spojení s jinými identifikačními metodami (IR, NMR, MS). Metodu lze použít ke stanovení čistoty organických sloučenin (Anderson, R., a spol. 2004).

Pro měření je nutno používat rozpouštědla, která neabsorbují v UV či VIS oblasti, aby nedocházelo k interferencím. Takovými rozpouštědly jsou například hexan, methanol či

ethanol. Kyvety jsou zhotoveny z křemene, jelikož sklo UV záření absorbuje. K měření ve viditelné oblasti se již skleněné kyvety používat mohou (Higson, S., 2004).

3.6.1 Instrumentace

3.6.1.1 Detektory pro ultrafialovou/viditelnou spektrometrii

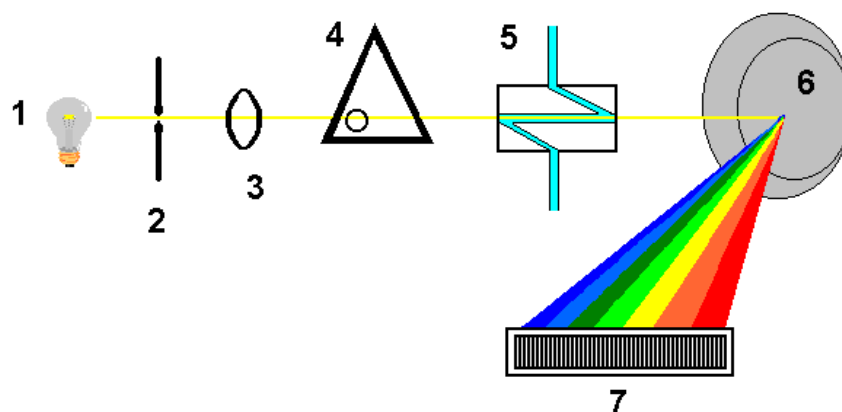
Podle konstrukčního typu se mohou rozdělit detektory na čtyři typy:

Detektory s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 253,7 nm), které používají jako zdroje záření nízkotlakou rtuťovou výbojku. Detektory se konstruují jako dvou paprskové a měří se rozdíl absorbance mezi měrnou a srovnávací celou.

Detektory s měnitelnou vlnovou délkou, a to pouze předem danými vlnovými délkami.

Detektory s programovatelnou vlnovou délkou; vlnovou délku lze nastavovat v určitém rozmezí, nejčastěji od 190 do 700 nm. Vlnová délka je měnitelná během analýzy, některé typy detektorů jsou schopny snímat spektra látek v měrné cele při zastaveném průtoku mobilní fáze (stop flow). Některé firmy nabízejí detektory umožňující měření při dvou až čtyřech vlnových délkách současně, jejich nevýhodou je však poněkud nižší citlivost ve srovnání s detektory s fixní vlnovou délkou.

Detektory diodového pole (photodiode-array, PDA, DAD) snímají celé spektrum bez přerušení chromatografické separace. Záření zdroje se po průchodu měrnou celou spektrálně rozkládá holografickou mřížkou (Obrázek 3.16). Ve spolupráci s počítačem umožňují tyto detektory pracovat v celém rozsahu vlnových délek UV/VIS oblasti (internet 3).



Obrázek 3.16: Schéma detektoru s diodovým polem.
1 – zdroj záření, 2 – štěrba, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – měrná cela detektoru,
6 – holografická mřížka, 7 - systém fotodiód

Zdroj: http://www.hplc.cz/Teorie/Figure/PDA_Detector.gif

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

- methanol CHROMASOLV® pro gradientovou eluci, Sigma – Aldrich (Steinheim, Německo)
- acetonitril, Multisolvant®, Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Španělsko)
- fosfátový pufr 0,1M, pH 7,4
- octanový pufr 0,2M, pH 4,0

4.2 Použitý standard

- Isoniazid $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Německo)

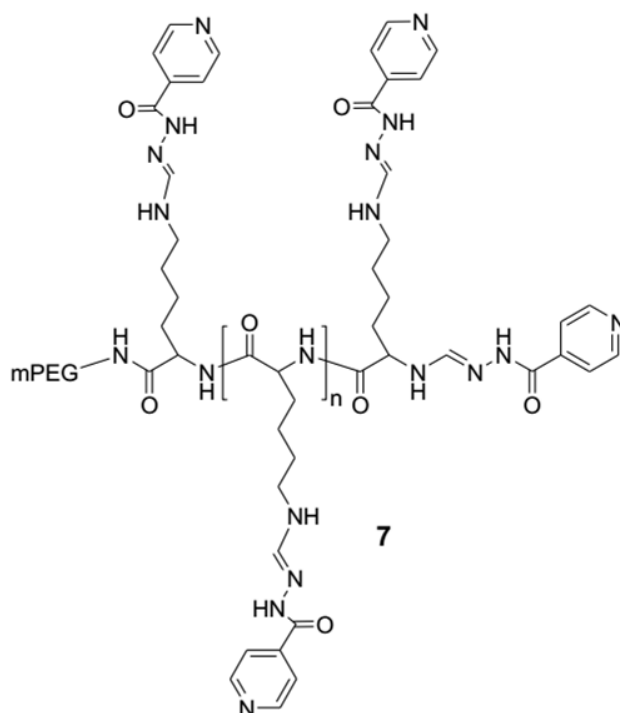
4.3 Použité konjugáty

- Konjugát LG042: mPEG-*b*-PLL-INH
- Konjugát LG046: mPEG-*b*-PLL-INH
- Konjugát LG048: mPEG-*b*-PLL-INH
- Konjugát LG049: mPEG-*b*-PLL-INH
- Konjugát LG050: mPEG-*b*-PLL-INH

Vlastnosti celého blokového kopolymeru mPEG-*b*-PLL jsou ovlivňovány počtem lysinových jednotek v kopolymeru. Se vzrůstajícím počtem lysinových jednotek v kopolymeru roste nežádoucí peptidický charakter, který je spojován s problémy při zpracování produktu.

K navázání reaktivní molekuly isoniazidu na volné ϵ -NH₂ skupiny lysinových jednotek biokompatibilního kopolymeru byla zvolena „CH spojka—zrealizovaná pomocí diethoxymethylacetátu (DEMA) (Grusová L., 2012).

Příprava a syntéza konjugátů byly předmětem diplomové práce Lucie Grusové. K syntéze konjugátu byl vybrán mPEG-NH₂ M = 5000, který se připraví třístupňovou syntézou z mPEG. Výsledkem syntézy je [mPEG-*b*-PLL]-INH (Obrázek 4.1)



Obrázek 4.1: konjugát [mPEG-b-PLL]-INH

Zdroj: http://dspace.upce.cz/bitstream/10195/45800/3/GrusovaL_Synteza%20%5BmPEG-b-PLL%5D-INH_AI_2012.pdf

4.4 Použité přístroje

4.4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s ultrafialovou detekcí

Uspořádání pro HPLC je od společnosti Shimadzu (Tokio, Japonsko) a skládá se z těchto částí:

- dvě vysokotlaké pumpy LC – 10AD_{VP}
- odplyňovač mobilní fáze DGU – 14A
- řídicí jednotka SCL – 10A_{VP}
- spektrofotometrický UV detektor s diodovým polem SPD – M10A_{VP}
- kolona LiChroCART® 125 x 4 mm s náplní LiChrospher® 100 RP-18e 5 μ m, Merck (Darmstadt, Německo), chráněná předklonkou (4 x 3 mm I.D.) s náplní C18, Phenomenex (Torrance, CA, USA)

4.4.1.1 Podmínky pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii

- Nástřik 20 μ l
- Průtok mobilní fáze 0,3 ml.min⁻¹

- Mobilní fáze: acetonitril a voda v poměru 10:90 od startu do 5. minuty a v poměru 90:10 od 10. minuty do ukončení analýzy
- Teplota termostatu 35°C
- UV detekce: 230-290 nm
- Délka analýzy 20 min

Jednotlivé složky mobilní fáze byly před použitím filtrovány hydrofilním propylenovým membránovým filtrem Pall Corporation (Ann Arbor, Michigan, USA) o velikosti pórů 0,45 μm .

