

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ

ANALÝZY



Chromatografické hodnocení amiodaronu a jeho aktivního metabolitu

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Mgr. Iva Kopecká

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 7.9.2019

.....

Iva Kopecká

Ráda bych poděkovala své školitelce PharmDr. Pavle Pilařové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala. Poděkování za pomoc a ochotu patří také celé katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy.

Tato rigorózní práce vznikla za podpory grantu SVV-260-401.

Obsah

1. Úvod	6
2. Teoretická část	8
2.1 Amiodaron a jeho vlastnosti	9
2.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti	9
2.1.2 Indikace	10
2.1.3 Mechanismus účinku	10
2.1.4 Farmakokinetické vlastnosti	10
2.1.5 Kontraindikace	10
2.1.6 Nežádoucí účinky	10
2.1.7 Interakce	11
2.1.8 Přípravky s obsahem amiodaronu na trhu	11
2.1.9 Chromatografické podmínky pro separaci amiodaronu pomocí kapalinové chromatografie uvedené v literárních zdrojích	12
2.2. Chromatografie	14
2.3 UHPLC.....	14
2.4 Analýza léčiv biologickém materiálu.....	16
2.4.1 Biologický materiál.....	17
2.4.2 Izolace léčiv z biologického materiálu	19
2.5 Validace	27
2.5.1 Druhy validace	27
2.5.2 Validační parametry	27
3. Cíl práce.....	30
4. Praktická část	32
4.1 Chemikálie a pomůcky	33
4.1.1 Chemikálie.....	33
4.1.2 Sestava pro analýzu	33
4.1.3 Přístroje:.....	33
4.1.4 Pomůcky:.....	34
4.2 Obecné postupy	34
4.2.1 Příprava standardů.....	34

4.2.2	Příprava mobilní fáze s fosforečnanovým pufrém.....	34
4.2.3	Příprava mobilní fáze s 0,1% kyselinou mravenčí.....	34
4.2.4	Příprava vnitřního standardu dronedaronu.....	35
4.2.5	Příprava roztoku síranu zinečnatého	35
4.2.6	Výchozí nastavení podmínek izolace a HPLC	35
4.2.7	Optimalizace podmínek separace.....	35
4.2.8	Příprava vzorků izolací z biologického materiálu.....	36
4.2.9	Validace metod	36
5.	Výsledky a diskuze	37
5.1.	Izolace analytu z buněčného materiálu	38
5.2.	Optimalizace podmínek separace.....	39
5.2.1.	Vliv koncentrace pufru.....	39
5.2.2.	Vliv zastoupení organické složky mobilní fáze.....	39
5.3.	Metody stanovení amiodaronu a desethylamiodaronu.....	40
5.4.	Validace metody	44
5.4.1.	Linearita	44
5.4.2.	Selektivita.....	47
5.4.3.	Stabilita	49
5.4.4.	Limit detekce a kvantifikace	49
5.4.5.	Správnost	50
5.4.6.	Přesnost	54
5.4.7.	Robustnost	58
5.5.	Analýza reálných vzorků séra pacientů FN HK.....	58
5.6.	Praktická úloha pro studenty.....	59
6.	Závěr.....	60
7.	Seznam použitých zkratek	63
8.	Zdroje	65
9.	Přílohy	72
	Abstrakt.....	76
	Abstract.....	77

1. Úvod

Amiodaron je léčivo, které se řadí do III. třídy antiarytmik. Antiarytmický účinek je způsoben bloádou draselných kanálů, indikací jsou poruchy srdečního rytmu. Specifický je jeho variabilní plazmatický poločas a vysoká afinita ke tkáním. Amiodaron má poměrně velké množství nežádoucích účinků a lékových interakcí. Především kvůli variabilitě jeho účinku a lékovým interakcím je třeba monitorovat hladiny tohoto léčiva v organismu.

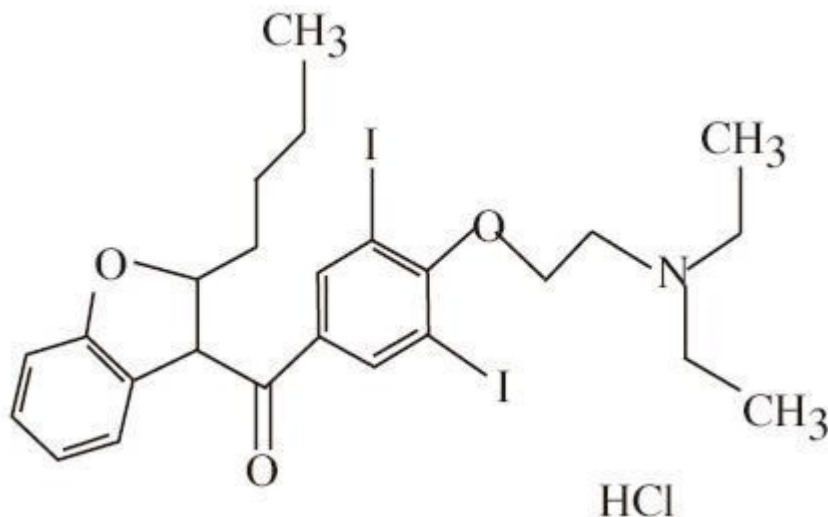
Pro analýzu hladiny léčiv v organismu je třeba vzorek nejprve izolovat z biologického materiálu. Izolace probíhá nejčastěji precipitací, extrakcí na pevné fázi, extrakcí do rozpouštědla nebo ultrafiltrací. Tyto metody jsou modernizovány a automatizovány za účelem nižší spotřeby rozpouštědel a vzorku, snížení časové a přístrojové náročnosti.

Po úpravě je vzorek analyzován nejčastěji pomocí kapalinové chromatografie pomocí vhodné zvolené metody, která je validovaná – tzn. vhodná pro daný účel analýzy. Validací metody jsou určeny podmínky, při kterých je analýza prováděna a jejich dodržení zajistí stejnou spolehlivost při testování v různých laboratořích. Mezi testované parametry validace patří správnost, přesnost, selektivita, limit detekce, linearita a robustnost.

2. Teoretická část

2.1 Amiodaron a jeho vlastnosti

2.1.1 Vzorec a chemické vlastnosti



Obr. 1 Vzorec amiodaronu (1)

Sumární vzorec: $C_{25}H_{30}ClI_2NO_3$

Molekulová hmotnost: 681,78

Systematický název: (2-butylbenzofuran-3-yl)[4-[2-(diethylamino)ethoxy]-3,5-diiodophenyl]methanon hydrochlorid

Obsahuje 98,5 až 101,0 % bezvodé látky. (2)

Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, který je velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu a v 96 % lihu mírně rozpustný. Je to jodovaný derivát benzofuranu. (2)

Nečistoty

- (2-butylbenzofuran-3-yl)[4-[2-(diethylamino)ethoxy]phenyl]methanon
- (2-butylbenzofuran-3-yl)[4-[2-(ethylamino)ethoxy]-3,5-diiodophenyl]methanon
- (2-butylbenzofuran-3-yl)[4-[2-(diethylamino)ethoxy]-3-iodophenyl]methanon
- [4-[2-(diethylamino)ethoxy]-3,5-diiodophenyl][2-[(1RS)-1-methoxybutyl]benzofuran-3-yl]methanon
- (2-butylbenzofuran-3-yl)(4-hydroxy-3,5-diiodophenyl)methanon
- (2-butylbenzofuran-3-yl)(4-hydroxyphenyl)methanon
- (2-butylbenzofuran-3-yl)(4-hydroxy-3-iodophenyl)methanon

- 2-chloro-N,N-diethylethanamino (2-chlorotriethylamin, (2-chloroethyl)diethylamin)
(2)

2.1.2 Indikace

Amiodaron patří do skupiny antiarytmik, konkrétně do III. třídy, blokátor draselných kanálů. Používá se především k léčbě těžkých poruch rytmu, kdy pacient nereaguje na jinou léčbu nebo pokud není jiná léčba možná. (3)(4)

2.1.3 Mechanismus účinku

Amiodaron blokuje iontové kanály pro draslík a tím prodlužuje akční potenciál a tlumí působení sympatiku. (3)

2.1.4 Farmakokinetické vlastnosti

Amiodaron má vysokou afinitu ke tkáním, biologická dostupnost je téměř 100 %, ale jeho vstup do tkáně je pomalý. Po jednorázovém podání je maximální koncentrace v plazmě po 3-7 hodinách. Jeho plazmatický poločas je velmi dlouhý a také variabilní, pohybuje se okolo 20-80 dní i více. Během prvních dní se látka kumuluje hlavně v tukové tkáni, terapeutický účinek se dostaví přibližně po týdnu.

Biotransformuje se v játrech, metabolitem je účinný blokátor především sodíkového kanálu N-desethylamiodaron – ten je pravděpodobně zodpovědný až za 70 % antiarytmického působení amiodaronu. Amiodaron se metabolizuje pomocí cytochromu P 450 – CYP3A4 a z toho vyplývá řada interakcí s jinými léčivými. Eliminován je žlučí. U pacientů s renální insuficiencí není potřeba úprava dávkování, jelikož není vylučován ledvinami. (4)(5)

2.1.5 Kontraindikace

Kontraindikací amiodaronu je hlavně sinusová bradykardie, sinoatriální blok, hypersensitivita na jod a na účinnou látku a poruchy štítné žlázy. V těhotenství kvůli nežádoucím účinkům na štítnou žlázu plodu je také kontraindikován, výjimečně lze podat ve zvláštních případech, kdy prospěch převažuje nad rizikem. Amiodaron přechází do mateřského mléka, tudíž je kontraindikován i při kojení. (4)

2.1.6 Nežádoucí účinky

Amiodaron má velké množství nežádoucích účinků a interakcí, proto je volen pro léčbu pouze tehdy, není-li reakce pacienta na jiná antiarytmická léčiva.

- Poruchy oka – amiodaron tvoří komplexy s fosfolipidy – ty se kumulují a ukládají v rohovce, což zhorší vidění. Je to reverzibilní nežádoucí účinek.
- Kůže – fotosensibilizace, modrošedá pigmentace, ekzém, alopecie, nespecifická exfoliativní dermatitida

- Poruchy štítné žlázy – hypotyroidismus, hypertyroidismus, vzácně syndrom nepřiměřené sekrece antidiuretického hormonu – SIADH
- Gastrointestinální poruchy – nevolnost, zvracení, nechutenství, zácpa, sucho v ústech
- Srdeční poruchy – často bradykardie, dále vznik nebo zhoršení srdeční arytmie až srdeční zástava, převodní poruchy
- Krev a lymfatický systém – vzácně hemolytická anemie, aplastická anemie, trombocytopenie
- Nervový systém – často extrapyramidový třes, noční děsy, poruchy spánku, periferní senzomotorická neuropatie, myopatie, bolest hlavy
- Respirační – plicní toxicita – fibróza, pleuritida, pneumonitida, dále vzácně bronchospasmus
- Cévy – vzácně vaskulitida
- Játra, žlučové cesty – v začátku léčby vzestup sérových aminotransferáz, akutní onemocnění jater až selhání, vzácně cirhóza, pseudoalkoholová hepatitida (4)(6)(7)

2.1.7 Interakce

Amiodaron je substrátem CYP3A4, je inhibítozem CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 a CYP3A4, dále je inhibítozem glykoproteinu P. Z toho vyplývá poměrně velké množství interakcí s ostatními léčivy. Nejvýznamnější lékové interakce amiodaronu:

- V důsledku inhibice glykoproteinu P zvýšení plazmatické hladiny digoxinu, zvýšené riziko krvácení u současného užívání dabigatranu
- Inhibicí CYP2C9 dojde při současném užívání warfarinu k jeho zvýšení účinku a riziku krvácení
- Současné užívání substrátů CYP3A4 zvýší jejich účinek – např. cyklosporin, fentanyl, statiny (simvastatin, atorvastatin, lovastatin – zvýšení rizika rhabdomyolýzy), lidokain, sildenafil, midazolam, ergotamin, kolchicin
- Protože je amiodaron substrátem CYP3A4 – mohou inhibitory tohoto cytochromu inhibovat jeho metabolismus a tím zvyšovat hladinu amiodaronu
- Kombinace s beta-blokátory nebo blokátory kalciového kanálu (verapamil, diltiazem) mohou způsobit poruchy rytmu a vedení
- Farmakodynamické interakce s léčivy, které prodlužují QT interval nebo vyvolávají tordsade de pointes (4)(8)

2.1.8 Přípravky s obsahem amiodaronu na trhu

- Amiokordin 200 mg, Krka ČR s.r.o., Česká republika
- Cordarone 200 mg, Sanofi-aventis s.r.o., Česká republika
- Rivodaron 200 mg, PRO.MED.CS Praha a.s., Česká republika
- Sedacoron 200 mg, Sandoz s.r.o., Česka republika (9)

2.1.9 Chromatografické podmínky pro separaci amiodaronu pomocí kapalinové chromatografie uvedené v literárních zdrojích

V literatuře jsou popsány různé způsoby separace amiodaronu (viz. Tab. 1)

Metoda č.1	
Stacionární fáze	C18
Mobilní fáze	50 mM H ₃ PO ₄ : acetonitril (50:50)
Detekce	UV 210nm
Průtok	2 ml/min
Typ extrakce	LLE
Zdroj	(10)
Metoda č.2	
Stacionární fáze	C8
Mobilní fáze	methanol : acetonitril : (25 mM KH ₂ PO ₄ : 3 mM H ₂ SO ₄ : 3,6 mM triethylamin) 63:12:25
Detekce	UV 254-242 nm
Průtok	1,5 ml/min
Typ extrakce	LLE
Zdroj	(11)
Metoda č.3	
Stacionární fáze	CN
Mobilní fáze	acetonitril : methanol : 0,05 M octan amonný (40:56:3)
Detekce	UV 242 nm
Průtok	0,9 ml/min
Typ extrakce	LLE
Zdroj	(16)
Metoda č.4	
Stacionární fáze	C18
Mobilní fáze	acetonitril : 0,1% mravenčí kyselina (46:54)
Detekce	ESI-MS
Průtok	0,5 ml/min
Typ extrakce	SPE
Zdroj	(12)
Metoda č.5	
Stacionární fáze	C18
Mobilní fáze	KH ₂ PO ₄ pufr s triethylaminem : methanol (10:90)

Detekce	UV při 254 nm
Průtok	2 ml/min
Zdroj	(17)
Metoda č.6	
Stacionární fáze	C18
Mobilní fáze	50 mM fosforečnanový pufr s 0,1% kyselinou mravenčí (pH3,1) : methanol : acetonitril (45:5:50)
Detekce	UV při 254 nm
Průtok	1,2 ml/min
Typ extrakce	LLE
Zdroj	(13)
Metoda č.7	
Stacionární fáze	C18
Mobilní fáze	50mM fosforečnanový pufr s 0,1% kyselinou mravenčí (pH3,1) : methanol : acetonitril (45:5:50)
Detekce	UV při 254 nm
Průtok	1,2 ml/min
Typ extrakce	mikroextrakce na pevné fázi (MEPS)
Zdroj	(14)
Metoda č.8	
Stacionární fáze	C18
Mobilní fáze	30 mM octan amonný (pH = 4,0) : methanol : acetonitril (12,5:43,8:43,8)
Detekce	DAD při 242 nm
Průtok	1,5 ml/min
Typ extrakce	SPE
Zdroj	(15)
Metoda č.9	
Stacionární fáze	C18
Mobilní fáze	acetonitril: 0,01% diethylamin (80:20)
Detekce	UV při 245 nm
Průtok	1,2 ml/min
Typ extrakce	SPE
Zdroj	(18)

Tab. 1 Podmínky chromatografické analýzy amiodaronu popsané v literatuře.

2.2. Chromatografie

Chromatografie je jedna z nejvyžívanějších analytických separačních metod, která vzorek analyzuje kvalitativně i kvantitativně za spotřeby malého množství vzorku. Při chromatografii dochází k oddělení analytu mezi mobilní a stacionární fázi na základě rozdílné retence jednotlivých složek vzorku na stacionární fázi. (21)(22)

Nejčastější chromatografickou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kdy je mobilní fáze kapalná, nejčastěji to jsou rozpouštědla s různou polaritou. Vzorek je pomocí autosampleru dávkován z vialky do toku mobilní fáze, která pomocí vysokotlakého čerpadla proudí do kolony, kde probíhá vlastní separace analytu. Chromatografická kolona je srdcem chromatografu, zvolení typu kolony má rozhodující význam pro separaci. Je třeba vybrat správnou délku, tvar, vnitřní povrch a náplň kolony. Náplň kolony musí mít vysokou účinnost separace, musí být vysoce selektivní a stabilní chemicky, mechanicky i termálně. Vzorek je po průchodu kolonou detekován pomocí snímače, který vyhodnocuje určitou vlastnost dle typu detektoru. Detektor je vybírán na základě vlastností analyzované látky, např. analyt absorbující v oblasti UV-VIS, dále fluorescenční, refraktometrický, elektrochemický, chemiluminiscenční nebo detektor hmotnostně spektrometrický. Nejpožívanějším detektorem je UV-VIS, jehož principem je změna intenzity záření paprsku procházejícím průtokovou celou detektoru v závislosti na interakci se vzorkem. Koncentrace analyzované látky je pak přímo úměrná absorpenci (dle Lambert-Beerova zákona). Vysoce citlivou a selektivní novější detekcí se stala hmotnostní spektrometrie, při které dochází k ionizaci vzorku (elektrosprejem, chemicky či fotoionizací), vzniklé ionty jsou podle poměru hmotnost/náboj rozděleny, v analyzátoru urychleny a analyzovány např. podle různé doby letu v magnetickém či elektrickém poli. (19)(20)(21)(22)(23)

Podle polarity stacionární a mobilní fáze se chromatografické systémy dělí na systémy s normálními fázemi, kdy je stacionární fáze polární (např. silikagel) a mobilní fáze nepolární (např. hexan, isooktan). Chromatografický systém s reverzními fázemi je častější separační technikou, jako mobilní polární fáze složí např. acetonitril či methanol a stacionární méně polární fázi může být např. silikagel, který má na sobě navázané dlouhé uhlíkaté řetězce – nejznámější je oktadecylsilikagel. S rostoucí polaritou mobilní fáze klesá retence analytu. (19)(21)

2.3 UHPLC

UHPLC (Ultra-high performance liquid chromatography) je novější a účinnější separační metoda kapalinové chromatografie. Používají se vysoce mechanicky odolné sorbenty s výbornou separační účinností. Analýza probíhá za velmi vysokých tlaků (100 MPa), průtoková rychlost je max 5 ml/min a chromatografické kolony mají částice o velikosti <2 µm.

