

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Lada Kropáčová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

ANALÝZA AMINOSALICYLÁTŮ A JEJICH  
METABOLITŮ POMOCÍ KAPALINOVÉ  
CHROMATOGRFIE

Lada Kropáčová

Bakalářská práce

2021

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

ANALYSIS OF AMINOSALICYLATES AND THEIR  
METABOLITES USING LIQUID CHROMATOGRAPHY

Lada Kropáčová

Bachelor thesis

2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lada Kropáčová**  
Osobní číslo: **C17070**  
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**  
Téma práce: **Analýza aminosalicylátů a jejich metabolitů pomocí kapalinové chromatografie**  
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracujte přehled využívaných léčiv na bázi aminosalicylátů, popište jejich vlastnosti a mechanismus působení.
2. Popište principy vysokoúčinné kapalinové chromatografie, uveďte přehled používané instrumentace a charakterizujte moderní trendy používané při analýze léčiv a jejich metabolitů.
3. V dostupné literatuře vyhledejte práce zabývající se analýzou aminosalicylátů a jejich metabolitů pomocí kapalinové chromatografie. Popište používané chromatografické módy.
4. Bakalářskou práci vypracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“ v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **26. února 2021**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

LS.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza aminosalicylátů a jejich metabolitů pomocí kapalinové chromatografie jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 s 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 11. 7. 2021

Lada Kropáčová

## PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří vedoucímu práce panu doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování této bakalářské práce.

## ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na seznámení s léčivy DMARDs, jmenovitě 5-aminosalicylovou kyselinu a její metabolity a také jejich stanovení v biologických vzorcích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V práci je popsána zejména indikace, mechanismus působení a nepříznivé účinky léčiv. Je zde uveden také popis onemocnění, při kterých se tyto léčiva užívají či používané chromatografické módy pro jejich analýzy.

### Klíčová slova

DMARD, 5-aminosalicylová kyselina (mesalazin, 5-ASA), metabolity, *N*-acetyl-5-ASA, Crohnova chorova, ulcerózní kolitida, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), fluorescenční detekce, hmotnostní spektrometrická detekce, detekce UV-fotodiodového pole

## ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on acquaintance with DMARDs drugs, namely 5-aminosalicylic acid and its metabolites, as well as their determination in biological samples by high performance liquid chromatography. The work mainly describes the indications, mechanism of action and adverse effects of the drugs. There is also a description of the diseases, in which these drugs are used, and the chromatographic modes suitable for their analysis.

### Key words

DMARD, 5-aminosalicylic acid (mesalazine, 5-ASA), metabolites, *N*-acetyl-5-ASA, Crohn's disease, ulcerative colitis, high performance liquid chromatography (HPLC), fluorescence detection, mass-spectrometric detection, UV photodiode-array detection



# Obsah

ÚVOD.....	13
1. Nemoci modifikující antirevmatická léčiva .....	14
1.1. Indikace a rozdělení.....	14
1.2. Historie.....	14
1.3. Mechanismus působení.....	15
1.4. Nepříznivé účinky.....	15
1.4.1. Lékové interakce .....	16
2. Sulfasalazin.....	17
2.1. Farmakologické vlastnosti a mechanismus působení .....	17
2.1.1 Farmakodynamické vlastnosti .....	18
2.1.2. Farmakokinetické vlastnosti .....	19
2.2. Snášlivost a nežádoucí účinky .....	19
3. Sulfapyridin .....	21
3.1. Mechanismus a použití.....	21
3.2. Toxicita.....	22
4. 5-aminosalicylová kyselina.....	23
4.1. Indikace a způsob podání .....	24
4.2. Mechanismus účinku .....	24
4.2.1. Farmakokinetické vlastnosti a exkrece .....	25
4.3. Terapeutické studie .....	26
4.4. Nežádoucí účinky .....	27
5. Idiopatické střevní záněty .....	29
5.1. Crohnova choroba .....	29
5.1.1. Profylaxe pooperačního relapsu u Crohnovy choroby s mesalazinem .....	30
5.2. Ulcerózní kolitida .....	31
5.2.1 Mesalazin v léčbě aktivní ulcerózní kolitidy.....	32
6. Metabolity 5-aminosalicylové kyseliny .....	34
6.1. Hlavní metabolit <i>N</i> -acetyl-5-aminosalicylová kyselina.....	35
7. Kapalinová chromatografie.....	36
7.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	37
7.1.1. Princip a používaná instrumentace v HPLC.....	37

8. Moderní techniky ve farmaceutické analýze .....	40
9. Chromatografické módy používané v analýze aminosalicylátů a jejich metabolitů .....	42
9.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí .....	42
9.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrickou detekcí ...	43
9.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí UV fotodiodového pole .....	44
10. Chromatografické stanovení 5-aminosalicylové kyseliny a jejich metabolitů v biologických vzorcích .....	45
10.1. HPLC stanovení 5-aminosalicylové kyseliny a jejich metabolitů v krevní plazmě.....	46
10.1.1 Použité materiály, chemikálie a instrumentace .....	46
10.1.2 Příprava vzorku .....	47
10.1.3. HPLC s tandemovým ultrafialovým fotodiodovým polem a fluorescenční detekcí .....	47
10.1.4. HPLC s hmotnostní spektrometrickou detekcí .....	50
SHRNUTÍ .....	51
Bibliografie .....	52

## Seznam obrázků

<b>Obrázek I</b> - Struktura sulfasalazinu [10] .....	17
<b>Obrázek II</b> - Struktura sulfapyridinu [25] .....	21
<b>Obrázek III</b> - Struktura mesalazinu [31] .....	23
<b>Obrázek IV</b> - Schéma tablety MMX mesalazinu [68] .....	32
<b>Obrázek V</b> – Metabolické štěpení salicylazosulfapyridinu na aktivní 5-ASA a následná biotransformace fáze II 5-ASA [73] .....	34
<b>Obrázek VI</b> - Struktura <i>N</i> -acetyl-5-aminosalicylové kyseliny [82].....	35
<b>Obrázek VII</b> - Schéma HPLC [84] .....	38
<b>Obrázek VIII</b> - Separace v koloně [84].....	38
<b>Obrázek IX</b> - HPLC chromatogram vzorku [84] .....	39
<b>Obrázek X</b> – UV spektra aminosalicilových kyselin (deriváty ASA) získaná pomocí UV-PDA detektoru během HPLC analýzy [73].....	48
<b>Obrázek XI</b> – Chromatogram separace směsi osmi aminosalicilových kyselin (deriváty ASA) získaný pomocí fluorescenčního detektoru [73].....	49
<b>Obrázek XII</b> – Chromatogram derivatizovaného extraktu z lidské plazmy obsahující hlavní metabolit fáze II <i>N</i> -acetyl-5-ASA, <i>N</i> -acetyl-4-ASA, základní sloučeninu 5-ASA a 4-ASA, ve formě svých <i>N</i> -propionylderivátů, získaný pomocí fluorescenčního detektoru [73] .....	49
<b>Obrázek XIII</b> - Chromatogram derivatizovaného extraktu z lidské plazmy obsahující hlavní metabolit fáze II <i>N</i> -acetyl-5-ASA, <i>N</i> -acetyl-4-ASA, základní sloučeninu 5-ASA a 4-ASA, ve formě svých <i>N</i> -propionylderivátů, získaný pomocí ultrafialového detektoru fotodiodového pole [73] .....	50

## Seznam zkratek

<b>4-ASA:</b> 4-aminosalicylová kyselina .....	46
<b>5-ASA:</b> 5-aminosalicylová kyselina .....	17
<b>Ac-5-ASA:</b> <i>N</i> -acetyl-5-aminosalicylová kyselina .....	26
<b>bdMARDs:</b> Biologické nemoci modifikující antirevmatická léčiva .....	14
<b>DMARD:</b> Nemoci modifikující antirevmatická léčiva .....	14
<b>DNA:</b> Deoxyribonukleová kyselina .....	35
<b>FL:</b> Fluorescenční detektor .....	47
<b>GC:</b> Plynová chromatografie .....	40
<b>HPLC:</b> Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	37
<b>IBD:</b> Idiopatické střevní záněty.....	29
<b>IgA:</b> Imunoglobulin A.....	21
<b>IL:</b> Interleukin.....	15
<b>LC:</b> Kapalinová chromatografie .....	36
<b>ME:</b> Mesalazin .....	17
<b>MMX:</b> Multi Matrix System.....	32
<b>NF:</b> Nukleární faktor .....	25
<b>PDA:</b> Detektor s diodovým polem.....	44
<b>RA:</b> Revmatoidní artritida.....	14
<b>SASP:</b> Nerozdělený sulfasalazin .....	18
<b>sDMARDs:</b> Syntetické nemoci modifikující antirevmatická léčiva .....	14
<b>SP:</b> Sulfapyridin.....	17
<b>TLC:</b> Chromatografie na tenké vrstvě.....	40
<b>TNF:</b> Tumor nekrotický faktor .....	25
<b>UHQ:</b> Ultra vysoká kvalita .....	46
<b>UV:</b> Ultrafialové záření .....	39
<b>Vis:</b> Viditelné záření.....	39

## ÚVOD

Nemoci modifikující antirevmatická léčiva jsou látky, které jsou určeny k léčbě zánětlivých onemocnění, jako je například revmatoidní artritida či zánětlivé onemocnění střev. Tyto látky můžeme rozdělit na dvě hlavní skupiny, na syntetické a biologické. Jejich mechanismus účinku je složitý a jedná se zejména o interferenci s cestami v zánětlivých kaskádách. Tak jako jiná léčiva, tak i tyto mají různé nežádoucí účinky, nejčastěji různorodé gastrointestinální potíže, či výskyt různých infekcí. Hlavním zástupcem těchto léčiv je sulfasalazin. Tento konjugát spojený azo vazbou, se v organismu metabolizuje na sulfapyridin a důležitou 5-aminosalicylovou kyselinu, známou také pod názvem mesalazin nebo zkratkou 5-ASA.

Mesalazin je klíčové gastrointestinální protizánětlivé činidlo používané k léčbě IBD chorob do nichž řadíme Crohnovu chorobu či ulcerózní kolitidu. Toto léčivo je nejlépe vstřebáváno z horního tenkého střeva, méně ochotně ale také ze střeva tlustého. Po vstřebání se v organismu dále metabolizuje na svoje metabolity, a to především na *N*-acetyl-5-aminosalicylovou kyselinu. Může se užívat buď perorálně v různých potahovaných tabletách se zpožděným či prodlouženým uvolňováním anebo rektálně jako klystýry a čípky. Do nežádoucích účinků nejčastěji řadíme nauzeu a bolesti hlavy.

5-aminosalicylová kyselina je v převážné většině velmi dobře tolerována a dá se použít k léčbě aktivního chronického onemocnění střev mírné až střední závažnosti či jako udržovací léčba.

# 1. Nemoci modifikující antirevmatická léčiva

## 1.1. Indikace a rozdělení

Nemoci modifikující antirevmatická léčiva – Disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD) jsou skupinou léků určených k léčbě zánětlivých artritid, včetně revmatoidní artritidy (RA), psoriatické artritidy a ankylozující spondylitidy. Mohou být také použity při léčbě dalších poruch, včetně onemocnění pojivové tkáně, jako je systémová skleróza, systémový lupus erythematosus a Sjogrenův syndrom, stejně jako při léčbě zánětlivé myositidy, vaskulitidy, uveitidy, zánětlivého onemocnění střev a některých druhů rakoviny [1; 2; 3].

V současné době je můžeme klasifikovat jako syntetické (sDMARDs) a biologické (bDMARDs) nemoci modifikující léčiva. Syntetické dělíme na konvenční syntetické a cílené syntetické. Cílené syntetické představují pouze ty, které byly speciálně vyvinuty pro cílení na konkrétní molekulární strukturu (například imatinib, tofacitinib), konvenční zahrnují tradiční léky – methotrexát, sulfasalazin, leflunomid, hydroxychlorochin, soli zlata a další. Biologické rozdělujeme na látky biologicky původní a biologicky podobné, jako je například infliximab, adalimumab, etanercept, rituximab, abatacept, tocilizumab, ale také nově vznikající clazakizumab nebo sirukumab. Biologicky podobné jsou ty, které mají stejnou primární, sekundární a terciární strukturu jako biologicky původní a mají podobnou účinnost a bezpečnost jako původní protein [4].

DMARDs jsou imunosupresivní a imunomodulační látky. Biologické DMARD jsou obvykle předepisovány po selhání konvenční léčby. Některé z těchto léků jsou monoklonální chimérické humanizované fúzní protilátky, jiné jsou receptory, které byly fúzovány s částí lidského imunoglobulinu nebo malými molekulami, jako jsou inhibitory Janusových kináz. DMARD lze podávat orálně, subkutánně a intravenózně [5].

## 1.2. Historie

Léky označené jako antirevmatická léčiva modifikující onemocnění byly zavedeny jako hlavní antirevmatická léčba v různých časových obdobích: injekční zlato ve 30. letech, hydroxychlorochin v 50. letech, azathioprin v 60. letech, sulfasalazin a methotrexát v polovině 80. let, selektivně imunomodulační látky nebo takzvané biologické DMARD od roku 1998 [6].

### 1.3. Mechanismus působení

Každé DMARDs má jedinečný mechanismus účinku, který nakonec interferuje s kritickými cestami v zánětlivé kaskádě. Methotrexát například stimuluje uvolňování adenosinu z fibroblastů, snižuje adhezi neutrofilů, inhibuje lokální produkci interleukinu 1 (IL-1), snižuje hladinu IL-6 a IL-8, inhibuje expresi genu synoviální kolagenázy a potlačuje buněčnou imunitu. Jiné léky v této kategorii slouží k inhibici proliferace nebo způsobují dysfunkce lymfocytů. Leflunomid inhibuje dihydroorotát dehydrogenázu, což vede k inhibici syntézy pyrimidinu, a tím blokuje proliferaci lymfocytů. Sulfasalazin zprostředkovává své protizánětlivé účinky prevencí oxidačního, nitrativního a nitrosativního poškození. Hydroxychlorochin je naproti tomu velmi mírné imunomodulační činidlo [4].

Biologické DMARD jsou na druhé straně velmi selektivní ve svém mechanismu působení. Jejich funkce zahrnující interferenci s funkcí nebo produkcí cytokinů, inhibují „druhý signál“ požadovaný pro aktivaci T-buněk nebo vyčerpání B-buněk, nebo inhibují faktor, který aktivuje B-buňky [7; 8].

### 1.4. Nepříznivé účinky

Většina konvenčních DMARD má podobné nežádoucí účinky.

Hydroxychlorochin má nejlepší bezpečnostní profil ze všech konvenčních DMARD. Ve srovnání s běžnými DMARDs nezvyšuje riziko závažných infekcí, nezpůsobuje hepatotoxicitu nebo renální dysfunkci. Mezi běžné nežádoucí účinky patří vyrážka nebo průjem. Vzácným, ale významným nežádoucím účinkem je retinopatie/makulopatie, což je patrné u vyšší kumulativní dávky. Rizikovými faktory je užívání více než 5 mg/kg/den, více než 5 let léčby, dále postupující věk a chronické onemocnění ledvin. U pacientů se tak doporučuje pravidelné oftalmologické vyšetření. Mezi další vzácné nežádoucí účinky patří anémie, leukopenie, myopatie a kardiomyopatie.