4.4.2 Horkovzdušný sterilizátor

K zajištění stálé teploty 37 °C byl použit horkovzdušný sterilizátor STERICELL® (Obrázek 14) od společnosti BMT – Brněnská medicínská technika a.s., (Brno, ČR). Přístroj slouží k horkovzdušné sterilizaci materiálů při stanovených parametrech teploty a času. V komoře přístroje je zajištěno stálé proudění vzduchu pomocí vestavěného ventilátoru, který eliminuje vznik oblasti „studeného vzduchu“. Teplotu lze nastavit v rozmezí od 10 °C nad okolní teplotou do 250 °C.

4.5 Kalibrační řada

Kalibrační řada byla připravena rozpuštěním isoniazidu v methanolu. Nejprve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, jehož zředěním byly připraveny roztoky o koncentracích 0,5, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 250, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jednotlivé roztoky standardů byly proměřeny metodou HPLC a detekovány UV detektorem v rozmezí vlnových délek 230 – 290 nm. Vyhodnocení a integrace píků byla prováděna programem LCMS solution při vlnové délce 262 nm, kdy vykazuje isoniazid maximální absorpenci. Byla sestavena závislost odezvy detektoru (plocha píků) na koncentraci isoniazidu.

4.6 Měření kinetické křivky

Příslušný konjugát byl navážen a rozpuštěn v 1 ml redestilované vody. Po rozpuštění byl nadávkován do 2 ml roztoku pufru s hodnotou pH 7,4; (fosfátový pufr $c = 1 \cdot 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$); pH 4 (octanový pufr $c = 2 \cdot 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Pro měření kinetické křivky byl rozpuštěný konjugát převeden do 18 – 20 derivatizačních zkumavek a tím bylo zamezeno chybě v koncentraci v důsledku zmenšování objemu během analýzy. Vzorby byly uchovávány v horkovzdušném sterilizátoru při 37°C

po celou dobu měření. Uchováváním vzorků ve sterilizátoru je tak simulována vnitřní teplota lidského těla.

Koncentrace isoniazidu byla zaznamenávána průběžně od začátku štěpení konjugátu po 12 - 20 hodin. Každá křivka byla proměřována 5x a výsledky jsou průměrem těchto měření. Délka jedné analýzy byla 20 minut.

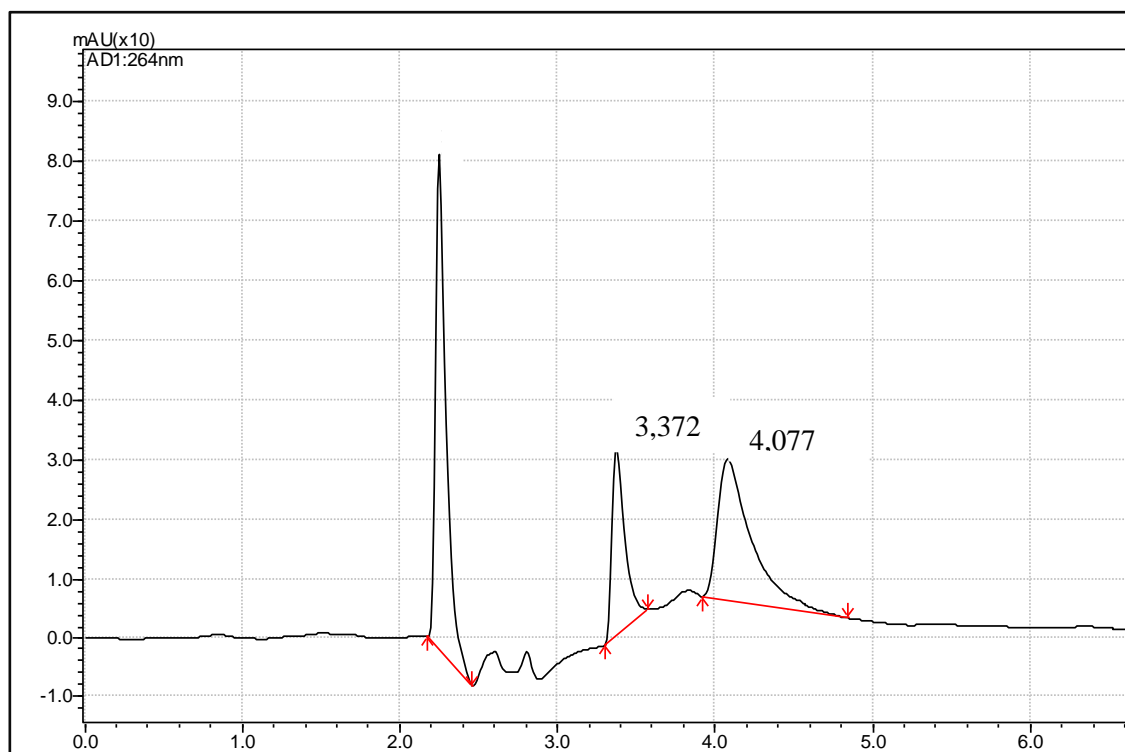
5. Výsledková část

5.1 Výběr experimentálních podmínek

Experimentální podmínky byly vybrány na základě rešerše a zkušeností z předchozí diplomové práce (Stanovení prednisolonu po štěpení polymerních konjugátů, Ježková V., 2009, Univerzita Pardubice). V této práci probíhalo stanovení koncentrace prednisolonu uvolněného z polymerního nosiče, metodou HPLC s UV detekcí v rozmezí vlnových délek 230 – 290 nm.

Jako mobilní fáze byl zvolen acetonitril a voda. Obě tato rozpouštědla byla během separace mísená v rozdílných poměrech tak, aby došlo k úplnému vymytí isoniazidu i poly(ethylenglykolu) z kolony. Podmínky jsou podrobněji probrány v experimentální části.

Během měření standardních roztoků byly v chromatografickém záznamu dva píky (Obrázek 5.1). První s retenčním časem 3,372 minut, druhý s retenčním časem 4,077 minut. Vzhledem k tomu, že oba měly stejné UV spektrum, jedná se pravděpodobně o isoniazid a jeho izomer. Pro výpočet kalibrační závislosti i pro sledování stability konjugátu je použita suma ploch obou píků.



Obrázek 5.17: Chromatogram z HPLC/UV isoniazidu o koncentrace $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Průtok $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, detekce při 264 nm^1