Oproti HPLC má tyto výhody:

- Zkrácení doby analýzy – vyšší produktivita
- Snížení nákladů, nižší spotřeba rozpouštědla
- Vyšší separační účinnost
- Snížení detekční meze a zvýšení citlivosti
- Více informací o kvalitě (24)

Srovnání HPLC a UHPLC

	HPLC	UHPLC
Velikost částic	3-5 μm	<2 μm
Maximální tlak na koloně	35-40 MPa	103,5 MPa
Kolona	C18	BEH C18
Rozměr kolony	150 x 3,2 mm	150 x 2,1 mm
Teplota na koloně	30 °C	65 °C
Nástřik	5 μl	2 μl

Tab. 2 Srovnání HPLC a UHPLC (25)

Sorbenty používané u UHPLC využívají technologii „hybrid (silicon-carbon) particle technology“. Tato technologie se pokouší spojit výhodné vlastnosti dvou typů sorbentů používaných u HPLC. Silikagel používaný u HPLC jako sorbent je mechanicky odolnější, má dobrou účinnost, ale jeho použití je omezeno pH mobilní fáze a je chemicky nestabilní. Polymerní sorbenty mohou pracovat v širším rozpětí pH, chemicky jsou stabilní, ale naopak mají zase mechanickou stabilitu a účinnost nižší. U technologie využívané v UHPLC jsou volné hydroxylové skupiny silikonu nahrazeny ethylenovými můstky, které zvýší mechanickou odolnost a zamezí interakcím hydroxylových skupin silikagelu. Velikost částic sorbentu se pohybuje nejčastěji okolo 1,7 μm . Pokud by byly částice ještě menší, zvyšoval by se pouze zpětný tlak a účinnost by se téměř nezvyšovala. Platí pravidlo, že se snižující se velikostí částic sorbentu se zvyšuje účinnost separace. (24)(25)

UHPLC přístroje vyžadují velmi vysokou čistotu rozpouštědel a chemikálií, obsahujících méně než 100 ppb alkalických kovů. (26)

Kolony UHPLC jsou vyráběny technologií plnění za vysokého tlaku, koncové spoje kolony jsou vysokému tlaku přizpůsobeny. Stacionární fáze jsou dostupné C18, C8, C18 se zabudovaným polárním karbamátem, fenylovou skupinou – tyto fáze se liší mírou hydrofobicity, hydrolytické stability, silanolové aktivity a chemickou interakcí s analyzovanou látkou. Stabilita kolon pro UHPLC bývá přibližně v rozsahu pH 1,5-10 při isokratické eluci a 1,5-8,5 při gradientové. Tlaková stabilita těchto kolon je pak 600-1000 bar. Byla vyvinuta i technologie, která zaznamenává kompletní historii kolony (počet nástřiků, provedení nástřiků, tlaková historie, data z testů způsobilosti systému) pro snadnější sledování životního cyklu a stavu kolony. Jednou z mála nevýhod UHPLC je právě životnost kolony, která je vystavována vysokému tlaku.

Pokud je zachována stejná stacionární i mobilní fáze, lze poměrně snadno převést metodu HPLC na UHPLC, je však potřeba změnit průtok, velikost nástřiku a dobu analýzy – gradientový čas.

- Objemový průtok – výpočet dle vzorce:

$$F_{UHPLC} = \frac{d_{UHPLC}^2}{d_{HPLC}^2} \cdot F_{HPLC}$$

, kde d_{HPLC} – vnitřní průměr HPLC kolony, d_{UHPLC} – vnitřní průměr UHPLC kolony, F_{UHPLC} – objemový průtok UHPLC, F_{HPLC} – objemový průtok HPLC

- Gradientový profil – výpočet dle vzorce:

$$tG_{UHPLC} = \frac{L_{UHPLC}}{L_{HPLC}} tG_{HPLC}$$

, kde L_{HPLC} – délka HPLC kolony, L_{UHPLC} – délka UHPLC kolony, tG je čas pro každý gradientový krok

- Objem nástřiku

$$V_{injUHPLC} = \frac{d_{UHPLC}^2}{d_{HPLC}^2} \frac{L_{UHPLC}}{L_{HPLC}} \cdot V_{injHPLC}$$

, kde V_{inj} – objem nástřiku, L – délka kolony, d – vnitřní průměr kolony UHPLC/HPLC

Pro přenos HPLC na UHPLC metody existují různé přepočtové kalkulačky, kde stačí vyplnit údaje o koloně (délka a vnitřní průměr) a vlastnosti původní metody – objem nástřiku, doba analýzy a rychlost průtoku mobilní fáze. (24)(25)

2.4 Analýza léčiv biologickém materiálu

Analýza léčiv v biologickém materiálu umožňuje získat důležité informace o osudu léčiva v organismu a o jeho koncentraci. Slouží především k optimalizaci farmakoterapie u jednotlivých pacientů. Díky naměřeným hodnotám lze stanovit vhodnou dávku léku a interval jeho podání, ale také se snižuje riziko předávkování či naopak poddávkování a tím se tak i zmenšují náklady na léčbu a délka hospitalizace. (27)

Biologický materiál má různé složení a také objem, který je pro testování dostupný. Proto je nutné vzorek pro analýzu připravit – izolovat sledovaný analyt a odstranit endogenní interferující látky. Příprava vzorku je časově nejnáročnějším krokem celkové analýzy. Nejčastěji se analyzují tělní tekutiny – moč, krev nebo její složky – plazma, sérum.

Využití:

- Studium farmakokinetiky – určení farmakokinetických parametrů (biologická dostupnost léčiva, distribuční objem, poločas eliminace, maximální koncentrace léčiva

v organismu apod.), dále identifikace metabolitů léčiva a určení způsobu vyloučení léčiva z organismu

- Bioekvivalenční studie generických přípravků
- Toxikologie, forenzní analýza
- Stanovení koncentrace léčiva v plazmě k určení individuálního dávkování – tzv. řízená léková terapie – to je důležité u léčiv s úzkým terapeutickým indexem, u léčiv s nelineární farmakokinetikou, u rizikových léčiv z hlediska interakcí s jinými léčivy a u specifických skupin pacientů
 - Terapeutické monitorování se provádí především u těchto léčiv: kardiotonikum digoxin, bronchodilatancium theofylin, antiepileptika (fenobarbital, fenytoin, lamotrigin, karbamazepin, valproát), lithium, antibiotika (amikacin, gentamicin, vankomycin, tobramycin), cytostatika (methotrexát, busulfan), imunosupresiva (cyklosporin, sirolimus, takrolimus)
 - Monitorování hladin amiodaronu v organismu je nezbytné především v případě současného užívání digoxinu, který s amiodaronem interaguje a dochází pak ke kumulaci digoxinu (27)(6)

2.4.1 Biologický materiál

2.4.1.1 Krev

Nejčastějším a nejvýznamnějším biologickým materiálem pro analýzu je krev a její složky. Složení krve ukazuje množství biochemických pochodů, které probíhají v různých tkáních. Odběr krve je snadno proveditelný a není tolik invazivní. Nejčastěji se odebírá žilní krev, méně často krev kapilární (tj. z prstu či ušního lalůčku) a výjimečně je odběr arteriální krve (z arteria femoralis či arteria radialis pro vyšetření krevních plynů a acidobazické rovnováhy).

Vzorek plazmy se připravuje odebráním krve do zkumavky obsahující antikoagulační činidlo (např. oxalát sodný, heparin, citrát trisodný, Na₂EDTA, K₂EDTA) a následnou centrifugací, při které dojde k oddělení plazmy a krevních buněk. Antikoagulační činidla na sebe váží vápenaté a hořečnaté ionty, které jsou nutné pro aktivaci srážecích faktorů.

Sérum se získá po sražení celé krve (při pokojové teplotě alespoň 20 minut) a následné centrifugaci. Sérum je tedy plazma bez fibrinogenu a srážecích faktorů. (28)(29)

2.4.1.2 Moč

Moč je snadno dostupná tělní tekutina, tvoří se v ledvinách filtrací krve. Je to vodný roztok metabolických odpadů (močovina), rozpuštěných solí (chlorid sodný) a dalších organických látek. Pro kvalitativní analýzu se většinou odebírá vzorek moči jednorázově, nejčastěji se odebírá první ranní moč, která je koncentrovanější a má nižší pH. Získává se buď spontánní mikcí nebo katetrizací močového měchýře (v případě, že je potřeba moč sterilní). Většinou není potřeba použít stabilizační přísadu. Při kvantitativní analýze moči se moč sbírá po určitý časový úsek. Pro fyzikálně chemické testování moči by měla být moč zpracována do hodiny

po odběru, jinak se její složení mění. Při kultivačním vyšetření moči je třeba ji do 2 hodin analyzovat nebo uchovat v lednici. (30)(31)

Odběr vzorků pro terapeutické monitorování léků má svá pravidla – musí být odebrán ze správného místa do správného kontejneru – např. některé kontejnery obsahující různé gely pro separaci jednotlivých složek krve nejsou vhodné kvůli možné interferenci gelu a léčiva. Podle časového odstupu odběru od podání léku rozlišujeme:

- „trough“ – vzorek, který je pacientovi odebrán těsně před aplikací další dávky
- „peak“ – dle doby potřebné k distribuci léku v těle je to vzorek odebraný po ukončení infuze nebo po perorálním podání léku
- „random“ – vzorek odebraný pacientovi kdykoliv v průběhu léčby – většinou slouží k odhalení případné toxicity léčiva (27)

Tab. 3 Doporučení k monitorování některých léčiv z hlediska času odběru vzorku

lék	čas dosažení ustáleného stavu	doporučení k monitorování a čas odběru vzorku
aminoglykosidy	distribuce dané dávky trvá 1–2 hod., ale dosažení ustáleného stavu pro terapeutické koncentrace stabilní dávky může trvat 1–2 dny	pacienti se signifikantními změnami v renální funkci a pacienti v režimu dialýzy vyžadují častější monitorování monitorování peak a trough koncentrace je doporučeno v čase podání 3. dávky nebo během 24 hodin po zahájení terapie, resp.: trough – odběr bezprostředně před další dávkou, též před dialýzou, peak – odběr 30–60 minut po ukončení infuze
karbamazepin	3–5 dnů	trough – odběr < 30 minut nebo bezprostředně před další dávkou
digoxin	5–7 dnů	trough – odběr > 6 hodin po dávce
lithium	4–7 dnů	trough – odběr < 30 minut nebo bezprostředně před další dávkou
fenobarbital	8–25 dnů	trough – odběr < 30 minut, nejlépe bezprostředně před další dávkou
fenytoin	1–5 týdnů	trough – odběr < 30 minut, nejlépe bezprostředně před další dávkou při i.v. podávání – odběr > 2 hodiny po infuzi
theofylin	3 dny	peak: pro rapid-release p.o.lékovou formu – odběr 1–2 hodiny po dávce pro sustained-release lékovou formu – odběr 3–7 hodin po dávce při i.v. podávání – odběr 30 minut po dávce po ukončení infuze
valproát	2–4 dny	trough – odběr < 30 minut, nejlépe bezprostředně před další dávkou
vankomycin	20–30 hodin	trough – odběr < 30 minut, nejlépe bezprostředně před další dávkou peak: při i.v. podávání – odběr 1–2 hodiny po ukončení infuze

Tab.3 Doporučení k monitorování některých léčiv z hlediska času odběru vzorku (27)

Po odběru vzorku následuje vlastní analýza danou metodou. Analýza buněčného materiálu má svá specifika. Jelikož se koncentrace léčiv v séru pohybují v rozmezí 10^{-5} - 10^{-10} g/ml, je nutné používat velmi citlivé metody. Metody by měly být i vysoce selektivní z důvodu

složitosti biologického materiálu. Důležitou podmínkou při analýze biologického materiálu je, že biologická matrice nesmí interferovat se stanovovaným léčivem.

Metody pro stanovení léčiv v biologickém materiálu

1) fyzikálně-chemické

- výhodou je vysoká citlivost a selektivita stanovení
- nevýhodou je složitá úprava vzorku před analýzou
- např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, chromatografie na tenké vrstvě, elektroanalytické a elektromigrační metody, spektrální metody

2) imunoanalytické metody

- výhodou je pouze jednoduchá příprava vzorku
- nevýhodou je špatná selektivita – při reakci antigenu s protilátkou mohou reagovat i strukturně podobná léčiva nebo metabolity
- např. enzymové a radioimunologické metody

Konečnou fází je analýza dat, což je složitý proces, při kterém se posuzuje správnost naměřených hodnot, porovnání s předchozími výsledky, orientační srovnání s terapeutickým rozmezím (tj. rozmezí minimální a potenciálně toxické koncentrace léčiva). (33)

2.4.2 Izolace léčiv z biologického materiálu

Izolací léčiva z biologického materiálu se odstraní interferující látky z matrice, čímž dojde ke zvýšení selektivity a také k zakoncentrování vzorku, zvýší se i citlivost analýzy.

Hlavní druhy izolace:

- Extrakce do organického rozpouštědla
- Deproteinace
- Extrakce na pevné fázi
- Ultrafiltrace

další metody úpravy vzorku převážně vycházejí z těchto základních metod, např. extrakce do jediné kapky rozpouštědla (SPME), disperzní SPE, mikroextrakce pomocí plněného dutého sorbentu (MEPS), sorpční extrakce míchadlem (SBSE), extrakce do jediné kapky rozpouštědla (SDME) atd. (33)

2.4.2.1 Extrakce do organického rozpouštědla (LLE)

Jedna z prvních technik, která byla vyvinuta pro upravení vzorku, patří mezi často používané techniky. Není potřeba složité přístrojové vybavení ani není náročná z hlediska provedení. Principem je extrakce léčiva do s vodou nemísitelného organického rozpouštědla na základě rozdělovacího koeficientu voda/oktanol. Extrahovaná látka se rozdělí mezi organickou a anorganickou fázi podle Nernstova zákona dle rozdělovacího poměru:

$$D_c = \frac{c_1}{c_2}$$

c_1 ... koncentrace látky v organické fázi

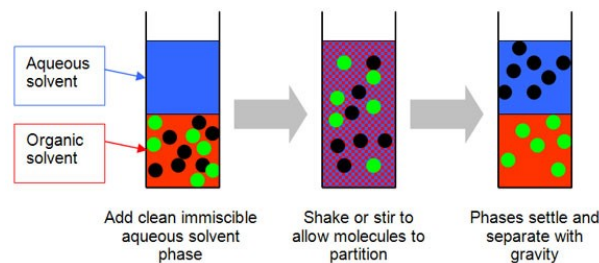
c_2 ... koncentrace látky ve vodné fázi

Organickým rozpouštědlem používaným pro extrakci může být např. dichlormethan, chloroform, hexan, diethylether. Je-li soustavou rozpouštědel oktanol-voda, je rozdělovací poměr P, hodnoty log P jsou tabelovány a charakterizují lipofilitu látek.

Výtěžek reakce závisí především na rozdělovacím poměru D_c , počtu extrakcí a na objemu jednotlivých fází. Extrahované množství závisí i na acidobazické rovnováze, protože organické kyseliny a baze existují ve vodném roztoku v neutrální a iontové formě – tyto formy však mají jiný rozdělovací poměr. Aby byla extrakce účinná, je potřeba mít analyt aspoň z 95 % v roztoku v neutrální formě – to se provede upravením pH vzorku před vlastní extrakcí.

Metoda je tedy nedostatečně účinná u iontových či amfoterních látek, kde se spíše používá jiná forma LLE, a to iont-párová extrakce. Pro látky ve velmi nízké koncentraci se používá zpětná extrakce z organického do vodného rozpouštědla.

Postup LLE zahrnuje úpravu pH vzorku, přidání organického rozpouštědla, vlastní třepání – možno urychlit třepáním na vortexu a nakonec centrifugace. Dalším krokem je odebrání vzorku, případné zakoncentrování vzorku např. proudem dusíku, poté se rozpustí ve vhodném rozpouštědle a analyzuje se. (32)(33)



Obr. 2 Princip LLE (32)

Nevýhody:

- Zdlouhavá metoda, těžko se automatizuje
- Spotřeba organických rozpouštědel
- Může docházet ke vzniku emulzí, špatné rozdělení vzorku mezi fáze

Výhody:

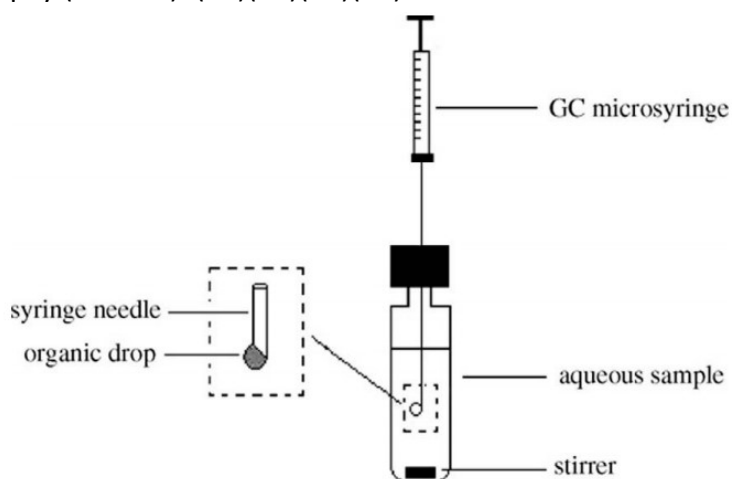
- Univerzální metoda
- Dobrá výtěžnost – zakoncentrování vzorku

Vylepšeným postupem LLE je extrakce na tuhém nosiči - tzv. Extrelut kolonky z chemicky inertní křemeliny, která slouží jako nosič k navázání roztoku vzorku. Nedojde tak k tvorbě emulze ze vzorku a je možné proces automatizovat. Spotřeba rozpouštědel však neklesá, spíše naopak může narůst vzhledem k opakování cyklu extrakce.

Pro složitější vzorky je využíváno modernějších metod – tzv. mikroextrakcí, např. extrakce do jediné kapky rozpouštědla (SDME), extrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna (HF-LPME) nebo disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME). Výhodou mikroextrakce je velmi malé množství použitého rozpouštědla, minimální počet kroků extrakce a malé množství odpadu. Mikroextrakční metody jsou však náročnější na vybavení laboratoře, na manipulaci a je složitější vybrat správné rozpouštědlo. (34)(37)

Extrakce do jediné kapky rozpouštědla

Extrakce do jediné kapky rozpouštědla (SDME) je založena na principu extrakce analytu z kapalného vzorku do kapky organického rozpouštědla, které je na špičce mikrojehly v objemu asi 1-3 μl . Po proběhnutí extrakce je kapka zpátky vrácena do jehly a vzorek lze přímo nastříknout na kolonu chromatografického systému. Pro dosažení maximální citlivosti metody je třeba dodržovat experimentální podmínky – objem kapky extrakčního rozpouštědla (ten však není konstantní vlivem částečného rozpouštění ve vzorku či odpaření v plynu nad vzorkem), teplota extrakce, doba extrakce, míchání vodného roztoku vzorku a pH vodného roztoku. Tato extrakce má různé způsoby provedení, např. mikroextrakce jedinou kapkou pomocí přímého ponoření (DI-SDME), kdy je mikrokapka organického rozpouštědla přímo ponořena do vodného roztoku analytu (viz Obr. 3). Dalšími způsoby může být HS-SDME – mikroextrakce jedinou kapkou pomocí head-space, což je extrakce a zakoncentrování těkavých analytů do mikrokapky rozpouštědla, která je v prostoru nad vzorkem. Dalšími modifikacemi jsou mikroextrakce z kapaliny do kapaliny a zpět (LLLME), mikroextrakce kontinuálního toku (CFME), mikroextrakce kapka v kapce (DDME), mikroextrakce přímo suspendované kapky (DSDME). (34)(35)(36)(37)



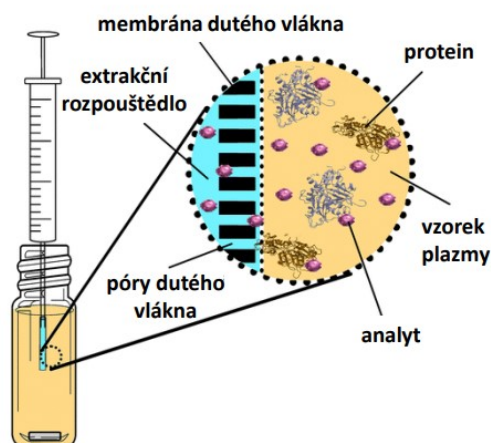
Obr. 3 Schéma DI-SDME (36)

Extrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna

Extrakce analytu ze vzorku probíhá přes membránu dutého vlákna, jejíž póry jsou vyplněny organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou. Uvnitř dutého vlákna je pak extrakční rozpouštědlo, které je kompatibilní s organickým rozpouštědlem. Je-li extrakční rozpouštědlo

organické, pak je to dvoufázový extrakční systém. Je-li extrakční rozpouštědlo kyselé nebo alkalický vodný roztok, je to třífázový extrakční systém – tento systém je pouze pro bazické nebo kyselé ionizovatelné analyty. Pro zásadité analyty je pak potřeba, aby bylo pH ve vzorku alkalické, aby nedošlo k rozpuštění analytu, a naopak v extrakčním rozpouštědle pH nízké pro rozpuštění analytu. Pro kyselé analyty je to naopak.