Methotrexát, leflunomid a sulfasalazin mají podobný profil nežádoucích účinků. Nejčastěji gastrointestinální potíže – jako jsou nauzea, bolesti břicha, průjem, dále vyrážka, alergické reakce, útlum kostní dřeně, hepatotoxicita a vyšší výskyt běžných, někdy závažných infekcí. Methotrexát i leflunomid mohou způsobit alopecii. Mezi další nežádoucí účinky pro methotrexát patří intestinální plicní onemocnění, nedostatek kyseliny listové a jaterní cirhóza.

Leflunomid může způsobit hypertenzi, periferní neuropatii a úbytek hmotnosti. Sulfasalazin má vysoké riziko gastrointestinálních potíží.

Nejzávažnějším nežádoucím účinkem všech biologických DMARDs je zvýšené riziko běžných a závažných infekcí, včetně bakteriálních, plísňových a virových infekcí. Může také dojít k reaktivaci tuberkulózy, herpes zoster a hepatitidy B/C. Vzácně bylo hlášeno také poškození kostní dřeně nebo hepatotoxicita.

Methotrexát a leflunomid jsou kontraindikovány v těhotenství a při kojení kvůli jejich teratogenním účinkům. Sulfasalazin může u kojence způsobit žloutenku, zejména pokud se užívá ve třetím trimestru těhotenství. Hydroxychlorochin může procházet placentou. U biologických DMARD jsou k dispozici omezené údaje o bezpečnosti v těhotenství. Certolizumab je jediný, který neproniká placentou kvůli větší velikosti molekuly a je považován za relativně bezpečný při užívání v těhotenství [4].

#### 1.4.1. Lékové interakce

Některé léky jako jsou nesteroidní protizánětlivé látky, inhibitory protonové pumpy, sulfasalazin nebo amoxicilin, mohou interferovat s renální exkrecí methotrexátu, a tím zvyšovat jeho účinnost a také zvyšovat riziko nežádoucích účinků.

I když je kombinace biologických DMARD s konvenčními DMARD či použití několika konvenčních DMARDs zároveň, považována za bezpečnou, nedoporučuje se používat kombinace různých biologických DMARD kvůli zvýšenému riziku těžké imunosuprese vedoucí k závažné a potenciálně život ohrožující infekci [4].

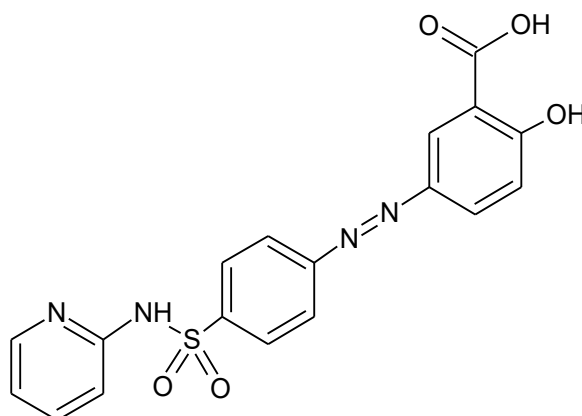


## 2. Sulfasalazin

Sulfasalazin, nebo také salazosulfapyridin, salicylazosulfapyridin, 2-hydroxy-5-[2-[4-[(2-pyridinylamino)sulfonyl]fenyl]diazenyl]benzoová kyselina, CAS 599-79-1; patří do skupiny antirevmatických léčiv modifikující choroby. Je to lék používaný k léčbě revmatoidní artritidy, ulcerózní kolitidy a Crohnovy choroby. Pro lékařské účely byl schválen v roce 1950 ve Spojených státech a stal se nejčastěji předepisovaným agentem pro léčbu zánětlivých onemocnění střev. Je užíván perorálně, nejlépe po jídle a je dostupný jako generické léčivo [9; 10; 11; 12].

Jedná se o konjugát kyseliny 5-aminosalicylové (5-ASA), analog salicylátu, a sulfapyridinu (SP), sulfonamidu, spojené azo vazbou [13].

Můžeme ho najít pod obchodními názvy – Azulfidine®, Colo-Pleon®, Salazopyrin® [10].



**Obrázek 1** - Struktura sulfasalazinu [10]

### 2.1. Farmakologické vlastnosti a mechanismus působení

Sulfasalazin je proléčivo, které se in vivo převádí na sulfapyridin (protiinfekční sulfonamid) a kyselinu 5-aminosalicylovou (mesalazin (ME), protizánětlivé činidlo) [12].

V roce 1977 byla studována terapeutická aktivita těchto dvou metabolitů a bylo prokázáno, že mesalazin je terapeuticky aktivní složkou léčiva [14].

Přesný mechanismus účinku léčiva není zcela objasněn. Možný antibakteriální způsob účinku léčiva byl navržen kvůli jeho sulfonamidové složce. Protože mohou být důležité imunologické mechanismy v patogenezi zánětlivého onemocnění střev, byly studovány možné

účinky sulfasalazinu na systémovou a lokální imunitu. Ukázalo se, že sulfasalazin a v menší míře i sulfapyridin, inhibují mitogenem indukovanou cytotoxicitu in vitro lidskými lymfocyty. Lék ani jeho metabolity nemění produkci imunoglobulinu mononukleárními buňkami periferní krve. Jak sulfasalazin, tak sulfapyridin inhibují náhodou migraci polymorfonukleárních leukocytů a také inhibují produkci superoxidu. Dále sulfasalazin a mesalazin blokují syntézu produktů lipoxygenázové dráhy – leukotrieny a hydroxymastné kyseliny. Inhibice syntézy těchto látek může vysvětlovat některé protizánětlivé účinky sulfasalazinu při zánětlivém onemocnění střev [15; 16; 17; 18; 19; 20].

Po perorálním podání je přibližně 10–30 % původního léčiva absorbováno z tenkého střeva. Sulfasalazin, který se dostane do tlustého střeva, je štěpen bakteriálními azoreduktázami, čímž uvolňuje sulfapyridin a mesalazin. Sulfapyridin je téměř úplně absorbován, ve srovnání s přibližně 20–30 % absorpcí mesalazinu. Všechny tři látky jsou značně metabolizovány [9].

#### 2.1.1 Farmakodynamické vlastnosti

Přibližně 90 % dávky se dostává do tlustého střeva, kde bakterie štěpí léčivo na sulfapyridin a mesalazin, ty jsou aktivní, a nerozdělený sulfasalazin (SASP).

Většina sulfapyridinu je absorbována, hydroxylována nebo glukuronidována a v moči se objevuje směs nezměněného a metabolizovaného SP. Sulfapyridin je detekován v krvi 3 až 5 hodin po perorálním podání sulfasalazinu, což je doba odpovídající době přechodu původního léčiva do míst redukce azo vazby v tlustém střevě. Mesalazin však zůstává z velké části v tlustém střevě, jen malá část tohoto léčiva se absorbuje a vylučuje se močí jako acetylovaný derivát. Většina 5-aminosalicylátu se ve stolici izoluje beze změny, některý lze nalézt v acetylované formě. Nezměněný sulfasalazin se vylučuje beze změny žlučí a močí. Celkově má léčivo a jeho metabolity imunomodulační účinky, antibakteriální účinky, účinky na kaskádu arachidonové kyseliny a změnu aktivity některých enzymů. Čistým klinickým výsledkem je snížení aktivity zánětlivého onemocnění střev. Enterosolventní SASP je registrován pro léčbu revmatoidní artritidy, kde se jeho účinek podobá účinkům penicilaminu nebo zlatu [15; 13; 21].

### 2.1.2. Farmakokinetické vlastnosti

Pokud jde o použití salazopyridinu u onemocnění střev, neexistují důkazy o tom, že by systémové hladiny měly jakýkoli jiný význam než na výskyt nežádoucích účinků. Hladiny sulfapyridinu přibližně nad 50 µg/ml jsou spojeny se značným rizikem nežádoucích účinků, zejména u pomalých acetylátorů. U nezměněného sulfasalazinu podávaného v jedné perorální dávce 3 g se maximální skokové hladiny dosáhlo za 3 až 5 hodin, eliminační poločas byl  $5,7 \pm 0,7$  hodiny, časová prodleva 1,5 hodiny. Během udržovací léčby byla renální clearance nerozděleného sulfasalazinu  $7,3 \pm 1,7$  ml, pro SP  $9,9 \pm 1,9$  ml a acetylovaný-ME  $100 \pm 20$  ml.

Volný sulfapyridin se poprvé objeví v plazmě za 4,3 hodiny po jedné dávce s absorpčním poločasem 2,7 hodiny. Poločas eliminace byl vypočítán na 18 hodin. Pokud jde o mesalazin, v moči byl prokazatelný pouze acetylovaný ME (ne volný ME), acetylace se pravděpodobně dosáhlo převážně na sliznici tlustého střeva. Po 3 g dávce SASP byla doba prodlevy  $6,1 \pm 2,3$  hodiny a plazmatické hladiny se udržovaly pod 2 µg/ml celkového ME. Poločas vylučování močí byl  $6,0 \pm 3,1$  hodiny a poločas absorpce na základě těchto údajů  $3,0 \pm 1,5$  hodiny. Konstanta renální clearance byla 125 ml/min, což odpovídá glomerulární filtraci [15].

### 2.2. Snášlivost a nežádoucí účinky

Z posledních výzkumů vyplývá, že 28 ze 133 pacientů (což odpovídá 21 %) užívající sulfasalazin mělo jeden nebo více vedlejších účinků [22].

Nejčastěji hlášenými nežádoucími účinky jsou gastrointestinální potíže – například nauzea, zvracení, dyspepsie, anorexie, také účinky na centrální nervovou soustavu jako jsou bolesti hlavy, závratě či vyrážka. Občas můžeme pozorovat také pálení žáhy či epigastrické potíže. Použití enterosolventních tablet sulfasalazinu v klinické praxi do značné míry nahradilo standardní formulaci sulfasalazinu, protože enterosolventní formulace výrazně snižuje závažnost a výskyt nežádoucích gastrointestinálních účinků [9; 23].

Mezi další nežádoucí účinky patří hematologické poruchy, jako je leukopenie, které se projevují u  $\leq 3$  % pacientů. Méně často hlášené problémy zahrnují krevní dyskrázie, hypersenzitivní reakce, dušnost a jaterní dysfunkce. Kromě toho se u mužských pacientů objevuje zjevně reverzibilní oligospermie [9].

Vzhledem k tomu, že sulfasalazin prochází placentou, je potřeba vzít v úvahu potenciál pro kernicterus u novorozenců. Je také distribuován do mléka [12].

Časté nežádoucí účinky přímo souvisí s hladinou sulfapyridinu v séru. Protože pacienti, kteří jsou pomalými acetylátory a kterým se podávají velké dávky sulfasalazinu, mají tendenci mít nejvyšší sérové hladiny sulfapyridinu, a tak není překvapivé, že většina nežádoucích účinků byla popsána právě u nich [22].

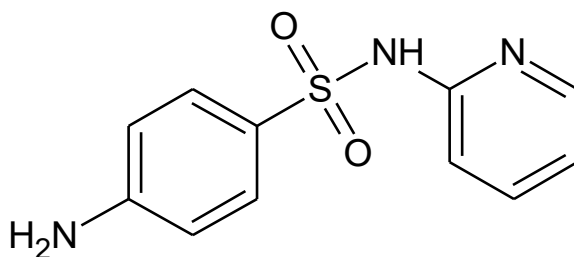
Sulfasalazin je kontraindikován u dětí mladších 2 let, dále u pacientů s přecitlivělostí na sulfonamidy, salicyláty nebo konzervační látku benzoát sodný a také u pacientů s porfyrií [24].

### 3. Sulfapyridin

Sulfapyridin (CAS 144-83-2) nebo také 4-amino-*N*-2-pyridinylbenzensulfonamid, dalšími názvy *N*<sup>1</sup>-2-pyridylsulfanylamid, 2-sulfanylamidopyridin, 2-(*p*-aminobenzensulfonamido)pyridin je sulfonamidový antibakteriální lék. Běžně jej můžeme označit jako M&B 693 [25; 26].

Je to bílý nebo světle žlutý prášek bez zápachu, který při expozici světla ztmavne. Jako nejméně rozpustný ve vodě ze všech sulfonamidů je po perorálním podání špatně a nepravidelně absorbován.

Sulfapyridin je dostupný ve formě 500 mg tablet a je získáván přímo od výrobce ve Spojených státech, protože je nyní považován za léčivý přípravek pro vzácná onemocnění a není obecně dostupný [27].



**Obrázek II** - Struktura sulfapyridinu [25]

#### 3.1. Mechanismus a použití

Sulfapyridin byl poprvé do lékařské praxe uveden pro léčbu pneumokokové pneumonie jako první v roce 1938. Je užitečný při mnoha infekčních a zánětlivých stavech. Používá se k léčbě dermatitidy herpetiformis (Duhringovy choroby) a kožních problémů. Sulfapyridin však nefunguje na jakýkoli druh infekce, jako to dělají jiné léky na sulfonamidové bázi. K léčbě infekcí u lidí již není předepisován, ale můžeme ho použít k léčbě lineárního onemocnění IgA a také ve veterinární medicíně [26; 27; 28].

Absorpce sulfapyridinu je méně předvídatelná kvůli jeho minimální rozpustnosti ve vodě. Je přibližně ze 70 % vázán na bílkoviny a prochází enterohepatální cirkulací. Snadno a

rovnoměrně se distribuuje ve všech tkáních. Také prochází hematoencefalickou bariérou a placentou a je vylučován do mateřského mléka.

Po vstupu do portálního oběhu se sulfapyridin metabolizuje hlavně acetylací, není však deacetylován. Dále je metabolizován hydroxylací a konjugací s kyselinou glukuronovou. Přibližně 90 % konjugátů se vylučuje močí, zbývajících 10 % se vylučuje žlučí [27; 29].

### 3.2. Toxicita

Nejběžnějším toxickým projevem pozorovaným po podání léku byla nevolnost a zvracení. Nauzea se vyskytla u 66 % a obtěžující zvracení u 30 % léčených případů. Navzdory své četnosti nepředstavují vážný problém v léčbě. Pokud v podávání sulfapyridinu pokračujeme, nevolnost i zvracení mají tendenci spíše klesat než stoupat.

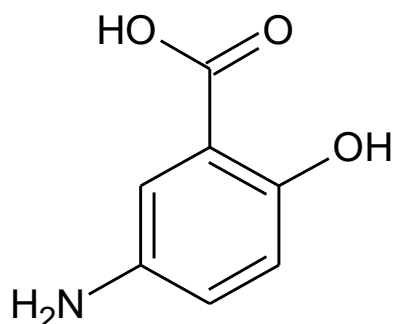
Bylo zjištěno, že většina pacientů snáší lék lépe, pokud se tablety drtí a podávají se ve formě prášku do mléka, do vody nebo ovocné šťávy.

Dále byla přítomná mírná methemoglobinémie u několika pacientů. Bolesti hlavy nebyly pozorovány. Sulfapyridin může dále způsobit vyrážku či horečku. Také se může objevit hrubá hematurie, která je obvykle doprovázena bolestmi močového. Příčina hematurie nebyla stanovena, ale přítomnost velkého počtu zubatých krystalů léčiva v čerstvě vyprázdňené moči to naznačuje jako možnou příčinu. Vývoj anémie nebo žloutenky způsobený lékem nebyl pozorován. Byl pozorován také výskyt granulocytopenie [30].