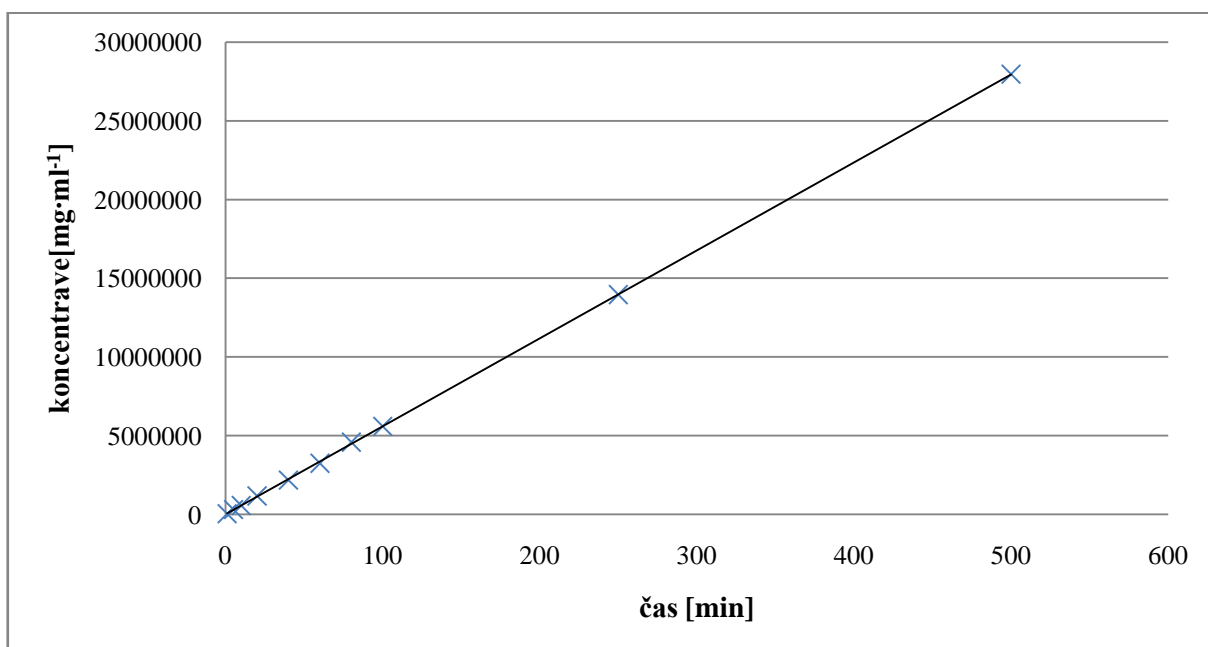
5.2 Kalibrační řada

Pro sestavení kalibrační závislosti byly připraveny standardní roztoky isoniazidu o koncentracích: 0,5; 1; 5; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 250; 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Graf 5.1). Roztoky byly 5x proměřeny metodou HPLC/UV a byla sestrojena závislost plochy píků na koncentraci isoniazidu odpovídající regresnímu modelu (Rovnice 2). Jak již bylo výše popsáno, v chromatografickém záznamu vykazoval standardní roztok isoniazidu dva píky. Pro sestrojení závislosti proto byla započítána jejich suma.

$$y = 55928x + 16194$$

$$R^2 = 0,998$$

Rovnice 2: Rovnice regrese kalibrační závislosti isoniazidu



Graf 5.1: Kalibrační závislost isoniazidu. Detekce při vlnové délce 264 nm.

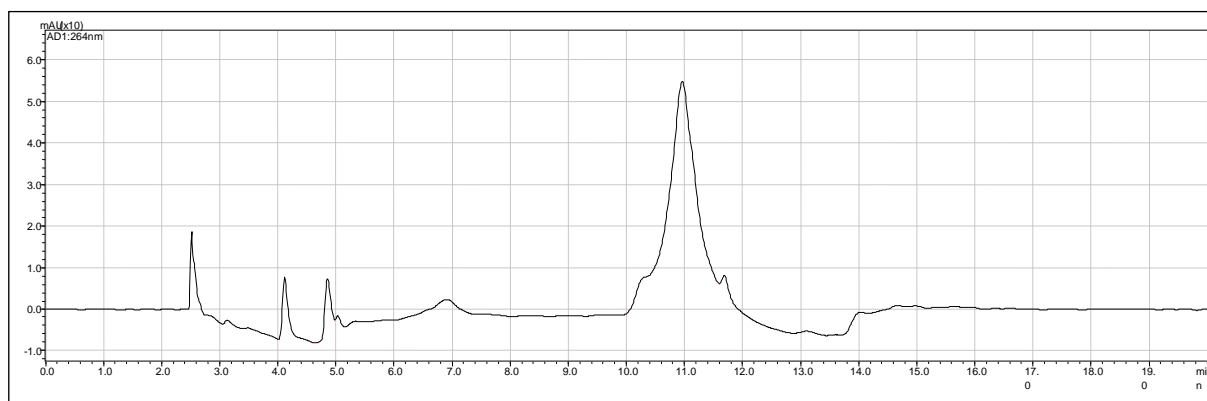
Z naměřených ploch píků byla pomocí rovnice zpětně spočítána koncentrace standardů a její procentuální rozdíl od připravené hodnoty. Výsledky validace jsou zaznamenány v Tabulce 5.1. Jak je z tabulky zřejmé, procentuální rozdíl mezi koncentracemi není vyšší, než 20 %. Nejvyšší rozdíl je u standardu o koncentraci 1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, kdy procentuální rozdíl naměřených dat je 19,14 %, to znamená, že kalibrační křivka splňuje podmínky validace. Limit detekce je 0,33 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a limit kvantifikace 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, standardní roztok 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je pod limitem kvantifikace, tudíž není v Grafu 5.1 obsažený.

Tabulka 5.1: Validace kalibrační křivky, n = 5

Koncentrace standardu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Spočítaná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Směrodatná odchylka	Rozdíl mezi koncentrací standardu a spočítané koncentrací [%]
1	0,81	0,19	19,14
5	5,50	0,20	10,09
10	9,97	0,16	0,26
20	20,84	0,33	4,21
40	38,87	0,26	2,83
60	57,93	0,63	3,45
80	81,90	0,70	2,38
100	99,98	0,05	0,02
250	249,55	0,48	0,18
500	500,20	0,21	0,04

5.3 Sledování stability konjugátu

Byly proměřeny kinetické křivky 5 různých konjugátů isoniazidu s poly(ethylenglykolem) a zjišťována jejich stabilita a postupné uvolňování volného isoniazidu. Příklad chromatogramu je na Obrázku 5.4.

**Obrázek 5.4 Chromatogram konjugátu LG46 při pH 7,4, detekce při 264 nm.**

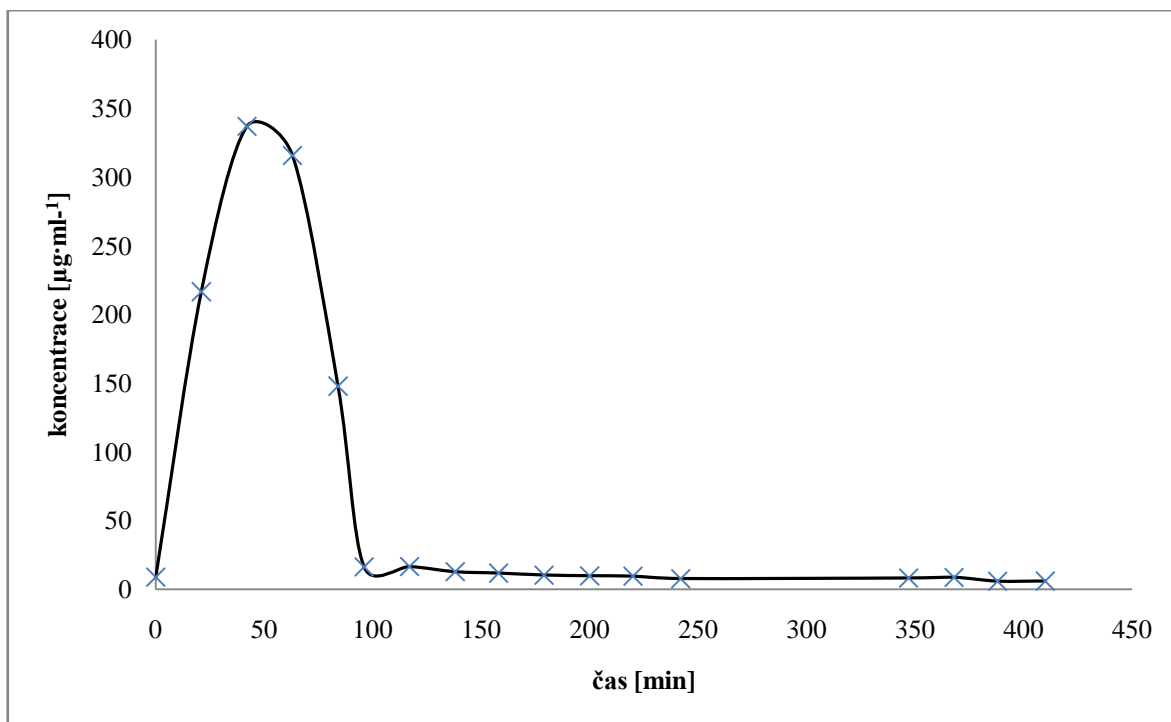
Konjugát LG042, konjugát LG048, konjugát LG049 byly rozpuštěny ve fosfátovém pufru, konjugát LG050 byly rozpuštěny v octanovém pufru Konjugát LG46 byl rozpuštěný ve fosfátovém i octanovém pufru.