Výhodou extrakce pomocí dutého vlákna je prakticky nulová spotřeba rozpouštědel, ale je zde riziko kontaminace vlákna. (34)(36)

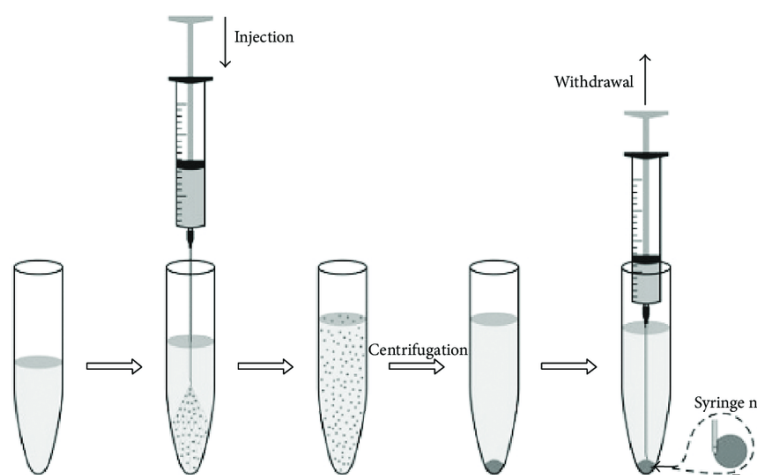


Obr. 4 Schéma HF-LPME (34)

Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny

V tomto typu mikroextrakce je využíváno tří druhů rozpouštědel – rozpouštědlo vodné s analyty, extrakční a disperzní rozpouštědlo. Extrakční činidlo nesmí být mísitelné s vodou (např. chloroform, nitrobenzen), disperzní musí být mísitelné s vodou i s extrakčním činidlem (např. methanol, ethanol, aceton). Všechny tři složky se smíchají, vznikne zakalený roztok, který je následně centrifugován. Na dně zkumavky se usadí extrakční fáze, která se následně odebírá k vlastní analýze.

Výhodou je rychlost, jednoduchost provedení, nízká spotřeba rozpouštědel, možnost zakoncentrování analytu a vysoká výtěžnost. Složitější je výběr rozpouštědla, které by splňovalo všechny podmínky extrakce. (34)(38)



Obr. 5 Schéma DLLME (38)

2.4.2.2 Deproteinace, precipitace proteinů

Deproteinace je velmi oblíbená metoda především kvůli rychlosti a jednoduchosti provedení. Principem je odstranění proteinů ze vzorku pomocí činidla. Nejčastěji se používají organická rozpouštědla (acetonitril, methanol), silné kyseliny nebo nasycené roztoky solí. Precipitační činidlo nesmí ovlivňovat sledovanou látku ani další postupy analýzy a detekce vzorku. K deproteinaci se používají různé postupy – precipitace, enzymová deproteinace, membránová filtrace, centrifugace.

Nejběžnější postup precipitace je přidání činidla ke vzorku, protřepání vzorku na vortexu a odstředění pro lepší oddělení vrstev. Horní vrstva tzv. supernatant je v závislosti na koncentraci analytu případně odpařena dusíkem a rozpuštěna v malém množství rozpouštědla či mobilní fáze a analyzována.

Způsoby provedení precipitace proteinů

- Přidání silných kyselin – trifluoroctová, trichloroctová, chloristá, mravenčí, chlorovodíková (nevýhoda – silně kyselý supernatant – může dojít k rozložení analytu)
- Přidání organického rozpouštědla mísitelného s vodou – methanol, ethanol, acetonitril, aceton
- Přidání solí vícemocných iontů – síran zinečnatý, wolframan sodný, hydroxid barnatý (nevhodné pro analyty tvořící komplexy s kovy)
- Srážením použitím taninu
- Zahříváním při teplotě 100 °C po dobu 5-10 minut (není tolik účinné, navíc hrozí rozklad analytu)

Nevýhody

- Možná vazba léčiv na precipitát
- Hodně balastů
- Naředění vzorku
- Nízká specifita a selektivita

Výhody

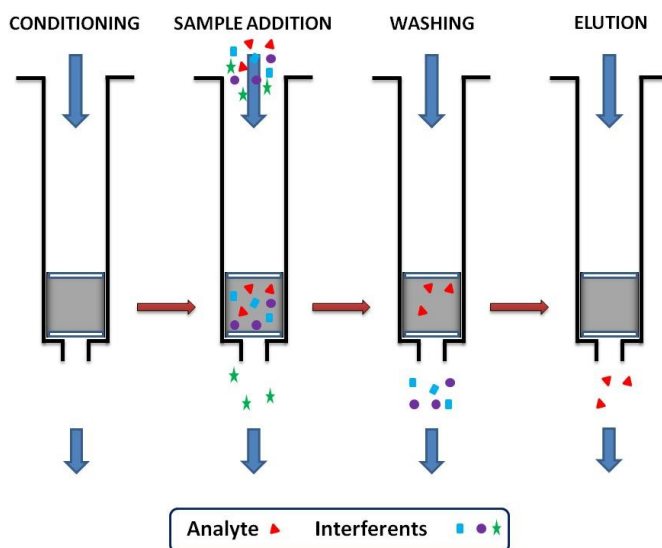
- Automatizace
- Jednoduchost (33)

2.4.2.3 Extrakce na pevné fázi (SPE)

SPE je dominantní úpravou vzorků před analýzou díky výhodám jejího použití. Principem je extrakce selektivního zachycení analytu na sorbent – extrakční kolonku. Vzorek je rozdělován mezi kapalnou fází a sorbent – analyt musí mít větší afinitu k tuhé fázi než k matici vzorku.

Postup při SPE:

- 1) Aktivace kolonky – např. methanolem, následné promytí vodou nebo pufrem
- 2) Aplikace biomatrice
- 3) Promytí vodnou fází/pufrem
- 4) Eluce analytu z pevné fáze pomocí organické fáze
- 5) Zakoncentrování vzorku pomocí dusíku
- 6) Rozpuštění analytu např. v methanolu nebo v mobilní fázi
- 7) Analýza (33)



Obr. 6 Schéma SPE (39)

Stacionární fáze – náplň SPE kolonek může být klasická nepolární (C18, C8), nebo polární fáze, tj. silikagel, iontově-výměnné materiály, polymery apod. V současné době jsou dostupné i tzv. vícemodální sorbenty obsahující nepolární i iontově-výměnnou skupinu a imunosorbenty. Výběr stacionární fáze záleží na chemických vlastnostech vzorku a rozpouštědla. Je-li rozpouštědlo nepolární, pak je použit sorbent polární.

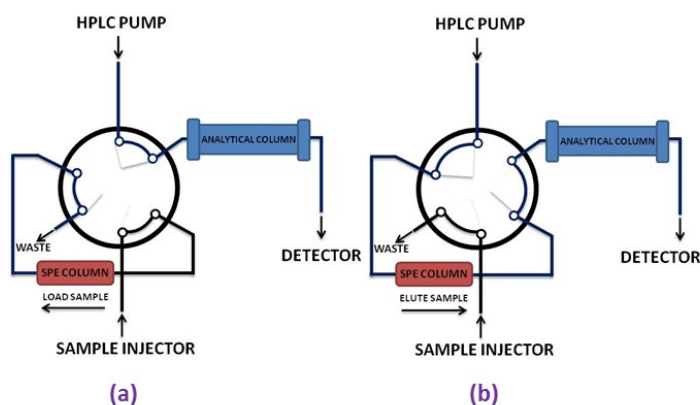
Nevýhody:

- Nákladná metoda – kolonky na jedno použití

- Relativně vysoká spotřeba rozpouštědel i vzorku
- Mnoho kroků metody
- Možnost odlišnosti kolonek z různých šarží výrobce

Výhody:

- Moderní metoda
- Možnost automatizace nebo spojení s HPLC (tzv. column switching – spojení SPE a HPLC – 2 kolony extrakční a analytická)
- Vysoká výtěžnost
- Účinné zakoncentrování vzorku (33)(39)



Obr. 7 Spojení SPE s HPLC (39)

Mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS)

Tato extrakce je v podstatě klasická SPE v miniaturní verzi. Sorbent je v množství asi 1-4 mg umístěn v 100-250 μ l stříkačce. Stříkačka je ovládána manuálně, poloautomaticky nebo plně automaticky. Vzorek je natažen stříkačkou, dojde k zachycení analytu na sorbent, následně je promýván rozpouštědly pro odstranění kontaminantů a posledním krokem je vymytí adsorbovaného analytu z pevné fáze elučním činidlem. MEPS stříkačky lze používat opakovaně, proto je důležité jehlu důkladně propláchnout.

Výhodami jsou časová nenáročnost, malé množství rozpouštědel a vzorku, možnost několikanásobného použití sorbentu a snadnost provedení. Nevýhodou může být tvorba bublin, nesprávná rychlost pohybu pístu mikrostříkačky či nekompatibilita s některými kapalinovými chromatografy. (34)

Mikroextrakce na bázi SPE – disperzní SPE

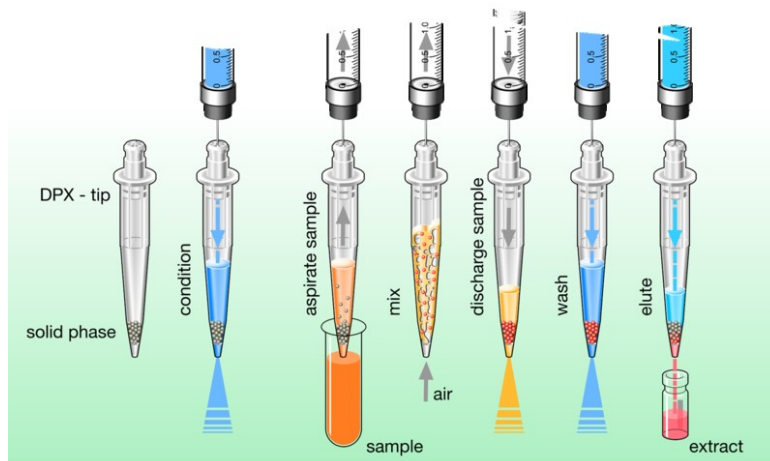
Přímé přidání sorbentu SPE do vzorku, odstředění centrifugací a následná extrakce analytu pomocí vhodného rozpouštědla. Při této extrakci dochází k lepšímu kontaktu analytu se sorbentem. (34)

Mikroextrakce pomocí plněných špiček pipet

Uvnitř špičky pipety je volně obsažen sorbent mezi dvěma fritami. Vzorek analytu je přes tento sorbent natažen, dojde ke kontaktu vzorku se sorbentem, pomocí vzduchových bublin

je vzorek promíchán, dochází tak k opakovanému kontaktu vzorku se sorbentem a tím i ke zvýšení efektivity extrakce. Následně je vzorek promyt, dojde k odstranění balastu a poté je elučním činidlem vymyt z pipety.

Opět je to metoda snadno automatizovatelná, nevyžaduje velké množství rozpouštědel a je časově nenáročná. Na rozdíl od MEPS je sorbent použitelný jen jednou. (34)(40)



Obr. 8 Schéma metody mikroextrakce pomocí plněných špiček pipet (40)

Mikroextrakce na tuhou fázi SPME

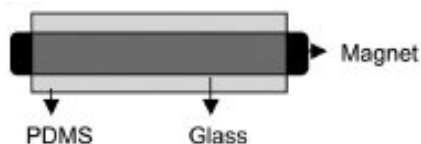
SPME probíhá ve speciální stříkačce, obsahující silikagelové vlákno, které je pokryté polymerem. Po vysunutí vlákna do vzorku, dochází k sorpci analytu. Podle povahy vrstvy jsou složky vzorku na vlákno absorbovány (vlákno pokryté polyakrylátem, polymethylsiloxanem) nebo adsorbovány (např. polymethylsiloxan-divynilbenzen). Jakmile je dosaženo sorpční rovnováhy, je vlákno ze vzorku vytaženo a desorpce je analyt z vlákna uvolněn. SPME extrakci lze provádět přímým ponořením vlákna do vzorku (DI-SPME) nebo je vlákno ponořeno do prostoru nad vzorkem – dochází k extrakci těkavých látek (HS-SPME).

Tato mikroextrakce je bezrozpouštědlová a automatizovatelná. Vlákno je však křehké, je kapacitně omezené a doba nutná k ustálení sorpční rovnováhy je dlouhá. (34)(41)(42)

Sorpční extrakce míchadlem SBSE

Vrstva extrakčního sorbentu je umístěna na magnetickém míchadle, které je přímo ve vzorku s analyty. Vrstva sorbentu (nejčastěji polydimethylsiloxan - PDMS) je mnohem silnější než u SPME vlákna (50-250x). Extrakce probíhá absorpcí za stálého míchání, k uvolnění dochází buď termální desorpce (následuje plynová chromatografie) nebo desorpce do kapaliny (následuje kapalinová chromatografie).

SBSE je bezrozpouštědlová extrakce, doba ustalování sorpční rovnováhy je dlouhá (až stovky minut) a je vhodná pouze pro nepolární analyty. (34)



Obr. 9 Magnetické míchadélko potažené PDMS (43)

2.5 Validace

Validace analytické metody je proces, který slouží ke statistickému prokázání spolehlivosti metody i celého analytického systému. Cílem validace je především určení podmínek, při kterých je daný postup použitelný a zároveň zajištění spolehlivosti metody při opakovaném použití v jedné nebo v různých laboratořích.

Validace se provádí především při vývoji nové metody, při změně metody, při změně laboratoře nebo při průkazu rovnocennosti metod. Validační program musí obsahovat hlavně pracovní postup, validační parametry, podmínky revalidace systému, validační protokol. Výsledky validace se zpracovávají v tzv. validačním protokolu, který obsahuje veškeré údaje včetně chromatogramů. (44)(45)(46)

2.5.1 Druhy validace

- Interní (vnitřní) validace – tzn. v rámci jedné laboratoře, podle účelu může být rozlišena validace průzkumová, plná validace, validace při převodu metody, retrospektivní validace
- Externí (vnější) validace – interní validace společně s validací metody srovnáním výsledků metody z více laboratoří, včetně výpočtu reprodukovatelnosti metody

2.5.2 Validační parametry

Podle účelu můžeme parametry rozdělit na:

- Identifikační (selektivita)
- Kvantitativní testování nečistot (správnost, opakovatelnost, mezilehlá přesnost, selektivita, kvantitativní limit, linearita, rozsah, robustnost)
- Limitní testování nečistot (selektivita, detekční limit)
- Obsahové (správnost, opakovatelnost, mezilehlá přesnost, selektivita, linearita, rozsah, robustnost)

2.5.2.1 Správnost - accuracy

Správnost je míra shody mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Získaný výsledek se může tedy porovnat se standardem, srovnáním s referenčním materiálem nebo výsledky z referenční laboratoře či porovnáním výsledků analýz osvědčené, zavedené metody.

Správnost metody lze zjistit porovnáním rozdílu správné a získané hodnoty alespoň u 6 vzorků o stejné koncentraci resp. 9 vzorků na 3 koncentračních hladinách a výpočtem výtěžnosti:

$$R_e = \frac{n_{II}}{n_I}$$

Výtěžnost (R_e) je poměr množství analytu získaného danou analytickou metodou (n_{II}) a referenční hodnotou (n_I). Vyjadřuje se jako desetinný zlomek nebo procentuálně ($R_e/\% = R_e * 100$).

2.5.2.2 Přesnost - precision

Přesnost je míra shody mezi výsledky naměřených opakovaně jednou metodou s jedním homogenním vzorkem. Vzorek se analyzuje kompletním postupem, a to většinou šestkrát o stejné koncentraci, resp. 9x na 3 koncentračních hladinách. Míra přesnosti se vypočítá jako relativní směrodatná odchylka, vyjadřuje se opět jako desetinný zlomek či jako procento.

Dle podmínek rozlišujeme tři úrovně:

- Opakovatelnost (repeatability) - opakování metody stejným způsobem se stejnými činidly prováděné jedním pracovníkem na tomtéž přístroji
- Mezilehlá přesnost (intermediate precision) - provedení metody s různými činidly, různými pracovníky a přístroji v různý den, ale se stejným vzorkem a v stejné laboratoři
- Reprodukovatelnost (reproducibility) - jako u mezilehlé přesnosti, avšak v různé laboratoři

2.5.2.3 Selektivita, specificita (specificity)

Je to schopnost metody přesně a správně určit danou látku v přítomnosti jiných látek, což mohou být např. látky pomocné, nečistoty pocházející z výroby, zbytková rozpouštědla či produkty rozkladu. Selektivita lze vyhodnotit pomocí analýzy standardu či analýzou vzorku, který obsahuje všechny složky přípravku kromě analyzované látky.

Vyjadřuje se jako rozdíl mezi výsledky analýzy daného vzorku bez nečistot a výsledky analýzy vzorku, ve kterém jsou rozkladné produkty, nečistoty apod.

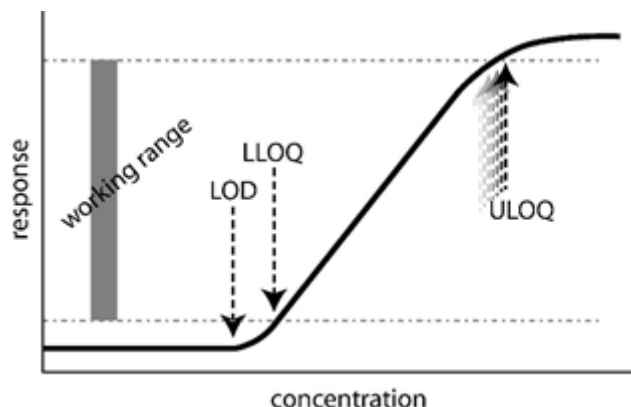
2.5.2.4 Detekční limit (limit of detection = LOD)

Hodnotí citlivost metody – je to nejnižší koncentrace látky, která je ještě detekovatelná. U instrumentálních metod je detekčním limitem koncentrace analytu, kdy je poměr signálu k šumu o hodnotě 3.

2.5.2.5 Kvantitativní limit (limit of quantitation = LOQ)

Tento limit též hodnotí citlivost metody. Je definován jako nejnižší koncentrace látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Jako limitující relativní směrodatná odchylka se považuje hodnota 10 %. Hodnota LOQ bývá trojnásobkem LOD – je to tedy koncentrace analytu s poměrem signálu k šumu 10. U biologických analýz se uvádí ještě hodnoty LLOQ (spodní limit meze kvantifikace) a ULOQ (horní limit meze kvantifikace). LLOQ udává nejnižší množství analyzované látky, které lze číselně stanovit s přijatelnou správností a přesností

(okolo 20 %), odlišitelné od detekčního šumu nebo signálu blanku. Signál analytu hodnoty LLOQ by měl být alespoň 5x větší než signál blanku, s poměrem signálu k šumu 10. ULOQ naopak udává nejvyšší množství analyzované látky, které lze kvantifikovat s přijatelnou hodnotou nejistoty – je to většinou nejvyšší bod kalibrační přímky s lineárním průběhem. (48)



Obr.10 Zobrazení chromatogramu s označeným LLOQ, ULOQ (47)

2.5.2.6 Linearita (linearity)

Linearita je schopnost metody poskytovat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci analyzované látky. Většinou se tento validační parametr stanovuje z minimálně pěti rozdílných koncentrací v rozmezí 50-150 % resp. 80-120 % deklarovaného obsahu. Ve validační zprávě je kromě koncentrace uveden i graf lineární regrese, rovnice přímky a korelační koeficient. Je-li daná metoda lineární, je možné určit směrnici z jednoho bodu.