#### 4. 5-aminosalicylová kyselina

Mesalazin – 5-aminosalicylic acid (CAS 89-57-6) neboli 5-amino-2-hydroxybenzoová kyselina, 5-aminosalicylová kyselina, 5-ASA a mesalamin je 5-aminosalicylový derivát a gastrointestinální protizánětlivé činidlo. Řadíme jej do skupiny léků, které se používají k léčbě zánětlivých onemocnění střev, včetně Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy [31; 32].

Můžeme ho najít pod obchodními značkami Asacol<sup>®</sup>, Asacolitin<sup>®</sup>, Claversal<sup>®</sup>, Lialda<sup>®</sup>, Lixacol<sup>®</sup>, Mesasal<sup>®</sup>, Pentasa<sup>®</sup>, Rowasa<sup>®</sup>, Salofalk<sup>®</sup> [31].



**Obrázek III** - Struktura mesalazinu [31]

Mesalazin je aktivní složkou sulfasalazinu (salazosulfapyridinu), který je metabolizován na sulfapyridin a mesalazin. Sulfapyridin působí jako nosič v tlustém střevě, kde je diazo vazba štěpena bakteriemi a uvolňován mesalazin [33; 34].

Při perorálním podání se rychle a úplně absorbuje z horního tenkého střeva, ale špatně se vstřebává z tlustého střeva. Aby se tlustého střeva dosáhlo v terapeutickém množství, musí být mesalazin potažen. Do tlustého střeva může být také dodáván nahrazením sulfapyridinu jiným nosičem [14; 34].

Volná 5-ASA podstupuje rychlou a téměř úplnou systémovou absorpci z proximálního střeva v závislosti na koncentraci a lokálním pH, následovanou rozsáhlým metabolismem. Je tedy nesmírně důležité dodávat mesalazin lokálně, aby se snížily vlivy systémové absorpce léčiva způsobující nežádoucí účinky a ztráta léčiva snižující pravděpodobnost terapeutického účinku [35].

Mesalazin můžeme také nalézt, jako aktivní složku, v léčivu balsalazid spolu s molekulou inertního nosiče 4-aminobenzoyl-beta-alaninu [36].

#### 4.1. Indikace a způsob podání

Mesalazin máme k dispozici ve speciálně formulovaných perorálních a také rektálních formách pro léčbu aktivní ulcerózní kolitidy mírné až střední závažnosti a pro udržovací terapii během remise onemocnění.

Tablety nebo tobolky potažené pryskyřicí na akrylové bázi a tablety obsahující mikrogranule potažené ethylcelulózou dodávají mesalazin do distálního tenkého střeva a tlustého střeva, čímž se zabrání potřebě nosiče, sulfapyridinu, který je odpovědný za mnoho nežádoucích účinků spojených se sulfasalazinem. Jelikož se mesalazin uvolňuje v tenkém střevě z některých potahovaných přípravků, narozdíl od sulfasalazinu, mají tyto perorální formulace terapeutický potenciál u Crohnovy choroby [34].

Perorálně podáváme buď tablety se zpožděným uvolňováním – například Asacol, Lialda, nebo tobolky s prodlouženým uvolňováním – Pentasa. Tablety se zpožděným uvolňováním jsou potaženy 80 až 130  $\mu\text{m}$  vrstvou Eudragit®S, která se rozpouští při  $\text{pH} \geq 7$  a měly by se podávat společně s jídlem. Tablety by se měly polykat celé, aniž by došlo k porušení vnějšího potahu, protože potah je navržen tak, aby udržoval integritu tablet před vstupem do terminálního ilea a tlustého střeva, kde se uvolňuje aktivní léčivo [37; 38].

Rektálně aplikujeme jako retenční klystýr nebo čípky. Rektální suspenze se podává nejlépe před spaním a nejlepších výsledků se dosahuje, pokud je střevo vyprázdněno těsně před podáním klystýru. Rektální čípky ponecháváme po dobu  $\geq 1$ –3 hodiny, aby se dosáhlo maximálního prospěchu [38].

#### 4.2. Mechanismus účinku

Přesný mechanismus účinku mesalazinu stále není znám. In vitro studie biopsií sliznice tlustého střeva od pacientů s chronickým zánětlivým onemocněním tlustého střeva ukázaly zvýšené koncentrace prostaglandinu E2, leukotrienu B4 a 5-hydroxyeikosatetraenových kyselin, a proto se řada linií výzkumu zabývala potenciální modulací chemických mediátorů zánětlivé odpovědi, zejména metabolitů kyseliny arachidonové. Návrat zvýšených koncentrací



prostaglandinu E2 k normálu s remisí zánětlivého onemocnění střev podporuje úlohu prostaglandinů a jejich metabolitů cestou cyklooxygenázy v patogenezi zánětlivého onemocnění střev.

Ukazuje se, že leukotrieny mohou být hlavními mediátory zánětu u pacientů se zánětlivým onemocněním střev. Zvýšené uvolňování leukotrienu B4 do rektálního lumenu u pacientů s ulcerózní kolitidou je oslabováno mesalazinem. Sulfasalazin a mesalazin inhibují migraci intestinálních makrofágů na leukotrieny B4 a tím tak mohou omezit střevní zánět.

Dále bylo navrženo, že mesalazin může působit jako lapač radikálů proti reaktivním kyslíkovým skupinám a také může působit jako supresor peroxidace mastných kyselin [34].

Nedávno bylo také zjištěno, že 5-ASA inhibuje syntézu IL-1 a IL-6 a tumor nekrotického faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), čímž brání následným zánětlivým reakcím. Rovněž bylo prokázáno, že mesalazin je silným a specifickým inhibitorem aktivace nukleárního faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B), což by mohlo vysvětlit jeho příznivý účinek při léčbě zánětu. Mesalazin má také řadu inhibičních účinků na zánětlivé kaskády aktivované při idiopatických střevních zánětech, jako je například schopnost blokovat syntézu faktoru aktivujícího trombocyty [39].

Dalším zjištěním je, že 5-ASA podporuje rychlé obnovení integrity sliznice in vitro zvýšením restituce epitelu a může tedy také přímo stimulovat hojení epitelálních ran [40].

#### 4.2.1. Farmakokinetické vlastnosti a exkrece

Pokud se mesalazin podává přímo do proximální části tenkého střeva nebo orálně jako běžná tableta, rychle a téměř úplně se vstřebává, přičemž malé množství léčiva se dostává do distálního tenkého střeva a tlustého střeva. Problém předčasné absorpce byl překonán potahováním tablet Eudragit®S, který umožňuje dezintegraci, když je pH  $\sim$  7, nebo Eudragit®L, ten umožňuje rozpad přibližně při pH 5,6, a potahováním mikrogranulí ethylcelulózou, což má za následek řízené uvolňování mesalazinu v gastrointestinálním traktu.

Všechny sloučeniny se zpožděným uvolňováním jsou schopné mesalazin dodávat do distálního střeva. Větší absorpce z tenkého střeva, než ze střeva tlustého byla prokázána při přímé aplikaci mesalazinu do pravé nebo levé části tlustého nebo tenkého střeva.

Mesalazin je primárně acetylován na svůj hlavní metabolit kyselinu *N*-acetyl-5-aminosalicylovou (Ac-5-ASA) ve střevch a játrech. Tento acetylmisalazin se vylučuje převážně močí. Acetylace není ovlivněna fenotypem acetylátoru a jeví se jako nevratná. Po perorálním podání mesalazinu se zpožděným uvolňováním se až 44 % podané dávky vylučuje stolicí jako nezměněný mesalazin nebo Ac-5-ASA [34; 37].

Nezměněný mesalazin je ze 43 % vázán na plazmatické bílkoviny, zatímco acetylovaný metabolit je ze 78 % vázán na bílkoviny. Distribuční objem je 18 až 25 litrů po intravenózním a orálním podání nepotaženého mesalazinu.

Výtěžek celkového mesalazinu v moči během 4 hodin je přibližně 50 % po požití nepotahovaných tablet a 13 % a 0 % po tabletách potažených Eudragit®L resp. S. Celková výtěžnost mesalazinu v moči v těchto formulacích, 24 až 28 hodin po požití, byla 52 %, 55 % a 21 % požití dávky. Průměrné vylučování celkového mesalazinu stolicí po dobu 7 dnů má tendenci být vyšší u pacientů s aktivní ulcerózní kolitidou než u pacientů v remisi. Existují určité důkazy, že mesalazin podléhá určitému stupni enterohepatální recirkulace.

Renální clearance acetylmisalazinu byla 2 až 3krát vyšší než rychlost glomerulární filtrace, což naznačuje převládající renální tubulární sekreci.

Plazmatický eliminační poločas celkového mesalazinu se pohyboval od 0,7 do 2,4 hodiny u pacientů se zánětlivým onemocněním střev, léčených enterosolventní formou léčiva, zatímco u acetylovaného metabolitu byl po intravenózním a perorálním podání přibližně dvojnásobný [34].

#### 4.3. Terapeutické studie

Mesalazin byl studován při léčbě aktivního chronického onemocnění střev mírné až střední závažnosti a jako udržovací léčba.

Komparativní studie mesalazinu 1,5 až 3,2 g podávaného denně ve formě potahovaných tablet, ukázaly klinickou remisi u přibližně 64–72 % pacientů s mírnou až středně těžkou ulcerózní kolitidou. Příznivé výsledky byly zaznamenány také u pacientů s Crohnovou chorobou a klinické výsledky ve velké studii obecné praxe zahrnující 1215 pacientů s ulcerózní kolitidou a 498 s Crohnovou chorobou byly popsány jako „velmi dobré“ nebo „dobré“ u 85-93 % pacientů. Retenční klystýry mesalazinu vedly ke klinickému zlepšení

u 60–87 % pacientů, z nichž mnozí trpěli onemocněním nereagujícím na předchozí léčbu sulfasalazinem anebo kortikosteroidy.

V několika studiích u pacientů s aktivním mírným až středně závažným zánětlivým onemocněním střev bylo zjištěno, že orálně podávaný potahovaný mesalazin v dávce 2,4 až 4,8 g denně je významně účinnější než placebo a sulfasalazin v dávce 2 g denně. Dávky 1,5 nebo 1,6 g však nebyly statisticky významně lepší než placebo a nelze je odlišit od sulfasalazinu podávaného po 3 g denně.

Mesalazin podávaný jednou denně jako retenční klystýr obsahující dávku 1 až 4 g, byl lepší než placebo, stejně jako dávka 1,5 g denně jako čípky u pacientů s distální ulcerózní kolitidou. Klystýry mesalazinu a sulfasalazinu stejné síly (1,5 g) ukázaly vyšší účinnost mesalazinu u pacientů se středně závažnou ulcerózní kolitidou, ale čípky mesalazinu (1,5 g) a perorální sulfasalazin 3 g měly podobnou účinnost u malého počtu pacientů s ulcerózní kolitidou nebo Crohnovou nemocí.

5-ASA podávaná v dávce 0,8 až 2,7 g denně a sulfasalazin podávaný v dávce 1,6 až 4 g denně byli podobně účinné při udržování remise u pacientů s inaktivní ulcerózní kolitidou, přičemž 73-82 % bylo stále v remisi po 4 až 6 měsících a 46-62 % na konci 1 roku. Mesalazin v dávce 1,5 g denně byl v prevenci relapsu u pacientů s neaktivní Crohnovou chorobou lepší než placebo [34].

#### 4.4. Nežádoucí účinky

Nejčastěji hlášenými nežádoucími účinky mesalazinu jsou bolesti hlavy (až 13 %) a nauzea (až 8 %), zatímco svědění, závratě, poruchy trávení, bolesti svalů a horečka se obvykle vyskytují u méně než 5 % pacientů. V několika případech byla hlášena idiosynkratická reakce charakterizována zhoršením příznaků, která ustoupila po vysazení léku.

Nežádoucí účinky na klystýry mesalazinu jsou obvykle omezeny na lokální podráždění nebo jiné účinky vyplývající z vložení špičky klystýru.

Minimálně 80 % pacientů s intolerancí sulfasalazinu je schopno tolerovat mesalaminové přípravky. Většina pacientů s intolerancí nebo alergií na sulfasalazin tolerovala mesalazin s malými nebo žádnými nežádoucími účinky. Asi u 10 % těchto pacientů došlo k podobným nežádoucím účinkům jako u perorálních forem obou léků, patrnější u těch

pacientů, kteří vykazovali závažné alergické nebo gastrointestinální reakce na sulfasalazin. Abnormality spermií vyvolané sulfasalazinem se po substituci mesalazinem zlepšily nebo byly rezervovány [34; 41].

Ačkoli jsou mesalaminové přípravky obecně dobře snášeny, jsou popsány i nežádoucí účinky, mezi které patří zhoršení kolitidy; renální toxicita, jako je intersticiální nefritida a nefrotický syndrom; dále plicní toxicita, jako je intersticiální plicní onemocnění a fibróza, bronchiolitis obliterans, plicní granulomatóza a eozinofilní pleurální výpotek; také perikarditida, pankreatitida, vypadávání vlasů a Stevens-Johnsonův syndrom. Tyto reakce se zdají být na počátku idiosynkratické, i když mechanismus zůstává nejasný. Je možné, že některé z těchto účinků lze pozorovat primárně u mesalaminu v důsledku vyšších dávek spojených s tímto léčivem než u sulfasalazinu. Obecně se tyto nežádoucí účinky vyskytnou u postižených pacientů s jakýmkoli perorálními nebo topickými přípravky se zpožděným uvolňováním mesalaminu nebo proléčivovými přípravky [42; 43].

## 5. Idiopatické střevní záněty

Zánětlivá onemocnění střev – Inflammatory Bowel Disease (IBD), která zahrnují Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu, jsou skupinou chronických poruch charakterizovaných střevním zánětem, někdy i mimostřevními projevy spojenými s obdobími remise a nepředvídatelnými relapsy [44].

Crohnova choroba postihuje tenké a tlusté střevo, stejně jako ústa, jícn, žaludek a konečník, zatímco ulcerózní kolitida postihuje především tlusté střevo a konečník [45; 46].

Nástup IBD se obvykle vyskytuje ve druhé a třetí dekádě života. Rodinná agregace je již dlouho uznávaná. Příbuzní prvního stupně postižených jedinců mají relativní riziko pětinašobné anebo větší. Dědičná složka se zdá být u Crohnovy choroby silnější než u ulcerózní kolitidy [47; 48].

### 5.1. Crohnova choroba

Crohnova choroba je chronické zánětlivé onemocnění gastrointestinálního traktu s celosvětovým výskytem. Projevuje se příznaky vyvíjejícími se relapsujícím a remitujícím způsobem. Jde také o progresivní onemocnění, které vede k poškození a postižení střev. Mohou být ovlivněny všechny segmenty gastrointestinálního traktu, nejčastější je terminální ileum a tlusté střevo. Zánět je obvykle segmentový, asymetrický a transmurální [49; 50].

Nejčastěji se projevuje bolestmi břicha, horečkou a klinickými příznaky střevní obstrukce nebo průjmem s průchodem krve, hlenu nebo obojím. Mezi další komplikace mimo gastrointestinální trakt patří anémie, kožní vyrážky, artritida, zánět oka a únava. Obstrukce střev může nastat jako komplikace chronického zánětu a pacienti s tímto onemocněním jsou vystaveni vyššímu riziku rakoviny tlustého a tenkého střeva.

Zdá se, že Crohnova choroba je důsledkem narušené interakce intestinální komenzální mikrobioty, která je normálně ve stavu symbiotického mutualizmu s lidským hostitelem – imunitní systém. Může být také výsledkem složité souhry mezi genetickou náchylností, faktory prostředí a změnou střevní mikroflóry, což má za následek abnormální imunitní odpověď sliznice a narušenou funkci epiteliální bariéry.