Prvním bodem křivky je vzorek s teoretickou nulovou koncentrací isoniazidu. V některých vzorcích však k reálné nulové koncentraci nedošlo. Pravděpodobně to bylo

způsobeno nenavázáním veškerého isoniazidu na mPEG, ve vzorcích tedy bylo určité množství volného isoniazidu. Další měření probíhala po 20 minutách do ustálení kinetické křivky a dále po více než 12 hodinách. Pro všechny konjugáty byly sestrojeny křivky závislosti koncentrace isoniazidu na čase (Graf 5.2 – 5.7), příslušné hodnoty jsou v tabulkách (5.2 – 5.7). Pro stanovení isoniazidu se vycházelo opět ze dvou píků, které standard poskytoval.

Průběh konjugátu LG0042 je velmi nestandardní. Dochází k prudkému nárůstu volného isoniazidu a následně k jeho strmému poklesu. Není vyloučeno, že se isoniazid zpětně váže na konjugát. Protože koncentrace volného isoniazidu byla od 220 minuty bez větší změny, měření bylo ukončeno ve 400 minutě.

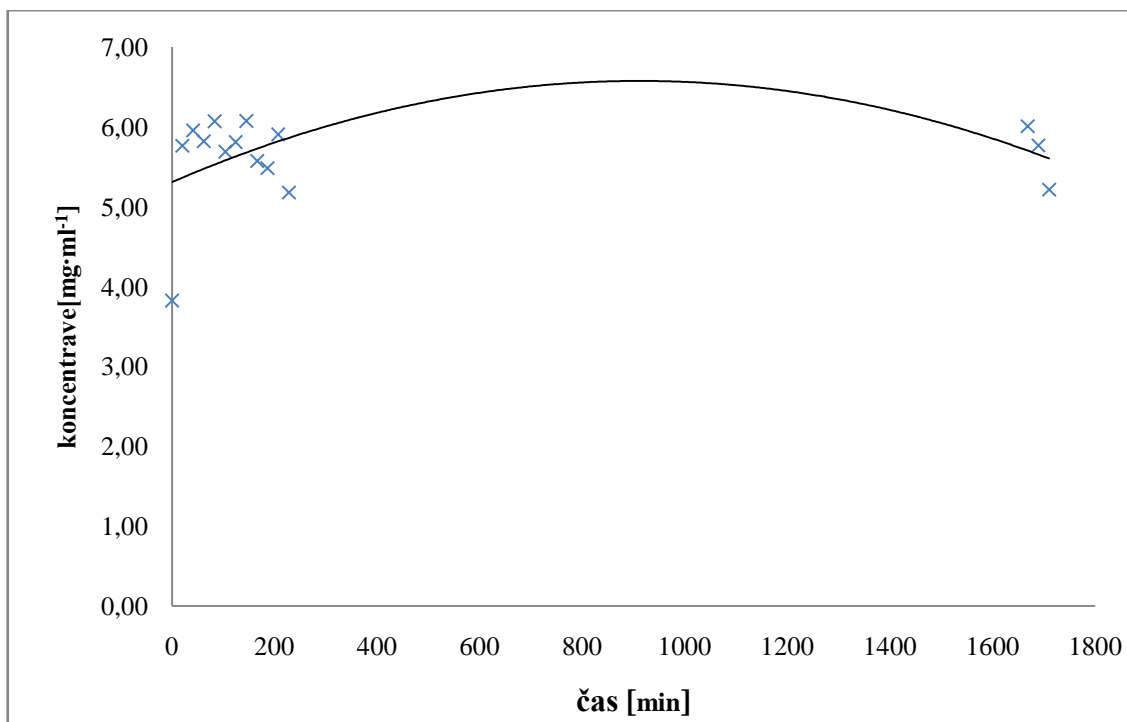
Konjugát LG0046 má také nestandardní průběh. Nejprve koncentrace volného isoniazidu klesne na $3,22 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (oproti počáteční koncentraci $7,03 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a od 132 minuty koncentrace vzrůstá na $16,71 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Grafem 5.5 jsou tedy proloženy 2 funkce. Jedna pro klesající část, druhá pro vzrůstající.



Graf 5.2: Závislost koncentrace INH z konjugátu LG042 v roztocích pufru o pH 7,4 (n = 5)

Tabulka 5.2 Množství uvolněného INH z konjugátu LG042 v roztoku pufru o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1\cdot 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), n = 5

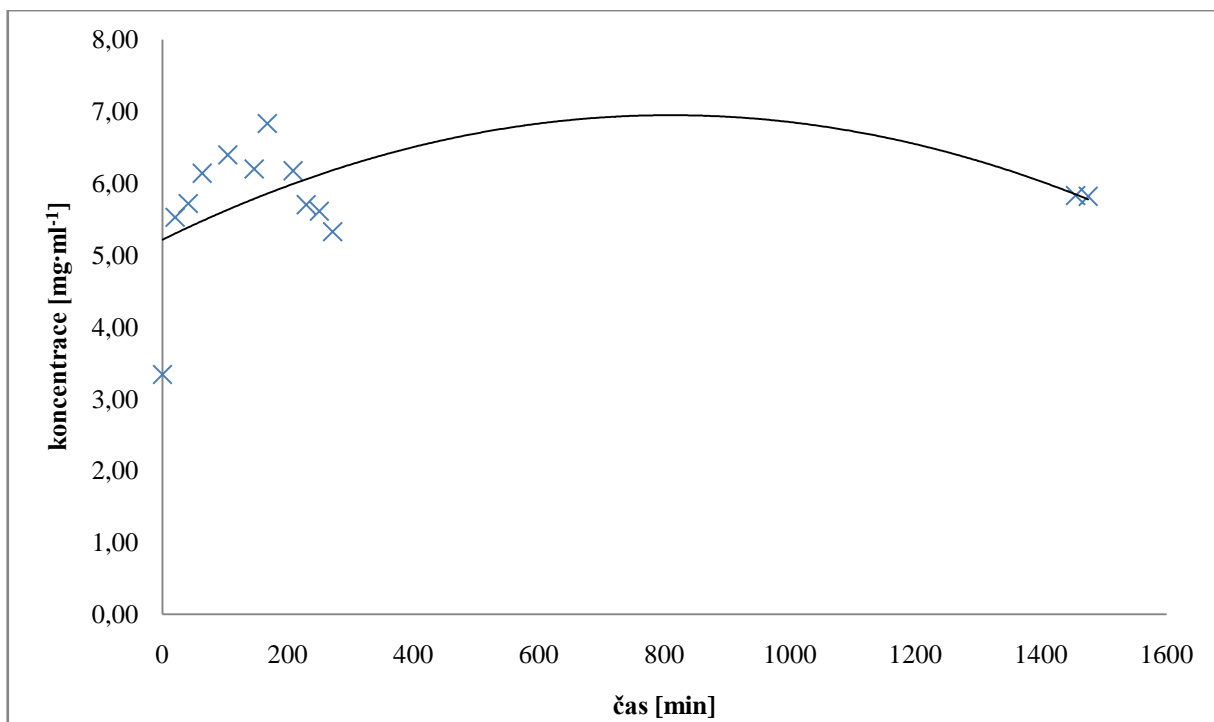
Čas [min]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Směrodatná odchylka
0	8,79	0,23
21	216,49	2,03
42	336,75	1,30
63	315,63	2,31
84	147,78	0,91
96	16,21	0,84
117	16,41	1,17
138	12,68	1,24
158	11,69	0,36
179	10,26	1,27
200	9,76	0,69
220	9,44	0,61
242	7,70	0,62
347	8,11	0,88
368	8,61	0,81
388	5,80	0,62
410	5,91	0,94



Graf 5.3: Závislost koncentrace INH z konjugátu LG049 v roztocích pufru o pH 7,4 (n = 5)

Tabulka 5.3: Množství uvolněného INH z konjugátu LG049 v roztoku pufru o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1\cdot 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), n = 5

