

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: PharmDr. Jana Maláková

Školitel: Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.

Název dizertační práce: Kvantitativní analýza léčiv v biologických materiálech separačními metodami

Dizertační práce uvádí instrumentální analytické metody určené k analýze léčiv a jejich metabolitů v biologických vzorcích za využití kapalinové a plynové chromatografie.

Ve fázi optimalizace analytických podmínek byly testovány různé postupy přípravy vzorků. Od běžné precipitace bílkovin acetonitrem (tento přístup byl aplikován např. při kvantitativní analýze cefuroximu), přes extrakci kapalina-kapalina (osvědčil se u metody analýzy topiramátu, 8-methoxypsoralenu) a konečně extrakty vhodné k separaci byly získány i extrakcí na pevné fázi s využitím sorbentů ve smíšeném módu (na principu reverzní fáze v kombinaci s iontovou výměnou) při analýze galantaminu a jeho metabolitů. Ultrafiltrace vzorků plazmy na na filtrech Microcon YM 10 umožnila oddělení volného a vázaného podílu léčiva a určení vazebnosti (u metody na stanovení cefuroximu).

Vlastní chromatografické podmínky tj. volba plynové nebo kapalinové chromatografie, závisela na fyzikálně chemických vlastnostech stanovovaného léčiva. A pokud tyto vlastnosti nebyly pro daný systém vhodné, bylo možno derivatizací, např. methylací v případě topiramátu, molekulu léčiva modifikovat k zajištění tepelné stability během GC.

V případě metod využívajících kapalinovou chromatografii byly optimální separační podmínky studovány na širokém spektru kolon nejčastěji na bázi silikagelu s navázanými různými funkčními skupinami, které určovaly jejich selektivitu a polaritu. Pro analýzu cefuroximu se tak osvědčila kolona Ascentis (Supelco) s amidovými skupinami vhodná pro analýzu polárních látek. Separace galantaminu a jeho metabolitů epigalantaminu, *O*-desmethylgalantaminu a *N*-desmethylgalantaminu byla z hlediska rozlišení a tvaru píků nejlepší na koloně Discovery HS F5 obsahující pentafluorofenylpropylovou skupinu navázanou na silikagel. Zvláště pozoruhodné bylo na uvedené separaci rozlišení galantaminu a jeho stereoizomeru epigalantaminu za podmínek reverzní fáze. Samostatnou kapitolou bylo pak testování chirální separace (*R*)-warfarinu a (*S*)-warfarinu. Polárně-organický mód a chirální kolony na bázi cyklodextrinu byly nahrazeny principem reverzní fáze a kolonou s vysoce čistým sférickým silikagelem s navázaným amfoterním glykopeptidem vankomycinem.

Detekce analytů při HPLC zahrnovala použití UV detektoru s diodovým polem a tam, kde k tomu byly předpoklady z hlediska struktury dané přítomností fluoroforní skupiny, se uplatnil citlivější a selektivnější fluorescenční detektor (např. při analýze galantaminu a metabolitů nebo u enantiomerů warfarinu). Galantamin a jeho metabolity byly v extraktech

z jaterní tkáně potkanů identifikovány pomocí ESI hmotnostních spekter na hmotnostním detektoru typu iontové pasti.

Převedení metody z HPLC na kapilární plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí znamenalo v případě kvantitativní analýzy 8-methoxy-psoralenu (8-MOP) podstatné zlepšení analytických parametrů především citlivosti a selektivity. Kapilární kolona na bázi 95 % dimethyl- a 5 % difenyl polysilarenu byla použita k separaci 8-MOP nebo methylovaného topiramátu na GC/MS analyzátoru. Změna detekce z alkalického dusíkového ionizačního detektoru na hmotnostní detektor typu kvadrupólu při kvantitativní analýze antiepileptika topiramátu o řád zvýšila citlivost metody GC.

Po fázi optimalizace analytických podmínek byly experimentálně ověřeny validační parametry kvantitativních metod. Metody splňovaly požadované limity na citlivost, parametry preciznosti, přesnosti a selektivity a byly proto aplikovány při měření vzorků získaných z experimentálních studií nebo zavedeny do rutinní praxe při analýze vzorků v rámci terapeutického monitorování u pacientů.

HPLC metoda s fluorescenční detekcí pro stanovení galantaminu byla například použita ve studii, zabývající se absorpcí cholinesterázového inhibitoru galantaminu a jejím ovlivněním L-karnitinem na modelu perfúze střeva *in situ* u potkana.

HPLC metoda s UV detekcí využívající diodové pole umožnila měření koncentrací volného a vázaného podílu v plazmě u profylakticky podávaného antibiotika cefuroximu a koncentrací cefuroximu v dialyzátech z intersticiální mikrodialýzy svalu v průběhu operace srdce. Farmakokinetika cefuroximu včetně plazmatické vazebnosti byla ovlivněna fyziologickými změnami při kardiopulmonálním bypasu. Koncentrace cefuroximu v plazmě a dialyzátech (resp. ve svaly) byly vyšší než minimální inhibiční koncentrace potenciálních patogenů. Lze usuzovat, že testované dávkové schéma cefuroximu poskytovalo účinné antibakteriální hladiny v periferní tkáni při operačním zákroku na srdci při kardiopulmonálním bypasu.

Chirální separace (*R*)-warfarinu a (*S*)-warfarinu na stacionární fázi s navázaným glykopeptidem vankomycinem a fluorescenční detekce se uplatnily při potvrzení stejnoměrné akumulace obou izomerů v buňkách hepatomu linie HepG2.

Metodou kapilární plynové chromatografie s hmotnostní detekcí bylo stanoveno antiepileptikum topiramát ve vzorcích od pacientů s epilepsií a léčivo 8-methoxy-psoralen při hledání optimální dávky při imunomodulační technice fotoferezy u pacientů po transplantaci kostní dřeně.