Crohnova choroba obvykle začíná u dospívajících a dvacátých let, i když se může vyskytnout v jakémkoli věku a neexistují žádné léky ani chirurgické zákroky, které by vyléčily tuto chorobu. Současné strategie se zaměřují na hlubokou a dlouhodobou remisi s cílem předcházet komplikacím, jako je chirurgický zákrok, a blokovat progresi onemocnění. Ústředním bodem těchto strategií je zavedení včasné imunosuprese nebo kombinované léčby biologickými látkami u vysoce rizikových pacientů v kombinaci s přísnou a častou kontrolou zánětu a přizpůsobení léčby na základě tohoto posouzení [51; 52].

#### 5.1.1. Profylaxe pooperačního relapsu u Crohnovy choroby s mesalazinem

Přestože jsou k dispozici účinné farmakologické strategie pro léčbu aktivní Crohnovy choroby, dlouhodobé řízení zůstává nevyřešeným problémem. Proto byl kladen důraz na studie k udržení remise po úspěšné léčebné terapii nebo chirurgické resekci. Pooperační relaps je však častý a z dlouhodobého hlediska téměř nevyhnutelnou událostí u pacientů s Crohnovou chorobou, která vyžaduje buď lékařské ošetření, nebo dokonce reoperaci.

Mesalazin se zdá být dobrým kandidátem na udržovací léčbu díky jeho nízké toxicitě. Určitý účinek zabraňující relapsu byl nalezen v několika studiích u pacientů po úspěšné medikaci aktivní fáze Crohnovy choroby. Přípravek mesalazinu s významným uvolňováním v tenkém střevě byl považován za potenciální výhodu, zejména u pacientů s lokalizací onemocnění, včetně tenkého střeva [53].

Byla provedena randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná multicentrická studie s velikostí vzorku 150 pacientů ve skupině, denní dávkou 4 g mesalazinu (denně rozdělené do 3 dávek) nebo placebo a zahájená léčbou do 10 dnů po operaci a pokračovala po dobu 18 měsíců až do klinického relapsu. Jako studijní lék byla použita Pentasa, která obsahuje 500 mg mesalazinu zapouzdřeného v mikrogranulích ethylcelulózy a lisovaných do formy tablety s mikrokrystalickou celulózą. Placebo tablety byly stejného vzhledu i konzistence.

Z výsledků dostupných údajů byly zvažovány tři možnosti. Zaprvé, zahájení léčby zabraňující relapsu brzy po operaci by mohlo zabránit opětovnému objevení endoskopických lézí, a tím i pokroku v symptomatickém návratu Crohnovy choroby. Za druhé, vyšší dávky

mesalazinu by mohly být účinné při prevenci relapsů. A zatřetí, způsob uvolňování léčiva může ovlivnit jeho klinickou účinnost.

Studie poskytuje důkazy, že Pentasa může účinně zabránit pooperační recidivě u pacientů s Crohnovou chorobou omezenou na tenké střevo [54].

## 5.2. Ulcerózní kolitida

Ulcerózní kolitida je řazena do podkategorie zánětlivých onemocnění střev. Postihuje tlusté střevo a konečník a obvykle zasahuje pouze nejnějnější výstelku nebo sliznici. Projevuje se jako souvislé oblasti zánětu a ulcerace, bez segmentů normální tkáně. *Crohn's and Colitis Foundation of America* definuje několik druhů ulcerózní kolitidy:

- Onemocnění postihující pouze nejvzdálenější část tlustého střeva a konečníku se nazývá ulcerózní proktitida.
- Nemoc sestupného tračníku se označuje jako omezená nebo distální kolitida.
- A onemocnění postihující celé tlusté střevo se nazývá pankolitida [55].

UC může nastat s postupným nástupem příznaků, nebo může být první záchvat akutní a fulminantní. Mezi mírnější příznaky patří postupné uvolňování stolice, křeče v břiše a průjem. Jak nemoc postupuje od mírné k závažnější, může se u pacienta vyskytnout také úbytek hmotnosti, únava, ztráta chuti k jídlu, tyto příznaky mohou mít za následek nedostatek živin, hlen ve stolici, těžké krvácení z konečníku, horečku a anémii [55; 56].

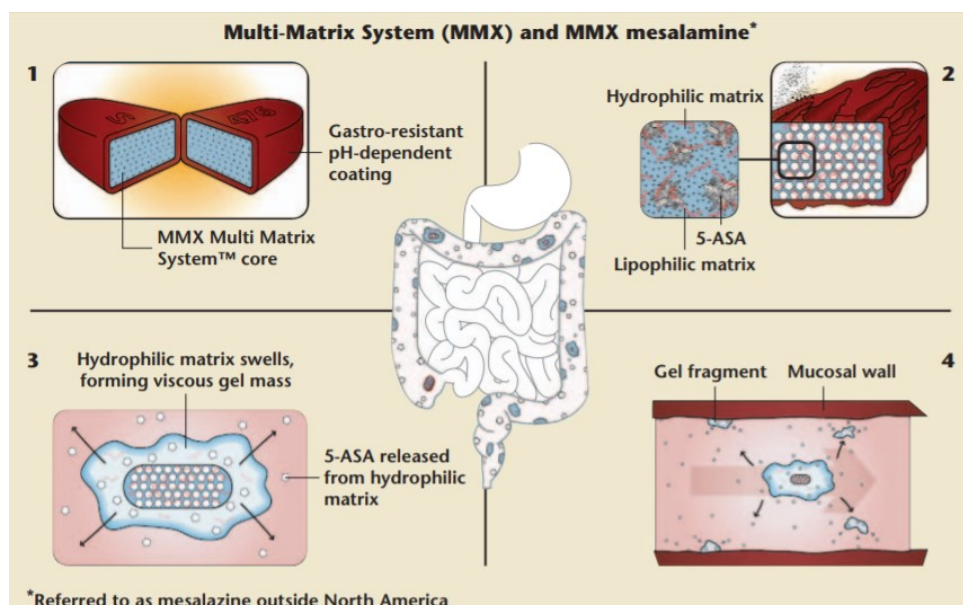
Ačkoli přesná příčina ulcerózní kolitidy zůstává neurčená, zdá se, že tento stav souvisí s kombinací genetických a environmentálních faktorů. Mezi patologické nálezy spojené s UC patří vzestup určitých zánětlivých mediátorů, známky oxidačního stresu, narušené prostředí tlustého střeva, abnormální obsah glykosaminoglykanu ve sliznici, snížená oxidace mastných kyselin s krátkým řetězcem, zvýšená střevní propustnost, zvýšená produkce sulfidů a snížená methylace [57; 58; 59].

UC se může objevit kdykoliv během života, ale obvykle je diagnostikována před 30. rokem věku. Zdá se, že onemocnění postihuje muže i ženy stejně a přibližně 20 % lidí s ulcerózní kolitidou má blízkého příbuzného se zánětlivým onemocněním střev [55].

### 5.2.1 Mesalazin v léčbě aktivní ulcerózní kolitidy

Současným standardem péče o ulcerózní kolitidu je kyselina 5-aminosalicylová. Byla vyvinuta řada mechanismů pro dodávání mesalazinu na sliznici tlustého střeva a bylo prokázáno, že dodržování doporučených dávkovacích schémat 5-ASA má zásadní vliv na míru relapsů, a tedy kvalitu života u pacientů léčených udržovací terapií [60; 61; 62; 63; 64].

MMX mesalazin je nová vysoce silná formulace 5-ASA, která využívá technologii Multi-Matrix System (MMX) navrženou k uvolňování 5-aminosalicylové kyseliny do tlustého střeva. Tento systém používá lipofilní a hydrofilní matrice uzavřené v gastrorezistentním povlaku závislém na pH, aby se usnadnilo dlouhodobé vystavení sliznice tlustého střeva touto kyselinou. Tableta je vystavena pH 7,0 nebo vyššímu, obvykle v terminálním ileu. Jak se gastrorezistentní povlak rozpadá, střevní tekutiny interagují s hydrofilní matricí a způsobují bobtnání tablety a tvoří viskózní gelovou hmotu. Jak jádro tablety a okolní gelová hmota postupují tlustým střevem, kousky gelové hmoty se postupně odtrhávají od jádra a uvolňují mesalazin. Kromě toho může hydrofilní matrice ulpívat na sliznici tlustého střeva, což dále usnadňuje cílené dodávání léčiva. Lipofilní matice, společně s 5-ASA, je rozptýlena v hydrofilní matrici a vytváří částečně hydrofobní prostředí. Očekává se, že se zpomalí pronikání vodných tekutin do jádra tablety, čímž se sníží rychlost rozpouštění léčiva a tím se prodlouží terapeutická aktivita [65; 66; 67].



Obrázek IV - Schéma tablety MMX mesalazinu [68]



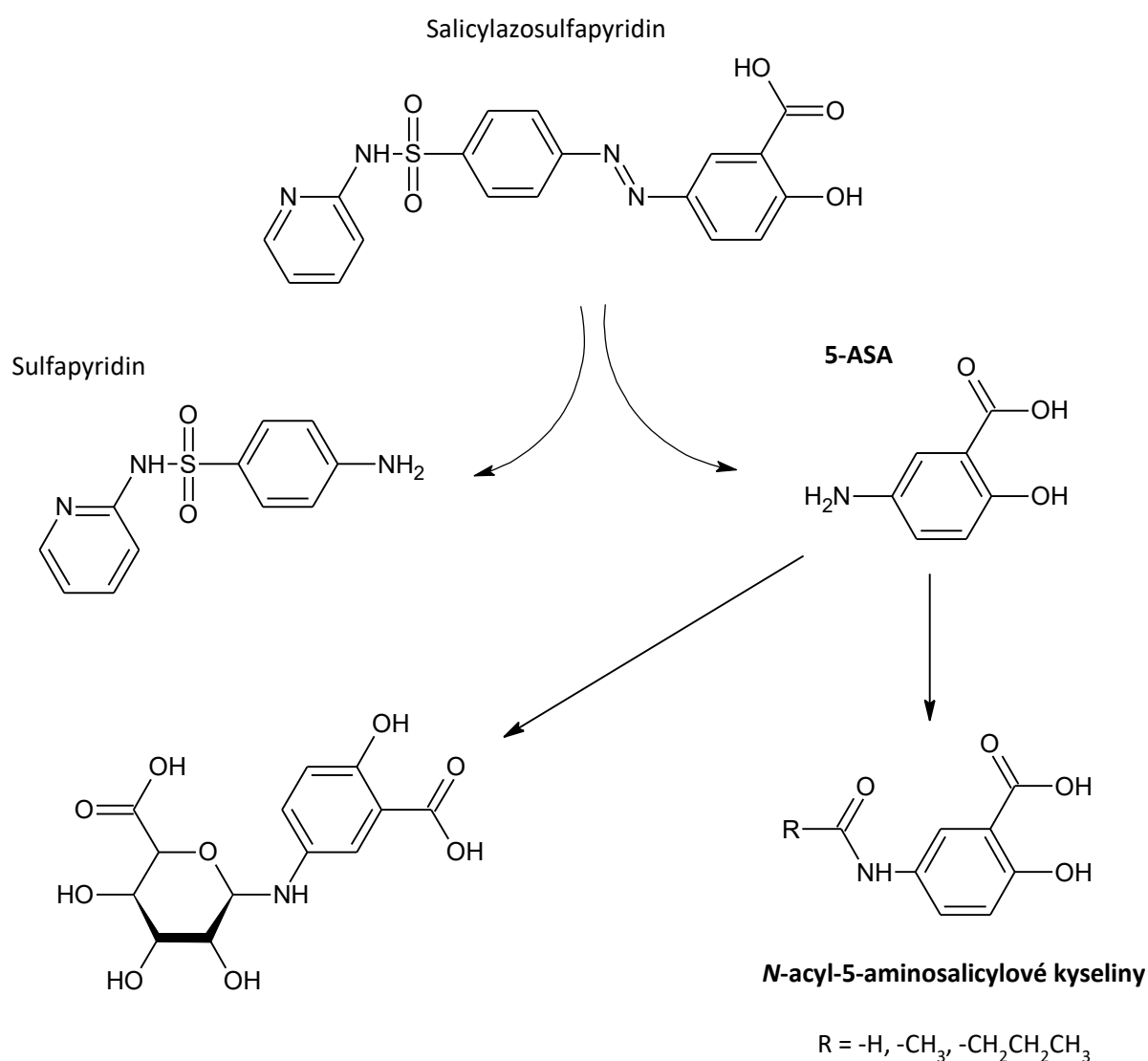
Studie vyhodnocovala účinnost a snášlivost MMX mesalazinu, nové formulace 5-aminosalicylové kyseliny určené k dodávání aktivního léčiva do tlustého střeva v jedné denní dávce, což potenciálně zlepšuje kompliance pacienta a tím celkový úspěch léčby.

Data ukazují, že MMX mesalazin podávaný v dávce 2,4 g/den nebo 4,8 g/den byl dobře tolerován, vykazoval vynikající bezpečnostní profil a byl účinný pro indukci klinické a endoskopické remise aktivní mírné až střední ulcerózní kolitidy. Protože se předpokládá, že 5-ASA působí lokálně na gastrointestinální sliznici, lze očekávat, že vyšší dávka MMX mesalazinu přinese větší klinický přínos.

MMX mesalazin nabízí perspektivu účinné léčby akutních epizod mírné nebo středně závažné, levostranné nebo rozsáhlé ulcerózní kolitidy, čímž se podstatná část pacientů dostane do úplné klinické a endoskopické remise. Snadnost dlouhodobého užívání 5-aminosalicylové kyseliny je klíčovým faktorem při prevenci relapsu ulcerózní kolitidy [69].

## 6. Metabolity 5-aminosalicylové kyseliny

Jak je znázorněno na obrázku V, pro léčivem mesalazinu je salicylazosulfapyridin, který je štěpen v tlustém střevě bakteriálními azoreduktázami na 5-aminosalicylovou kyselinu, aktivní sloučeninu, která se dále metabolizuje ve střevní stěně a v játrech na biotransformační produkty fáze II, tedy na *N*-acetyl-5-ASA, který je hlavním metabolitem, a dále *N*-formyl-5-ASA, *N*-butyryl-5-ASA a *N*- $\beta$ -D-glukopyranosyl-5-ASA [70; 71; 72].



**Obrázek V** – Metabolické štěpení salicylazosulfapyridinu na aktivní 5-ASA a následná biotransformace fáze II 5-ASA [73]

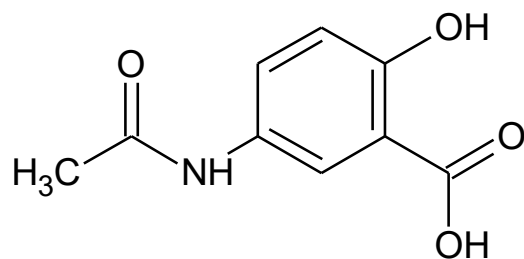
Acetylované metabolity se vylučují hlavně močí tubulární sekrecí, spolu se stopami 5-aminosalicylové kyseliny. Poločas mesalazinu je přibližně asi 1 hodina a léčivo se váže na

plazmatické proteiny ze 40-50 %. *N*-acetyl-5-ASA má poločas až 10 hodin a je vázán na plazmatické proteiny z 80 %. Určitá část 5-ASA je vyloučena ve stolici [74; 75].