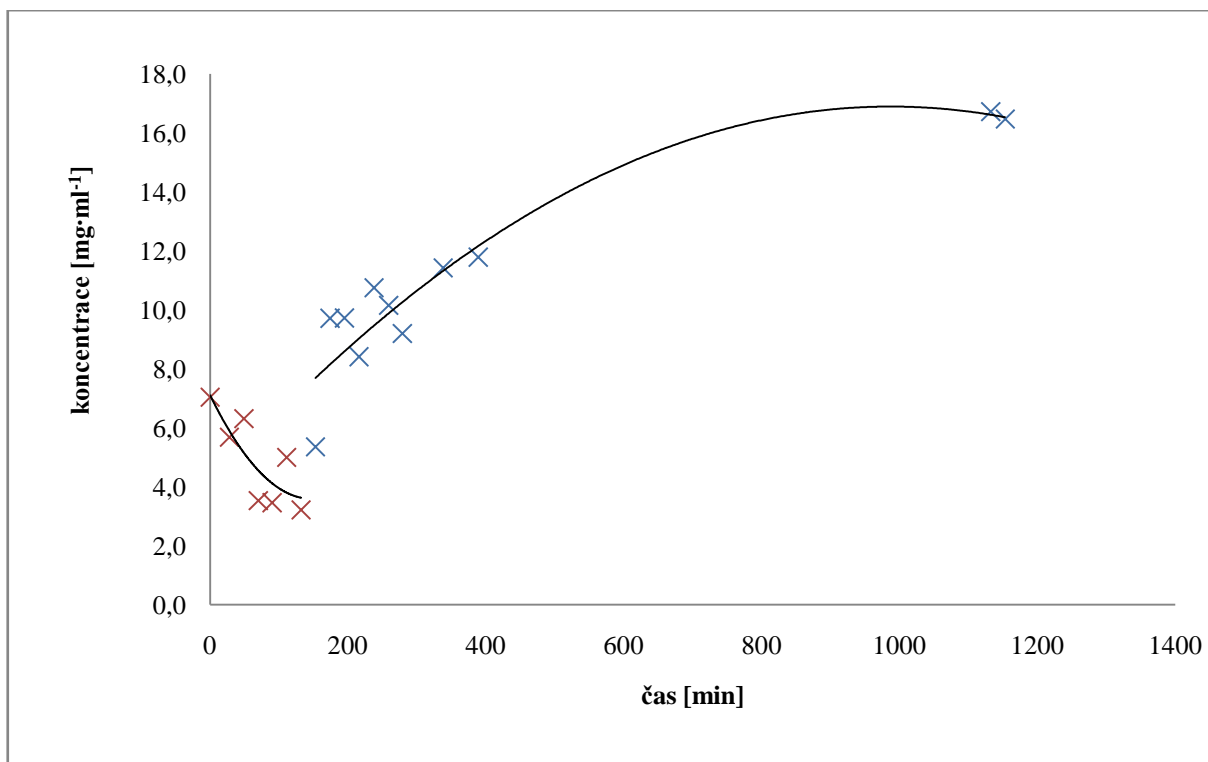
Čas [min]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Směrodatná odchylka
0	3,82	0,19
20	5,76	0,26
41	5,96	0,46
62	5,82	0,46
83	6,07	0,82
104	5,69	0,43
124	5,81	0,67
145	6,08	0,90
166	5,58	0,44
186	5,48	0,97
207	5,91	0,87
228	5,18	1,07
1668	6,01	0,24
1689	5,77	0,93
1710	5,22	1,19



Graf 5.4: Závislost koncentrace INH z konjugátu LG048 v roztocích pufru o pH 7,4 (n = 5)

Tabulka 5.4: Množství uvolněného INH z konjugátu LG048 v roztoku pufru o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), n = 5

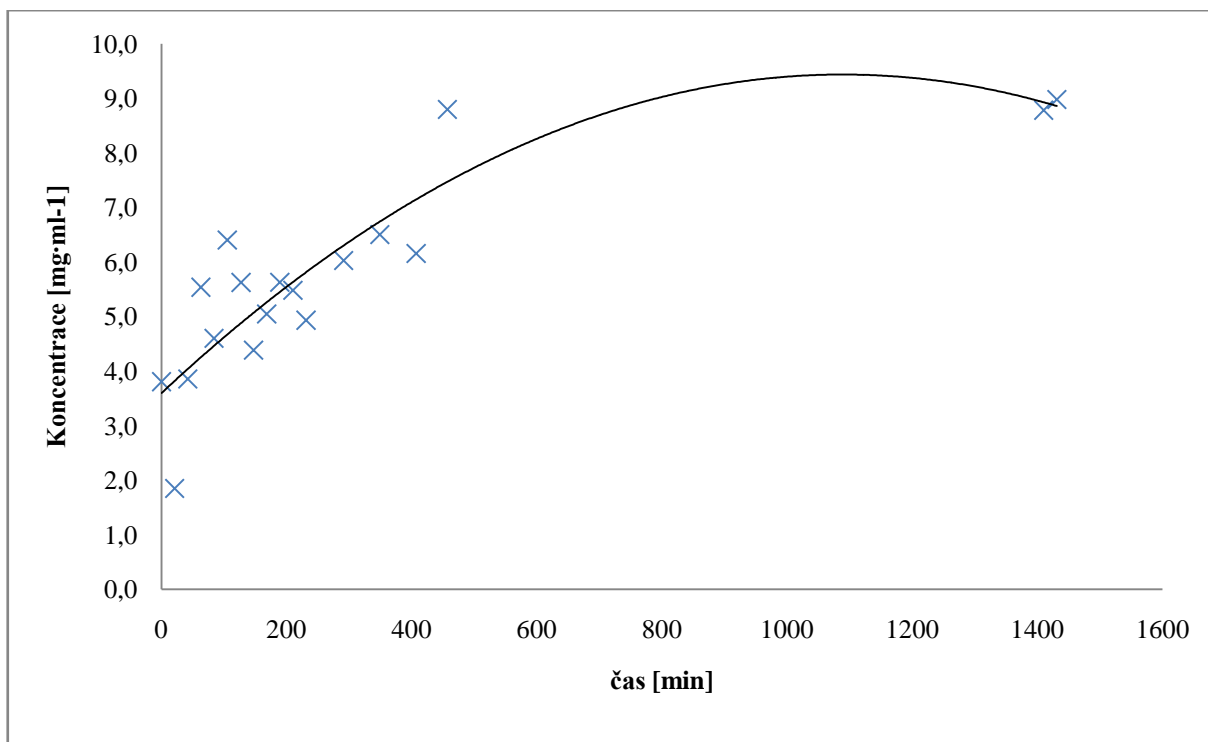
Čas [min]	Koncentrace [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	Směrodatná odchylka
0	3,34	0,24
20	5,53	0,15
41	5,72	0,10
63	6,14	0,19
84	4,81	0,11
104	6,40	0,15
125	5,36	0,10
146	6,20	0,58
167	6,83	0,19
187	5,85	0,20
208	6,17	0,28
229	5,70	0,16
250	5,61	0,40
271	5,32	0,37
1455	5,83	0,19
1475	5,82	0,28



Graf 5.5: Závislost koncentrace INH z konjugátu LG046 v roztocích pufru o pH 7,4 (n = 5)

Tabulka 5.5: Množství uvolněného INH z konjugátu LG046 v roztoku pufru o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), n = 5