2.5.2.7 Rozsah (range)

Rozsah se určuje z linearity metody, je to hranice s mezní horní a dolní koncentrací analytu, kdy je ještě metoda přesná, správná a lineární. Jako dolní limit může být třeba limit detekční, horní hranicí může být maximální odezva přístroje, při jejímž překročení už není měření přesné.

2.5.2.8 Robustnost (robustness)

U tohoto parametru není přesný údaj, jak ho vyhodnocovat. Vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na naměřené výsledky při analýze. Hlavním cílem je upozornění na ty podmínky, které mohou měnit výsledky. Takovými podmínkami se rozumí např. složení mobilní fáze (změny poměru vodné a organické složky, změny pH), teplota na koloně, rozdílné vlastnosti kolon různých šarží, rychlost průtoku apod.

2.5.2.9 Test způsobilosti systému (systém suitability test SST)

Tento test je jakýmsi souborem podmínek, při jejichž splnění je dříve provedená validace platná. V HPLC jsou to obvykle tyto podmínky: opakovatelnost nástřiku, poměr signál k šumu, rozlišení, počet teoretických pater apod. Výběr podmínek záleží na typu metody, zkušenostech a předpisech. (44)(45)(46)

3. Cíl práce

Cílem práce byla optimalizace stávající HPLC metody používané ve FN HK pro stanovení amiodaronu a jeho aktivního metabolitu desethylamiodaronu v biologickém materiálu. Následně převedení této metody na UHPLC a vypracování předlohy pro praktická cvičení pro studijní obor Farmacie směr Pokročilá farmaceutická analýza. Zároveň byla optimalizována i preanalytická část stanovení, a to izolace ze séra, popř. plazmy. Byla také nalezena vhodná metoda pro hodnocení pomocí MS detektoru a otestována její vhodnost. Metody byly validovány a aplikovány na reálné vzorky pacientů.

4. Praktická část

4.1 Chemikálie a pomůcky

4.1.1 Chemikálie

- pracovní standard: amiodaron, Sigma Aldrich, Německo
- desethylamiodaron, Sigma Aldrich, Německo
- methanol (MeOH), Chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Německo
- acetonitril (ACN), Chromasolv gradient grade for HPLC, Sigma Aldrich, Německo
- kyselina fosforečná 85 %, Dr. Kulich Pharma Hradec Králové, Česká republika
- hydrogenfosforečnan draselný, Balex, Pardubice – Rosice nad Labem, Česká republika
- kyselina mravenčí, Sigma Aldrich, Německo
- octan amonný, Penta, Česká republika
- síran zinečnatý, Penta, Česká republika
- voda čištěná reverzní osmózou, Millipore
- ethylacetát, Penta, Česká republika
- trifluoroctová kyselina, Penta, Česká republika
- dronedaron, Sigma Aldrich, Německo
- sérové kontroly level I a II, ClinCheck, Německo

4.1.2 Sestava pro analýzu

- kontrolní jednotka: CTO-20AC VP Shimadzu
- čerpadlo: LC-20AD XR VP Shimadzu
- degasér: DGU-20A3 VP Shimadzu
- termostat kolony: CTO-20AS VP Shimadzu
- PC program: Shimadzu LC Solution
- UV-VIS detektor: SPD-20A VP Shimadzu
- autosampler: SIL-20AC XR VP Shimadzu
- řídicí jednotka: CBM-20A VP Shimadzu
- Kolony:
 - HPLC kolona: HPLC kolona Waters Symetry C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm
 - UHPLC kolona Phenomenex Kinetex XB-C18, 100 x 3 mm, 2,6 μm
 - UHPLC kolona Phenomenex Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 μm

4.1.3 Přístroje:

- digitální váhy: Sartorius AG typ A200S, Německo
- pH-metr: SCHOTT CG 843, Schott Instruments GmbH, Německo
- magnetické míchadlo, IKA Color Squid, Německo
- Vortex, Velp scientifica, Itálie
- Koncentrátor Dri-Block DB-3A Techne (UK)

4.1.4 Pomůcky:

- kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, zkumavky, stojan na zkumavky, eppendorfské zkumavky, dělené pipety, balónek k pipetě, skleněná tyčinka, zábrusové lahve k uchovávání kapalin, vialky, inserty, laboratorní lžičky, lodičky, stříčka, mikropipety, membránový filtr 0,45 μm a 0,22 μm , alobal, eppendorfské zkumavky

4.2 Obecné postupy

4.2.1 Příprava standardů

Na analytických vahách bylo naváženo 10 mg standardu amiodaronu, který byl rozpuštěn v 10 ml methanolu. Stejným způsobem byl připraven standard desethylamiodaronu. Koncentrace připravených roztoků standardů tedy byla 1 mg/ml.

4.2.2 Příprava mobilní fáze s fosforečnanovým pufr

Použitá mobilní fáze byla složená ze dvou částí:

- anorganická složka: fosforečnanový pufr
- organická složka: acetonitril

Pufr o koncentraci 50 mM byl připraven navážením 3,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného do 1 l odměrné baňky, rozpuštěním v 500 ml čištěné vody, přidáním 200 μl 83% kyseliny fosforečné a doplněním po rysku čištěnou vodou. Poté bylo změřeno pH a případně upraveno na pH 3,1 pomocí 83% kyseliny fosforečné, resp. jejím ředěným roztokem. Pufr byl filtrován přes porcelánovou fritu a poté přes mikrofiltr o pórovitosti 0,45 μm . Připravený pufr byl pak v různých poměrech smíchán s organickou částí mobilní fáze. Při přípravě mobilní fáze pro analýzu byly použity tyto koncentrace pufru: 50 mM, 25 mM, 12,5 mM, 6,25 mM. Koncentrace 25 mM byla připravena naředěním 50 mM fosforečnanového pufru vodou v poměru 1:1, ostatní koncentrace byly připraveny obdobným způsobem a bylo vždy ověřeno pH, popř. upraveno na požadovanou hodnotu.

Bylo zkoušeno i použití pufru octanového o koncentraci 2 mM – navážením 0,1542 g octanu amonného do odměrné baňky, rozpuštěním v 1,0 l čištěné vody a pH upraveno pomocí koncentrované kyseliny mravenčí na pH 3,1.

4.2.3 Příprava mobilní fáze s 0,1% kyselinou mravenčí

Anorganická složka mobilní fáze – 0,1% kyselina mravenčí byla připravena odměřením 199,8 ml čištěné vody a přidáním 0,2 ml kyseliny mravenčí ($\geq 95\%$), výsledný roztok měl pH 2,69. Následně byl roztok přefiltrován přes porcelánovou fritu a mikrofiltr o pórovitosti 0,45 μm a smíchán v určitém poměru s organickou složkou – acetonitrilem.

4.2.4 Příprava vnitřního standardu dronedaronu

Roztok vnitřního standardu dronedaronu byl k analýze připraven použitím zásobního roztoku dronedaronu hydrochloridu v acetonitrilu o koncentraci 0,5 mg/ml. Poté bylo odebráno 100 µl tohoto zásobního roztoku do 20 ml acetonitrilu na výslednou koncentraci 2,5 µg/ml.

4.2.5 Příprava roztoku síranu zinečnatého

Roztok 10% síranu zinečnatého byl připraven navážením 1 g síranu zinečnatého a jeho rozpuštěním v 10 ml vody. 5% roztok síranu zinečnatého byl připraven navážením 0,5 g síranu zinečnatého a rozpuštěním v 10 ml vody.

4.2.6 Výchozí nastavení podmínek izolace a HPLC

Izolace z biologického materiálu:

- 500 µl biologického materiálu
- 10 µl IS (0,5 mg/ml)
- 990 µl acetonitrilu

HPLC:

- Kolona: HPLC kolona Waters Symetry C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm
- Mobilní fáze: 50 mM fosforečnanový pufr: acetonitril (50:50)
- Teplota: 45 °C
- Průtok: 1,4 ml/min,
- Detekce: 242 nm
- Nastříkovaný objem: 40 µl

4.2.7 Optimalizace podmínek separace

Výchozí nastavení mobilní fáze bylo měněno z hlediska poměru ACN: pufr – 70:30, 60:40, 55:45, molarity fosforečnanového pufru (25 mM; 12,5 mM; 6,25 mM), resp. použitím jiného pufru (mravenčí, octanový). Dále byly testovány změny velikosti nástřiku (3 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl) a rychlost průtoku mobilní fáze 0,3 ml/min, 0,5 ml/min, 0,8 ml/min, 1 ml/min, 1,4 ml/min. Vždy byly sledovány změny retenčních časů, symetrie a rozlišení píků.

Kromě HPLC kolony byly k analýze použity i dva druhy UHPLC kolon s různou velikostí náplně a vnitřním průměrem: UHPLC kolona Phenomenex Kinetex XB-C18, 100 x 3 mm, 2,6 µm a UHPLC kolona Phenomenex Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm. Obdobně jako na klasické HPLC koloně byly testovány různé chromatografické podmínky, tedy změny poměru organické a anorganické fáze, molarity fosforečnanového pufru, velikosti nástřiku a průtok mobilní fáze. U kolony se zrněním 2,6 µm byl testován i 2 mM octanový pufr. Pro převod z HPLC na UHPLC byly použity přepočtové programy:

- Kalkulátor pro převod metody HPLC na UPLC (www.hplc.cz) (49)
- Kinetex 2,6 µm Calculator (www.phenomenex.com) (50)

4.2.8 Příprava vzorků izolací z biologického materiálu

Do eppendorfských zkumavek bylo pipetováno 100 μl biologického materiálu (sérum nebo plazma), dále bylo přidáno 200 μl acetonitrilu s vnitřním standardem dronedaronem, došlo tak k precipitaci. Následně byl vzorek 2 minuty intenzivně třepán na vortexu. Po důkladném protřepání bylo provedeno odstředění vzorku na centrifuze, a to po dobu 10 minut při 15 °C rychlostí 10000 otáček za minutu. Došlo tak k oddělení precipitovaných bílkovin od vzorku. Pro nástřik na kolonu bylo do insertu odebráno 150 μl supernatantu.

Dále byla testována precipitace acetonitrilem s použitím 2-6 μl 5% nebo 10% síranu zinečnatého, který byl přidán k plazmě a vzorek byl protřepán, další postup stejný jako výše.

Kromě precipitace byla zkoušena i jiná metoda izolace z biologického materiálu - LLE. Prvním testovaným způsobem bylo použití 500 μl ethylacetátu, vytřepání a následné odpaření pomocí dusíku. Druhý postup byl též s použitím 500 μl ethylacetátu a přidání 5 μl koncentrované kyseliny mravenčí.

4.2.9 Validace metod

4.2.9.1 Linearita

Byla ověřena linearita metody u amiodaronu v rozmezí 0,05 $\mu\text{g/ml}$ – 3,77 $\mu\text{g/ml}$ a u desethylamiodaronu 0,05 $\mu\text{g/ml}$ - 4,74 $\mu\text{g/ml}$, bylo vždy 6 různých koncentrací u obou vzorků. Kalibrační vzorky byly připraveny takto: ke 100 μl plasmy bylo přidáno 0,015 μl , 0,15 μl , 0,45 μl , 0,675 μl , 0,756 μl a 1,131 μl roztoku standardu amiodaronu a 0,015 μl , 0,15 μl , 0,45 μl , 0,675 μl , 0,948 μl a 1,422 μl roztoku standardu desethylamiodaronu.

Poté byl vzorek upraven precipitací pomocí acetonitrilu (viz. Kapitola 4.2.5). Do insertu bylo pak odebráno 150 μl supernatantu a 5 μl bylo nástřikováno na kolonu vždy ve dvou nástřících.

4.2.9.2 Přesnost a správnost

Přesnost a správnost byla ověřena vzorky ve třech koncentracích (0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1,5 $\mu\text{g/ml}$ a 2,52 $\mu\text{g/ml}$ u amiodaronu a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1,5 $\mu\text{g/ml}$ a 3,02 $\mu\text{g/ml}$ u desethylamiodaronu. V každé koncentraci bylo připraveno 6 vzorků. Ke 100 μl plasmy bylo přidáno 0,15 μl , 0,45 μl a 0,756 μl roztoku standardu amiodaronu a 0,15 μl , 0,45 μl a 0,948 μl roztoku standardu desethylamiodaronu.

Poté byl vzorek upraven precipitací pomocí acetonitrilu (viz. Kapitola 4.2.5). Do insertu bylo odebráno 150 μl supernatantu a 5 μl bylo nástřikováno na kolonu vždy ve dvou nástřících.

4.2.9.3 Selektivita

Selektivita byla ověřena porovnáním analýzy vzorků prázdné plasmy se vzorky analyzované látky.

5. Výsledky a diskuze

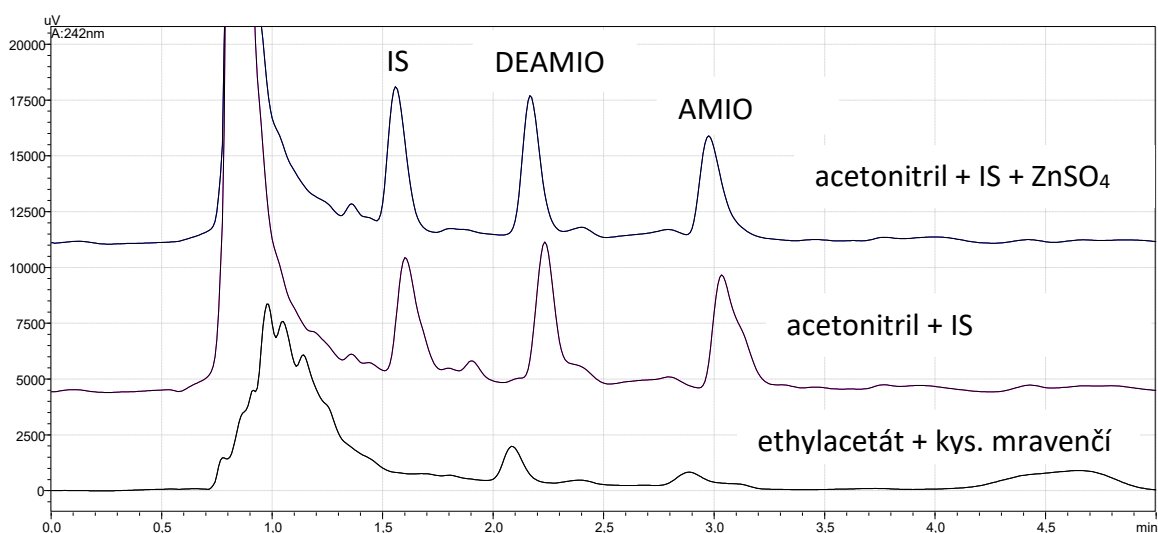
5.1. Izolace analytu z buněčného materiálu

Byla optimalizována izolace zkoušené látky z biologického materiálu. Izolace byla prováděna pomocí extrakce ethylacetátem. Tento způsob se ani po okyselení 5 μ l koncentrované kyseliny mravenčí nezdál vhodný. Výtěžnost extrakce byla velmi nízká.

Byla zkoušena také precipitace pomocí acetonitrilu s přidavkem vnitřního standardu. Pro zvýšení výtěžnosti byl testován přidavek 10% síranu zinečnatého, v různých koncentracích (5, 10%) a objemech (2-6 μ l).

Každý izolační postup byl proveden zároveň 3x a byly porovnány plochy jednotlivých analytů.

Z hlediska nejlepší výtěžnosti byl tedy pro naši analýzu zvolen postup precipitace pomocí 200 μ l acetonitrilu s vnitřním standardem dronedaronem a přidáním 4 μ l 10% síranu zinečnatého viz Obr. 11.



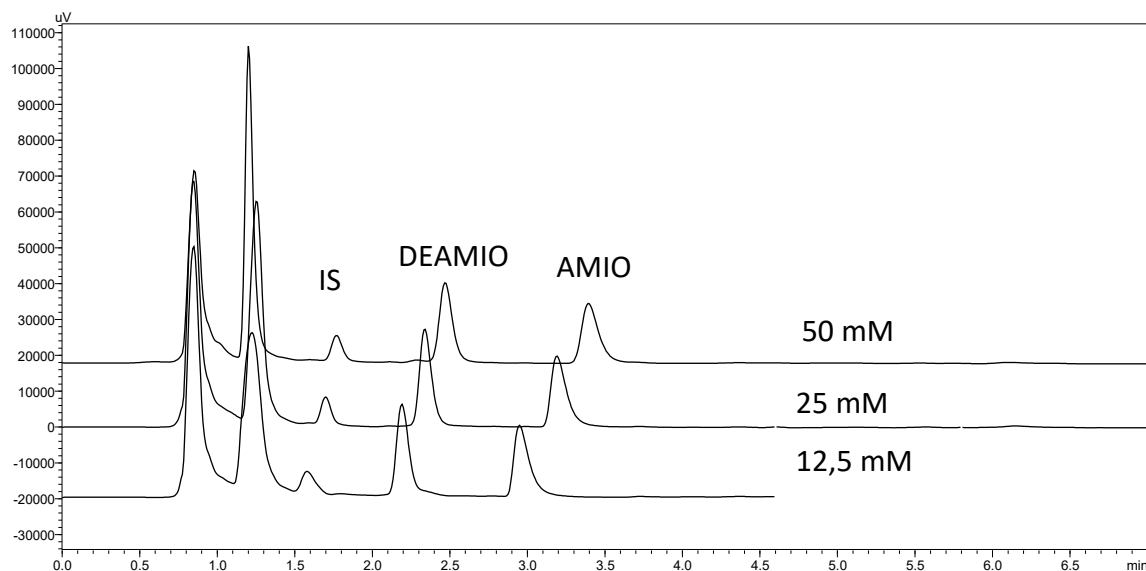
Obr. 11 Záznam analýzy po izolaci z biologického materiálu pomocí acetonitrilu s vnitřním standardem a $ZnSO_4$, acetonitrilu s vnitřním standardem a ethylacetátu s kyselinou mravenčí.

Komentář: Optimalizace podmínek izolace z buněčného materiálu byla provedena metodou HPLC s použitím mobilní fáze acetonitril : 12,5mM fosforečnanový pufr (poměr 60:40), průtok 1,4 ml/min. Na obrázku jsou porovnány vybrané chromatogramy, kde je patrné, že deproteinace s přidavkem síranu zinečnatého má lepší výtěžnost i lepší symetrii píků.

5.2. Optimalizace podmínek separace

5.2.1. Vliv koncentrace pufru

Analýza amiodaronu, desethylamiodaronu a vnitřního standardu, podmínky separace: HPLC kolona C18 150 x 4,6 mm, zrnění 5 μ m, mobilní fáze: acetonitril : fosforečnanový pufr – 60:40, pH= 3,1, průtok 1,4 ml/min, teplota na koloně 45 °C.