#### 6.1. Hlavní metabolit *N*-acetyl-5-aminosalicylová kyselina

Kyselina *N*-acetyl-5-aminosalicylová je metabolitem protizánětlivého činidla kyseliny 5-aminosalicylové a její proléčivé formy, sulfasalazinu. Je vytvářena v játrech, střevním lumenu a buňkách epitelu tlustého střeva prostřednictvím *N*-acetyltransferáz.

Kyselina je schopna snižovat vazbu interferonu- $\gamma$  na buňky epitelu tlustého střeva o 24 %, pokud se použije v koncentraci 10 mM. Zachycuje 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl radikály v bezbuněčném testu a inhibuje bazickou hydroxylaci v DNA stimulovanou hydroxyl radikály. Na rozdíl od sulfasalazinu neinhibuje 15-hydroxyprostaglandindehydrogenázu. Močové hladiny kyseliny *N*-acetyl-5-aminosalicylové byly použity jako marker adherence 5-aminosalicylové kyseliny u pacientů se zánětlivým onemocněním střev [76; 77; 78; 79; 80; 81].



**Obrázek VI** - Struktura *N*-acetyl-5-aminosalicylové kyseliny [82]

## 7. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie – Liquid Chromatography (LC) je velmi důležitá separační metoda používaná prakticky ve všech oblastech chemie. Chromatografické metody umožňují nejen dělení velmi složitých směsí, ale také identifikaci a kvantitativní stanovení jednotlivých látek. Používá se k analýze nebo čištění složek ze složitých směsí, například k oddělení proteinů či léčiv od nečistot nebo k analýze léčiv a endogenních složek v biologických materiálech. Dále také k izolaci látek ve velmi čistém stavu, k analytické kontrole čistoty barviv, rozpouštědel, k přečištění chemikálií a podobně. Mají široké uplatnění, a to nejen v monitorování jednotlivých složek životního prostředí, ale také toxikologii, farmakologii a dalších oborech [83; 84].

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě fáze, z nichž jedna je nepohyblivá a nazývá se stacionární fáze. Přes ní se pohybuje druhá, která se proto nazývá mobilní fáze. Pohybem mobilní fáze je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku, které interagují ochotněji se stacionární fází než s fází mobilní, se proto při pohybu zadržují více než jiné složky, které se ke stacionární fázi poutají hůře. Tím se postupně jednotlivé složky od sebe separují. Obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, ale jeden z nich vždy převládá, podle této povahy děje se poté chromatografie může dále dělit.

O separaci složek vzorku v kapalinové chromatografii rozhodují nejen jejich interakce se stacionární fází, ale také použitá mobilní fáze. Mezi mechanismy separace patří adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt či specifické interakce.

V kapalinové chromatografii, kde je stacionární fází kapalina zakotvená na pevném nosiči, se využívá při separaci rozdělovací rovnováhy. Rozhodující podmínkou je vzájemná nemísitelnost mobilní a stacionární fáze. Nyní se nejčastěji používají jako sorbenty látky, které jsou chemicky navázány na nosič. Nosičem je běžný silikagel nebo sklo. Póry mohou prostupovat celý objem kuličky nosiče nebo mohou být povrchové. U kapalinové chromatografie se kolona naplní vhodným způsobem pevnou fází a na její povrch se nanese malý objem roztoku směsi látek určené k dělení. Sloupec se pak vyvíjí proléváním zvolenou kapalinou. Kapalina se hydrostatickým tlakem protlačuje náplní kolony. Eluent se sbírá

v oddělených frakcích nebo je ve vytékajícím eluátu měřen výstup každé složky z kolony detektorem a průběžně zaznamenáván.

Dělení probíhá ve skleněných trubicích o délce 20–25 cm a vnitřním průměru 10–12 cm. Ve spodní části jsou obvykle skleněnou teflonovou fritou a kohoutem na vypouštění kolony. S výhodou se používají mikrokolony z polystyrénu nebo z nízkotlakového polyethylenu.

Podle druhu náplně kolony můžeme kapalinovou chromatografii dělit na adsorpční, iontově-výměnnou, gelovou, afinitní nebo rozdělovací [84].

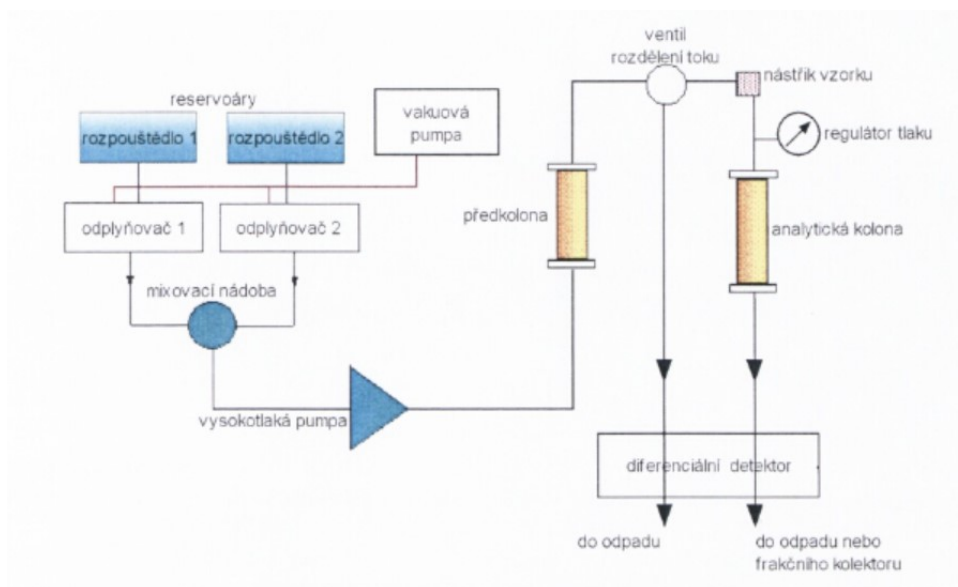
### 7.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokotlaká neboli vysokoučinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je velmi perspektivní metoda pro separaci látek ve směsi. Od klasické kapalinové chromatografie se liší tím, že pracuje s úzkými kolonami o průměru 2–8 mm, které se plní tříděným materiálem s malými částicemi nejlépe o průměru 3–10  $\mu\text{m}$ . K účinné separaci je potřeba použít dostatečně malá zrníčka sorbentu, která však kladou prostupující kapalině značný odpor. Průtok pohyblivé mobilní fáze zde probíhá pod tlakem čerpadla.

Zóny dělených látek neboli analytů se během prostupu kolonou rozšiřují. Zóně analytu v chromatogramu odpovídá pík (eluční křivka), která charakterizuje koncentrační profil analytu v zóně [84].

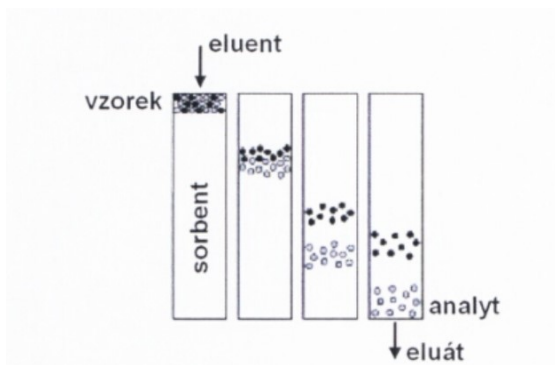
#### 7.1.1. Princip a používaná instrumentace v HPLC

Pokud zůstává složení mobilní fáze stálé, hovoříme o izokratické eluci. Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Obvykle pracují dvě čerpadla, aby na sebe navazovaly fáze výtlačku a fáze sání. Řízení mikroprocesorem zaručuje vyhlazení tlakových pulsů. Dávkování injekční stříkačkou přes pryžové septum proti vysokému tlaku je možné z hlediska těsnosti do tlaků pouze 10 MPa. Proto se dnes používá v HPLC výhradně dávkování obtokovým dávkovacím ventilem.



**Obrázek VII** - Schéma HPLC [84]

Separace probíhá v separační koloně, která obsahuje stacionární, nepohyblivou, fázi, kterou je sorbent a mobilní, pohyblivou, fázi – eluent. Dělené látky mají rozdílnou afinitu ke stacionární fázi a různé analyty podléhají různé distribuci mezi mobilní a stacionární fázi a jsou rozdílně zadržovány a rozdílně zpožďovány (retardovány). Aby byla umožněna distribuce mezi stacionární a mobilní fází, musí existovat fázové rozhraní. Při dělení látek pak dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. Chromatografický systém se v ideálním případě může blížit rovnováze. Distribuci složek mezi dvě fáze můžeme popsat distribuční (rozdělovací) konstantou  $K_D$ , která je vyjádřena jako poměr koncentrace složky ve stacionární fázi a koncentrace v mobilní fázi. Čím vyšší je hodnota této konstanty pro danou látku, tím delší dobu setrvávají její molekuly ve stacionární fázi, a tím větší je jejich retence.

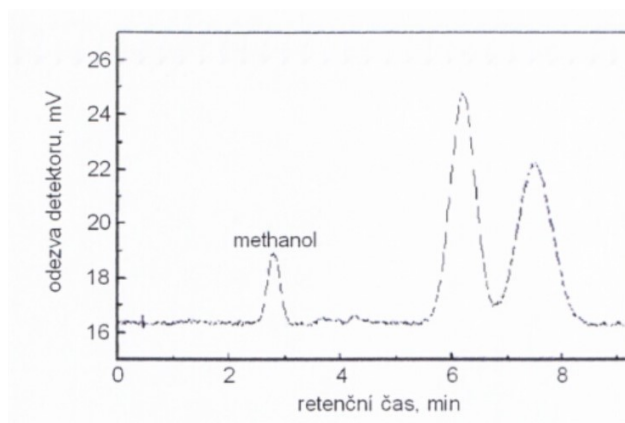


**Obrázek VIII** - Separace v koloně [84]

Kolony se používají pouze náplňové, které jsou vyrobeny z tlustého borosilikátového skla pro nižší tlaky nebo z nerezové oceli pro vysoké tlaky kolem 50 MPa, a délkou většinou 5 až 30 cm. Podle druhu náplně kolony můžeme technikou HPLC dělit látky na principu výměny iontů, na principu dělení podle rozdílné relativní molekulové hmotnosti, na principu rozdělovací chromatografie. Ve všech případech tvoří pohyblivou fázi kapalina, která prochází kolonou pod tlakem čerpadla a stacionární fázi materiál v koloně.

U vysokoúčinné kapalinové chromatografie prochází eluát vytékající z kolony průběžně detektorem, který je vestavěn do jejího výtoku. Detektor pak automaticky a kontinuálně měří některou z fyzikálních vlastností eluátu, například absorpci v UV nebo Vis části spektra – spektrofotometrický UV-Vis detektor, fluorescenci – fluorescenční detektor, vodivost – vodivostní detektor, index lomu – refraktometrický detektor, a podobně. Pro detekci látek schopných oxidace nebo redukce se používá elektrochemických detektorů. Pro analýzu složitých směsí vyžadující vysokou selektivitu nebo při analýze těžko určených látek lze použít detektoru se zakotvenými enzymy.

Signál z detektoru je převeden do podoby chromatografického záznamu, kterému říkáme chromatogram – časová závislost intenzity veličiny, která je sledována detektorem. Tento záznam charakterizují křivky gaussovského tvaru a nazýváme je píky (eluční křivky).



**Obrázek IX** - HPLC chromatogram vzorku [84]

Předností vysokoúčinné kapalinové chromatografie je rychlost analýzy, vysoká dělicí schopnost, možnost automatické detekce, identifikace a kvantitativní vyhodnocení chromatogramu. Touto technikou můžeme dělit i látky termolabilní nebo polární. Mezi nevýhody naopak patří drahé přístrojové vybavení a také provoz [84; 85].

## 8. Moderní techniky ve farmaceutické analýze

Stanovení léčiv a jejich metabolitů v biologických tekutinách je ve farmaceutických a biomedicínských vědách stále důležitější. Úspěšné analýzy vyžadují citlivost na úrovni ppb nebo nižší, vysokou selektivitu a minimální interference z artefaktů. Až doposud se biofarmaceutická analýza spoléhala hlavně na titrace, spektrofotometrické, chromatografické a imunochemické metody. Nejnáročnější z farmaceutických analytických testů vyžadují vysokou specifitu a stanovení léků s mezí detekce subnanogramu v biologických vzorcích [86; 87; 88].

Běžně používanými postupy pro měření stopové úrovně koncentrace léčiva v biologických vzorcích jsou plynová chromatografie (GC) s elektronovým záchytem, ionizací dusíkovým plamenem nebo hmotnostní spektrometrickou detekcí, HPLC ve spojení s hmotnostní spektroskopií, LC s ultrafialovou nebo fluorescenční detekcí a radioimunoanalýzou. Novější moderní elektroanalytické techniky spojené s TLC nebo LC jsou extrémně užitečné při měření hladin v krvi a vylučování léků v nízkých dávkách (do 50–100 ng/ml). Aplikace elektroanalytických metod umožňuje analýzu materiálů s rozptýlenými barevnými nebo pevnými částicemi [89; 90; 91; 92].

Dále tyto techniky vyžadují pouze velmi malé objemy vzorků, často v rozsahu mikrolitrů, spojené s nízkými detekčními limity umožňujícími analýzu na množství subpikogramů léčivých přípravků a metabolitů. Z těchto důvodů a také pro jejich jednoduchost a rychlost je elektrochemie jedinečně vhodná pro klinickou a bioanalýzu, kde se analyzují malé objemy krve nebo moči na nízké koncentrace léčivých přípravků a metabolitů [93].

S příchodem technologií mikroobrábění a zdokonalením konstrukcí elektrochemických článků je nejnovějším trendem detekce a kvantifikace různých léčiv v biologických tekutinách a farmaceutických přípravcích pomocí elektrochemických metod.

Elektroanalytická chemie znamená analýzu chemických látek pomocí elektrochemických metod, jinými slovy studium chemické odezvy systému na elektrickou stimulaci. V elektrochemickém experimentu se měří jeden nebo více ze čtyř parametrů – potenciál, proud, náboj a čas. Různé kombinace parametrů a typu pracovní elektrody tvoří dlouhý seznam technik, jako je voltametrie, polarografie, lineární voltametrie, cyklická



voltametrie, hydrodynamická voltametrie, diferenciální puls, voltametrie s obdélníkovými vlnami a stripovací voltametrie. Voltametrie je zvláště cenná technika pro stanovení polárních metabolitů, které nelze snadno derivatizovat plynovou chromatografií [90; 94; 95].

## 9. Chromatografické módy používané v analýze aminosalicylátů a jejich metabolitů

### 9.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí

Fluorescenční detektory jsou založeny na principu fluorescence a na měření sekundárního emisního záření. Takové záření látka vydává po absorpci primárního excitačního elektromagnetického záření. Doba trvání fotoluminiscence bývá u fluorescence  $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  s. Pokud látka absorbuje elektromagnetické záření, přechází molekuly látky ze základního singletového elektronového stavu do různých vibračních hladin excitovaného singletového elektronového stavu. Tuto absorbovanou energii může excitovaná molekula buď vyzářit jako fluorescenci nebo ji může přeměnit jiným mechanismem na energii vibrační, anebo ji předá jiným molekulám. Ztrátou energie přejde molekula nejprve do základního vibračního stavu a poté emituje fluorescenční záření se stejnou vlnovou délkou jako absorbované záření = rezonanční fluorescence, nebo vyšší vlnovou délkou v důsledku vibrační relaxace.