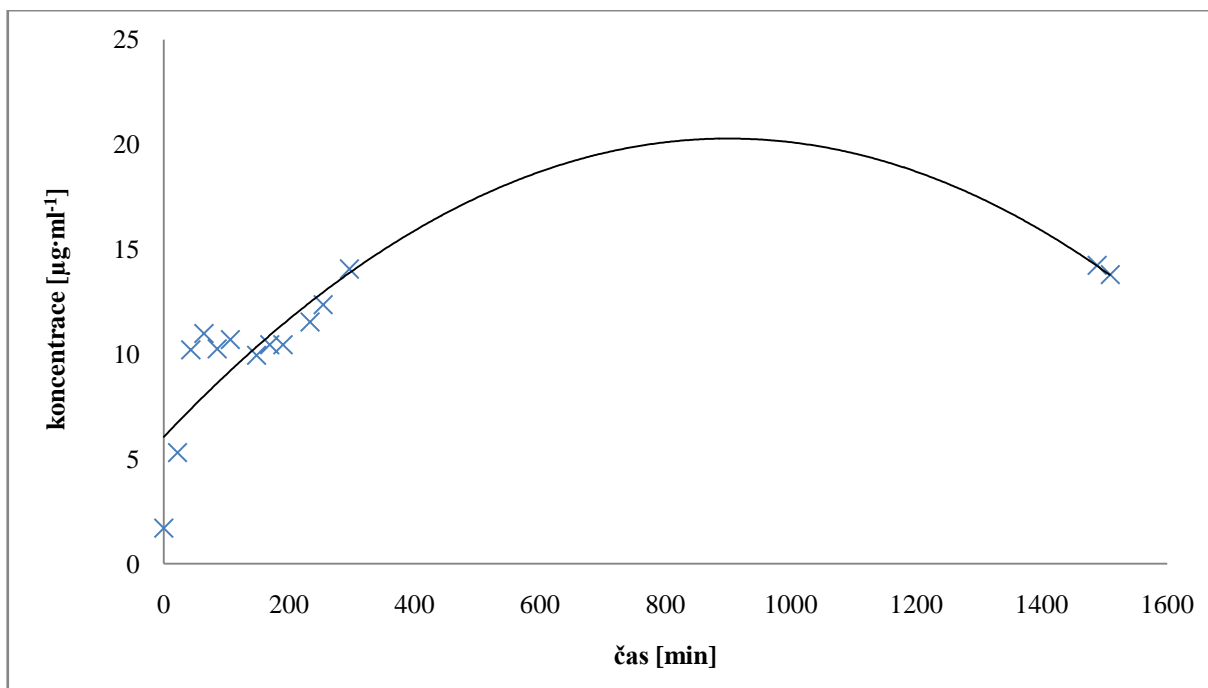
Čas [min]	Koncentrace [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	Směrodatná odchylka
0	7,03	0,53
28	5,67	0,75
49	6,30	0,71
70	3,53	0,49
90	3,46	0,56
111	5,00	0,48
132	3,22	0,34
153	5,35	0,15
174	9,70	0,41
195	9,72	0,23
216	8,40	0,36
238	10,74	0,09
259	10,15	0,49
279	9,19	0,68
338	11,42	0,83
389	11,78	0,74
1132	16,71	0,32
1153	16,46	0,64



Graf 5.6: Závislost koncentrace INH z konjugátu LG046 v roztocích pufru o pH 4,0 (n = 5)

Tabulka 5.6 Množství uvolněného INH z konjugátu LG046 v roztoku pufru o pH 4,0; (octanový pufr $c = 2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), n = 5

Čas [min]	Koncentrace [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	Směrodatná odchylka
0	3,80	0,22
21	1,85	0,67
42	3,85	0,51
63	5,54	0,54
84	4,60	0,95
105	6,40	0,88
127	5,63	1,06
147	4,38	0,64
168	5,05	0,84
189	5,63	1,12
210	5,48	0,67
231	4,93	0,54
291	6,03	0,96
349	6,50	0,55
407	6,16	0,73
457	8,80	0,48
1410	8,79	0,54
1431	8,98	0,56



Graf 5.7: Závislost koncentrace INH z konjugátu LG050 v roztocích pufru o pH 4,0 (n = 5)

Tabulka 5,7 Množství uvolněného INH z konjugátu LG050 v roztoku pufru o pH 4,0; (octanový pufr $c = 2 \cdot 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), n = 5

Čas [min]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Směrodatná odchylka
0	1,70	0,55
22	5,30	0,62
43	10,21	1,11
64	10,98	0,89
85	10,25	0,99
106	10,69	0,99
127	11,16	0,89
148	9,95	0,69
169	10,44	1,31
190	10,45	1,07
212	12,73	0,36
233	11,53	1,16
254	12,36	1,20
275	11,68	1,04
296	14,06	0,79
1234	9,61	0,64
1488	14,23	0,80
1509	13,79	0,42

Pro porovnání jsou postupné přírůstky koncentrace isoniazidu u jednotlivých konjugátů uvedeny v Tabulce 5.2 a Tabulce 5.3. V tabulkách jsou uvedeny pouze přibližné časové úseky, které jsou společné pro všechna měření. Pokud koncentrace INH u konjugátu chybí, nebyla v tomto časovém úseku měřena. Nejvyšší nárůst volného isoniazidu je ve vzorku konjugátu, LG042 ve fosfátovém pufru, kdy je uvolňování během prvních 60 minut nejrychlejší. Jen v prvních 20 minutách se jeho koncentrace zvýšila 25x. Konjugát LG050 v octanovém pufru má taktéž vysoký nárůst volného isoniazidu. Během prvních 60 minut dojde ke zvýšení jeho hladiny 6,5x a tato koncentrace přetrvává po více než 24 hodinách.

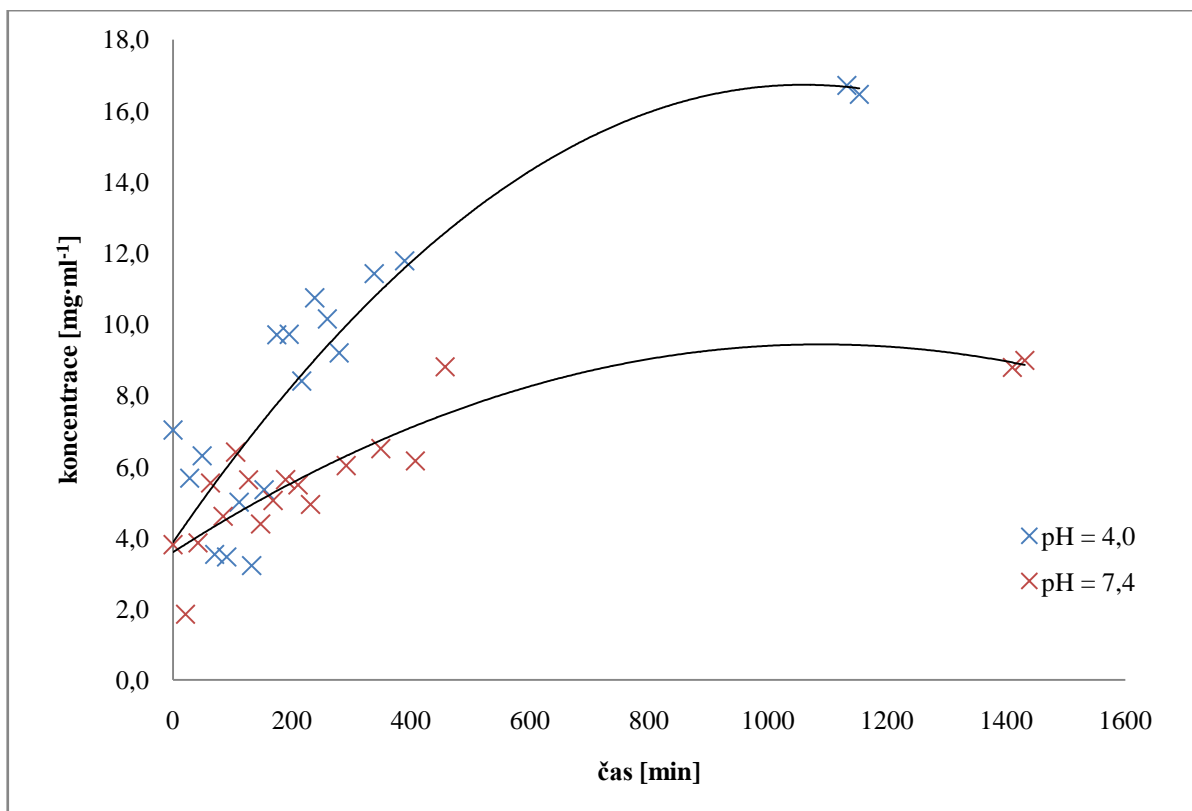
Tabulka 5.8: Množství uvolněného INH z konjugátu [mPEG-b-PLL]-INH v roztoku pufru o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), n = 5.

Čas [min]	LG042 [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	LG046 [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	LG048 [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]
0	8,79	7,03	3,34
20	216,49	5,67	5,53
40	336,75	6,3	5,71
60	315,63	3,53	6,14
80	147,78	3,46	4,81
100	16,41	5,00	6,40
130	12,68	3,22	5,36
150	11,68	5,35	6,20
200	9,76	9,72	6,17
230	9,44	10,74	5,70
300	8,10	11,42	5,32
400	5,91	11,78	-
1400	-	16,46	5,83

Tabulka 5.9: Množství uvolněného INH z konjugátu [mPEG-b-PLL]-INH v roztoku pufru o pH 4,0 (acetátový pufr, $2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ n = 5).