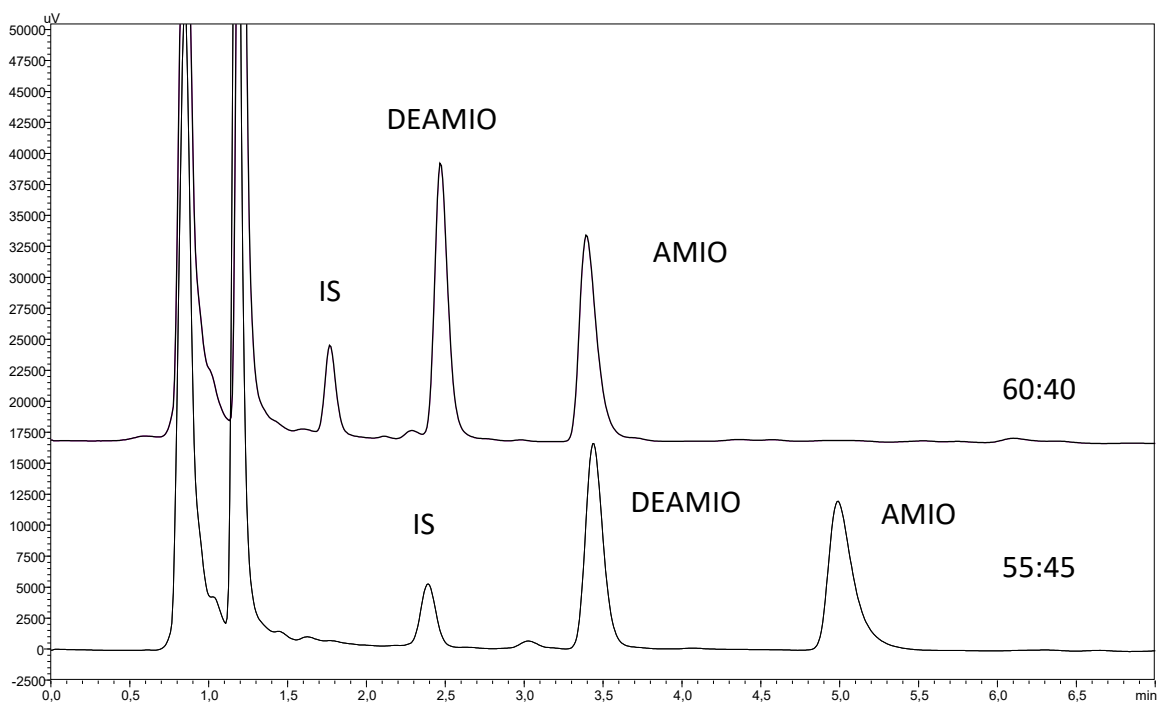


Obr. 12 Záznam analýzy amiodaronu, desethylamiodaronu a vnitřního standardu při různých koncentracích fosforečnanového pufru (50 mM, 25 mM a 12,5 mM).

Komentář: Se snižující se koncentrací fosforečnanového pufru se zkracoval retenční čas analyzovaných látek. Separace amiodaronu a desethylamiodaronu nebyla ovlivněna změnou koncentrace pufru.

5.2.2. Vliv zastoupení organické složky mobilní fáze

Analýza amiodaronu, podmínky separace: HPLC kolona, mobilní fáze: acetonitril : 50mM fosforečnanový pufr, pH 3,1, průtok 1,4 ml/min, teplota na koloně 45 °C



Obr. 13 Záznam analýzy amiodaronu při změnách poměru anorganické a organické složky mobilní fáze (60:40 a 55:45).

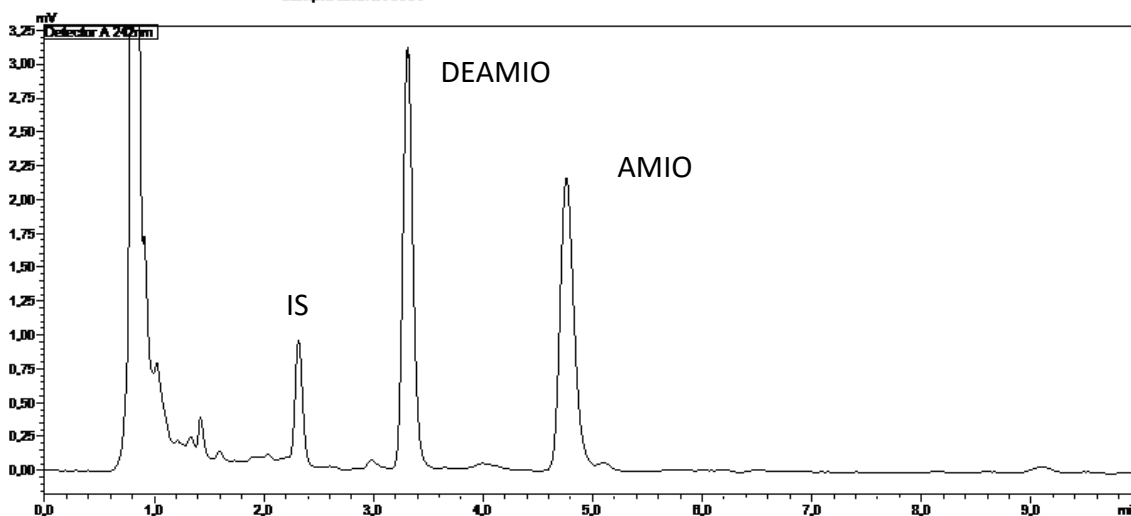
Komentář: Se snižujícím se poměrem anorganické složky mobilní fáze se retenční čas zkracoval. Při poměru mobilní a stacionární fáze 50:50 byly píky eluovány o 3 minuty déle, proto se v analýze nepokračovalo.

5.3. Metody stanovení amiodaronu a desethylamiodaronu

Pro analýzu amiodaronu a desethylamiodaronu byly vybrány tyto podmínky analýzy:

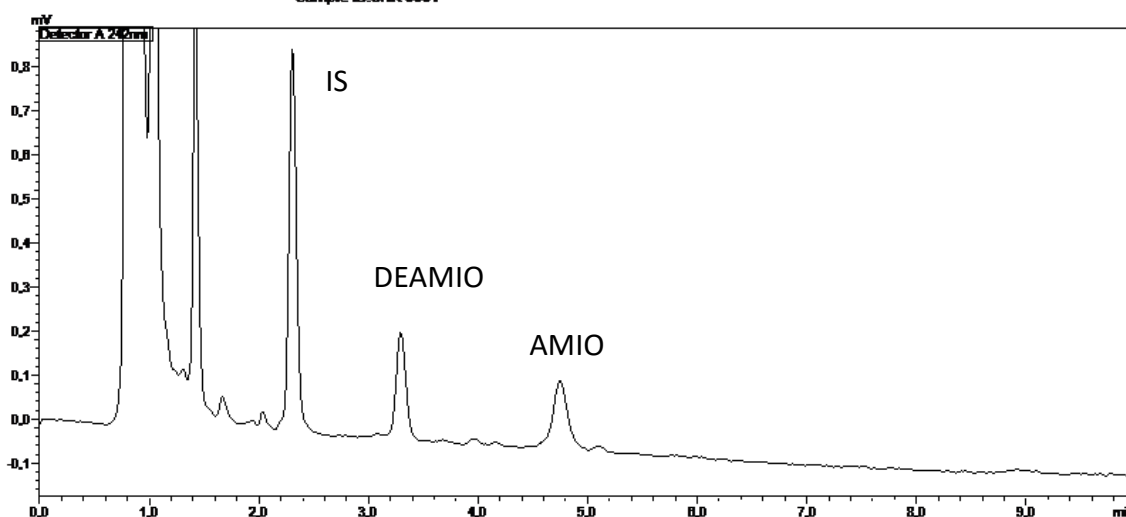
- Metoda HPLC, mobilní fáze: acetonitril: 25 mM fosforečnanový pufr (55:45), průtok: 1,4 ml/min, nástřik: 5 μ l, 45 °C (Metoda 1)

Datafile Name:HPLC_KONTROLA_LEVEL2_55%_1.4_25mlMosi_45_Sulnastrik_002.lcd
Sample Name:Unknown Sample
Sample ID:UNK-0001



Obr. 14 Záznam analýzy amiodaronu, desethylamiodaronu a vnitřního standardu ze sérové kontroly level 2 metodou 1.

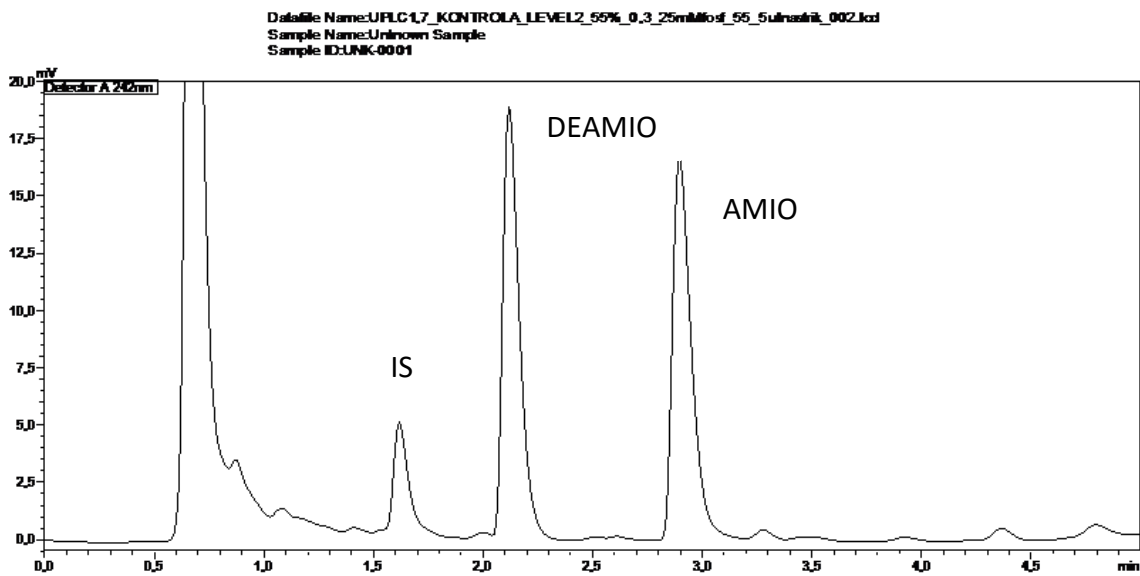
Datafile Name:HPLC_HLADINA2_3_55%_1.4_25mlMosi_45_Sulnastrik_002.lcd
Sample Name:Unknown Sample
Sample ID:UNK-0001



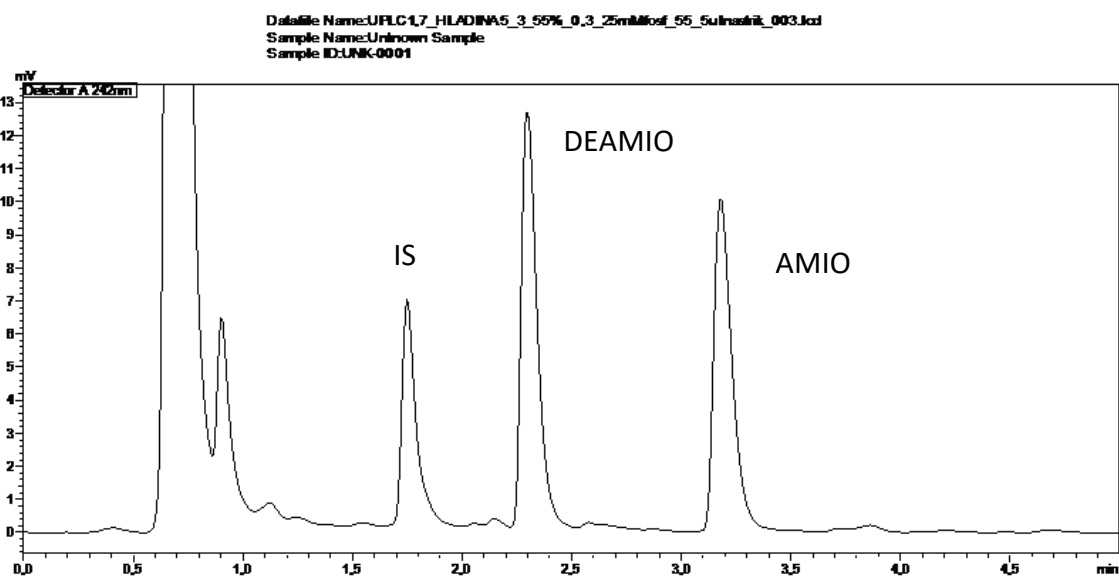
Obr. 15 Záznam analýzy amiodaronu, desethylamiodaronu a vnitřního standardu z králičí plazmy (koncentrace AMIO 0,5 µg/ml, DEAMIO 0,5 µg/ml) metodou 1.

Podmínky získané na základě výsledků přepočtových programů (viz Kap. 4.2.7) byly ještě obměňovány s cílem získat nejlepší separaci jednotlivých složek a tvary píků. Byly testovány různé rychlosti průtoku mobilní fáze (0,14 ml/min, 0,3 ml/min, 0,5 ml/min, 0,8 ml/min, 1 ml/min) a množství vzorku nastříknutého na kolonu (3 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl). Následně byly metody vyhodnoceny a byly vybrány podmínky pro UHPLC. Pro analýzu byla zvolena UHPLC kolona Phenomenex Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm. Na druhé testované koloně UHPLC Phenomenex Kinetex XB-C18, 100 x 3 mm, 2,6 µm docházelo k výraznému chvostování píků.

- Metoda UHPLC, mobilní fáze: acetonitril: 25 mM fosforečnanový pufr (55:45), průtok: 0,3 ml/min, nástřik: 5 µl, 45 °C (Metoda 2)

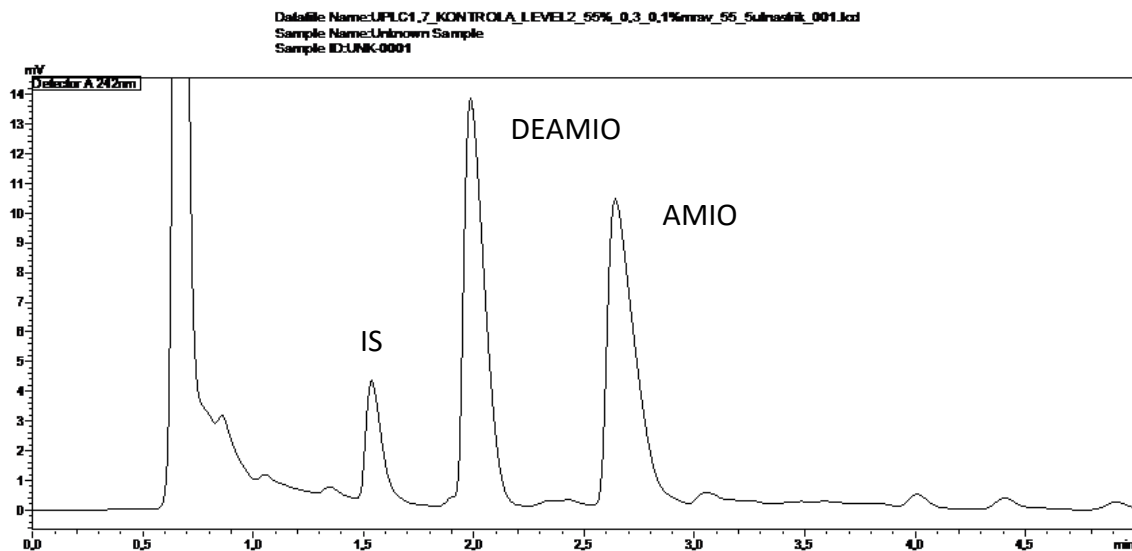


Obr. 16 Záznam analýzy amiodaronu, desethylamiodaronu a vnitřního standardu ze sérové kontroly level 2 metodou 2.

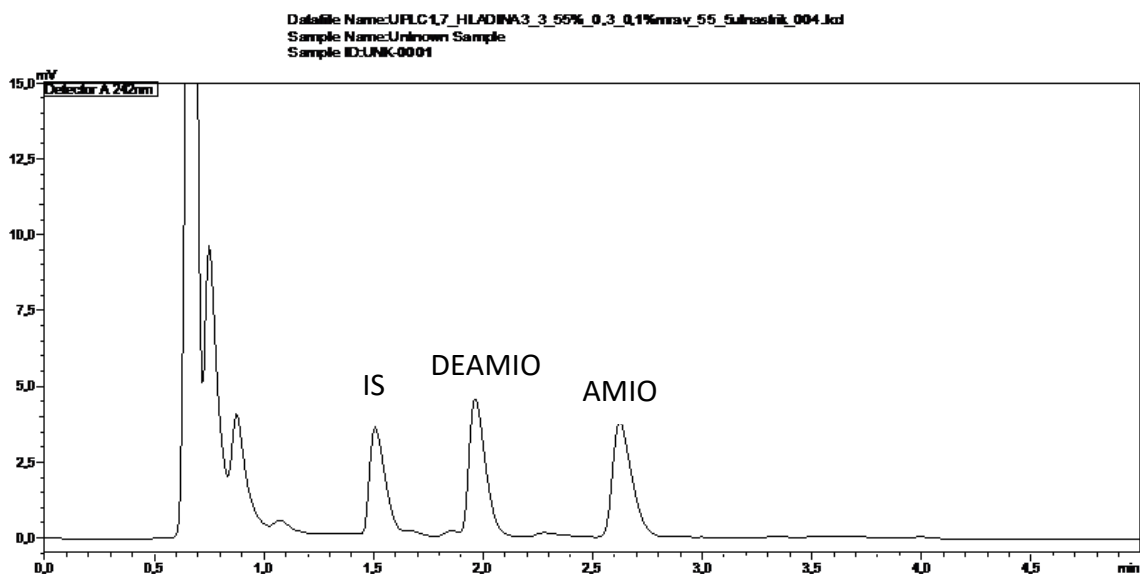


Obr. 17 Záznam analýzy amiodaronu, desethylamiodaronu a vnitřního standardu z králičí plazmy (koncentrace AMIO 2,52 µg/ml, DEAMIO 3,02 µg/ml) metodou 2.

- Metoda UHPLC, mobilní fáze: acetonitril: 0,1% kyselina mravenčí (55:45), průtok: 0,3 ml/min, nástřik: 5 μ l, 45 °C (Metoda 3)

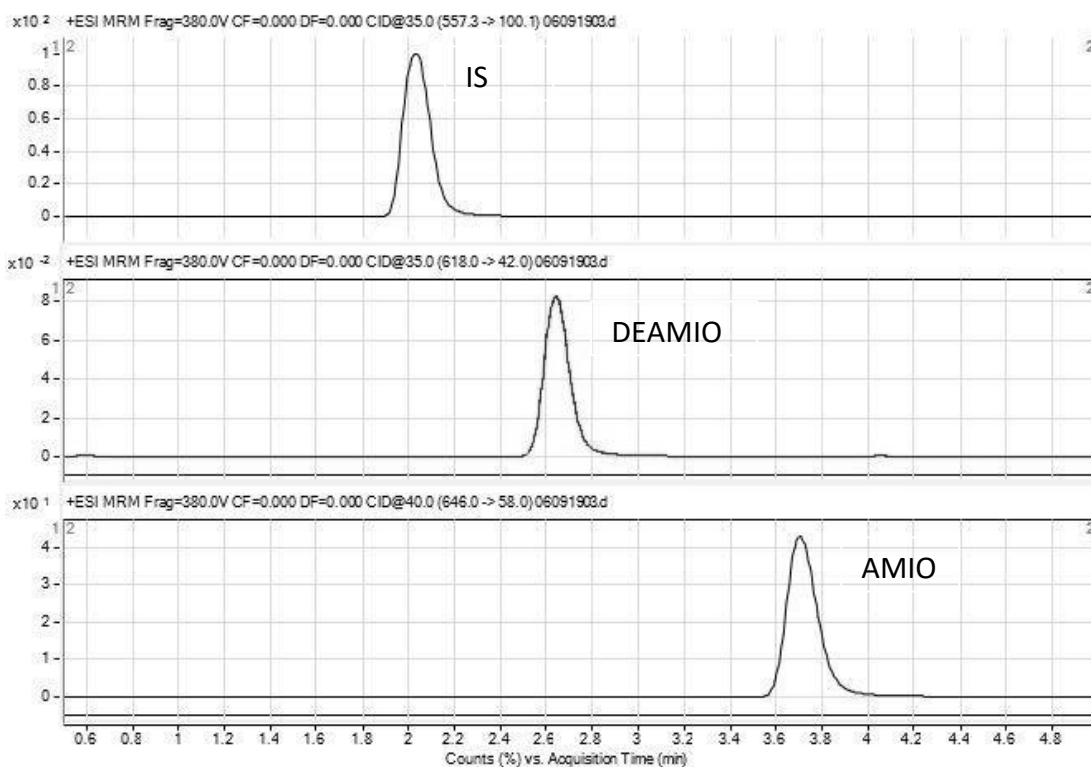


Obr. 18 Záznam analýzy amiodaronu, desethylamiodaronu a vnitřního standardu ze sérové kontroly level 2 metodou 3.