Výtěžek fotoluminiscence se zpravidla zmenšuje se stoupající teplotou a je závislý na koncentraci a dalších faktorech. Jev, který způsobuje pokles výtěžku se nazývá zhášení. To může být způsobeno intramolekulárními i intermolekulárními pochody.

Závislost mezi intenzitou fluorescence a koncentrací fluoreskující látky je lineární pouze v oblastech nízkých koncentrací.

Fluorescenční detektor se skládá ze rtuťové nebo xenonové výbojky, excitační a emisní mřížky neboli monochromátoru, štěrbiny, průtokové cely, mikročočky, limitního filtru a fotonásobiče. Konstrukce fluorescenčního detektoru umožňuje zachytit maximální množství fluorescenčního záření, jež vzniká v cele detektoru násobičem. Toto čidlo pak musí být chráněno před dopadem excitačního záření, to nám umožňuje kombinace interferenčních filtrů a umístění násobiče kolmo na zdroj excitačního záření. Rtuťové výbojky a interferenční filtr slouží jako zdroj monochromatického excitačního záření. Detekují fluorescenční záření při všech vlnových délkách po oddělení zbytku rozptýleného excitačního záření. Současně lze tyto vlnové délky programovat v průběhu eluce, tím můžeme dosáhnout maximální citlivosti pro každou separovanou látku. Měření spekter je uskutečňováno buď v systému *stop-flow* nebo u některých detektorů i bez zastavení toku mobilní fáze [84].

## 9.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrickou detekcí

Hmotnostní spektrometry (MS) jako detektory v HPLC patří do skupiny spojených technik. Jsou velice specifické a poskytují společně s údaji z chromatogramu ještě spektrální údaje o identické látce.

Proces identifikace či kvantifikace látek hmotnostním spektrometrem se odehrává se 3 krocih. Prvním krokem je ionizace vzorku, kdy jsou neutrální molekuly v iontovém zdroji převedeny na ionty. Poté následuje rozdělení iontů dle poměru  $m/z$  (hmotnost/náboj) a jejich urychlení v analyzátoru. Posledním krokem je detekce iontů a zesílení signálu v detektoru.

Ke sběru dat slouží sofistikovaný software. Mezi další části spektrometru patří vakuový systém, zařízení pro zavádění vzorku, tedy sonda, iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů a počítač sloužící k ovládání a ladění přístroje, sběr a zpracování dat. 78 plus knížka

Nejpoužívanějšími ionizačními technikami jsou ionizace za atmosférického tlaku zahrnující ionizaci elektrosprejem, chemickou ionizaci za atmosférického tlaku a fotoionizaci za atmosférického tlaku. Všechny tyto techniky patří mezi měkké ionizační techniky, tzn že při ionizaci vznikají protonované molekuly nebo deprotonované molekuly a nedochází k rozsáhlé fragmentaci. Hmotnostní analyzátor je umístěn za iontovým zdrojem a před detektorem. Úkolem analyzátoru je rozdělení iontů dle poměru  $m/z$  a následně jejich urychlení a fokusaci.

Spojení LC-MS je klíčové pro analýzu reálných vzorků, jako například biologické tkáně či tekutiny. Hmotnostní spektrometr je jediným detektorem, který může provést potvrzení identity analytu na základě molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů. Hlavními výhodami spojení LC-MS jsou: možnost analýzy složitých směsí, zlepšení kvality spektrálních dat, lepší spolehlivost kvantitativní analýzy nebo větší jistota identifikace látek.

Signál hmotnostního spektrometru v závislosti na intenzitě je zaznamenáván jako chromatogram celkového iontového proudu = TIC. Pomocí LC-MS mohou být získány záznamy: základní sken, selektivní záznam jednoho nebo více iontů, sken produktových iontů, sken prekurzorových iontů, sken neutrálních ztrát nebo selektivní záznam jedné či více reakcí [84; 96].

### 9.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie s detekcí UV fotodiodového pole

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně.

Základem správné činnosti spektrofotometrických detektorů je samostatná cela detektoru. Konstrukce cely musí být taková, aby eliminovala mísení separovaných elučních zón. Mimokolonový příspěvek objemu cely detektoru musí být minimální. Optika cely detektoru koncentruje paprsek světla do středu cely. Šířka cely zajišťuje, aby bylo využito maximum energie a směřováno z cely detektoru do fotodetektoru.

Detektor je složen z deuteriové výbojky, štěrbin, čočky, clony, průtokové Z-cely, konkávní holografické mřížky a diodového pole.

Detektory s diodovým polem (PDA) snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Záření ze zdroje pro průchodu měrnou celou detektoru je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, takže na každou z fotodiod dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru.

Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, ten je předem nabitý na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud, který vzniká po dopadu záření na diodu, vybije kondenzátor, to je úměrné intenzitě dopadajícího záření. V další fázi jsou kondenzátory nabity a je měřen proud potřebný na dobití příslušných kondenzátorů. Sekvence vybíjení a nabíjení je velmi rychle opakována a jsou zaznamenávány údaje o absorbanci při každé vlnové délce v každém okamžiku. Spektrální rozlišení je dáno počtem diod na poli. Pro spektrální rozsah od 190 do 800 nm je při počtu diod 512 spektrální rozlišení 1,2 nm.

PDA detektory umožňují detekci látky při jakékoliv vlnové délce, umožňují porovnávat snímaná spektra a také vypočítat čistotu píku [84].

## 10. Chromatografické stanovení 5-aminosalicylové kyseliny a jejích metabolitů v biologických vzorcích

Aby se odstranily rušivé balasty z biomatric a zvýšila se selektivita a citlivost analytické metody, je před instrumentální analýzou kyseliny 5-aminosalicylové a jejích metabolitů obvykle použit krok předúpravy vzorků [73].

Pro deproteinizaci tekutých vzorků (plazma, sérum) nebo tkáňových homogenátů byl použit acetonitril, methanol nebo kyselina chloristá. Po centrifugaci byl získán supernatant, který se nejčastěji přímo dávkoval na HPLC kolonu, a který obsahoval analyt. Ve většině metod byly deriváty ASA obsažené v supernatantu derivatizovány a extrahovány před HPLC analýzou. Derivatizace spočívala v acylaci primární aromatické skupiny, a to buď anhydridem kyseliny octové, kyseliny propionové nebo benzylchlorformiátem. Posledním krokem v přípravě vzorku byla extrakce kapalina-kapalina *N*-acyl-ASA-derivátů do diethyletheru, dichlormethanu, ethylacetátu, acetonitrilu, methanolu nebo 1,1,1-trichlorethanu.

Jako vnitřní standardy byly použity 4-aminosalicylová kyselina, *N*-acetyl-4-ASA, *N*-propionyl-4-ASA a *N*-acetyl-anthranilová kyselina. Následně byla 5-aminosalicylová kyselina a její metabolity identifikovány a stanoveny v různých biomatricích – v plazmě, séru, mozkomíšním moku, moči, stolici, střevní či rektální tkáni. Bylo zjištěno, že ASA-deriváty jsou stabilní ve vzorcích plazmy po dobu 8 měsíců při teplotě -20 °C [97; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107].

Pro identifikaci a stanovení 5-ASA a jejích metabolitů byly použity tři detekční principy – pro rutinní analýzy vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovým ultrafialovým fotodiodovým polem a fluorescenčními detekcemi, pro potvrzení struktury syntetizovaných standardů a metabolitů nalezených v biomatricích HPLC s hmotnostní spektrometrickou detekcí [73].

## 10.1. HPLC stanovení 5-aminosalicylové kyseliny a jejich metabolitů v krevní plazmě

### 10.1.1 Použité materiály, chemikálie a instrumentace

- 5-aminosalicylová kyselina (čípky nebo tablety obsahující 500 mg 5-ASA), 4-aminosalicylová kyselina, *N*-propionyl-5-ASA, *N*-formyl-5-ASA, *N*-acetyl-5-ASA, *N*-butyryl-5-ASA, *N*-acetyl-4-ASA, *N*-propionyl-4-ASA
- Acetonitril, octan amonný, ethylacetát, kyselina chloristá 70%, kyselina mravenčí 85%, kyselina chlorovodíková 35%, kyselina fosforečná 85%, methanol, dihydrogenfosforečnan draselný, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, hydroxid sodný, anhydrid kyseliny propionové, anhydrid kyseliny máselné, UHQ voda
- Byl vytvořen pufr octanu amonného, fosfátový pufr z dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (pH 3), fosfátový pufr z dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a dihydrogenfosforečnanu draselného (pH 7,4).
- Zásobní roztoky všech studovaných sloučeniny byly připraveny za použití ekvimolárních množství NaOH. Nižší koncentrace byly připraveny zředěním zásobních roztoků vodou UHQ.
- Dále byla připravena směs vnitřních standardů vodného *N*-acetyl-4-ASA a vodného 4-ASA.

Pro NMR analýzy syntetických standardů *N*-acylderivátů 5-ASA, také 4-ASA, byl použit NMR spektrometr. Spektra v tomto měření byla zaznamenávána při 300 MHz a 75 MHz. Analytický vzorek 15–20 mg byl rozpuštěn v deuterovaném methanolu a následně pipetou přenesen do zkumavky NMR.

Analýzy vysokoúčinné kapalinové chromatografie – hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS) byly provedeny na analyzátoru iontové pasti a kapalinovém chromatografu, jehož součástí bylo čerpadlo, autosampler, termostatický kolonový oddíl a detektor fotodiodového pole. Hmotnostní spektra při elektrosprejové ionizaci byla zaznamenána v hmotnostním rozmezí  $m/z$  50–1200 s použitím kladných i záporných iontových režimů a parametrů: cílová hmotnost  $m/z$  = 200, stabilita sloučeniny = 100 %, tlak nebulizačního plynu = 70 psi, průtok sušícího plynu = 12 l/min, teplota iontového zdroje = 365 °C. UV spektra všech chromatografických píků byla zaznamenána v rozsahu 200–400 nm, kdy se použilo diodové

pole UV detektoru. Standardy a extrakty z biomatric byly rozpuštěny v mobilní fázi a 100 µl roztoku bylo nastříknuto do systému HPLC/MS. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu – pufru octanu amonného (15: 85, obj./obj.).

Do farmakologické studie vstoupila skupina zahrnující 14 zdravých dobrovolníků. Každému z dobrovolníků byla podána jedna rektální dávka mesalazinu (čípky obsahující 500 mg 5-ASA) a byly odebrány krevní vzorky o objemu 5 ml v časových intervalech 0 (před dávkou); 0,33; 0,67; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 12; 24 a 32 hodin po rektálním podání čípku. Vzorky byly ihned centrifugovány. Plazma byla oddělena a do analýzy skladována v polypropylenových zkumavkách při -70 °C [73].

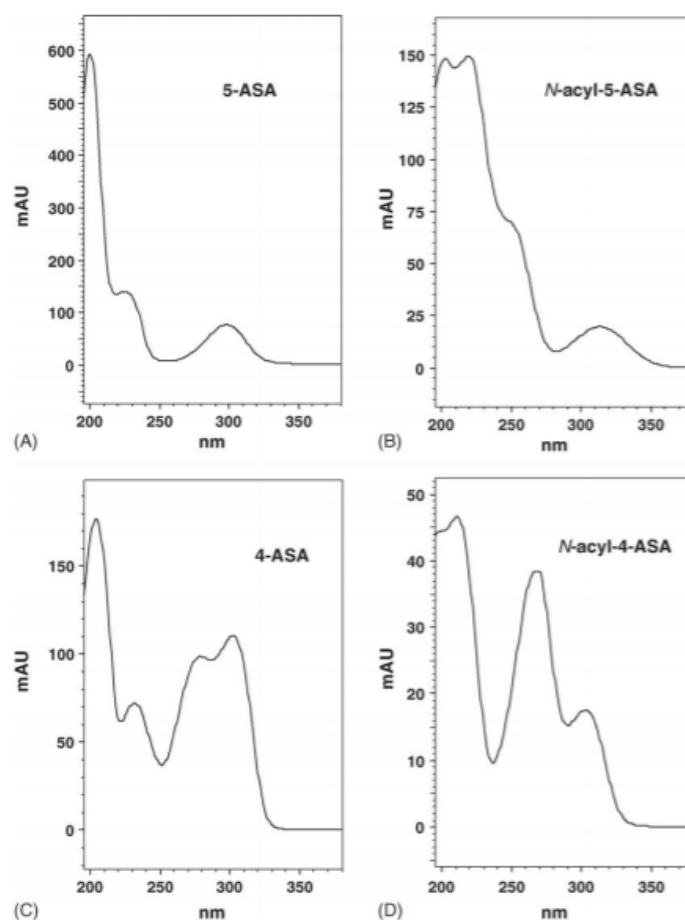
#### 10.1.2. Příprava vzorku

Zmrazené vzorky plazmy byly poté rozmrazeny a odstředěny. K 1 ml plazmy ve zkumavce se přidalo 30 µl směsi vnitřních standardů a 4-ASA. Dále bylo přidáno 20 µl kyseliny chloristé a obsah zkumavky byl míchán vířením po dobu 1 minuty. Po centrifugaci byl supernatant přenesen do čisté zkumavky a bylo přidáno 600 µl fosfátového pufru o pH 7,4. Pak se přidalo 20 µl anhydridu kyseliny propionové, směs byla protřepána a ponechána 20 minut při teplotě 25 °C. Přidala se kyselina chlorovodíková (50 µl), znova se zkumavka protřepala a acylderiváty se extrahovaly do 3 ml ethylacetátu. Po centrifugaci byly zkumavky skladovány v mrazáku při teplotě -34 °C asi 60 minut, dokud vodní vrstva nezmrzla na led. Organická vrstva, která obsahovala analyty byla dekantována do další čisté zkumavky a rozpouštědlo bylo odpařeno na vodní lázni při 45 °C. Suchý extrakt ve skleněné trubici byl obnoven v 600 µl mobilní fáze a přenesen do autosampleru. 100 µl vzorku bylo nastříknuto do chromatografické kolony [73].

#### 10.1.3. HPLC s tandemovým ultrafialovým fotodiodovým polem a fluorescenční detekcí

Pro stanovení byl použit chromatograf, který se skládal z odplyňovače s rozpouštědlem, kvartérního čerpadla, autosampleru, UV-fotodiodového (UV-PDA) a fluorescenčního detektoru (FL). Dále byla použita kolona o rozměrech 250 mm x 4 mm a předkolona se stejnou stacionární fází. Délka izokratické analýzy byla 23 minut při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. K monitorování eluátu z kolony byl použit tandemový UV-PDA detektor

→ FL detektor. UV detekce byla prováděna při 313 nm. Pro sběr charakteristických UV spekter (obr. IX) byl použit režim fotodiodového pole.