Čas [min]	LG046 [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	LG050 [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]
0	3,80	1,70
20	1,85	5,30
40	3,85	11,32
60	5,54	10,98
80	4,60	10,25
100	6,40	10,69
130	56,3	11,16
150	4,38	9,95
200	5,48	10,45
230	4,93	11,53
300	6,03	14,06
400	6,16	-
1400	8,79	14,23

Dále bylo měřením zjištěno, že konjugát LG046, který byl proměřen ve fosfátovém i octanovém pufru, se při pH 4 během prvních 100 minut uvolňuje rychleji a dosahuje vyšší koncentrace, než při pH 7,3 (Graf 5.8). V obou případech dochází k dalšímu uvolňování.



Graf 5.8: Závislost koncentrace INH ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na čase (min) pro konjugát LG046 v roztocích pufrů o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1\cdot 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$); pH 4 (acetátový pufr, $2\cdot 10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) n = 5

6. Závěr

Cílem diplomové práce bylo navrhnout a optimalizovat metodu stanovení volného isoniazidu, který se uvolňuje z blokového polymeru α -methoxypoly(ethylenglykol)-*b*-poly(L-lysinu), sledovat jeho koncentraci v různých pH pomocí HPLC a využít ji při měření v reálných vzorcích.

Analýzy jednotlivých konjugátů probíhaly v roztocích o pH 7,4 a pH 4,0, při teplotě 37°C. Tato teplota odpovídá vnitřní teplotě lidského těla. Neutrální pH 7,4 je fyziologické pH a kyselé pH 4,0 je v místech napadených mykobakteriální infekcí.

Kinetická křivka jednotlivých konjugátů byla zaznamenávána od času 0 po dobu 12 až 20 hodin. Obecně lze říci, že při nižším pH, se isoniazid během prvních 100 minut uvolňuje rychleji, než při pH 7,4, což je žádoucí. Zvýšené uvolňování při nižším pH je v souladu s principem cíleného uvolňování léčiv.

Tato práce potvrdila stabilitu syntetizovaných konjugátů v daných pH a poskytla informaci o množství isoniazidu uvolněného v jednotlivých časových úsecích. Tato problematika by mohla být dále studována.

7. Literatura

- Anderson, R., Bendell, D., Groundwater, P.: *Organic Spectroscopic Analysis*. Royal Society of Chemistry 2004, 7-10.
- Argekar A.P, Kunjir S.S, Purandare K.S., Simultaneous determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamid by high performance thin layer chromatography. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*. 1996, Vol. 14, Issue. 11, 1645-50.
- Attwood D., Florence A.T., Surfactants system – their chemistry pharmacy and biology, Chapman and Hall, London, 1985.
- Budavari, S. et all: *The Merck Index*, 1996, 1304-1305.
- Cao, X., Rui, J., Wang: *Simultaneous Determination of Isoniazid and Acetylisoniazid in Human Plasma by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and Its Application to a Pharmacokinetics Related to N-Acetyltransferase2 Genetic Polymorphism*. *Analytical Letters*, 2012, Vol. 45, Issue 15, 2125-2135.
- Colin P., De Bock L., *Development and validation of a fast and uniform approach to quantify β -lactam antibiotics in human plasma by solid phase extraction-liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry*. *Talanta*. 2013, Issue. 103, 285-293.
- Feng Li, Jie Lu, Jie Cheng, Laiyou Wang, Tsutomu Matsubara, Iván L Csanaky, Curtis D Klaassen, Frank J Gonzalez & Xiaochao Ma, *Human PXR modulates hepatotoxicity associated with rifampicin and isoniazid co-therapy*. *Nature Medicine*. 2013, roč. 19, č. 4, s. 418-20.
- Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J. *Farmakochemie, 2nd ed.*; VŠCHT Praha: Praha, 2007; 32.
- Garbulet D., Dorneanu V. *Development of A Hplc Method for the Determination of Isoniazid in Rat Plasma*. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*. 2009, Vol. 66, Issue 1, 373-377.
- Greenwald, R. B., J.: *Control Release*, 2001, 74, 159-171.
- Grusová L. *Syntéza a charakterizace konjugátu isoniazidu s poly(ethylenglykol)-b-poly(L-lysinem)*. Pardubice, 2012. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.

- Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J. *Farmakochemie, 2nd ed.*; VŠCHT Praha: Praha, 2007; p 17.
- Higson, S.: *Analytical Chemistry*. Oxford University Press 2004, 232.
- Churáček, J.: *Analytická separace látek*. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1990.
- Khan, M. O. F., Park, K. K., Lee, H. J., *Antedugs: An approach to safer drugs*. Current Medicinal Chemistry 2005, 12, 2227–2239.
- Khandare, J.; Minko, T. *Polymer-drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs*. Prog. Polym. Sci. 2006, 31, 359–397.
- Kim S.Y., Lee S.M., Yim J.J., Yoo C.G., Kim Y.W., Han S.K., Yang S.C., *Treatment response and averse reactions in older tuberculosis patients with immunocompromising comorbidities*. Yonsei Medical Journal. 2013, Vol. 54, Issue 5, 1227-33.
- Kopeček, J.; Kopečková, P., *HPMA copolymers: Origins, early developments, present, and future*. Adv. Drug Delivery Rev. 2010, 62 (2), 122–149.
- Krishnamurthy N., G., Suvardhan K. G., *Simple Sensitive Spectrophotometric Determination of Isoniazid and Ritodrine Hydrochloride*. Journal of Analytical Chemistry. 2005, Vol. 60, Issue. 9, 822-827.
- Lewis, R. J., *Hawley's Condensed Chemical Dictionary (15th Edition)*. John Wiley&Sons, 2007, 1011.
- Li, W., Zhan, P. et all., *Curren tdrugre search on PEGylation with small molecular agents*. Progress in Polymer Science, March-April 2013, Volume 38, Issues 3-4, 421-444.
- Liu, Y., Fu, Zhifeng, Wang, L., *Capillary electrophoresis analysis of isoniazid using luminol-periodate potassium chemiluminescence system*. Luminescence. John Wiley&Sons Inc.2011, Vol. 26, Issue 6, 397-402
- Longley C. B., Zhao H., Lozanguiez Y.L., Conover C.D., *Biodistribution and excretion o fradiolabeled 40kDa polyethyleneglycol following intravenou sadministration in mice*. Journal of pharmaceutical sciences, 2013, Vol. 102, Issue 7, 2362-2370.
- Lunn G.: *HPLC Methods for Pharmaceutica Analysis*. John Wiley&Sons, 2000, Volumes 2-4, 756-762.

- Lüllmann H., Mohr K., *Farmakologie a toxikologie*. GradaPublishing a.s., 2009, 35-36, 489-491.
- Martinková J., *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. GradaPublishing a.s., 2007, 305-306.
- Moreno-Bondi M. C., Marayuela M.D. *An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples*. Analytical & Bioanalytical Chemistry. 2009, Vol. 395, Issue. 4, 921-946.
- Opekar, F.: *Základní analytická chemie*. Karolinum, Praha 2002.
- Sabitha, P., Ratna Sabitha, P., Ratna J.V., Reddy K.R., *A new RP-HPLC method for the determination of isoniazid in plasma*. Drug Invention Today. 2010, Vol. 2, Issue 7, 331-334.
- Richardson, M. L., Gangolli, S., *The Dictionary of Substances and their effects*, 1994, 6, 714-725.
- Sedlák, M., *Recent advances in chemistry and applications of substituted poly(ethyleneglycol)s*. Collect. Czech. Chem. Commun. 2005, 70, 269–291.
- Silva, M., Lara, A. S., Leite, C. Q. F., Ferreira, E. I., *Potential Tuberculostatic Agents: Micelle-Forming Copolymer Poly(ethylene glycol)-Poly(aspartic acid) Prodrug with Isoniazid*. Arch. Pharm. (Weinheim) 2001, 334, 189–193.
- Silva, M.; Ricelli, N. L.; Seoud, O. E.; Valentim, C. S.; Ferreira, A. G.; Sato, D. N.; Leite, C. Q. F.; Ferreira, E. I., *Potential Tuberculostatic Agent: Micelle-forming Pyrazinamide Prodrug*. Arch. Pharm. (Weinheim) 2006, 339, 283–290
- Stella V. J, Charman W. N, Naringrekar V. H.: *Drugs*. 1985, 29, 455-473.
- Subhash, Chandra Ray, Narayan Nand Lakshmi a Baldev Singh Baldev. Council of scientific and industrial research. *Process for the synthesis of isonicotinic acid hydrazide* [patent]. US 6734309 B1. Uděleno 11. květen 2004. [15] Maier S. A.: *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. Springer, UK, 2007, ISBN-10: 0387331506.
- Sun, Da-Wen: *Modern Techniques for Food Authentication*. Elsevier 2008, 369-370.
- Tsai I., Hsiang-Yin L., *Quantitative determination of isoniazid in biological samples by cation-selective exhaustive injection-sweeping-micellar electrokinetic chromatography*. Analytical And Bioanalytical Chemistry. 2011, Vol. 401, Issue 7, 2205-14
- Vokurka, M.; Hugo, J.; et al. *Velký lékařský slovník*, 8th ed.; Maxdorf: Praha, 2009.