Obr. 19 Záznam analýzy amiodaronu, desethylamiodaronu a vnitřního standardu z králičí plazmy (koncentrace AMIO 2,25 μ g/ml, DEAMIO 2,16 μ g/ml) metodou 3.

Metoda byla ověřena PharmDr. Pavlou Pilařovou na pracovišti ve FN HK na Úseku farmakologie za použití UHPLC Agilent 1290 Infinity ve spojení s Agilent 6490 Triple Quadropole viz Obr. 20.



Obr. 20 Záznam analýzy amiodaronu, desethylamiodaronu a vnitřního standardu metodou UHPLC naměřenou ve FN HK PharmDr. Pavlou Pilařovou.

5.4. Validace metody

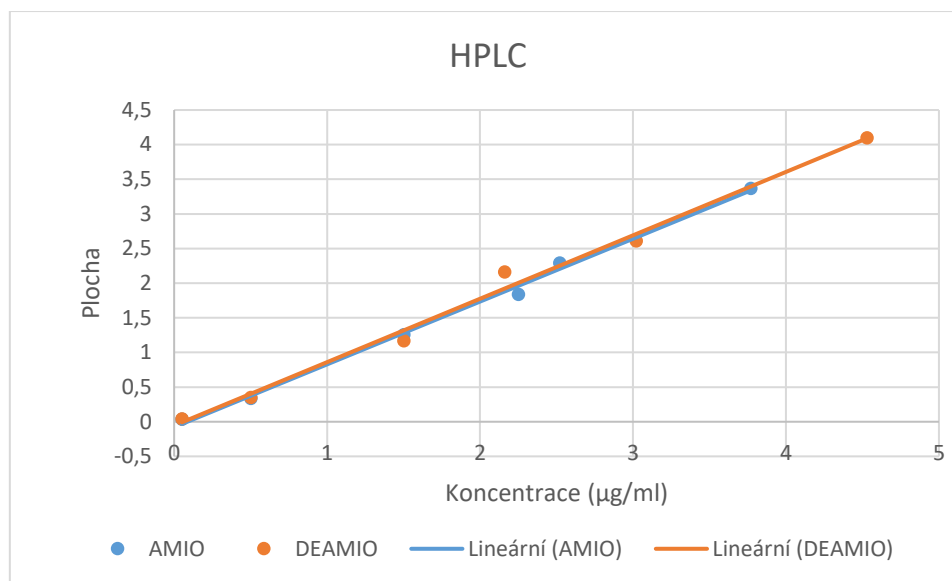
5.4.1. Linearita

Linearita byla prokázána koncentrační řadou – u amiodaronu 0,05 $\mu\text{g/ml}$ - 3,77 $\mu\text{g/ml}$ a u desethylamiodaronu 0,05 $\mu\text{g/ml}$ - 4,53 $\mu\text{g/ml}$. Tato koncentrační řada byla zvolena na základě terapeutického rozmezí dle SOP FN HK.

Metoda 1:

Koncentrace AMIO ($\mu\text{g/ml}$)	Poměr ploch AMIO/IS	Koncentrace DEAMIO ($\mu\text{g/ml}$)	Poměr ploch DEAMIO/IS
0,05	0,0384	0,05	0,0424
0,5	0,3345	0,5	0,3519
1,5	1,2577	1,5	1,1696
2,25	1,8394	2,16	2,1615
2,52	2,2905	3,02	2,6117
3,77	3,3694	4,53	4,0964
Rovnice (AMIO)	$y = 0,9065x - 0,0784$	Rovnice (DEAMIO)	$y = 0,9154x - 0,0553$
Korelační koeficient (AMIO)	$R = 0,9980$	Korelační koeficient (DEAMIO)	$R = 0,9959$

Tab. 4 Hodnoty kalibrační přímky pro amiodaron a desethylamiodaron naměřené metodou 1

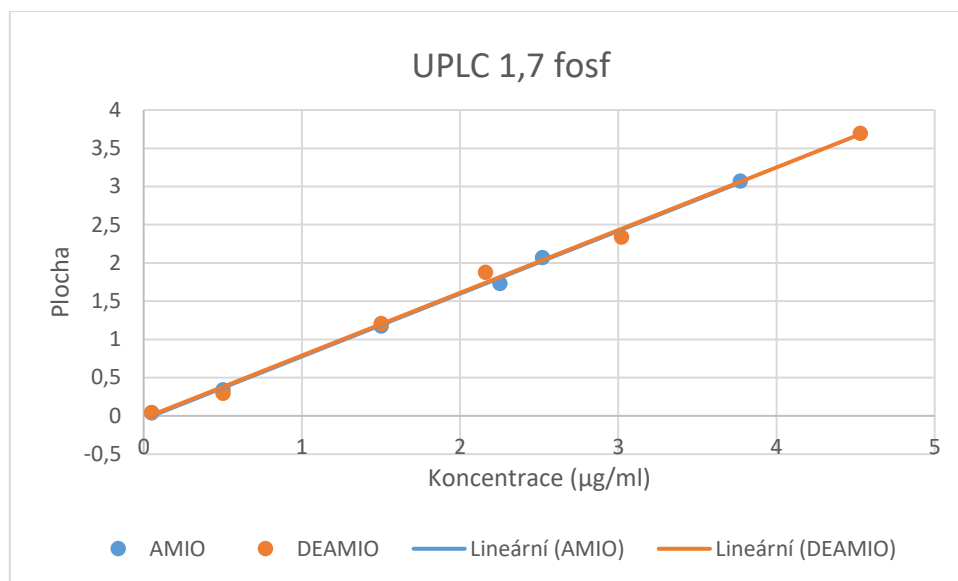


Obr. 21 Graf závislosti poměru ploch AMIO/IS a DEAMIO/IS na koncentraci AMIO a DEAMIO v plazmě naměřené metodou 1

Metoda 2:

Koncentrace AMIO (µg/ml)	Poměr ploch AMIO/IS	Koncentrace DEAMIO (µg/ml)	Poměr ploch DEAMIO/IS
0,05	0,0412	0,05	0,0448
0,5	0,3408	0,5	0,2934
1,5	1,1758	1,5	1,2061
2,25	1,7325	2,16	1,8791
2,52	2,0683	3,02	2,3391
3,77	3,0722	4,53	3,6956
Rovnice (AMIO)	$y = 0,8211x - 0,044$	Rovnice (DEAMIO)	$y = 0,8201x - 0,031$
Korelační koeficient (AMIO)	R = 0,9991	Korelační koeficient (DEAMIO)	R = 0,9979

Tab. 5 Hodnoty kalibrační přímky pro amiodaron a desethylamiodaron naměřené metodou 2

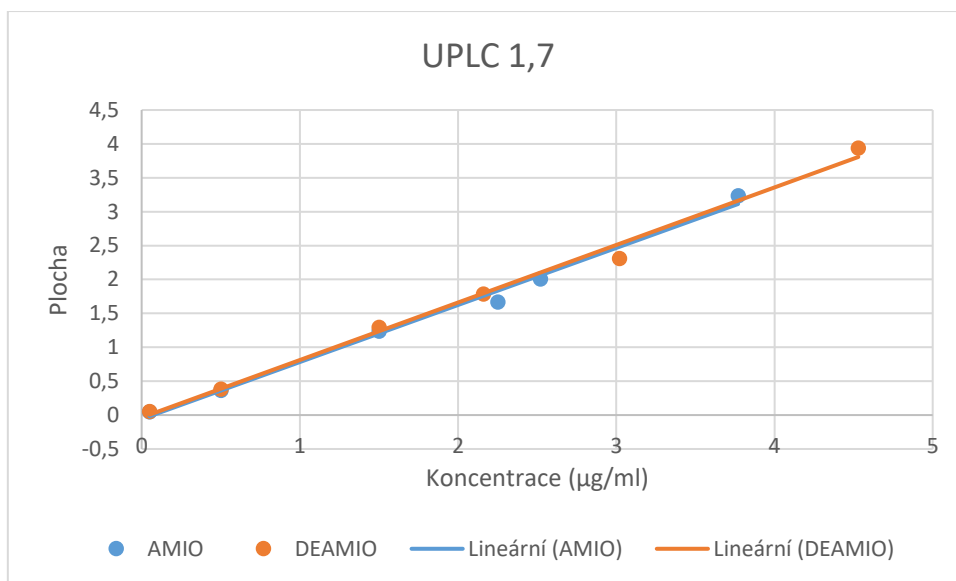


Obr. 22 Graf závislosti poměru ploch AMIO/IS a DEAMIO/IS na koncentraci AMIO a DEAMIO v plazmě naměřené metodou 2

Metoda 3:

Koncentrace AMIO (µg/ml)	Poměr ploch AMIO/IS	Koncentrace DEAMIO (µg/ml)	Poměr ploch DEAMIO/IS
0,05	0,0476	0,05	0,0518
0,5	0,3621	0,5	0,3821
1,5	1,2385	1,5	1,2937
2,25	1,6670	2,16	1,7862
2,52	2,0056	3,02	2,3074
3,77	3,2355	4,53	3,9392
Rovnice (AMIO)	$y = 0,8416x - 0,0593$	Rovnice (DEAMIO)	$y = 0,8485x - 0,0363$
Korelační koeficient (AMIO)	R = 0,9962	Korelační koeficient (DEAMIO)	R = 0,9964

Tab. 6 Hodnoty kalibrační přímky pro amiodaron a desethylamiodaron naměřené metodou 3



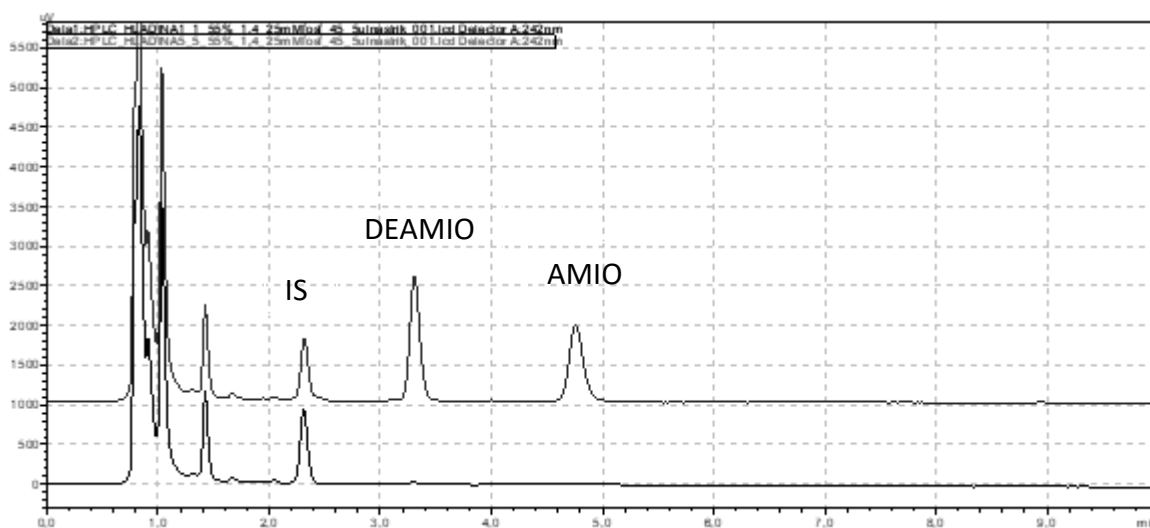
Obr. 23 Graf závislosti poměru ploch AMIO/IS a DEAMIO/IS na koncentraci AMIO a DEAMIO v plazmě naměřené metodou 3

5.4.2. Selektivita

Metoda 1:

Pro zjištění selektivity byl použit vzorek plasmy s analyty amiodaronem, desethylamiodaronem a IS dronedaronem, analýza HPLC, mobilní fáze: acetonitril : 25 mM fosforečnanový pufr (55:45), průtok 1,4 ml/min.

Metoda je selektivní, protože jsou píky analytů dostatečně odděleny a neinterferují s píky balastů plasmy.

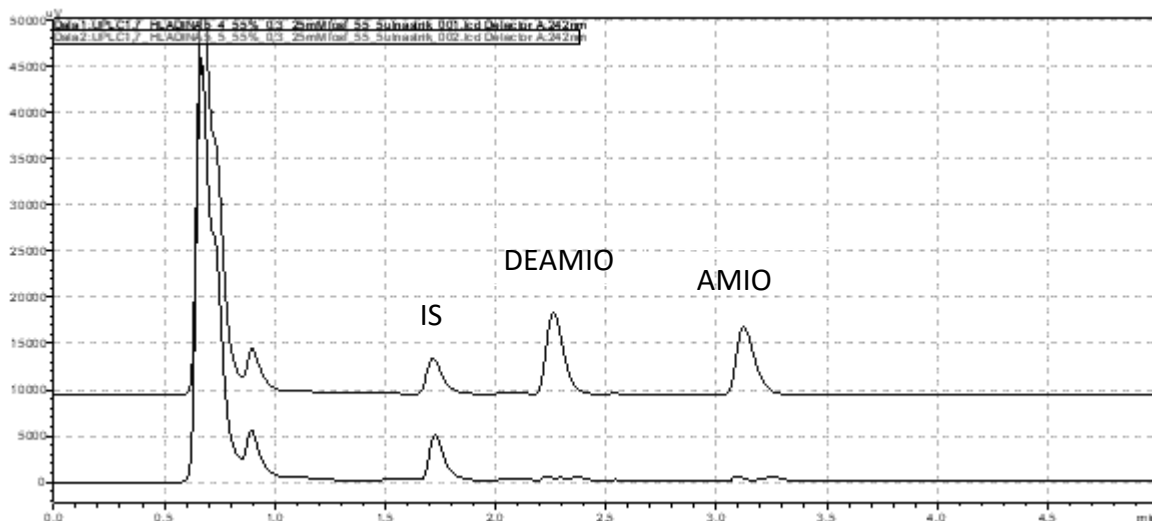


Obr. 24 Záznam analýzy plasmy s analyty amiodaronem, desethylamiodaronem a IS a analýzy prázdné plasmy s IS metodou 1.

Metoda 2:

Pro zjištění selektivity byl použit vzorek plasmy s analyty amiodaronem, desethylamiodaronem a IS dronedaronem, analýza UHPLC, mobilní fáze: acetonitril : 25mM fosforečnanový pufr (55:45), průtok 0,3 ml/min.

Metoda je selektivní, protože jsou píky analytů dostatečně odděleny a neinterferují s píky balastů plasmy.

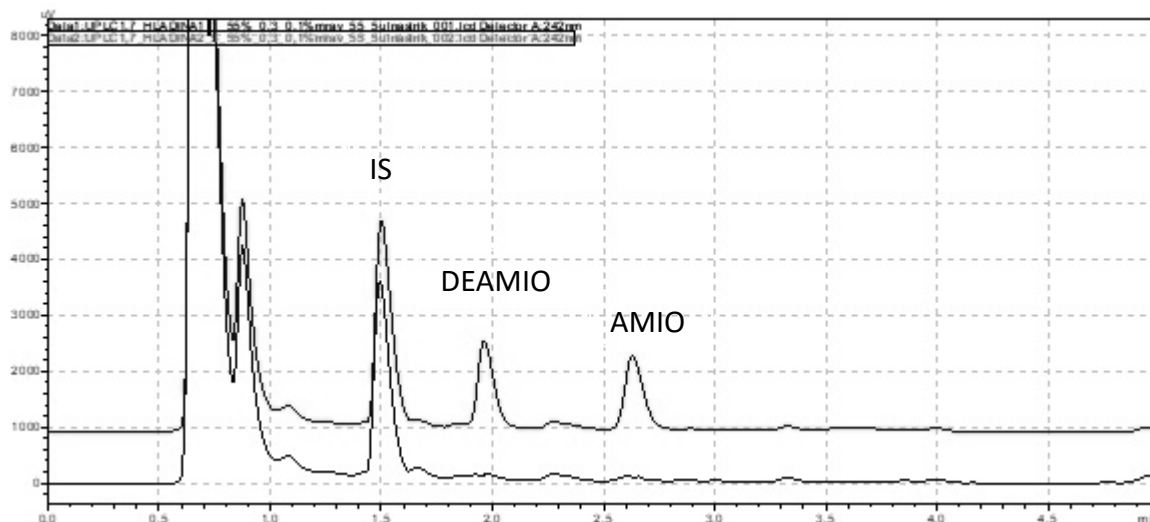


Obr. 25 Záznam analýzy plasmy s analyty amiodaronem, desethylamiodaronem a IS a analýzy prázdné plasmy s IS metodou 2.

Metoda 3:

Pro zjištění selektivity byl použit vzorek plasmy s analyty amiodaronem, desethylamiodaronem a IS dronedaronem, analýza UHPLC, mobilní fáze: acetonitril : 0,1% kyselina mravenčí (55:45), průtok 0,3 ml/min.

Metoda je selektivní, protože jsou píky analytů dostatečně odděleny a neinterferují s píky balastů plasmy.



Obr. 26 Záznam analýzy plasmy s analyty amiodaronem, desethylamiodaronem a IS a analýzy prázdné plasmy s IS metodou 3.

5.4.3. Stabilita

Stabilita analyzovaných vzorků, které byly získány z plasmy, byla sledována při teplotě 25 °C při jejich uložení v autosampleru. Po 24 hodinách téměř nedocházelo k žádným změnám koncentrace analytů – rozdíl nebyl větší než 1 %.

Dále byla sledována stabilita vzorku standardu, který byl uchováván v lednici při 2-8 °C. Vzorky byly analyzovány po 24 hod a po 14 dnech. V prvním případě nebyla odchylka ploch obou analytů větší než 0,5 % a ve druhém případě 1,0 %.

5.4.4. Limit detekce a kvantifikace

LOD a LOQ byly stanoveny pro amiodaron a desethylamiodaron – hodnoty jsou vyjádřené pomocí koncentrace stanovovaných látek v plazmě. Hodnoty byly vypočítány z koncentrace 0,05 µg/ml amiodaronu a desethylamiodaronu a experimentálně ověřeny.

Hodnoty LLOQ byly určeny z grafu závislosti RSD (%) na koncentraci látek v plazmě a poté experimentálně ověřeny. Pro každý analyt byly připraveny postupným ředěním příslušné koncentrace a nastříknuty šestkrát. Byla spočítána RSD, která byla v rozmezí 16,3 – 19,2 %, což vyhovuje požadavku méně než 20 %.

metoda	LOD			LOQ			LLOQ		
	1 HPLC	2 UHPLC fosf	3 UHPLC mrav	1 HPLC	2 UHPLC fosf	3 UHPLC mrav	1 HPLC	2 UHPLC fosf	3 UHPLC mrav
AMIO	0,029	0,023	0,022	0,093	0,081	0,074	0,088	0,079	0,061
DEAMIO	0,033	0,025	0,021	0,088	0,076	0,069	0,094	0,079	0,062

Tab. 7 Hodnoty LOD, LOQ a LLOQ.