**Obrázek X** – UV spektra aminosalicilových kyselin (deriváty ASA) získaná pomocí UV-PDA detektoru během HPLC analýzy [73]

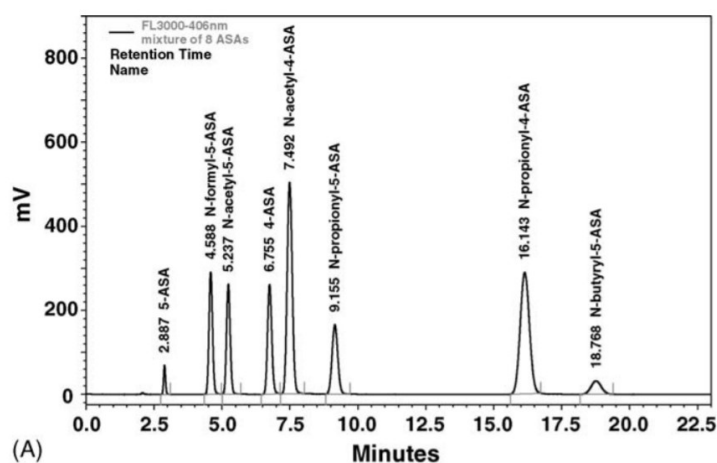
Kvůli přítomnosti primární aromatické aminoskupiny, karboxylové a fenolové skupiny vykazuje 5-ASA amfoterní vlastnosti, které komplikují spolu s jeho značnou polaritou extrakci a HPLC analýzu. Proto se aminoskupina derivatizovala acylací. Ionizovatelná aminoskupina byla maskována jako neionizovatelná *N*-acylaminoskupina. Výsledný *N*-acyl-5-ASA měl vyšší lipofilitu a byl dobře extrahovatelný při nízkém pH. K této derivatizaci byl použit anhydrid kyseliny propionové a derivatizace byla provedena při 25 °C 20 minut s vysokými výtěžky *N*-propionyl-5-ASA a *N*-propionyl-4-ASA.

Použití jednoduché izokratické mobilní fáze se stacionární fází umožnilo efektivní oddělení všech osmi studovaných sloučenin do 20 minut (obr. X). Všechny sloučeniny včetně amfoterních 5-ASA a 4-ASA se eluovaly z chromatografické kolony v úzkých symetrických

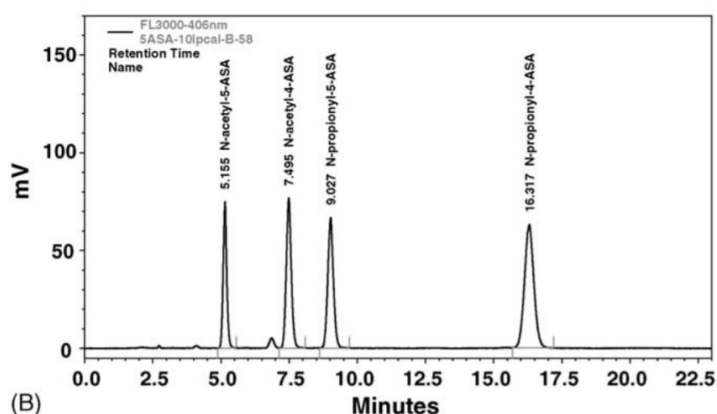


koncentračních zónách. 5-ASA měl velmi krátký retenční čas, 2,89 min, a nízkou odezvu, což potvrzuje jeho derivatizace na lipofilnější a snadněji extrahovatelný *N*-propionyl-5-ASA s retenčním časem 9,16 min.

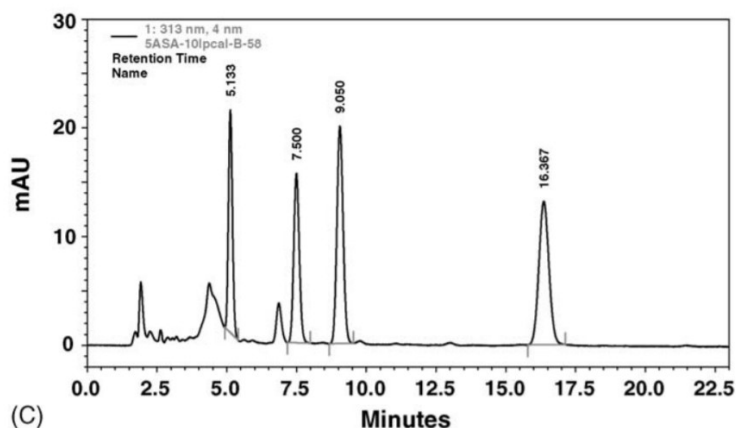
Analýza extraktů ze vzorků lidské plazmy ukázala, že v takovém vzorku byl přítomen pouze mateřský lék 5-ASA a jeho hlavní metabolit *N*-acetyl-5-ASA. Selektivita metody byla testována analýzou slepých vzorků lidské plazmy. V extraktech těchto vzorků nebyly pozorovány žádné interference.



**Obrázek XI** – Chromatogram separace směsi osmi aminosalicilových kyselin (deriváty ASA) získaný pomocí fluorescenčního detektoru [73]



**Obrázek XII** – Chromatogram derivatizovaného extraktu z lidské plazmy obsahující hlavní metabolit fáze II *N*-acetyl-5-ASA, *N*-acetyl-4-ASA, základní sloučeninu 5-ASA a 4-ASA, ve formě svých *N*-propionyl-derivátů, získaný pomocí fluorescenčního detektoru [73]



**Obrázek XIII** - Chromatogram derivatizovaného extraktu z lidské plazmy obsahující hlavní metabolit fáze II *N*-acetyl-5-ASA, *N*-acetyl-4-ASA, základní sloučeninu 5-ASA a 4-ASA, ve formě svých *N*-propionylderivátů, získaný pomocí ultrafialového detektoru fotodiodového pole [73]

Fluorescenční chromatogramy byly mnohem jasnější a bylo dosaženo lepší odezvy ve srovnání s UV detekcí. Na druhou stranu, UV-PDA detektor měl důležitou roli při identifikaci jednotlivých derivátů ASA.

Všechny sloučeniny byly jednoznačně identifikovány UV s fotodiodovou detekcí na základě jejich UV-spekter a retenčních časů, a dva hlavní analyty, 5-ASA a *N*-acetyl-5-ASA, byly stanoveny pomocí validované metody inertního standardu využívající fluorescenční detekci [73].

#### 10.1.4. HPLC s hmotnostní spektrometrickou detekcí

Všechny syntetické standardy byly proměřeny také pomocí HPLC/MS a hmotnostní spektra byla podrobně interpretována. Ve studovaných vzorcích lidské plazmy byly pozitivně identifikovány následující analyty na základě interpretace jejich hmotnostních spekter a shody jejich retenčních časů a UV-spekter se syntetickými standardy: *N*-acetyl-5-ASA, *N*-propionyl-5-ASA, *N*-acetyl-4-ASA a *N*-propionyl-4-ASA [73].

## SHRNUTÍ

Bakalářská práce pojednává o 5-aminosalicylové kyselině neboli mesalazinu, aktivní složku sulfasalazinu spadajícího do chorob modifikujících antirevmatických léků, který se využívá jako gastrointestinální protizánětlivé činidlo, zejména u zánětlivých onemocnění střev, včetně Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy.

První část této práce je zaměřena na nemoci modifikující antirevmatické léky, a to především na sulfasalazin, který se využívá jako lék při revmatické artritidě a při zánětlivém onemocnění střev. Jedná se o konjugát spojený azo vazbou, který se v tlustém střevě štěpí pomocí bakteriálních azoreduktáz na sulfapyridin, který slouží jako nosič, a na 5-aminosalicylovou kyselinu, aktivní složku tohoto léčiva. Sulfapyridin řadíme do sulfonamidových antibakteriálních látek a lze jej aplikovat například při pneumokokové pneumonii. Mesalazin je klíčovým zástupcem při léčbě idiopatických střevních zánětů. V organismu se metabolizuje na *N*-formyl-5-ASA, *N*-butyryl-5-ASA a *N*- $\beta$ -D-glukopyranosyl-5-ASA a svůj hlavní metabolit *N*-acetyl-5-ASA, která je schopna zachycovat různé radikály. S užíváním mesalazinu se podstatná část pacientů dostane do úplné klinické remise a je účinný i jako prevence proti relapsu u ulcerózní kolitidy a může účinně zabránit pooperační recidivě u pacientů s Crohnovou chorobou.

Ve druhé části práce se jedná zejména o stanovení 5-aminosalicylové kyseliny a jejich metabolitů v biologických vzorcích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovým ultrafialovým fotodiodovým polem a fluorescenční detekcí a s hmotnostní spektrometrickou detekcí. Ve studovaných vzorcích krevní plazmy byly pozitivně identifikovány všechny určené analyty. Jsou popsány také chromatografické metody používané v analýze aminosalicylátů či některé moderní techniky ve farmaceutické analýze.

## Bibliografie

- [1] LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Anakinra in Still's disease: a profile of its use. *Drugs Ther Perspect.* 2018, **34**(12), 543-553.
- [2] GREGORI, D., G. GIAVELLI, C. MINTO, B. BARBETTA, F. GUALTIERI, D. AZZOLINA, P. VAGHI a L. ROVATI. *Association of Pharmacological Treatment With Long-term Pain Control on Patients With Knee Osteoarthritis: A systematic Review and Meta-analysis.* 2018, **320**(24), 2564-2579.
- [3] ABBASI, M., M. MOUSAVI, S. JAMALZEHI, R. ALIMOHAMMADI, M. BEZVAN, H. MOHAMMADI a S. ASLANI. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy, the old and the new. *J Cell Physiol.* 2019, **234**(7), 10018-10031.
- [4] SMOLEN, J., D. VAN DER HEIJDE, K. MACHOLD, D. ALETAHA a R. LANDEWÉ. Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. *Annals of the Rheumatic Disease.* 2014, **73**(1), 3-5.
- [5] BENJAMIN, Onecia, Pankaj BANSAL, Amandeep GOYAL a L. LAPPIN. Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug (DMARD). *National Center for Biotechnology Information* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC, 2021 [cit. 2021-06-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507863/#>
- [6] BUER, J. K. A history of the term „DMARD". *Inflammopharmacol.* 2015, **23**, 163-171.
- [7] ALETAHA, D. a J. SMOLEN. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA.* 2018, **320**(13), 1360-1371.
- [8] WANG, W., H. ZHOU a L. LIU. Side effects of methotrexate therapy of rheumatoid arthritis: A systematic review. *European journal of medicinal chemistry.* 2018, **158**, 502-516.
- [9] PLOSKER, L. a F. CROOM. Sulfasalazine: A review of its Use in the Management of Rheumatoid Arthritis. *Drugs.* 2005, **65**(13), 1825-1849.
- [10] Sulfasalazine. *The Merck Index\* online* [online]. Whitehouse Station, N. J., U.S.A.: Royal Society of Chemistry, 2021, Last Revised 2013 [cit. 2021-04-18]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m10343/sulfasalazine?q=unauthorize>
- [11] PEPPERCORN, Mark Allen. Sulfasalazine: Pharmacology, Clinical Use, Toxicity, and Related New Drug Development. *Annals of the Internal Medicine.* 1984, **101**(3), 377.
- [12] Sulfasalazine. *Drugs.com* [online]. Maryland, U.S.A.: American Society of Health-System Pharmacists, 2021, Last Revised 2009 [cit. 2021-06-10]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/monograph/sulfasalazine.html>
- [13] SCHRÖDER, Hasse a E. CAMPBELL. Absorption, metabolism, and excretion of salicylazosulfapyridine in man. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 1972, **13**(4), 539-551.
- [14] KHAN, A., Juan PIRIS a S. TRUELOVE. An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *The Lancet.* 1977, **310**(8044), 892-895.

- [15] Salazopyrin Tablets. *Electronic medicines compendium* [online]. Leatherhead, Surrey, England & Wales: Datapharm Ltd, 1977 [cit. 2021-03-11]. Dostupné z: <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/3344#companyDetails>
- [16] COOKE, E. Mary. Faecal flora of patients with ulcerative colitis during treatment with salicylazosulphapyridine. *Gut*. 1969, **10**(7), 565-568.
- [17] HOLM, Geoffrey a Peter PERLMANN. Cytotoxicity of Lymphocytes and its Suppression. *Antibiotica et Chemotherapia*. 1969, **15**, 295-309.
- [18] HOLDSTOCK, Greg, B. ERSHLER a L. KRAWITT. Defective Lymphocyte IgA Production in Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1982, **24**(1), 47-54.
- [19] MOLIN, Lars a Olle STENDAHL. The Effect of Sulfasalazine and Its Active Components on Human Polymorphonuclear. *Acta Medica Scandinavica*. 2009, **206**, 1-6.
- [20] SIRCAR, C., F. SCHWENDER a E. CARETHERS. Inhibition of soybean lipoxygenase by sulfasalazine and 5-aminosalicylic acid: a possible mode of action in ulcerative colitis. *Biochemical Pharmacology*. 1983, **32**(1), 170-172.
- [21] PEPPERCORN, A. a Peter GOLDMAN. Distribution Studies of Salicylazosulfapyridine and its Metabolites. *Gastroenterology*. 1973, **64**(2), 240-245.
- [22] DAS, K., M. EASTWOOD, J. MCMANUS a W. SIRCUS. Adverse Reactions during Salicylazosulfapyridine Therapy and the Relation with Drug Metabolism and Acetylator Phenotype. *New England Journal of Medicine*. 1973, **289**(10), 491-495.
- [23] SINGLETON, W., H. LAW, L. KELLEY, S. MEKHJIAN a A. STURDEVANT. National Cooperative Crohn's Disease Study: Adverse Reactions to Study Drugs. *Gastroenterology*. 1979, **77**(4), 870-882.
- [24] Sulfasalazine 250mg/5ml Oral Suspension. *Electronic medicines compendium* [online]. Leatherhead, Surrey, England & Wales: Datapharm, Ltd, 1977 [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/413/smpc>
- [25] Sulfapyridine. *The Merck Index\* online* [online]. Whitehouse Station, N. J., U.S.A.: Royal Society of Chemistry, 2021, Last Revised 2013 [cit. 2021-04-18]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m10339/sulfapyridine?q=unauthorize>
- [26] Sulfapyridine (Oral). *Drugs.com* [online]. Maryland, U.S.A.: American Society of Health-System Pharmacists, 2021, Last Revised 2009 [cit. 2021-06-10]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/cons/sulfapyridine.html>
- [27] PANIKER, Uma a Norman LEVINE. Dapsone and Sulfapyridine. *Dermatologic Clinics*. 2001, **19**(1), 79-86.
- [28] EVANS, G. a W. GAISFORD. Treatment of Pneumonia with 2-(p-Aminobenzenephonamido)Pyridine. *The Lancet*. 1938, **232**(5992), 14-19.

- [29] BICKERS, R. David. Sulfones and Sulfapyridine. *Clinical Pharmacology and Skin Disease*. 1988, , 217-234.
- [30] GRAHAM, Duncan, W. WARNER, J. DAUPHINEE a R. DICKSON. The Treatment of Pneumococcal Pneumonia with Dagenan (M. & B. 693). *Canadian Medical Association Journal*. 1939, **40**(4), 325-332.
- [31] Mesalamine. *The Merck Index\* online* [online]. Whitehouse Station, N. J., U.S.A.: Royal Society of Chemistry, 2021, Last Revised 2013 [cit. 2021-04-19]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m7244/mesalamine?q=unauthorize>
- [32] BONDESEN, Stig, N. RASMUSSEN, Jørden RASK-MADSEN, N. NIELSEN, Karsten LAURITSEN, Vibeke BINDER, H. HANSEN a F. HVIDBERG. 5-Aminosalicylic Acid in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Acta Medica Scandinavica*. 1987, **221**(3), 227-242.
- [33] WHALEN, Karen. *Lippincott Illustrated Reviews: Pharmacology*. South Asian Edition. Haryana: Wolters Kluwer Healthy, 2019. ISBN 9789388313209.
- [34] BROGEN, N. a M. SORKIN. Mesalazine: A review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Chronic Inflammatory Bowel Disease. *Drugs*. 1989, **38**(4), 500-523.
- [35] PERTUIT, D., B. MOULARI, T. BETZ et al. 5-aminosalicylic bound nanoparticles for the therapy of inflammatory bowel disease. *Journal of Controlled Release*. 2007, **123**(3), 211-218.
- [36] Balsalazide: increasing the choice for patients with ulcerative colitis. *Drugs and Therapy Perspectives*. 2003, **19**, 1-4.
- [37] PRAKASH, Amitabh a Anthony MARKHAM. Oral Delayed-Release Mesalazine: A Review of its Use in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Drugs*. 1999, **57**, 383-408.
- [38] Mesalamine. *Drugs.com* [online]. Maryland, U.S.A.: American Society of Health-System Pharmacists, 2021, Last Revised 2009 [cit. 2021-06-10]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/monograph/mesalamine.html>
- [39] LINARES, Victoria, Virginia ALONSO a L. DOMINGO. Oxidative stress as a mechanism underlying sulfasalazine-induced toxicity. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2011, **10**(2), 253-263.
- [40] BAUMGART, C., Karin VIERZIGER, Andreas STURM, Bertram WIEDENMANN a U. DIGNASS. Mesalamine promotes intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2005, **40**(8), 958-964.
- [41] SHARMA, K. Vinod. Safety Profile of the New 5-ASA Based Compounds. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 1990, **4**(7), 443-445.
- [42] RANSFORD, R. a M. LANGMAN. Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines. *Gut*. 2002, **51**(4), 536-539.