- Wang, B., Siahaan, T., Soltero, R.: *Drug Delivery - Principles and Applications*. John Wiley&Sons, 2005, 125-166.
- Yoshino, K., Taguchi, K. et al., *Novel analytical method to evaluate the surface condition of polyethyleneglycol-modified liposomes*, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2012, Vol. 397, 73-79.
- Zargar B, Hatamie A., *Localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles as colorimetric probes for determination of Isoniazid in pharmaceutical formulation*. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular And Biomolecular Spectroscopy*. 2013, Vol. 106, 185-9
- [internet 1]
[http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS%20Monographs/CPS-%20\(General%20Monographs-%20I\)/ISONIAZID.html](http://www.rxmed.com/b.main/b2.pharmaceutical/b2.1.monographs/CPS%20Monographs/CPS-%20(General%20Monographs-%20I)/ISONIAZID.html)
 [citováno 14. dubna 2013]
- [internet 2]
<http://www.vscht.cz/main/studenti/rp/2011/5.Schreiberova.ZZ11.priloha3.pdf>
 [citováno 14. dubna 2014]
- [internet 3]
<http://www.hplc.cz/>
 [citováno 23. dubna 2014]
- [internet 4]
<http://www.lcresources.com/resources/getstart/generic%20HPLC.gif>
 [citováno 23. dubna 2014]

8. Přílohy

8.1. Seznam zkratk

AIDS	Syndrom získaného selhání imunity
ALP	Alkalická fosfatáza
AST	Aspartátaminotransferáza
CV	Variační koeficient
DEMA	diethoxymethylacetát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
INH	Isoniazid
LSPR	Lokalizované plazmonové rezonance
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
mPEG- <i>b</i> -PLL	α -methoxypoly(ethylenglykol)- <i>b</i> -poly(L-lysin)
(PEO)	poly(ethylenoxid)
PEG	Polyethylenglykol
(PO)	Polyoxiran
(POE)	poly(oxyethylen)
ROP	<i>Ring-opening</i> polymerace
RP – HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
SD	Směrodatná odchylka
SDS	Dodecyl síran sodný
UV	Ultra fialové
VIS	Viditelné záření

8.2 Seznam vyobrazení

- Obrázek 3.1: Syntéza isoniazidu
- Obrázek 3.2. Metabolismus isoniazidu
- Obrázek 3.3: Průměrná plazmatická koncentrace isoniazidu po jednorázovém perorálním podání 100mg(w/w group – homozygot, w/m group – heterozygot, m/m group – mutace obou alel.)
- Obrázek 3.4: UV/VIS absorpční spektrum zlatých nanočástic v roztoku o různých koncentracích isoniazidu (roztok (a) blank, (b) $3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, (c) $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a (d) $8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ isoniazidu)
- Obrázek 3.5: Chromatogram plazmy
- Obrázek 3.6: Chromatogram isoniazidu v plazmě, retenční čas isoniazidu je 5,968 minut
- Obrázek 3.7: Chromatografický záznam standardního roztoku isoniazidu
- Obrázek 8: Spektroskopické záznamy isoniazidu (1) a ritodrinu s methylenbis(3-nitroanilinem), (n = 10)
- Obrázek 3.9: Denzitogram. (1) rifampicilin: (a) 25-desacetyl rifampicilin, (b) rifampicilin chinon; (2) isoniazid; (3) pyrazinamid
- Obrázek 3.10: UV/VIS spektrum (1) rifampicilin; (2) isoniazid; (3) pyrazinamid
- Obrázek 3.11: Princip uvolňování léčivé látky z polymeru
- Obrázek 3.12: Základní typy poly(ethylenglykolu)
- Obrázek 4.13: Molekula konjugátu isoniazidu s mPEG-b-PAsp a pyrazinamidu
- Obrázek 3.14: Základní schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie
- Obrázek 3.15: Ukázka chromatografických kolon
- Obrázek 3.16: Schéma detektoru s diodovým polem.
- Obrázek 5.1: Chromatogram z HPLC/UV isoniazidu o koncentrace $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Průtok $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, detekce při 264 nm^1
- Obrázek 5.2: Hmotnostní spektrum isoniazidu ($10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Záznam pořízen přístrojem LCMS 2010 mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)

8.3 Seznam tabulek

- Tabulka 3.1: Výtěžnosti separačního kroku pro isoniazid a acetylisoniazid (n=5)
- Tabulka 5.1: Validace kalibrační křivky, n = 5

- Tabulka 5.8 Množství uvolněného INH z konjugátu LG042 v roztoku pufru o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $n = 5$
- Tabulka 5.9: Množství uvolněného INH z konjugátu LG049 v roztoku pufru o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $n = 5$
- Tabulka 5.10: Množství uvolněného INH z konjugátu LG048 v roztoku pufru o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $n = 5$
- Tabulka 5.11: Množství uvolněného INH z konjugátu LG046 v roztoku pufru o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $n = 5$
- Tabulka 5.12 Množství uvolněného INH z konjugátu LG046 v roztoku pufru o pH 4,0; (octanový pufr $c = 2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $n = 5$
- Tabulka 5.13 Množství uvolněného INH z konjugátu LG050 v roztoku pufru o pH 4,0; (octanový pufr $c = 2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $n = 5$
- Tabulka 5.8: Množství uvolněného INH z konjugátu [mPEG-b-PLL]-INH v roztoku pufru o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $n = 3$.
- Tabulka 5.9: Množství uvolněného INH z konjugátu [mPEG-b-PLL]-INH v roztoku pufru o pH 4,0 (acetátový pufr, $2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), $n = 3$.

8.4 Seznam grafů

- Graf 5.1: Kalibrační závislost isoniazidu. Detekce při vlnové délce 264 nm.
- Graf 5.2: Sledování uvolňování INH z konjugátu LG042 v roztocích pufru o pH 7,4 ($n = 3$)
- Graf 5.3: Sledování uvolňování INH z konjugátu LG049 v roztocích pufru o pH 7,4 ($n = 3$)
- Graf 5.4: Sledování uvolňování INH z konjugátu LG048 v roztocích pufru o pH 7,4 ($n = 3$).
- Graf 5.5: Sledování uvolňování INH z konjugátu LG046 v roztocích pufru o pH 7,4 ($n = 3$)
- Graf 5.6: Sledování uvolňování INH z konjugátu LG046 v roztocích pufru o pH 4,0 ($n = 3$)
- Graf 5.7: Sledování uvolňování INH z konjugátu LG050 v roztocích pufru o pH 4,0
- Graf 5.8: Závislost koncentrace INH ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) na čase (min). Sledování uvolňování INH z konjugátu LG046 v roztocích pufrů o pH 7,4; (fosfátový pufr, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$); pH 4 (acetátový pufr, $2 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) $n = 3$.

8.5. Seznam rovnic

- Rovnice 1: Lambert-Beerův zákon
- Rovnice 2: Rovnice regrese kalibrační závislosti isoniazidu