5.4.5. Správnost

Správnost byla určena na třech koncentračních hladinách, v každé koncentraci bylo 6 vzorků (viz. Kapitola 4.2.9.2). Hodnota správnosti by měla být do 15 % od hodnoty skutečné. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách.

Metoda 1:

Amiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Průměr vypočítané koncentrace	Průměrná správnost (%)	Rozdíl od skutečné hodnoty (%)
0,5	0,3393	0,51	0,50	99,93	-0,069
	0,3329	0,50			
	0,3271	0,49			
	0,3423	0,51			
	0,3379	0,50			
	0,3221	0,49			
1,5	1,1850	1,47	1,49	99,36	-0,643
	1,2074	1,50			
	1,2109	1,50			
	1,2077	1,50			
	1,1789	1,47			
	1,2009	1,49			
2,52	1,9642	2,37	2,37	93,94	-6,060
	1,9676	2,37			
	1,9592	2,36			
	1,9652	2,37			
	1,9536	2,36			
	1,9745	2,38			

Tab. 8 Stanovení správnosti metodou 1 pro amiodaron.

Desethylamiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Průměr vypočítané koncentrace	Průměrná správnost (%)	Rozdíl od skutečné hodnoty (%)
0,5	0,3527	0,50	0,50	99,71	-0,293
	0,3392	0,49			
	0,3463	0,50			
	0,3452	0,49			
	0,3620	0,51			
	0,3448	0,49			
1,5	1,2725	1,60	1,61	107,49	7,429
	1,2811	1,61			
	1,2905	1,62			
	1,2825	1,61			
	1,2817	1,61			
	1,2850	1,62			
3,02	2,2200	2,73	2,74	90,67	-9,330
	2,2192	2,73			
	2,2154	2,73			
	2,2259	2,74			
	2,2544	2,77			
	2,2220	2,73			

Tab. 9 Stanovení správnosti metodou 1 pro desethylamiodaron.

Metoda 2:

Amiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Průměr vypočítané koncentrace	Průměrná správnost (%)	Rozdíl od skutečné hodnoty (%)
0,5	0,3483	0,52	0,52	103,03	3,033
	0,3460	0,51			
	0,3465	0,51			
	0,3448	0,51			
	0,3495	0,52			
	0,3477	0,52			
1,5	1,1655	1,45	1,40	93,61	-6,389
	1,1467	1,43			
	1,1530	1,44			

	1,1383	1,42			
	1,0983	1,38			
	1,0375	1,31			
2,52	1,9265	2,32	2,30	91,23	-8,768
	1,9265	2,32			
	1,8935	2,29			
	1,8884	2,28			
	1,8938	2,29			
	1,8982	2,29			

Tab. 10 Stanovení správnosti metodou 2 pro amiodaron.

Desethylamiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Průměr vypočítané koncentrace	Průměrná správnost (%)	Rozdíl od skutečné hodnoty (%)
0,5	0,3617	0,51	0,52	104,95	4,954
	0,3663	0,52			
	0,3715	0,53			
	0,3744	0,53			
	0,3747	0,53			
	0,3736	0,53			
1,5	1,1812	1,49	1,47	97,82	-2,176
	1,1691	1,48			
	1,1711	1,48			
	1,1573	1,46			
	1,1481	1,45			
	1,1370	1,44			
3,02	2,2260	2,74	2,80	92,77	-7,233
	2,2796	2,80			
	2,3285	2,86			
	2,3244	2,86			
	2,2539	2,77			
	2,2631	2,78			

Tab. 11 Stanovení správnosti metodou 2 pro desethylamiodaron.

Metoda 3:

Amiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Průměr vypočítané koncentrace	Průměrná správnost (%)	Rozdíl od skutečné hodnoty (%)
0,5	0,3654	0,54	0,53	106,62	6,615
	0,3619	0,53			
	0,3694	0,54			
	0,3615	0,53			
	0,3601	0,53			
	0,3583	0,53			
1,5	1,3041	1,61	1,60	106,35	6,347
	1,2799	1,58			
	1,3008	1,61			
	1,2841	1,59			
	1,2870	1,59			
	1,2842	1,59			
2,52	2,0206	2,43	2,44	96,97	-3,026
	2,1240	2,55			
	2,0145	2,43			
	2,0103	2,42			
	2,0100	2,42			
	2,0054	2,41			

Tab. 12 Stanovení správnosti metodou 3 pro amiodaron.

Desethylamiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Průměr vypočítané koncentrace	Průměrná správnost (%)	Rozdíl od skutečné hodnoty (%)
0,5	0,3882	0,55	0,54	108,18	8,179
	0,3818	0,54			
	0,3909	0,55			
	0,3804	0,54			
	0,3808	0,54			
	0,3812	0,54			
1,5	1,3221	1,66	1,65	109,81	9,812
	1,2989	1,63			
	1,3197	1,66			

	1,3074	1,64			
	1,3106	1,65			
	1,3096	1,65			
3,02	2,2276	2,74	2,77	91,68	-8,319
	2,3813	2,92			
	2,2562	2,77			
	2,2166	2,73			
	2,2166	2,73			
	2,2121	2,72			

Tab. 13 Stanovení správnosti metodou 3 pro desethylamidaron.

5.4.6. Přesnost

Přesnost byla určena na třech koncentračních hladinách, v každé koncentraci bylo 6 vzorků (viz. Kapitola 4.2.9.2). Hodnota přesnosti by měla být do 15 % od hodnoty skutečné. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách.

Metoda 1:

Amiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Správnost (%)	RSD (%)
0,5	0,3393	0,51	101,24	1,785
	0,3329	0,50	99,78	
	0,3271	0,49	98,44	
	0,3423	0,51	101,93	
	0,3379	0,50	100,91	
	0,3221	0,49	97,29	
1,5	1,1850	1,47	98,33	1,024
	1,2074	1,50	100,04	
	1,2109	1,50	100,31	
	1,2077	1,50	100,06	
	1,1789	1,47	97,86	
	1,2009	1,49	99,54	
2,52	1,9642	2,37	93,95	0,345
	1,9676	2,37	94,10	
	1,9592	2,36	93,72	
	1,9652	2,37	93,99	
	1,9536	2,36	93,47	

	1,9745	2,38	94,41	
--	--------	------	-------	--

Tab. 14 Stanovení přesnosti metodou 1 pro amiodaron.

Desethylamiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Správnost (%)	RSD (%)
0,5	0,3527	0,50	100,75	1,900
	0,3392	0,49	97,52	
	0,3463	0,50	99,21	
	0,3452	0,49	98,94	
	0,3620	0,51	102,95	
	0,3448	0,49	98,87	
1,5	1,2725	1,60	106,72	0,434
	1,2811	1,61	107,40	
	1,2905	1,62	108,15	
	1,2825	1,61	107,52	
	1,2817	1,61	107,45	
	1,2850	1,62	107,71	
3,02	2,2200	2,73	90,43	0,621
	2,2192	2,73	90,40	
	2,2154	2,73	90,24	
	2,2259	2,74	90,66	
	2,2544	2,77	91,79	
	2,2220	2,73	90,51	

Tab. 15 Stanovení přesnosti metodou 1 pro desethylamiodaron.

Metoda 2:

Amiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Správnost (%)	RSD (%)
0,5	0,3483	0,52	103,30	0,377
	0,3460	0,51	102,77	
	0,3465	0,51	102,88	
	0,3448	0,51	102,50	
	0,3495	0,52	103,57	
	0,3477	0,52	103,17	

1,5	1,1655	1,45	96,84	3,900
	1,1467	1,43	95,40	
	1,1530	1,44	95,89	
	1,1383	1,42	94,76	
	1,0983	1,38	91,71	
	1,0375	1,31	87,06	
2,52	1,9265	2,32	92,23	0,863
	1,9265	2,32	92,23	
	1,8935	2,29	90,74	
	1,8884	2,28	90,50	
	1,8938	2,29	90,75	
	1,8982	2,29	90,95	

Tab. 16 Stanovení přesnosti metodou 2 pro amiodaron.

Desethylamiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Správnost (%)	RSD (%)
0,5	0,3617	0,51	102,88	1,196
	0,3663	0,52	103,99	
	0,3715	0,53	105,23	
	0,3744	0,53	105,92	
	0,3747	0,53	105,98	
	0,3736	0,53	105,72	
1,5	1,1812	1,49	99,46	1,327
	1,1691	1,48	98,50	
	1,1711	1,48	98,66	
	1,1573	1,46	97,56	
	1,1481	1,45	96,83	
	1,1370	1,44	95,94	
3,02	2,2260	2,74	90,66	1,724
	2,2796	2,80	92,78	
	2,3285	2,86	94,71	
	2,3244	2,86	94,55	
	2,2539	2,77	91,76	
	2,2631	2,78	92,13	

Tab. 17 Stanovení přesnosti metodou 2 pro desethylamiodaron.

Metoda 3:

Amiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Správnost (%)	RSD (%)
0,5	0,3654	0,54	107,22	0,862
	0,3619	0,53	106,41	
	0,3694	0,54	108,14	
	0,3615	0,53	106,41	
	0,3601	0,53	106,01	
	0,3583	0,53	105,59	
1,5	1,3041	1,61	107,42	0,714
	1,2799	1,58	105,57	
	1,3008	1,61	107,17	
	1,2841	1,59	105,89	
	1,2870	1,59	106,12	
	1,2842	1,59	105,91	
2,52	2,0206	2,43	96,51	2,153
	2,1240	2,55	101,21	
	2,0145	2,43	96,23	
	2,0103	2,42	96,04	
	2,0100	2,42	96,03	
	2,0054	2,41	95,82	

Tab. 18 Stanovení přesnosti metodou 3 pro amiodaron.

Desethylamiodaron

Teoretická koncentrace (µg/ml)	Poměr plochy vzorku/IS	Vypočítaná koncentrace (µg/ml)	Správnost (%)	RSD (%)
0,5	0,3882	0,55	109,22	0,999
	0,3818	0,54	107,68	
	0,3909	0,55	109,86	
	0,3804	0,54	107,34	
	0,3808	0,54	107,44	
	0,3812	0,54	107,54	
1,5	1,3221	1,66	110,67	0,614
	1,2989	1,63	108,82	
	1,3197	1,66	110,47	

	1,3074	1,64	109,50	
	1,3106	1,65	109,75	
	1,3096	1,65	109,67	
3,02	2,2276	2,74	90,73	2,820
	2,3813	2,92	96,80	
	2,2562	2,77	91,86	
	2,2166	2,73	90,29	
	2,2166	2,73	90,30	
	2,2121	2,72	90,12	

Tab. 19 Stanovení přesnosti metodou 3 pro desethylamidaron.

5.4.7. Robustnost

Byla hodnocena míra vlivu různých experimentálních podmínek pro analýzu našich vzorků. Sledováno bylo ovlivnění analýzy změnou složení mobilní fáze – změna poměru složek mobilní fáze ($\pm 5\%$ ACN tj. 57 resp. 52 %), změna molarity fosforečnanového pufru ($\pm 5\%$ tj. 30 resp. 20 mM), změna koncentrace kyseliny mravenčí ($\pm 20\%$ tj. 0,12 resp. 0,08 %), změna teploty na koloně ($\pm 5\%$ tj. 47 resp. 43 °C).

Při měření těchto proměnných podmínek analýzy byla zjištěna pouze nevýrazná změna faktoru symetrie píků a retenčního času – metoda je tedy při mírné změně parametrů metody robustní.

5.5. Analýza reálných vzorků séra pacientů FN HK

Vzorky séra pacientů byly izolovány a analyzovány původní metodou ve FN HK dle SOP FN HK. Stejně vzorky byly analyzovány i pomocí našich metod. Námi naměřené hodnoty byly následně porovnány s hodnotami naměřenými ve FN HK.

U dobře kompenzovaných pacientů by měla být hladina amidaronu a desethylamidaronu podobná.

Byly testovány 4 vzorky pacientů metodou 1 a 2. Každý vzorek byl izolován dvakrát pro každou metodu a nastříknut dvakrát na kolonu. Průměrné hodnoty ploch, resp. poměrů ploch analytu a vnitřního standardu byly vyhodnoceny z rovnice kalibrační křivky a porovnány s výsledky z FN HK (viz Tab. 20, 21).

AMIO	FN HK		HPLC metoda 1		UHPLC metoda 2	
	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	odchylka (%)	$\mu\text{g/ml}$	odchylka (%)
Pacienti						
SH	0,76	0,46	0,42	-8,7	0,51	10,9
CM	1,33	0,86	0,91	5,8	0,83	-3,5
JJ	0,91	0,59	0,56	-5,1	0,52	-11,9
PJ	1,12	0,72	0,79	9,7	0,80	11,1

Tab. 20 Koncentrace amiodaronu vyhodnocené ve FN HK a jejich srovnání s vyhodnocením metodou 1 a 2.

DEAMIO	FN HK		HPLC metoda 1		UHPLC metoda 2	
	$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	odchylka (%)	$\mu\text{g/ml}$	odchylka (%)
Pacienti						
SH	0,81	0,50	0,56	12,0	0,46	-8,0
CM	1,62	1,00	0,94	-6,0	1,09	9,0
JJ	-	-	0,63	-	0,59	-
PJ	-	-	1,11	-	0,96	-

Tab. 21 Koncentrace desethylamiodaronu vyhodnocené ve FN HK a jejich srovnání s vyhodnocením metodou 1 a 2.

Byla spočítána procentuální odchylka od hodnoty naměřené ve FN HK, která se pohybuje $\pm 15\%$. Z čehož lze usuzovat, že lze tyto metody využít k hodnocení reálných vzorků. Vzniklé rozdíly mohou být způsobeny tím, že se jedná o starší vzorky z archivu, které byly zmrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ více než 3 měsíce a byly dvakrát zmrazeny a rozmrazeny, což může ovlivnit stabilitu léčiva v biologickém materiálu.

U metabolitu nejsou některé hodnoty v Tab. 21 uvedeny, protože při měření ve FN HK nebylo možné vzhledem k interferenci s jiným analytem desethylamiodaron vyhodnotit.

5.6. Praktická úloha pro studenty

Vypracované metody a izolační postup sloužily jako podklad pro vypracování úlohy pro studenty 4. ročníku Farmaceutické fakulty v předmětu Pokročilá farmaceutická analýza, která se provádí během letního semestru. Zadání úlohy je uvedeno jako Příloha č. 1 rigorózní práce.

6. Závěr

Teoretická část rigorózní práce je zaměřena na charakterizaci amiodaronu, jeho farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti. Dále je popsána chromatografie - základní popis přístroje, druhy detekce a chromatografických systémů. V kapitole jsou základní informace o UHPLC, o jeho rozlišení od HPLC a převod těchto metod. V další teoretické části je charakterizována analýza léčiv v biologickém materiálu, základní postupy a moderní trendy analýzy. Poslední kapitola se věnuje validaci analytických metod a popisuje validační parametry.

V praktické části jsou popsány obecné postupy přípravy vzorků a roztoků. Byly optimalizovány podmínky pro izolaci vzorku z plazmy – nejlepších výsledků bylo dosaženo po přidání 10% síranu zinečnatého a precipitací acetonitrilem:

- 100 μ l plazmy
- 4 μ l 10% síranu zinečnatého
- 2 μ l vnitřního standardu dronedaronu (0,5 μ g/ml)
- 198 μ l acetonitrilu
- třepání a centrifugace

Dále hodnocen vliv různých podmínek chromatografické analýzy na retenci amiodaronu a jeho metabolitu. Na základě zjištěných údajů byly navrženy tři metody. Nejdříve byla optimalizována HPLC metoda z FN HK (metoda 1) a byla převedena na rychlejší metodu UHPLC (metoda 2), která byla obměněna pro případné využití při měření na hmotnostním detektoru (metoda 3).

Metoda 1:

- Kolona: HPLC kolona Waters Symetry C18, 150 x 4,6 mm, 5 μ m
- Mobilní fáze: acetonitril : 25 mM fosforečnanový pufr (55:45)
- Teplota: 45 °C
- Průtok: 1,4 ml/min,
- Detekce: 242 nm
- Nastříkovaný objem: 5 μ l

Metoda 2:

- Kolona: UHPLC kolona Phenomenex Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 μ m
- Mobilní fáze: acetonitril : 25 mM fosforečnanový pufr (55:45)
- Teplota: 45 °C
- Průtok: 0,3 ml/min
- Detekce: 242 nm
- Nastříkovaný objem: 5 μ l

Metoda 3:

- Kolona: UHPLC kolona Phenomenex Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 μ m
- Mobilní fáze: acetonitril : 0,1% kyselina mravenčí (55:45)
- Teplota: 45 °C
- Průtok: 0,3 ml/min
- Detekce: 242 nm
- Nastříkovaný objem: 5 μ l

U všech metod byly vyhodnoceny validační parametry (linearita, selektivita, stabilita, limit detekce a kvantifikace, správnost, přesnost, robustnost) a těmto parametrům vyhovují. Metoda 3 byla validována s UV detekcí, takže ji lze využít pro měření s tímto druhem detekce. Pro hodnocení hmotnostní spektrometrií bylo jen potvrzeno, že lze pro tento typ detekce použít, validace by musela být provedena znovu na přístroji s tímto druhem detekce.

Navržené metody sloužily jako podklad pro přípravu praktické úlohy pro studenty 4. ročníku.