- [43] KUNG, S.-J., C. CHOUDHARY, S. MCGEADY a J. COHN. Lack of cross-reactivity between 5-aminosalicylic acid-based drugs: a case report and review of the literature. *Annals of Allergy Asthma & Immunology*. 2006, **97**(3), 284-287.
- [44] SUBASINGHE, D., N. NAWARATHNA a D. SAMARASEKERA. Disease Characteristics of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2011, **15**(9), 1562-1567.
- [45] BAUMGART, D. a S. CARDING. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet*. 2007, **369**(9573), 1627-1640.
- [46] BAUMGART, D. a W. SANDBORN. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*. 2007, **369**(9573), 1641-1657.
- [47] ORHOLM, M., P. MUNKHOLM, E. LANGHOLZ, O. NIELSEN, T. SØRENSEN a V. BINDER. Familial Occurrence of Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine*. 1991, **324**(2), 84-88.
- [48] TYSK, C., E. LINDBERG, G. JARNEROT a B. FLODERUS-MYRHED. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*. 1988, **29**(7), 990-996.
- [49] THIA, K., W. SANDBORN, W. HARMSSEN, A. ZINSMEISTER a E. LOFTUS. Risk Factors Associated With Progression to Intestinal Complications of Crohn's Disease in a Population-Based Cohort. *Gastroenterology*. 2010, **139**(4), 1147-1155.
- [50] PEYRIN-BIROULET, L., E. LOFTUS, J.-F. COLOMBEL a W. SANDBORN. The Natural History of Adult Crohn's Disease in Population-Based Cohorts. *The American Journal of Gastroenterology*. 2009, **105**(2), 289-297.
- [51] BAUMGART, D. a W. SANDBORN. Crohn's disease. *The Lancet*. 2012, **380**(9853), 1590-1605.
- [52] TORRES, Joana, Saurabh MEHANDRU, Jean-Frédéric COLOMBEL a Laurent PEYRIN-BIROULET. Crohn's disease. *The Lancet*. 2017, **385**(10080), 1741-1755.
- [53] CAMMA, C., M. GIUNTA, M. ROSSELLI a M. COTTONE. Mesalamine in the maintenance treatment of Crohn's disease: a meta-analysis adjusted for confounding variables. *Gastroenterology*. 1997, **113**, 1465-1473.
- [54] LOCHS, H., M. MAYER, W. FLEIG, P. MORTENSEN, P. BAUER, D. GENSER a L. NESJE. Prophylaxis of postoperative relapse in Crohn's disease with mesalamine: European cooperative Crohn's disease study VI. *Gastroenterology*. 2000, **118**(2), 264-273.
- [55] *The Crohn's & Colitis Foundation of America* [online]. New York: Irwin M., Suzanne R. Rosenthal, William D., Shelby Modell, Henry D. Janowitz, 1967 [cit. 2021-06-19]. Dostupné z: <https://www.crohnscolitisfoundation.org/>
- [56] *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* [online]. Bethesda, Maryland: National Institutes of Health, 1950 [cit. 2021-06-19]. Dostupné z: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/digestive-diseases/ulcerative-colitis>

- [57] RUTGEERTS, Paul a Karel GEBOES. Understanding inflammatory bowel disease—the clinician's perspective. *The European Journal of Surgery*. 2001, **167**(8), 66-72.
- [58] MACDONALD, Thomas a Simon MURCH. Aetiology and pathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. *Baillière's Clinical Gastroenterology*. 1994, **8**(1), 1-34.
- [59] HEAD, A. a S. JURENKA. Inflammatory Bowel Disease Part I: Ulcerative Colitis – Pathophysiology and Conventional and Alternative Treatment Options. *Alternative Medicine Review*. 2003, **8**(3), 247-283.
- [60] FORBES, A., A. AL-DAMLUJI, S. ASHWORTH et al. Multicentre randomized-controlled clinical trial of Ipocol, a new enteric-coated form of mesalazine, in comparison with Asacol in the treatment of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2005, **21**, 1099-1104.
- [61] MARAKHOUSKI, Y., B. FIXA, J. HOLOMAN et al. A double-blind dose-escalating trial comparing novel mesalazine pellets with mesalazine tablets in active ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2005, **21**, 133-140.
- [62] JANKE, K., B. KLUMP, M. GREGOR, C. MEISNER a W. HAEUSER. Determinants of life satisfaction in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2005, **11**, 272-286.
- [63] HAN, S., E. MCCOLL, J. BARTON, P. JAMES, I. STEEN a M. WALFARE. Predictors of quality of life in ulcerative colitis: the importance of symptoms and illness representations. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2005, **11**, 24-34.
- [64] VAN HEES, P. a J. VAN TONGEREN. Compliance to therapy in patients on a maintenance dose of sulfasalazine. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 1982, **4**, 333-336.
- [65] PRANTERA, C., A. VISCIDO, L. BIANCONE, A. FRANCAVILLA, L. GIGLIO a M. CAMPIERI. A new oral delivery system for 5-ASA: preliminary clinical findings for MMX. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2005, **11**, 421-427.
- [66] MOHAMMADI-SAMANI, S., R. BAHRI-NAJAFI a G. YOUSEFI. Formulation and in vitro evaluation of prednisolone buccoadhesive tablets. *Farmaco*. 2005, **60**, 339-344.
- [67] ALI, J., R. KHAR a A. AHUJA. Formulation and characterisation of a buccoadhesive erodible tablet for the treatment of oral lesions. *Pharmazie*. 1998, **53**, 329-334.
- [68] BAKER, E. Danial. MMX™ Mesalamine. *Review in Gastroenterological Disorders*. 2006, **6**(3), 146-152.
- [69] KANN, A., J. SANDBORN, Miguel GASSULL et al. Once-Daily, High-Concentration MMX Mesalamine in Active Ulcerative Colitis. *Once-Daily, High-Concentration MMX Mesalamine in Active Ulcerative Colitis*. 2007, **132**(1), 66-75.
- [70] VREE, T., E. DAMMERS, P. EXLER, F. SÖRGEL, S. BONDESEN a R. MAES. Liver and gut mucosa acetylation of mesalazine in healthy volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2000, **38**(11), 514-522.



- [71] Tjørnelund, J., S. Hansen a C. Cornett. New metabolites of the drug 5-aminosalicylic acid. I: N- $\beta$ -D-glucopyranosyl-5-aminosalicylic acid. *Xenobiotica*. 1989, **19**(8), 891-899.
- [72] Tjørnelund, J., S. Hansen a C. Cornett. New metabolites of the drug 5-aminosalicylic acid. II. N-Formyl-5-aminosalicylic acid. *Xenobiotica*. 1991, **21**(5), 605-612.
- [73] Nobilis, M., Z. Vybíralová, K. Sládková, M. Lísa, M. Holčápek a J. Květina. High-performance liquid-chromatographic determination of 5-aminosalicylic acid and its metabolites in blood plasma. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1119**(1-2), 299-308.
- [74] Martindale, William. *The complete drug reference*. 32nd Edition. London: Pharmaceutical Press, 1999. ISBN 978-0-853-69424-3.
- [75] Klotz, Ulrich. Clinical Pharmacokinetics of Sulphasalazine, Its Metabolites and Other Prodrugs of 5-Aminosalicylic Acid. *Clinical Pharmacokinetics*. 1985, **10**, 285-302.
- [76] Allgayer, H., M. Kolb a V. Stuber. Modulation of base hydroxylation by bile acids and salicylates in a model of human colonic mucosal DNA: Putative implications in colonic cancer. *Digestive Diseases and Sciences*. 1999, **44**(4), 761-767.
- [77] Berry, C., J. Houlst a S. Peers. Inhibition of prostaglandin 15-hydroxydehydrogenase by sulphasalazine and a novel series of potent analogues. *Biochemical Pharmacology*. 1983, **32**(19), 2863-2871.
- [78] Small, R. a C. Schraa. Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical applications of mesalamine for the treatment of inflammatory bowel disease. *Pharmacotherapy*. 1994, **14**(4), 385-398.
- [79] Crotty, B., W. Rosenberg a J. Aronson. Inhibition of binding of interferon- $\gamma$  to its receptor by salicylates used in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1992, **33**(10), 1353-1357.
- [80] Borges, R., G. Pereira a J. Vale. Design and evaluation of 4-aminophenol and salicylate derivatives as free-radical scavenger. *Chemical Biology & Drug Design*. 2013, **81**(3), 414-419.
- [81] Červený, P., M. Bortlík a A. Kuběna. Nonadherence in inflammatory bowel disease: Results of factor analysis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2007, **13**(10), 1244-1249.
- [82] *Chemical Book* [online]. 2006 [cit. 2021-06-19]. Dostupné z: [https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_cb2118749.htm](https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb2118749.htm)
- [83] Fornstedt, Torgny, Patrik Forssén a Douglas Westerlund. Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution. *Analytical Separation Science* [online]. 1. Weinheim: Wiley-VCH, 2015, s. 1 - 24 [cit. 2021-06-19]. ISBN 9783527678129. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527678129.assep001>
- [84] Nováková, Lucie a Michal Douša. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.

- [85] PERTILE, Eva a Vladimír ČABLÍK. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1049-2.
- [86] LEE, C. a L. WEBB. *Pharmaceutical Analysis*. 1st Edition. Blackwell, 2003. ISBN 9780849328145.
- [87] WATSON, G. David. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. 3rd Edition. London: Churchill Livingstone, 2012. ISBN 978-0702046216.
- [88] ZACHARIS, K. a D. TZANAVARAS. *Reviews in Pharmaceutical & Biomedical Analysis* [online]. Volume 1. Greece: Aristotelian University of Thessaloniki, 2010 [cit. 2021-06-19]. ISBN 978-1-60805-190-8. Dostupné z: [https://www.eurekaselect.net/ebook\\_volume/876](https://www.eurekaselect.net/ebook_volume/876)
- [89] LUNN, George a Norman SCHMUFF. *HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*. Volume 4. Wiley, 2000. ISBN 978-0-47133191-9.
- [90] KAR, Ashutosh. *Pharmaceutical Drug Analysis*. First Edition. India: New Age International, 2001. ISBN 81-224-1582-2.
- [91] GORTON, L. *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques, Volume 44*. 1st Edition. Elsevier Science, 2005. ISBN 9780444507150.
- [92] JAHN, S. a U. KARST. Electrochemistry coupled to liquid chromatography/mass spectrometry - Current state and future perspectives. *Review, Journal of Chromatography A*. 2012, **1259**, 16-49.
- [93] GUPTA, V., R. JAIN, K. RADHAPYARI, N. JADON a S. AGARWAL. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals - A review. *Analytical Biochemistry*. 2011, **408**, 179-196.
- [94] TOPAL, B., S. OZKAN a B. USLU. The Analytical Applications of Square Wave Voltammetry on Pharmaceutical Analysis. *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*. 2010, **3**, 56-73.
- [95] GUPTA, K., Rama DUBEY a Jitendra MALIK. Application of modern electroanalytical techniques: recent trend in pharmaceutical and drug analysis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2013, **4(7)**, 2450-2458.
- [96] DASS, Chhabil. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2007. ISBN 9780471682295.
- [97] Tjørnelund, J. a S. HANSEN. High-performance liquid chromatographic assay of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) and its metabolites N-beta-D-glucopyranosyl-5-ASA, N-acetyl-5-ASA, N-formyl-5-ASA and N-butyryl-5-ASA in biological fluids. *Journal of chromatography*. 1991, **570(1)**, 109-117.
- [98] FISCHER, C. a U. KLOTZ. High-performance liquid chromatographic determination of aminosalicylate, sulfapyridine and their metabolites : Its application for pharmacokinetic studies with salicylazosulfapyridine in man. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1979, **162(2)**, 237-243.

- [99] FISHER, C., K. MAIER a U. KLOTZ. Simplified high-performance liquid chromatographic method for 5-aminosalicylic acid in plasma and urine. *Journal of chromatography*. 1981, **225**(2), 498-503.
- [100] HANSEN, S. H. Assay of 5-aminosalicylate and its acetylated metabolite in biological fluids by high-performance liquid chromatography on dynamically modified silica. *Journal of chromatography*. 1981, **226**(2), 504-509.
- [101] VAN HOGEZAND, R., H. VAN BALEN, A. VAN SCHAİK, A. TANGERMAN, P. VAN HESS, B. ZWANENBURG a J. VAN TONGEREN. Determination of sodium azodisalicylate, salazosulphapyridine and their metabolites in serum, urine and faeces by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1984, **305**, 470-476.
- [102] BRENDDEL, E., I. MEINEKE, D. WITSCH a M. ZSCHUNKE. Simultaneous determination of 5-aminosalicylic acid and 5-acetylaminosalicylic acid by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*. 1987, **385**, 299-304.
- [103] NAGY, E., I. CSIPO, I. DEGRELL a G. SZABO. High-performance liquid chromatographic assay of 5-aminosalicylic acid and its acetylated metabolite in biological fluids using electrochemical detection. *Journal of chromatography*. 1988, **425**(1), 214-219.
- [104] DE VOS, M., H. VERDIEVEL, R. SCHOONJANS, R. BEKE, G. DE WEERDT a F. BARBIER. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of 5-aminosalicylic acid and acetyl-5-aminosalicylic acid concentrations in endoscopic intestinal biopsy in humans. *Journal of chromatography*. 1991, **564**(1), 296-302.
- [105] HUSSAIN, F., R. AJJAN, M. MOUSTAFA, J. ANDERSON a S. RILEY. Simple method for the determination of 5-aminosalicylic and N-acetyl-5-aminosalicylic acid in rectal tissue biopsies. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1998, **716**(1-2), 257-266.
- [106] BYSTROWSKA, B., J. NOWAK a J. BRANDYS. Validation of a LC method for the determination of 5-aminosalicylic acid and its metabolite in plasma and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000, **22**(2), 341-347.
- [107] PALUMBO, G., S. BACCHI, L. PRIMAVERA, P. PALUMBO a G. CARLUCCI. A validated HPLC method with electrochemical detection for simultaneous assay of 5-aminosalicylic acid and its metabolite in human plasma. *Biomedical chromatography*. 2005, **19**(5), 350-354.