7. Seznam použitých zkratek

ACN – acetonitril

AMIO – amiodaron

BEH – ethylene bridged hybrid

DAD – detektor diodového pole

DEAMIO – desethylamiodaron (mono N-desethylamiodaron)

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

FN HK – Fakultní nemocnice v Hradci Králové

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IS – vnitřní standard

LLE – extrakce kapaliny kapalinou

LOD – detekční limit

LLOQ – spodní limit meze kvantifikace

LOQ – kvantitativní limit

MeOH – methanol

RSD – relativní směrodatná odchylka

SOP – standardní pracovní postup

SPE – extrakce na pevné fázi

UHPLC – ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ULOQ – horní limit meze kvantifikace

UV-VIS – ultrafialová – viditelná oblast světla

8. Zdroje

- (1) Dailymed [online]. [cit. 2019-02-05]. Dostupné z: <https://www.dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archivid=239180>
- (2) COUNCIL OF EUROPE. *European Pharmacopoeia*. 9th ed. Strasbourg: Council Of Europe, 2016. ISBN: 978-92-871-8127-5
- (3) *Antiarytmika* [online]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/w/Antiarytmika>
- (4) Výpis z databáze SPC přípravku Cordarone 200mg: tablety. Aktualizováno 23. 12. 2016
- (5) JIRAVSKÁ GODULA B., VÁVRA P., JIRAVSKÝ O. a BRANNY M. Nežádoucí účinky amiodaronu. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2004 (18), 171-174. [cit. 2019-01-09]. Dostupné z: https://www.klinickafarmakologie.cz/artkey/far-200403-0010_Nezadouci_ucinky_amiodaronu.php
- (6) HRČKOVÁ I., ŠARAPATKOVÁ H., LUKL J. Vedlejší účinky amiodaronu. *Interní medicína pro praxi*. 2005 (6), 288-290. [cit. 2019-01-10]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2005/06/03.pdf>
- (7) LÜLLMANN H., MOHR K., WEHLING M. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 1., české. Přeložil WENKE M., MÜHLBACHOVÁ E. Praha: Grada Publishing, 2002. ISBN 80-7169-976-4
- (8) *Lékové interakce antiarytmik: Edukafarm.cz*. [online]. [cit. 05.02.2019]. Dostupné z: <http://www.edukafarm.cz/c585-lekove-interakce-antiarytmik>
- (9) *Databáze léků* [online]. [cit. 2019-01-09]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>
- (10) SUSANTO F., HUMFELD S., REINAUER H. A *high-performance liquid chromatographic method for the measurement of amiodaronu and its main metabolite (desethylamiodaronu) in plasma samples from patients treated with Cordarex®*. *Chromatographia* [online]. 1986 (22), 135. [cit. 04.09.2017]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF02257314>
- (11) JUN A. S., BROCKS D. R. *High-performance liquid chromatographic assay of amiodaronu in rat plasma*. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science* [online]. 2001 (4), 263-268. [cit. 04.09.2017]. Dostupné z: [https://sites.ualberta.ca/~csps/JPPS4\(3\)/D.Brocks/hplc.htm](https://sites.ualberta.ca/~csps/JPPS4(3)/D.Brocks/hplc.htm)

- (12) KOLLROSER M., SCHOBER C. *Determination of amiodaronu and desethylamiodarone in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spektrometry with an ion trap detector*. Journal of Chromatography [online]. 2002 (766), 219-226. [cit. 04.09.2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11824809>
- (13) RODRIGUES M., ALVES G., FERREIRA A., QUEIROZ J., FALCAO A. *A rapid HPLC method for the simultaneous determination of amiodaronu and its major metabolite in rat plasma and tissues: A useful tool for pharmacokinetic studies*. Journal of Chromatographic Science [online]. 2013 (4), 361-370. [cit. 04.09.2017]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/chromsci/article/51/4/361/416056>
- (14) RODRIGUES M., ALVES G., ROCHA M., QUEIROZ J., FALCAO A. *First liquid chromatographic method for the simultaneous determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma using microextraction by packed sorbent (MEPS) as sample preparation procedure*. Journal of Chromatography [online]. 2013 (913-914), 90-97. [cit. 04.09.2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23286980>
- (15) JANDRESKI M. A., VANDERSLICE W.E. *Clinical measurement of serum amiodaronu and desethylamiodarone by using solid-phase extraction followed by HPLC with a high-carbon reversed-phase column*. Clinical Chemistry [online]. 1993 (39-3), 496-500 [cit. 04.09.2017]. Dostupné z: <http://clinchem.aaccnls.org/content/39/3/496.long>
- (16) JUENKE J. M., BROWN P. I., MCMILLIN G. A., URRY F. M. *A Rapid Procedure for the Monitoring of Amiodarone and N-Desethylamiodarone by HPLC-UV Detection*. Journal of Analytical Toxicology. 2004 (28/1), 63–66 [cit. 04.09.2017]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jat/28.1.63>
- (17) EL-BAGARY R.I., ELKADY E.F., MOWAKA S., ATTALLAH M. *Validated HPLC and Ultra-HPLC Methods for Determination of Dronedarone and Amiodarone Application for Counterfeit Drug Analysis*. Journal of AOAC International. 2015 (98/6), 1496-502 [cit. 04.09.2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26651561>

- (18) MAES A., BAERT K., CROUBELS S., DE CLERCQ D., VAN LOON G., DEPRez P., DE BACKER P. *Determination of amiodarone and desethylamiodarone in horse plasma and urine by high-performance liquid chromatography combined with UV detection and electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography. 2006 (836/1-2), 47-56 [cit. 04.09.2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16616880>
- (19) MOTYKA K., HLAVÁČ J. *Stručný přehled separačních metod*. 1. vydání. Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 978-80-244-2304-3
- (20) KLOUDA P. *Moderní analytické metody*. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 1996. ISBN 80-902155-0-5
- (21) NOVÁKOVÁ L., DOUŠA M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vydání, Hradec Králové, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3
- (22) CHURÁČEK J., JANDERA P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. 1. vydání SNTL, 1985. ISBN 04-607-85
- (23) CHURÁČEK J., JANDERA P. *Separace látek – Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. Vyd. druhé, nezměněné, SNTL Praha, 1986. ISBN 05-033-86
- (24) HPLC: High Performance Liquid Chromatography [online]. [cit. 04.01.2019] Dostupné z: <http://www.hplc.cz/uplc/index.htm>
- (25) TALEUZZAMAN M., ALI S., GILANI S. J., IMAM S. S., HAFEEZ A. *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review*. Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry – A Review. 2015 (2/6), 1-5 [cit. 04.01.2019]. Dostupné z: <http://austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/>
- (26) UHPLC – Chromatografie: Chromservis.eu. About us / Chromservis.eu [online]. [cit. 17.02.2019]. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/g/uhplc?lang=CZ>
- (27) TESFAYE H. *Terapeutické monitorování léčiv v současném pojetí*. Remedia 2014 (1), 52-57 [cit. 04.01.2019]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Klinicka-farmacie/Terapeuticke-monitorovani-leciv-v-soucasnem-pojeti/6-1xn-1Ce.magarticle.aspx>
- (28) Biochemická analýza krve – WikiSkripta. [online]. [cit. 07.02.2019] Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Biochemick%C3%A1_anal%C3%BDza_krve

- (29) Odběr krve – Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. [online]. [cit. 07.02.2019] Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/ps16/osetrovatelske_postupy/web/pages/03-02-krev.html#arterialni
- (30) Moč – Wikipedie. [online]. [cit. 07.02.2019] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Mo%C4%8D>
- (31) Vyšetření moči – WikiSkripta. [online]. [cit. 07.02.2019] Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Vy%C5%A1et%C5%99en%C3%AD_mo%C4%8Di
- (32) SOWJANYA D., RAMESH T., RAMESH M., VASANTH P. M. *A review on the process of single dose crossover comparative oral bioavailability studies in humans*. International Journal of Pharmacy Review and Research 2014 (4/3), 175-182 [cit. 03.01.2018]. Dostupné z: [http://www.ijpr.com/File_Folder/175-182\(ijpr\).pdf](http://www.ijpr.com/File_Folder/175-182(ijpr).pdf)
- (33) KLIMEŠ J. Analýza léčiv v buněčném materiálu. In: *Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze: Studijní materiály Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, předmět Kontrola chemických léčiv. 2015* Dostupné z: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijní-materialy/KFCHFA>
- (34) NOVÁKOVÁ L. Moderní trendy v přípravě vzorku k analýze s využitím instrumentálních technik. In: *Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze. 2014.* [cit. 07.02.2019] Dostupné z: https://www.pragolab.cz/files/udalosti/2014-10/01_LNovakova.pdf
- (35) Extrakční techniky. In: *University information system MENDELU* [online]. [cit. 07.02.2019] Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968
- (36) SARAFRAZ-YAZDI A., AMIRHASSAN AMIR. *Liquid-phase microextraction*. Trends in Analytical Chemistry. 2010 (29/1), 1-14 [cit. 10.02.2018]. Dostupné z: <https://profdoc.um.ac.ir/articles/a/1013566.pdf>
- (37) KASALOVÁ E. *Moderní separační techniky pro analýzu biologického materiálu v klinickém výzkumu*. Hradec Králové, 2017. Disertační práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze.

- (38) QUIGLEY A., CUMMINS W., CONNOLLY D. *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction in the Analysis of Milk and Dairy Products: A Review*. Journal of Chemistry. 2016. 1-12. [cit. 10.02.2018]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/309594301> Dispersive Liquid-Liquid Microextraction in the Analysis of Milk and Dairy Products A Review
- (39) LUCCI P., PACETTI D., NUNEZ O., FREGA N. G. *Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis*. In: IntechOpen. [online]. [cit. 18.02.2019]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/current-trends-in-sample-treatment-techniques-for-environmental-and-food-analysis>
- (40) GERSTEL Disposable Pipette Extraction - Research Institute for Chromatography. [online] [cit. 10.02.2018].. Dostupné z: http://www.richrom.com/en_GB/pages/show/id/56
- (41) Vzorkování metodou SPME (Solid phase microextraction). In: *University information system MENDELU* [online]. [cit. 10.02.2019] Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52969
- (42) SPME. Labicom. [online]. [cit. 10.02.2019] Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/priprava-vzorku-prislusenstvi/spme>
- (43) BICCHI C., LIBERTO E., CORDERO CH., SGORBINI B., RUBIOLO P. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and Headspace Sorptive Extraction (HSSE): An Overview. Labicom. 2009 (27/5) 376-390. [online]. [cit. 10.02.2019] Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/stir-bar-sorptive-extraction-sbse-and-headspace-sorptive-extraction-hsse-overview>
- (44) Validace v HPLC. High Performance Liquid Chromatography [online] [cit. 10.02.2018]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/validace/program_validace.htm
- (45) KLIMEŠ J. A KOL. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 1. vydání, vydavatel: RNDr. František Skopec, CSc. Nucleus HK, 2011. ISBN 978-80-87009-29-1

- (46) KLIMEŠ J. Validace metody. In: *Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze: Studijní materiály Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, předmět Kontrola chemických léčiv. 2015* Dostupné z: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijní-materialy/KFCHFA>
- (47) ZABELL A. P. R., LYTLE F.E., JULIAN R. K. *A proposal to improve calibration and outlier detection in high-throughput mass spectrometry.* *Clinical Mass Spectrometry* 2016 (2) 25-33 [cit. 06.03.2019]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2376999816300204>
- (48) Moeller proteomics course. Slide share. [online] [cit. 06.03.2019]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/BrettPhinney/moeller-proteomics-course>
- (49) HPLC.cz: Kalkulátor pro převod metody HPLC na UPLC. [online] [cit. 04.09.2019]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/UPLC/uplc_hplc_calculator.html
- (50) Phenomenex.com: Kinetex 2,6 μm Calculator [online] [cit. 04.09.2019]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/tools/kinetexcalculator>

9. Přílohy

Příloha č. 1: Pracovní postup pro vypracování úlohy pro studenty 4. ročníku Farmaceutické fakulty v předmětu Pokročilá farmaceutická analýza

Převod metody HPLC na UHPLC - analýza amiodaronu a jeho metabolitu

- HPLC analýza standardu a vzorků biologického materiálu (případná optimalizace)
- výpočet podmínek pro UHPLC (on-line kalkulátory)
- UHPLC analýza standardu a vzorku biologického materiálu dle vypočtených parametrů
- optimalizace UHPLC parametrů pro analýzu biologického materiálu
- porovnání vybraných parametrů HPLC a UHPLC metody

Podmínky měření pro HPLC analýzu

Kolona	Symmetry C18 150 × 4,6 mm; 5 μm (Waters)
Mobilní fáze	Fosfátový pufr 25 mol/l, pH 3,1 / Acetonitril (poměr 45:55)
Průtok	1,4 ml/min
Teplota na koloně	45 °C
Nástřik	5 μl
UV detekce	242 nm

Podmínky měření pro UHPLC analýzu

Kolona	Kinetex C18 100 × 2,1 mm; 1,7 μm (Phenomenex)
Mobilní fáze	Fosfátový pufr 25 mM pH 3,1 / Acetonitril (poměr 45:55)
Průtok	na základě výpočtu
Teplota na koloně	45 °C
Nástřik	na základě výpočtu
UV detekce (DAD)	242 nm

Reagencie

- **Fosfátový pufr:**
3,2 g KH₂PO₄ a 195 μl 85% H₃PO₄ bylo rozpuštěno v 1000 ml vody v odměrné baňce, roztok byl zfiltrován (0,45 μm) a odvzdušněn v ultrazvukové lázni (30 min).
Před použitím pufru jako mobilní fáze proveďte kontrolu pH (pH ≈ 3,1). Pokud je hodnota pH vyšší, je nutné provést korekci přidávkem H₃PO₄ vždy po 20 μl do pH ≈ 3,1.
- **Zásobní roztok amiodaronu (1 mg/ml) v methanolu**
- **Zásobní roztok desethylamiodaronu (1 mg/ml) rozp. v methanolu**
- **Precipitační činidlo – acetonitril s přidávkem vnitřního standardu (I.S.; dronedaron)**
100 μl zásobního roztoku dronedaronu (0,5 mg/ml) naředěno do 20 ml acetonitrilu
- **10% roztok síranu zinečnatého**
- **Lyofilizovaný standard (hladina 2) obsahující amiodaron a jeho metabolit desethylamiodaron**

Proved'te rekonstituci séra. K lyofilizovanému séru v originální lahvičce přidejte pipetou 3,0 ml destilované vody. Lyofilizát nechte za občasného promíchání rozpouštět v temnu za laboratorní teploty, dokud nevznikne homogenní roztok.

Lyofilizovaný standard obsahuje **4,94 $\mu\text{mol/l}$ amiodaronu** a **5,4 $\mu\text{mol/l}$ desethylamiodaronu**.

Přepočítejte koncentraci z $\mu\text{mol/l}$ na $\mu\text{g/ml}$ pomocí molekulární hmotnosti uvedené v tab 1., výsledek použijte pro přípravu standardu pro analýzu.

Tab. 1

	Molární hmotnost (g/mol)	Terapeutické rozmezí v $\mu\text{mol/l}$
Amiodaron	645,31	0,80 – 3,90
Desethylamiodaron	617,27	0,80 – 4,90

Pracovní postup

Příprava standardu před HPLC/UHPLC analýzou

1. Do mikrozkušavky postupně pipetujte 500 μl vody, **x μl** zásobního roztoku amiodaronu a **x μl** zásobního roztoku desethylamiodaronu. Po každém přidavku je nutné směs mírně zamíchat na vortexu!
2. K směsi přidejte 20 μl 10% roztoku síranu zinečnatého, mírně zamíchejte na vortexu a následně přidejte 1000 μl precipitačního činidla s vnitřním standardem (dronedaron). Je nutné pracovat rychle a přesně. Vzorky nesmí dlouho stát (hrozí sorpce na precipitát, odpařování).
3. Zkušavku ihned uzavřete a nechte intenzivně třepat 5 min na vortexu.
4. Centrifugujte 15 minut při 15 °C a 10 000 ot/min, supernatant zfiltrujte (0,22 μm).
5. 150 μl čirého supernatantu pipetujte do insertu vloženého do vialky a ihned vialku uzavřete.

Příprava vzorku před HPLC/UHPLC analýzou

1. Do mikrozkušavky pipetujte 500 μl rekonstituovaného séra (hladina 2).
2. Do vzorku pak přidejte 20 μl 10% roztoku síranu zinečnatého, směs mírně zamíchejte na vortexu a přidejte 1000 μl precipitačního činidla s vnitřním standardem (dronedaron). Je nutné pracovat rychle a přesně. Vzorky nesmí dlouho stát (hrozí sorpce na precipitát, odpařování).
3. Zkušavku ihned uzavřete a nechte intenzivně třepat 5 minut na vortexu.
4. Centrifugujte 15 minut při 15 °C a 10 000 ot/min, supernatant zfiltrujte (0,22 μm).
5. 150 μl čirého supernatantu pipetujte do insertu vloženého do vialky a ihned vialku uzavřete.

Chromatografická analýza

1. Analýza standardu amiodaronu a desethylamiodaronu a vzorku séra na HPLC
2. Výpočet parametrů metody pro analýzu na UHPLC pomocí on-line kalkulátorů
 - http://www.hplc.cz/UPLC/uplc_hplc_calculator.html
 - <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/method-transfer-calculator.html>
3. Analýza standardu a vzorku séra na UHPLC s vypočtenými parametry metody pomocí kalkulátoru. Porovnejte plochu píku standardu a vzorku.
4. Optimalizace podmínek metody na UHPLC dle výsledků analýzy
5. Nástřik vzorku séra za optimalizovaných UHPLC podmínek
6. Porovnání délky analýzy, retenčních časů, symetrie píku, počtu teoretických pater, rozlišení a šířky píků – HPLC vs. UHPLC. Experimentální hodnoty doplňte do tab. 2.

Tab. 2 Porovnání experimentálních hodnot optimalizované analýzy vzorku séra

	HPLC			UHPLC		
	AMIO	DEAMIO	I.S.	AMIO	DEAMIO	I.S.
Velikost částic (μm)						
Tlak (bar)						
Průtok (ml/min)						
Nástřik (μl)						
Délka analýzy (min)						
Retenční čas (min)						
Symetrie píku						
Počet teoretických pater						
Rozlišení						
Šířka píku (min)						

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Mgr. Iva Kopecká

Školitel: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Název diplomové práce: Chromatografické hodnocení amiodaronu a jeho aktivního metabolitu

Cílem této rigorózní práce byla optimalizace stávající HPLC metody používané ve FN HK pro stanovení amiodaronu a jeho aktivního metabolitu v biologickém materiálu. Nalezená metoda HPLC probíhala na koloně Waters Symetry C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm, mobilní fáze: acetonitril : 25mM fosforečnanový pufr v poměru 55:45, průtok 1,4 ml/min při teplotě 45°C, nástřik 5 µl, UV detekce při 242 nm. Tato metoda byla následně převedena na UHPLC – kolona Phenomenex Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm, mobilní fáze: acetonitril : 25mM fosforečnanový pufr v poměru 55:45, průtok 0,3 ml/min při teplotě 45°C, nástřik 5 µl, UV detekce při 242 nm. Pro případnou detekci hmotnostním detektorem byla tato UHPLC metoda upravena - na stejné UHPLC koloně, mobilní fází byl acetonitril : 0,1% kyselina mravenčí v poměru 55:45, průtok 0,3 ml/min při teplotě 45°C, nástřik 5 µl, UV detekce při 242 nm.

Zároveň byla optimalizována i izolace vzorku z plazmy, resp. séra. Nejlepší výtěžnosti bylo dosaženo po přidání 4 µl 10% síranu zinečnatého ke vzorku plazmy a následné precipitaci přidáním 200 µl acetonitrilu s vnitřním standardem dronedaronem, následovalo protřepání a centrifugace.

Nalezené metody vyhovují validačním parametrům (linearita, selektivita, stabilita, limit detekce a kvantifikace, správnost, přesnost, robustnost). Metody byly aplikovány na reálné vzorky pacientů a porovnány s hodnotami naměřenými ve FN HK.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Mgr. Iva Kopecká

Tutor: PharmDr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Name of Degree Paper: Chromatographic evaluation of amiodaronu and its active metabolite

The main purpose of this thesis was to optimize the existing HPLC method used in University Hospital Hradec Králové for determination of amiodarone and its active metabolite in biological material. For this HPLC method was used Waters Symetry C18 column, 150 x 4,6 mm, 5 μ m, mobile phase: acetonitrile: 25 mM phosphate buffer (55:45), flow rate 1,4 ml/min, at 45 ° C, injection 5 μ l, UV detection at 242 nm. This method was subsequently transferred to a UHPLC using Phenomenex Kinetex C18 column, 100 x 2,1 mm, 1,7 μ m, mobile phase: acetonitrile: 25 mM phosphate buffer (55:45), flow rate 0,3 ml/min, at 45 ° C, injection 5 μ l, UV detection at 242 nm. This UHPLC method was modified for eventual detection by mass detector using same UHPLC column, mobile phase: acetonitrile: 0,1% formic acid (55:45), flow rate 0,3 ml/min, at 45 ° C, injection 5 μ l, UV detection at 242 nm.

At the same time plasma, resp. serum sample isolation was optimized. The best result was achieved by adding 4 μ l of 10% zinc sulfate to the plasma sample followed by precipitation by adding 200 μ l of acetonitrile with internal standard dronedarone, followed by shaking and centrifugation.

The found methods meet validation parameters (linearity, selectivity, stability, limit of detection and quantitation, accuracy, precision, robustness). The methods were applied to real sample of patients and compared with the values measured in the University Hospital.